

CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO

SCINAX (ANURA: HYLIDAE)

Autor: Luísa de Paula Reis

Orientador: Prof. Dra. Marta Svartman

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Christiano de Anchietta Garcia

MESTRADO

BELO HORIZONTE, 2016

CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO

SCINAX (ANURA: HYLIDAE)

Autor: Luísa de Paula Reis

Orientador: Prof. Dra. Marta Svartman

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Christiano de Anchietta Garcia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zoologia, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Zoologia.

BELO HORIZONTE, 2016

FICHA CATALOGRÁFICA

BANCA EXAMINADORA

Dra. Marta Svartman
Universidade Federal de Minas Gerais
Orientador

Dr. Paulo Christiano de Anchieta Garcia
Universidade Federal de Minas Gerais
Coorientador

Dra. Luciana Nascimento
Pontifícia Universidade Católica
Titular

Dr. Fernando Perini
Universidade Federal de Minas Gerais
Titular

Dr. Adalberto J. Santos
Universidade Federal de Minas Gerais
Suplente

***“Um cavalheiro deveria conhecer um pouco de zoologia,
chame isso de cultura ou o que queira, assim como ele
deve conhecer algo sobre pintura e música e sobre as
plantas em seu jardim”.***

Adaptado de Martin Wells, Lower Animals, 1968

AGRADECIMENTOS

Agradeço os professores Dra. Marta Svartman e Dr. Paulo Garcia pela orientação.

Agradeço a todos os meus colegas do laboratório de citogenômica evolutiva da UFMG, em especial: Naiara Araújo, Matias, Mirela, Guilherme e a Nayara Netto.

O professor Dr. Roscoe Stanyon, por sugerir testes com preparações *in vitro*.

Agradeço meus colegas e amigos do laboratório de Herpetologia da UFMG, em especial ao Johnny, Henrique, Hans, Estevão e Carol.

Agradeço a pós-graduação em Zoologia, tanto os professores quanto os alunos, em especial a Paula Zama.

Agradeço o laboratório de Citogenética de Anfíbios sob orientação da professora Luciana Lourenço, pela hospitalidade e ensino das técnicas de citogenética em anfíbios.

Agradeço a banca, pelas correções e sugestões que serão muito bem vindas.

A minha família e amigos pelo o apoio! Principalmente minha irmã Mariana.

A Capes, pela bolsa concedida.

RESUMO

O gênero *Scinax* (Anura, Hylidae) é constituído por 113 espécies distribuídas do leste e sul do México até a Argentina e o Uruguai; Trinidad e Tobago e Santa Lucia. O gênero pode ser dividido em dois grandes clados: clado de *S. ruber*, composto pelos grupos de *S. rostratus*, *S. uruguayus* e espécies não alocadas em nenhum grupo e o clado de *S. catharinae*, composto pelos grupos de *S. catharinae* e *S. perpusillus*, o qual não teve seu monofiletismo testado. Para contribuir no reconhecimento das relações filogenéticas, tanto fornecendo novos caracteres para análise, quanto através do estudo da evolução dos caracteres cromossômicos, utilizamos a citogenética. As análises citogenéticas permitem a caracterização cariotípica, o que tem revelado grande variabilidade em Anura. Este presente trabalho foi dividido em dois capítulos. No primeiro, caracterizamos citogeneticamente sete espécies do grupo de *S. perpusillus*, incluindo a marcação das regiões organizadoras de nucléolos (NORs), que podem apresentar variações inter e intraespecíficas, servindo assim como marcadores citotaxonômicos. No segundo capítulo, foi apresentado o protocolo que desenvolvemos para cultura de fibroblastos em anfíbios anuros, que possibilita a obtenção de preparações cromossômicas que apresentam quantidade e qualidade de metáfases superiores às obtidas por preparações diretas. Foi descrito o cariótipo da espécie de perereca *Scinax* cf. *machadoi*, realizada a partir de cultura de células.

ABSTRACT

The genus *Scinax* (Anura, Hylidae) consists of 113 species distributed from eastern to southern Mexico to Argentina and Uruguay; Trinidad and Tobago and St. Lucia. A phylogenetic analysis of the genus led to its into two major clades: *S. ruber*, composed of the *S. rostratus* and *S. uruguayus* groups and species not allocated to any group and the *S. catharinae* clade, composed of the *S. catharinae* and *S. perpusillus* groups. The monophyletism of the *S. perpusillus* group was not tested. In order to contribute to the recognition of phylogenetic relationships, by providing new characters for analysis, and to the study of chromosome characters evolution, we used the cytogenetic approach. Cytogenetic analyses allow the characterization of chromosome features, have shown great variability in Anura. This work is divided into two chapters. In the first, we describe cytogenetically seven species of *S. perpusillus* group, including the analysis of the nucleolus organizer regions (NORs) that present inter and intraspecific variation, functioning as a cytotaxonomic marker. In the second chapter, we describe the protocol that we developed for fibroblast culture in anurans, which allows the obtention of better chromosome preparations than direct preparations. We describe the karyotype os *Scinax* cf. *machadoi*, obtained from cultured cells.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

- Figura 1** *Scinax belloni*, espécie do grupo de *Scinax perpusillus* (Comprimento rostro- cloacal CRC= 22mm). Foto: João Victor A. Lacerda..... 9
- Figura 1** Localidades de coleta dos espécimes do grupo de *Scinax perpusillus* analisados. Mapa gerado através do programa Qgis.....13
- Figura 3** Cariótipos das espécies do grupo de *Scinax perpusillus* analisadas: **a** *Scinax* sp. 6 (cf. *arduous*); **b** *Scinax belloni*; **c** *Scinax* sp. 4 (cf. *cosenzai*); **d** *Scinax insperatus*; **e** *Scinax littoreus*; **f** *Scinax* sp. 5 (gr. *perpusillus*); **g** *Scinax* sp. 3 (gr. *perpusillus*) Barra= 10µM.18
- Figura 4** Células de seis espécies do grupo de *Scinax perpusillus* após marcação das regiões organizadoras de nucléolos com nitrato de prata (AgNOR - seta vermelha): **a** *Scinax* sp. 6 (cf. *arduous*); **b** *Scinax belloni*; **c** *Scinax* sp. 4 (cf. *cosenzai*); **d** *Scinax insperatus*; **e** *Scinax* sp. 5 (gr. *perpusillus*); **f** *Scinax* sp. 3 (gr. *perpusillus*).....19
- Figura 5** Núcleos de *Scinax littoreus* após marcação com nitrato de prata (AgNOR).....20

Capítulo II

- Figura 1** Cultivo primário de fibroblastos a partir de membros posteriores de imagos de *Scinax* cf. *machadoi* após cinco dias. Barra = 10µM.38
- Figura 2 (A)** Metáfase e **(B)** cariótipo (2n=24, NF=48) de *Scinax* cf. *machadoi*. Barra = 10µM.39
- Figura 3 (A)** Metáfase de *Scinax* cf. *machadoi* após bandeamento CBG. **(B)** Coloração com DAPI, coincidente com a marcação obtida após bandeamento CBG. Barra = 10µM.....42
- Figura 4** Metáfase de *Scinax* cf. *machadoi* após marcação das regiões organizadoras de nucléolo pela prata. As setas indicam marcações no par 6.....43

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1 Dados de espécies de <i>Scinax</i> analisadas citogeneticamente.....	47
Tabela 2 Exemplares de espécies de <i>Scinax</i> que foram analisados.....	12
Tabela 3 Análises morfométricas de cromossomos das espécies de <i>Scinax</i> analisadas, incluindo CR (comprimento relativo), MC (morfologia cromossômica), m (metacêntrico), sm (submetacêntrico) e st (subtelocêntrico).....	17

Capítulo II

Tabela 1 Exemplares de <i>Scinax</i> analisados.....	35
Tabela 2 Diferentes condições testadas para cultura primária de fibroblastos de <i>Scinax</i> cf. <i>machadoi</i>	36
Tabela 3 Análises morfométricas de cromossomos da espécie <i>Scinax</i> cf. <i>machadoi</i>	41

SUMÁRIO

Resumo	V
Abstract.....	VI
Lista de figuras	VII
Lista de tabelas	IX
Introdução geral	1
Referências bibliográficas	4
Capítulo I	
Resumo	6
Abstract	8
Introdução.....	9
Objetivos.....	11
Material e Métodos	11
Resultados.....	15
Discussão	21
Referências bibliográficas.....	26
Capítulo II	
Resumo	30
Abstract	31
Introdução.....	32
Objetivos.....	34

Material e Métodos	34
Resultados e discussão	39
Referências bibliográficas.....	43
Considerações finais	46
Anexo I	48
Anexo II	55

INTRODUÇÃO

Os Amphibia modernos, ou Lissamphibia, são representados atualmente por três ordens: Gymnophiona (cobras-cegas), Caudata (salamandras) e Anura (sapos, rãs e pererecas) (Vitt e Caldwell, 2009). Atualmente, são conhecidas 7384 espécies de anfíbios no mundo, das quais 6488 pertencem à ordem Anura, composta por 54 famílias. Possuem ampla distribuição, sendo encontradas em todos os continentes, exceto na Antártica e em algumas ilhas oceânicas (Frost 2015).

A família Hylidae é a maior dentre os anuros e é composta por espécies arborícolas, que usualmente possuem cabeça e olhos grandes, geralmente com cintura delgada e patas longas. Além disso, possuem discos digitais aumentados e recebem a denominação de 'perereca'. O grupo é dividido em três subfamílias: Pelodyadinae, Phyllomedusinae e Hylinae. A subfamília Hylinae é composta por quatro tribos: Cophomantini, Dendropsophini, Hylini e Lophiohylini. A tribo Dendropsophini atualmente agrupa seis gêneros, dentre os quais o gênero *Scinax* (Frost, 2015).

Scinax compreende 113 espécies neotropicais (Frost, 2015) e possui distribuição geográfica bastante ampla do leste e sul do México até a Argentina e o Uruguai; Trinidad e Tobago e Santa Lucia. Em 2002, Faivovich realizou uma análise filogenética utilizando 38 espécies, no qual a partir da análise dos resultados, foi sugerida a divisão de *Scinax* em dois clados principais: clado *S. ruber*, composto pelos grupos de *S. rostratus*, *S. uruguayus* e ainda espécies não alocadas em nenhum grupo; e o clado de *S. catharinae* composto pelos grupos de *S. catharinae* e *S. perpusillus*. O grupo de *Scinax perpusillus* não teve seu monofilestismo testado.

Estudos citogenéticos podem contribuir para o reconhecimento de relações filogenéticas, fornecendo novos caracteres para análise (Cardozo *et al.* 2011). Os primeiros estudos citogenéticos com anuros se iniciaram as décadas de 60 e 70. Primeiramente, os trabalhos baseavam-se na descrição dos kariótipos das espécies, identificando o número e a morfologia dos cromossomos através de coloração convencional (Bogart, 1973). Estes trabalhos representaram uma contribuição significativa para indicar relações filogenéticas e até mesmo a ocorrência de processos de especiação (Faraut, 2008).

A partir da década de 70, foram desenvolvidas técnicas de bandeamento cromossômico, dentre elas, a marcação das regiões organizadoras de nucléolos pelo nitrato de prata (AgNOR), que pode revelar variações intra e interespecíficas, servindo como marcadores citotaxonômicos. A evidenciação da heterocromatina constitutiva pelo bandeamento CBG pode apresentar padrões extremamente variáveis, o que permite em muitos casos observar polimorfismos e diferenciar espécies muito próximas. Além disso, métodos como a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com diferentes tipos de sequências de DNA, como as teloméricas e de rDNA, permitem observar diferenças entre indivíduos, populações e espécies. Em Anura, análises citogenéticas utilizando tais técnicas têm evidenciado variações em vários níveis taxonômicos e permitido deduzir a ocorrência de rearranjos cromossômicos (Medeiros *et al.* 2003).

Trabalhos em andamento que descrevem dados de ecologia, morfologia de adultos e larvas, bioacústica e biologia molecular (comunicação pessoal João Victor A. Lacerda – Departamento de Zoologia, UFMG) juntamente com trabalho de descrição de cariótipos como o presente estudo, são importantes para a determinação de novas espécies e para entender a evolução cariotípica no grupo.

Neste contexto, foi proposta, em uma primeira etapa dessa dissertação, a descrição citogenética de sete espécies do grupo de *Scinax perpusillus*, incluindo a localização das regiões organizadoras de nucléolos (NORs). As espécies foram comparadas entre si e com as já descritas na literatura (Capítulo I).

Tendo em vista a dificuldade encontrada em obter resultados citogenéticos satisfatórios para o grupo de estudo, desenvolvemos um protocolo para estabelecer culturas de células in vitro, técnica que possui muitas vantagens e é raramente usada em anfíbios anuros. Foi realizada então a análise cariotípica de *Scinax* cf. *machadoi*, do grupo *S. catharinae*, a partir da cultura de fibroblastos (Capítulo II).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bogart, J. P. 1973. Evolution of anuran karyotypes, p. 337–349. In: Evolutionary Biology of the Anurans. J. L. Vial (ed.). University of Missouri Press, Columbia, Missouri.
- Cardozo, D. E. Leme, D.M. Bortoleto, J.F. Catroli, G.F. Baldo, D. Faivovich, J. Kolenc, F. Silva, A.P.Z. Borteiro, C. Haddad, C.F.B. Kasahara, S. 2011. Karyotypic Data on 28 Species of *Scinax* (Amphibia: Anura: Hylidae) Diversity and Informative Variation. *Copeia*, 2: 251–263.
- Faivovich, J. 2002. A cladistic analysis of *Scinax* (Anura: Hylidae). *Cladistics*, 18: 367–393.
- Faraut, T. 2008. Addressing chromosome evolution in the whole-genome sequence era. *Chromosome Research*, 16: 5–16.
- Frost, Darrel R. 2015. Amphibia Species of the World: an Online Reference. Version 5.0 (Date of access). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- Medeiros, L.R. Rossa-Feres, D.C. Recco-Pimentel, S.M. 2003. Chromosomal differentiation of *Hyla nana* and *Hyla sanborni* (Anura, Hylidae) with a description of polymorphism in *H. nana*. *Journal of Heredity*, 94: 2: 149–154.
- Vitt, L.J. Caldwell, J.P. 2009. Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles. 3ª edição. Academic Press, 697pp.

CAPÍTULO I

CITOGENÉTICA DE SETE ESPÉCIES DO GRUPO DE SCINAX

***PERPUSILLUS* (ANURA: HYLIDAE)**

Luísa de Paula Reis^{1,2}, Paulo C. A. Garcia², Marta Svartman¹

¹Laboratório de Citogenômica Evolutiva, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

²Laboratório de Herpetologia, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

RESUMO

Scinax é um gênero neotropical composto por 113 espécies e dividido em dois grandes clados: *S. catharinae* e *S. ruber*. O clado *S. catharinae* é composto pelos grupos de *S. catharinae* e *S. perpusillus*, cujo monofiletismo ainda não foi testado, já que apenas uma espécie foi analisada em estudos filogenéticos recentes. Uma vez que a citogenética pode contribuir com o reconhecimento de relações filogenéticas, o objetivo deste trabalho foi descrever o cariótipo das espécies *Scinax* sp. 3 (gr. *perpusillus*), *Scinax* sp. 4 (cf. *cosenzai*), *Scinax* sp. 5 (gr. *perpusillus*), *Scinax* sp. 6 (cf. *arduous*), *S. littoreus*, *S. belloni* e *S. insperatus*, levantando dados que possam ajudar a entender melhor a evolução cariotípica do gênero. Foram realizadas preparações diretas a partir do epitélio intestinal dos indivíduos das sete espécies estudadas e marcação de regiões organizadoras de nucléolo com nitrato de prata (AgNOR) nas metáfases obtidas. Todas as espécies apresentaram número diplóide $2n=24$ e número fundamental $NF=48$. As espécies estudadas apresentaram fórmulas cariotípicas variadas, que foram comparadas entre si e com as de outras espécies de *Scinax* estudadas descritas citogeneticamente na literatura. *Scinax belloni* apresentou o par 1 metacêntrico, corroborando Peixoto *et al.* (2015). As espécies *Scinax* sp. 4 (cf. *cosenzai*), *S. insperatus*, *Scinax* sp. 5 (gr. *perpusillus*) e *Scinax* sp. 3 (gr. *perpusillus*) apresentaram o par 1 maior que o par 2, sendo associado às alterações na morfologia cromossômica. As marcações AgNOR foram detectadas no braço curto do par 6 nas seis espécies em que este padrão foi analisado, coincidindo com dados já descritos para o clado *Scinax*

catharinae. Estudos complementares que estão sendo realizados para o grupo de *S. perpusillus*, permitirão uma melhor compreensão das relações filogenéticas entre as espécies.

Palavras-chave: Amphibia, espécies bromelígenas, AgNOR.

ABSTRACT

Scinax is a neotropical genus comprising 113 species and divided into two major clades: *S. catharinae* and *S. ruber*. The *S. catharinae* clade is composed by the *S. catharinae* and *S. perpusillus* groups, whose monophyly has not been tested because only one species was included in recent phylogenetic studies. Since cytogenetics can contribute to the recognition of phylogenetic relationships, the aim of this study was to describe the karyotypes of *Scinax* sp. 3 (gr. *perpusillus*), *Scinax* sp. 4 (cf. *cosenzai*), *Scinax* sp. 5 (gr. *perpusillus*), *Scinax* sp. 6 (cf. *arduous*), *S. littoreus*, *S. belloni* and *S. insperatus* species, revealing data that can help to better understand the karyotype evolution of the genus. Chromosome preparations were obtained from the intestinal epithelium of specimens from seven studied species and staining of the nucleolar organizing regions with silver nitrate (AgNOR) was performed in the metaphases obtained. All species showed a diploid number of $2n=24$ and fundamental number $NF=48$. The species showed variable karyotype formulas and, were compared to each other and with *Scinax* species cytogenetically studied reported in the literature. *S. belloni* presented a metacentric pair 1, corroborating Peixoto *et al.* (2015) findings. In *Scinax* sp. 4 (cf. *cosenzai*), *S. insperatus*, *Scinax* sp. 5 (gr. *perpusillus*) and *Scinax* sp. 3 (gr. *perpusillus*) pair 1 was larger than pair 2, which was associated with changes in chromosome morphology. The AgNOR markings were detected in the short arms of pair 6 in the six species in which this pattern was analyzed, coinciding with data already described for the *S. catharinae* clade. Additional studies in the *S. perpusillus* group, which will allow us a better understanding of the phylogenetic relationships among these species.

Keywords: Amphibia, bromeligenous species, AgNOR.

INTRODUÇÃO

Peixoto (1987) foi o primeiro a propor o grupo de *Scinax perpusillus*, caracterizado por espécies de pererecas pequenas e bromelígenas, com ausência de membrana interdigital entre os três primeiros artelhos. As espécies deste grupo estão distribuídas ao longo de áreas de baixada e de altitude no domínio Mata Atlântica, desde o estado de Santa Catarina até o Espírito Santo. Atualmente, é composto por 13 espécies: *Scinax alcatraz* Lutz, 1973; *S. arduous* Peixoto, 2002; *S. atratus* (Peixoto, 1989); *S. belloni* Faivovich, Gasparini & Haddad, 2010 (Figura 1); *S. faivovichii* Brasileiro, Oyama & Haddad, 2007; *S. insperatus* Silva e Alves-Silva, 2011; *S. littoreus* Peixoto, 1988; *S. melloi* (Peixoto, 1989); *S. peixotoi* Brasileiro, Haddad, Sawaya & Martins, 2007; *S. perpusillus* Lutz e Lutz, 1939; *S. tupinamba* Silva & Alves-Silva, 2008; *S. v-signatus* Lutz, 1968; e *S. cosenzai* Lacerda, Peixoto & Feio, 2012.



Figura 2 *Scinax belloni*, espécie do grupo de *Scinax perpusillus* (Comprimento rostro- cloacal CRC= 22mm). Foto: João Victor A. Lacerda.

Apesar de diversos estudos filogenéticos envolvendo o gênero *Scinax*, as relações entre seus grupos e suas espécies ainda não estão resolvidas. Muitas espécies não são alocadas em nenhum dos grupos existentes e, além disso, o monofiletismo do grupo de *S. perpusillus* ainda não foi testado adequadamente, pois apenas uma espécie foi incluída nas filogenias recentes (Faivovich, 2002; Faivovich *et al.* 2005, Pyron & Wiens, 2011).

Em relação ao cariótipo, Bogart (1973) foi o primeiro a apresentar estudos citogenéticos envolvendo espécies do gênero, com a descrição do cariótipo de *Hyla perpusilla* (= *Scinax perpusillus*), *Hyla rubra* (= *Scinax ruber*), *Hyla catharinae* (= *Scinax catharinae*), *Hyla brienti* (= *Scinax brienti*) e *Hyla rostrata* (= *Scinax rostratus*), que apresentaram número diplóide $2n=24$ e número fundamental $NF=48$. Até o momento, já foram descritos os cariótipos de 43 das 113 espécies de *Scinax* (Tabela 1, Anexo I). Todas apresentaram $2n=24$, $NF=48$ e ausência de cromossomos sexuais reconhecíveis. No entanto, foram observadas diferenças interespecíficas na morfologia de alguns pares cromossômicos (Cardozo *et al.* 2011). As AgNORs aparecem frequentemente numa constrição secundária, característica comum em anuros, e sua presença no par 6 é uma sinapomorfia do clado de *S. catharinae* (Cardozo *et al.* 2011). As espécies do gênero também têm um padrão semelhante de bandeamento CBG, o que é comum em Hylidae (Kasahara *et al.* 2003; Busin *et al.* 2006; Gruber *et al.* 2012; Nogueira *et al.* 2015; Peixoto *et al.* 2015).

OBJETIVOS

Caracterizar citogeneticamente espécies do grupo de *Scinax perpusillus*.

- I. Determinar e comparar os cariótipos das espécies amostradas;
- II. Observar a ocorrência de variações cariotípicas intra- e interespecíficas envolvendo as AgNORs, o bandeamento CBG e a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) nas espécies estudadas;
- III. Comparar os dados obtidos com os já publicados para espécies de *Scinax*;

MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRA

A amostra consistiu de exemplares de sete espécies do grupo de *S. perpusillus*: *Scinax* sp. 3 (gr. *perpusillus*), *Scinax* sp. 4 (cf. *cosenzai*), *Scinax* sp. 5 (gr. *perpusillus*), *Scinax* sp. 6 (cf. *arduous*), *Scinax littoreus*, *Scinax belloni* e *Scinax insperatus*. As espécies analisadas foram coletadas e identificadas por João Victor A. Lacerda (Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Minas Gerais), seguindo a classificação nominal a partir da espécie *Scinax* sp. analisada citogeneticamente por Peixoto *et al.* 2015 e *Scinax* sp 1. e *Scinax* sp. 2 analisadas por Cardozo *et al.* (2011).

Os espécimes foram coletados nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Santa Catarina durante o período de outubro de 2015 a março de 2016 (licença do IBAMA/ICMBio 46628-1). Todos os exemplares serão depositados na Coleção Herpetológica da Universidade Federal de Minas Gerais (Tabela 2, Figura 2).

Tabela 2 Exemplares de *Scinax* analisados e suas respectivas localidades.

Número de exemplares			
Espécie	Macho	Fêmea	Procedência (coordenadas)
<i>Scinax</i> sp. 4 (cf. <i>cosenzai</i>)	3 (LPR 28, LPR 30, LPR 31)	-	Açucena, MG (18°58'3,53''S, 42°33'37,14''W)
<i>Scinax</i> sp. 5 (gr. <i>perpusillus</i>)	3 (JVAL 251, JVAL 252, JVAL 254)	2(JVAL 253 – JVAL 255)	São Bento do Sul, SC (26°19'25.86"S, 49°18'27.11"W)
<i>Scinax</i> <i>littoreus</i>	5 (JVAL 418- JVAL 422)	-	Niterói, RJ (22°58'27.23"S, 43°1'48.44"W)*
<i>Scinax</i> sp. 6 (cf. <i>arduous</i>)	4 (JVAL 346 - JVAL 349)	-	Afonso Cláudio, ES (20° 4'29.67"S, 41° 1'44.25"W)
<i>Scinax</i> <i>belloni</i>	4 (JVAL 356 - JVAL 364)	-	Castelo, ES (20°30'28.63"S, 41° 5'11.32"W)
<i>Scinax</i> sp.3 (gr. <i>perpusillus</i>)	10 (JVAL 370-JVAL 385; JVAL 395)	-	Mimoso do Sul, ES (21° 2'18.30"S, 41°19'17.50"W)
<i>Scinax</i> <i>insperatus</i>	2 (JVAL 466, JVAL 464)	-	Miguel Pereira, RJ (22°30'39.59"S, 43°25'36.62"W)

* Coordenada aproximada. Coletado nas proximidades do Parque Estadual Serra da Tiririca.

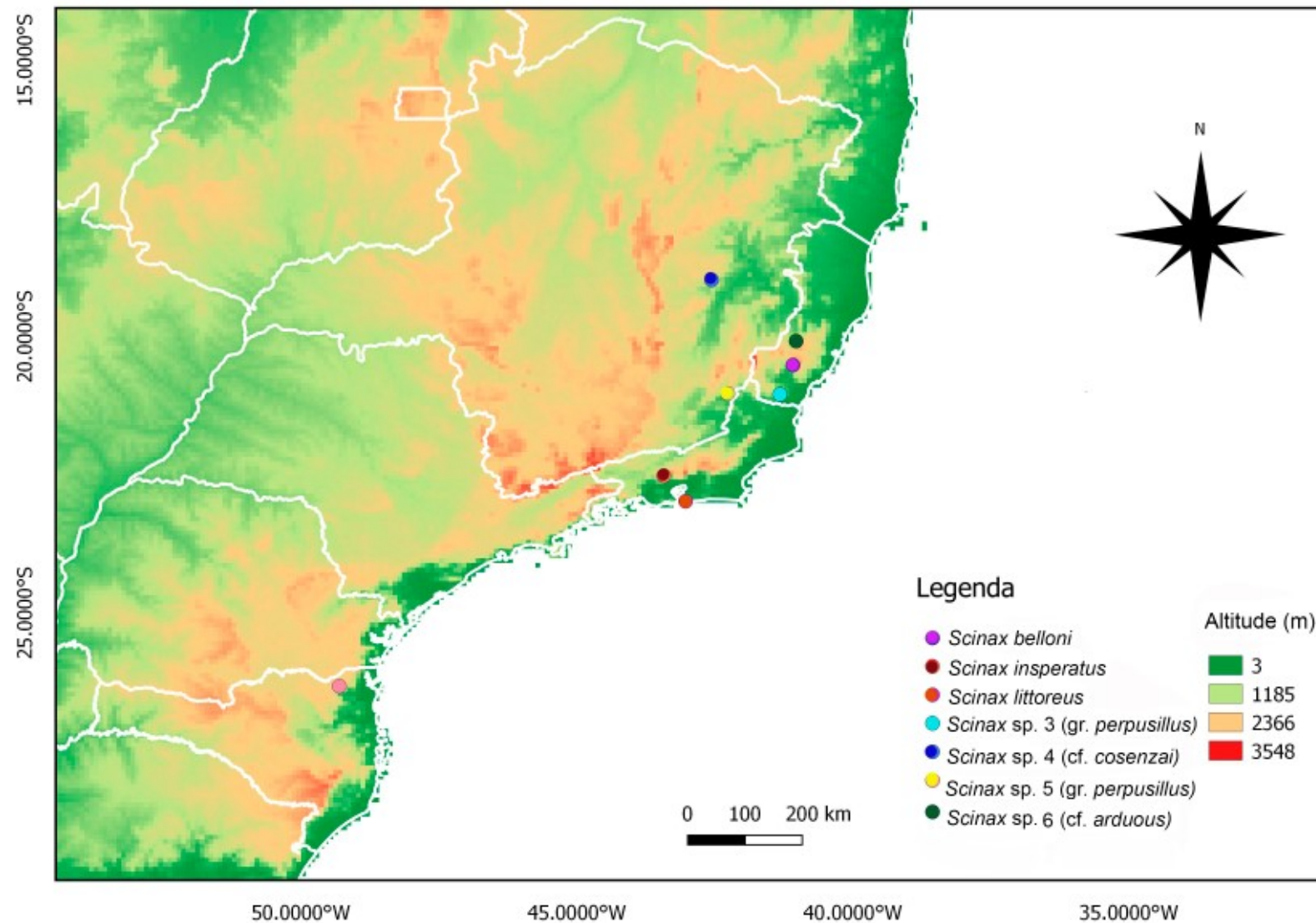


Figura 3 Localidades de coleta dos espécimes do grupo de *Scinax perpusillus* analisados. Mapa gerado através do programa Qgis.

MÉTODOS

Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células do epitélio intestinal, conforme a técnica descrita por Schmid (1978) e a marcação das regiões organizadoras de nucléolos pelo nitrato de prata foi feita segundo Howell e Black (1980). Tentamos obter o padrão de bandeamento CBG segundo o protocolo de Sumner (1972) para evidenciar a heterocromatina constitutiva. Também aplicamos a técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH), usando como sonda a sequência de DNA telomérico (Anexo II). A análise e captura de imagens foi feita sob um microscópio Olympus B071, e os cariótipos foram montados utilizando os softwares Adobe Photoshop v.2 e ImageJ. Os cromossomos foram classificados segundo Green e Sessions (1991) em metacêntricos, submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos e alinhados em ordem decrescente de tamanho.

Recentemente, foi publicado o artigo intitulado "Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae)" por Duellman, Marion & Hedges (2016). Optou-se por não usar a nomenclatura proposta pelo Duellman porque ela ainda é muito recente e há pesquisadores trabalhando em novas filogenias do grupo (Comunicação pessoal Paulo C. A. Garcia – Departamento de Zoologia, UFMG). e, portanto, usar a nomenclatura do Duellman neste momento poderia criar instabilidade nomenclatural desnecessária.

RESULTADOS

Todas as espécies analisadas apresentaram um número diplóide de $2n=24$ cromossomos, número fundamental $NF=48$, ausência de cromossomos sexuais reconhecíveis e um par 2 submetacêntrico. O par 1 é submetacêntrico em todas as espécies, exceto em *Scinax belloni*, que apresentou o primeiro par metacêntrico. *Scinax* sp. 6 (cf. *arduus*), *S. littoreus* e *Scinax* sp. 3 (gr. *perpusillus*) apresentaram par 3 subteloacêntrico. Já *S. insperatus* e *Scinax* sp. 4 (cf. *cosenzai*) e *S. belloni* apresentaram par 3 submetacêntrico. Apenas *Scinax* sp. 5 (gr. *perpusillus*) apresentou par 3 metacêntrico. O par 4 é subteloacêntrico nas espécies *Scinax* sp. 6 (cf. *arduus*), *S. insperatus*, *Scinax* sp. (gr. *perpusillus*) e *S. littoreus* e submetacêntrico em *Scinax* sp. 4 (cf. *cosenzai*), *Scinax* sp. 5 (gr. *perpusillus*) e *S. belloni*. Em *Scinax* sp. 6 (cf. *arduus*), *S. insperatus*, *S. littoreus*, *Scinax* sp. 3 (gr. *perpusillus*) e *S. belloni* o par 5 é subteloacêntrico. Entretanto, o par 5 é submetacêntrico em *Scinax* sp. 4 (cf. *cosenzai*) e *Scinax* sp. 5 (gr. *perpusillus*). O par 6 é subteloacêntrico em todas as espécies, exceto *Scinax* sp. 4 (cf. *cosenzai*), *Scinax* sp. 5 (gr. *perpusillus*) e *S. belloni*, nas quais é submetacêntrico. Em *Scinax* sp. 6 (cf. *arduus*), *S. littoreus*, *Scinax* sp. 3 (gr. *perpusillus*) e *S. belloni*, o par 7 é subteloacêntrico, e em *S. insperatus* e *Scinax* sp. 5 (gr. *perpusillus*), é submetacêntrico. Apenas em *Scinax* sp. 4 (cf. *cosenzai*) é metacêntrico. O par 8 é submetacêntrico em *Scinax* sp. 3 (gr. *perpusillus*) e *S. belloni*, subteloacêntrico em *S. insperatus* e *S. littoreus* e metacêntrico em *Scinax* sp. 4 (cf. *cosenzai*), *Scinax* sp. 5 (gr. *perpusillus*) e *Scinax* sp. 6 (cf. *arduus*). Os pares 9, 10, 11 e 12 foram metacêntricos em todas as espécies analisadas (Tabela 3, Figura 3).

Os cariótipos de *S. belloni* e *S. littoreus* apresentaram as seguintes fórmulas cromossômicas, respectivamente: 10m+10sm+4st e 8m+ 4sm+ 12st. *Scinax insperatus* apresentou fórmula cromossômica igual a 8m+8sm+8st e *Scinax* sp. 3 (gr. *perpusillus*) apresentou a fórmula cromossômica 8m+6sm+10st. Já *Scinax* sp. 5 (gr. *perpusillus*) e *Scinax* sp. 4 (cf. *cosenzai*) apresentaram 12 cromossomos metacêntricos e 12 submetacêntricos (12m+12sm). *Scinax* sp. 6 (cf. *arduous*) apresentou fórmula igual a 10m+4sm+10st. Constrições secundárias foram encontradas apenas nos braços curtos do par 6 em *S. belloni* e *Scinax* sp. 6 (cf. *arduous*).

Após a impregnação pelo nitrato de prata, observou-se a presença de AgNOR nos braços curtos do par 6 de seis espécies, coincidindo com as constrições secundárias em *Scinax* sp. 6 (cf. *arduous*) e *S. belloni* (Figuras 4 e 5). Nas metáfases de *S. littoreus* não observamos marcações, mas verificamos a presença de uma ou duas marcações nos núcleos, indicando a presença de AgNOR em apenas um par cromossômico. Após vários testes para obter bandeamento CBG e a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) não foi possível observar os padrões de bandeamento e hibridação nos cromossomos das espécies estudadas. Mais testes devem ser realizados para obter resultado destas técnicas nas espécies deste estudo.

Tabela 3 Análises morfométricas de cromossomos das espécies de *Scinax* analisadas, incluindo CR (comprimento relativo) e MC (morfologia cromossômica).

Pares de cromossomos													
Espécie		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Scinax</i> sp. 6 (cf. <i>arduus</i>)	CR	11,85	11,56	11,55	11,41	10,12	8,70	8,14	6,13	5,96	5,04	4,76	4,19
	MC	sm	sm	st	st	st	st	st	m	m	m	m	m
<i>Scinax</i> <i>belloni</i>	CR	13,05	12,19	11,41	10,59	9,57	8,89	8,20	6,85	5,46	4,77	4,56	4,46
	MC	m	sm	sm	sm	st	sm	st	sm	m	m	m	m
<i>Scinax</i> sp. 4 (cf. <i>cosenzai</i>)	CR	15,25	12,51	11,26	8,65	9,06	6,99	6,96	6,94	6,65	6,37	5,52	3,83
	MC	sm	sm	sm	sm	sm	sm	m	m	m	m	m	m
<i>Scinax</i> <i>insperatus</i>	CR	14,85	12,45	11,88	11,65	9,33	8,26	6,49	6,45	5,73	4,50	4,27	4,12
	MC	sm	sm	sm	st	st	st	sm	st	m	m	m	m
<i>Scinax</i> <i>littoreus</i>	CR	11,38	10,73	10,54	9,98	9,33	9,28	8,35	8,13	6,46	5,69	4,46	4,68
	MC	sm	sm	st	st	st	st	st	st	m	m	m	m
<i>Scinax</i> sp. 5 (gr. <i>perpusillus</i>)	CR	17,40	11,69	11,20	10,29	8,79	8,02	7,08	5,59	5,27	5,21	4,89	4,57
	MC	sm	sm	m	sm	sm	sm	sm	m	m	m	m	m
<i>Scinax</i> sp. 3 (gr. <i>perpusillus</i>)	CR	15,34	12,11	11,44	11,09	9,66	9,36	6,03	5,74	5,57	4,94	4,88	3,84
	MC	sm	sm	st	st	st	st	st	sm	m	m	m	m

m (metacêntrico), sm (submetacêntrico) e st (subtelocêntrico).

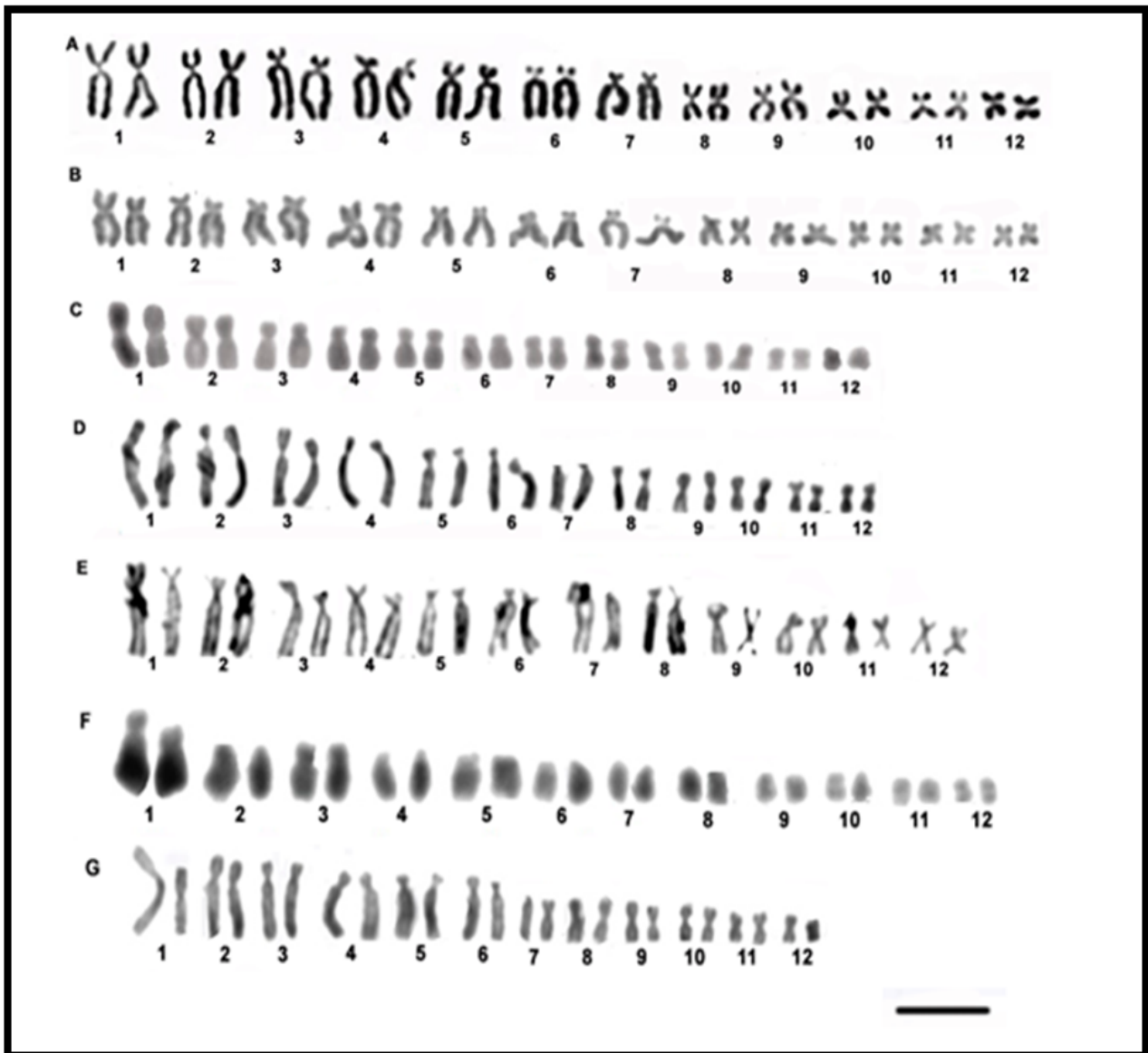


Figura 4 Cariótipos das espécies de *Scinax* analisadas: **a** *Scinax* sp. 6 (cf. *arduous*); **b** *Scinax belloni*; **c** *Scinax* sp. 4 (cf. *cosenzai*); **d** *Scinax insperatus*; **e** *Scinax littoreus*; **f** *Scinax* sp. 5 (gr. *perpusillus*); **g** *Scinax* sp. 3 (gr. *perpusillus*). Barra= 10µM.

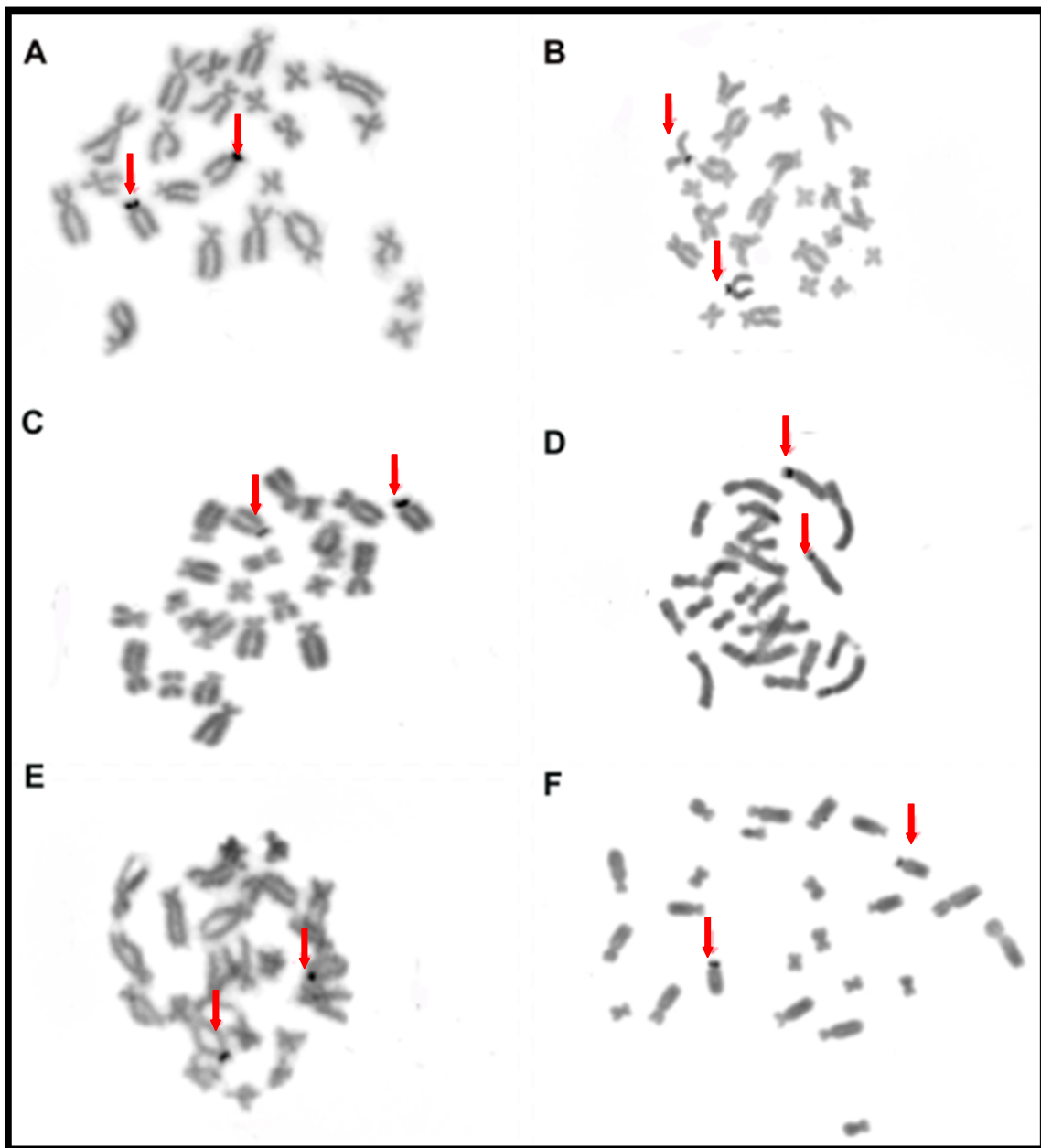


Figura 5 Células de seis espécies do grupo de *Scinax perpusillus* após marcação das regiões organizadoras de nucléolos com nitrato de prata (AgNOR - seta vermelha): **a** *Scinax* sp. 6 (cf. *arduus*); **b** *Scinax belloni*; **c** *Scinax* sp. 4 (cf. *cosenzai*); **d** *Scinax insperatus*; **e** *Scinax* sp. 5 (gr. *perpusillus*); **f** *Scinax* sp. 3 (gr. *perpusillus*).

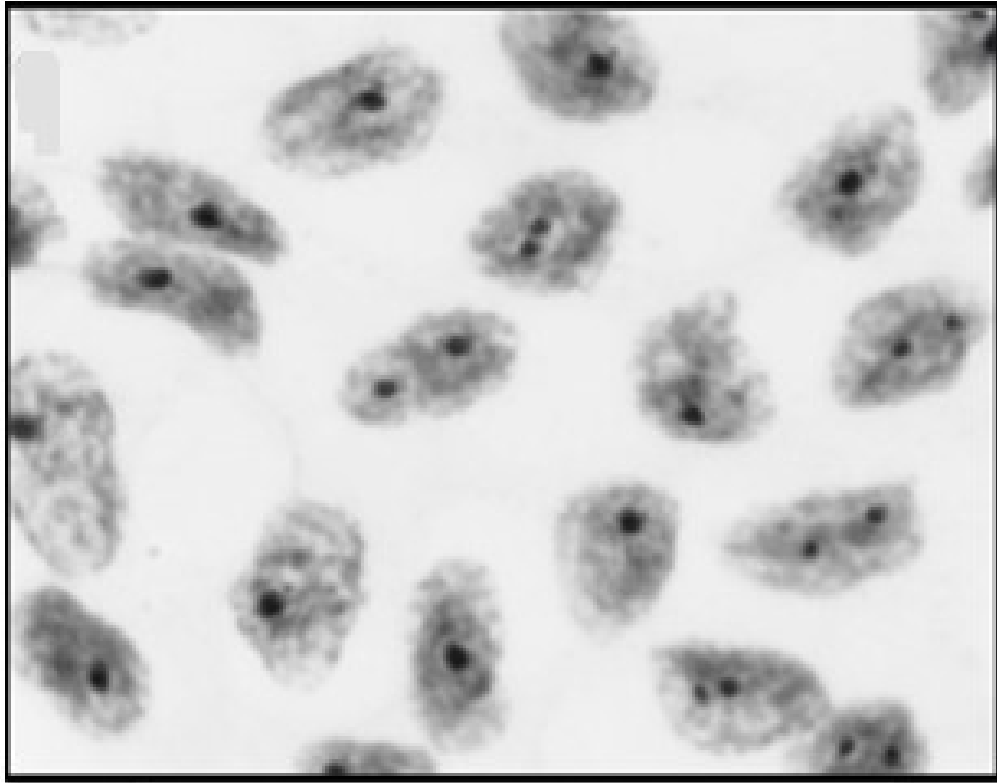


Figura 6 Núcleos de *Scinax littoreus* após marcação com nitrato de prata (AgNOR).

DISCUSSÃO

Neste trabalho apresentamos os primeiros dados citogenéticos de *Scinax* sp. 6 (cf. *arduous*), *Scinax* sp. 5 (gr. *perpusillus*), *Scinax* sp. 4 (cf. *cosenzai*), *S. belloni*, *S. insperatus*, *Scinax* sp. 3, *S. littoreus*. As sete espécies apresentaram $2n=24$ e $NF=48$, confirmando a alta conservação cariotípica no gênero *Scinax* e da subfamília Hylinae (Catroli & Kasahara, 2009).

O cariótipo de *Scinax perpusillus* foi primeiro analisado por Bogart (1973), quando a espécie era reconhecida como *Hyla perpusilla*. Este autor considerou a espécie como intermediária entre as cinco espécies analisadas. Isso porque, *Hyla catharinae* e *Hyla brieri* (*S. albicans* e *S. brieri*, no contexto atual) apresentaram maior número de cromossomos submetacêntricos que os cariótipos de *Hyla rostrata* e *Hyla rubra* (*S. rostratus* e *S. ruber*), estas duas últimas similares entre si. Entretanto, Bogart (1973) não forneceu índices centroméricos e por isso Faivovich (2002), em sua análise filogenética, considerou apenas como caractere a morfologia do par 1 (submetacêntrico ou metacêntrico), reconhecendo desta maneira os dois grandes clados de *Scinax*: *S. catharinae* e *S. ruber*. Cardozo et al. (2011) forneceram mais informações sobre estes clados, observando que as espécies alocadas em *S. catharinae* e *S. ruber* apresentavam os pares 1 e 2 submetacêntricos, com exceção de *S. rostratus* e de espécies não alocadas em nenhum grupo, que apresentavam o par 1 metacêntrico. Assim como relatado por Peixoto et al. (2015), *S. belloni* apresentou par 1 metacêntrico, que pode ser considerada como uma possível autopomorfia para o grupo.

Entretanto, observamos divergência entre as fórmulas cromossômicas para essa espécie. Os exemplares de *S. belloni* analisados neste estudo apresentaram fórmula cromossômica 10m+10sm+4st, enquanto os espécimes analisados por Peixoto *et al.* (2015), apresentaram fórmula igual a 10m+4sm+10st.

Todas as espécies do grupo de *Scinax perpusillus* analisadas aqui apresentaram o par 2 submetacêntrico, assim como as espécies analisadas por Peixoto *et al.* (2015) e Cardozo *et al.* (2011). O par 3 é subteloentrico em *Scinax* sp. 6 (cf. *arduous*), *S. littoreus* e *Scinax* sp. 3, assim como observado em *Scinax* sp., *S. belloni* e *S. v-signatus* analisadas por Peixoto *et al.* (2015) e em *Scinax* sp. 1 analisada por Cardozo *et al.* (2011). Em *S. insperatus*, *Scinax* sp. 4 (cf. *cosenzai*) e *S. belloni* este par é submetacêntrico como em *Scinax* sp. 2, analisada por Cardozo *et al.* (2011). Apenas em *Scinax* sp. 5 (gr. *perpusillus*), o par 3 é metacêntrico. As espécies *Scinax* sp. 6 (cf. *arduous*), *S. insperatus*, *S. littoreus*, *Scinax* sp. 3 (gr. *perpusillus*) apresentam par 4 subteloentrico, assim como todas as espécies analisadas por Peixoto *et al.* (2015) e *Scinax* sp. 1 analisada por Cardozo *et al.* (2011). O par 4 é submetacêntrico em *Scinax* sp. 4 (cf. *cosenzai*), *Scinax* sp. 5 (gr. *perpusillus*) e *S. belloni*, além de *Scinax* sp. 2 analisada por Cardozo *et al.* (2011). Em *Scinax* sp. 6 (cf. *arduous*), *S. insperatus*, *S. littoreus*, *Scinax* sp. 3 e *S. belloni*, o par 5 é subteloentrico, assim como em todas as espécies analisadas por Peixoto *et al.* (2015) e em *Scinax* sp. 1 analisada por Cardozo *et al.* (2011). Já em *Scinax* sp. 4 (cf. *cosenzai*), *Scinax* sp. 5 (gr. *perpusillus*) e *Scinax* sp. 2 analisada por Cardozo *et al.* (2011) este par é submetacêntrico.

O par 6 é subtelocêntrico em todas as espécies analisadas citogeneticamente, exceto *Scinax* sp. 4 (cf. *cosenzai*), *Scinax* sp. 5 (gr. *perpusillus*) e *S. belloni*, nas quais é submetacêntrico. Todas as espécies apresentaram par 7 subtelocêntrico, exceto *Scinax* sp. 5 (gr. *perpusillus*) que têm este par submetacêntrico, assim como *Scinax* sp. 1 analisada por Cardozo *et al.* (2011) e todas as espécies analisadas por Peixoto *et al.* (2015). Apenas *Scinax* sp. 4 (cf. *cosenzai*) apresenta par 7 metacêntrico. Os pares 8, 9, 10, 11 e 12 são metacêntricos em *Scinax* sp. 1 e *Scinax* sp. 2 analisadas por Cardozo *et al.* (2011). O par 8 é submetacêntrico em todas as espécies analisadas por Peixoto *et al.* (2015). Nas espécies analisadas neste estudo, o par 8 é subtelocêntrico em *S. littoreus*, submetacêntrico em *S. insperatus*, *Scinax* sp. 3 (gr. *perpusillus*) e *S. belloni* e metacêntrico nas outras espécies. Os pares 9, 10, 11 e 12 são metacêntricos em todas as espécies analisadas por Peixoto *et al.* (2015), assim como nas espécies aqui analisadas.

Observou-se também grande variação entre as fórmulas cromossômicas das espécies do grupo de *S. perpusillus* analisadas e nas descritas na literatura. *Scinax* sp.3 (gr. *perpusillus*), *Scinax* sp. e *S. v-signatus*, apresentaram 8m+6sm+10st. *Scinax insperatus* apresentou a mesma fórmula encontrada em *S. arduous* e *S. cosenzai*: 8m+8sm+8st. Já *Scinax* sp. 4 (cf. *cosenzai*) e *Scinax* sp. 5 (gr. *perpusillus*), apresentaram 12m+12sm. Em *Scinax* sp. 6 (cf. *arduous*), o padrão foi o mesmo encontrado por Peixoto *et al.* (2015) em *S. belloni* e por Cardozo *et al.* (2011) em *Scinax* sp. 2, 10m+4sm+10st. Entretanto, as relações entre as espécies do grupo

ainda precisam ser devidamente testadas incluindo-se esses táxons em estudo filogenéticos.

Outra característica observada por Cardozo *et al.* (2011) foi a diferença entre o tamanho dos pares 1 e 2 entre os clados de *Scinax catharinae* e *S. ruber*. Segundo eles, os pares 1 e 2 em espécies de *S. catharinae* são similares em tamanho, enquanto no grupo de *S. ruber*, o par 1 é maior que o par 2. Observou-se o tamanho similar entre os pares 1 e 2 em *Scinax* sp. 6 (cf. *arduous*), *S. belloni* e *S. littoreus*, e o par 1 era maior que o par 2 *Scinax* sp. 4 (cf. *cosenzai*), *S. insperatus*, *Scinax* sp. 5 (gr. *perpusillus*) e *Scinax* sp. 3 (gr. *perpusillus*). Segundo Cardozo *et al.* (2011), o mecanismo responsável por esta diferença pode ser a perda ou adição de sequências repetitivas ou alterações morfológicas não identificadas e a aplicação do bandeamento CBG pode auxiliar a identificá-lo.

A posição da AgNOR também fornece um caractere que separa os clados de *Scinax catharinae* e *S. ruber*. Em todos os estudos já realizados em espécies de *S. catharinae*, a AgNOR estava localizada no par 6, exceto em *S. brieni*, na qual Bogart (1973) descreveu a presença de AgNOR no par 5. Como estes pares são muito similares, é provável que também em *S. brieni* a NOR esteja no par 6. Nas espécies do clado de *S. ruber*, a AgNOR está localizada no par 11, com exceção apenas de *S. alter*, na qual muitos estudos confirmaram AgNORs nos pares 10, 11 e 12 (Anderson, 1991; Baldissera *et al.* 1993; Pombal *et al.* 1995; Kasahara *et al.* 2003). Todas as espécies analisadas no presente estudo apresentaram AgNOR no braço curto do par 6, demonstrando conservação da posição da NOR no clado *S. catharinae*. Não foram obtidas marcações pelo nitrato de prata em metáfases de *S. belloni*, no entanto,

no máximo duas marcações pela prata foram observadas em núcleos interfásicos, sugerindo apenas um par portador de NOR.

O presente estudo contribui para fornecer caracteres importantes para uma futura filogenia, complementada com dados de morfologia de adultos e larvas, bioacústica e biologia molecular, e assim esclarecer as relações entre as espécies e auxiliar no entendimento da evolução cariotípica do gênero *Scinax*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bogart, J. P. 1973. Evolution of anuran karyotypes, p. 337–349. In: Evolutionary Biology of the Anurans. J. L. Vial (ed.). University of Missouri Press, Columbia, Missouri.
- Busin, C. S., A. Pimentel Lima, C. Peralta De Almeida Prado, C. Strumann, S. Sequeira, Jr., and S. M. Recco-Pimentel. 2006. Chromosomal differentiation of populations of *Lysapsus limellus limellus*, *L. bolivianus*, and of *L. caraya* (Hylinae, Hylidae). *Micron* 37:355–362.
- Cardozo, D.E. Leme, D.M. Bortoleto, J.F. Catroli, G.F. Baldo, D. Faivovich, J. Kolenc, F. Silva, A.P.Z. Borteiro, C. Haddad, C.F.B. Kasahara, S. 2011. Karyotypic Data on 28 Species of *Scinax* (Amphibia: Anura: Hylidae) Diversity and Informative Variation. *Copeia*, 2: 251–263.
- Catroli, G.F. e Kasahara, S. 2009. Cytogenetic data on species of the family Hylidae (Amphibia, Anura): results and perspectives. *Publicatio: Ciências Biológicas e da Saúde*, 15, 67–86.
- Duellman, W.E. Marion, A.B Hedges, S.B. 2016. Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). *Zootaxa*, 4104(1), 1-109.
- Faivovich, J. 2002. A cladistic analysis of *Scinax* (Anura: Hylidae). *Cladistics*, 18: 367-393.
- Faivovich, J. Haddad, C.F.B. Garcia, P.C.A. Frost, D.R. Campbell, J.A. Wheeler, W.C. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to the Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of American Museum of Natural History*, Nova Iorque, 294: 1–240.

Green, D.M. Sessions, S.K. (eds) 1991. Nomenclature for chromosomes. In: Amphibian cytogenetics and evolution. Academic Press, San Diego, p 223.

Gruber, S.L. Zina, J. Narimatsu, H. Haddad, C.F.B. Kasahara, S. 2012. Comparative karyotype analysis and chromosome evolution in the genus *Aplastodiscus* (Cophomantini, Hylinae, Hylidae). BMC Genet., 13: 28-10.1186/1471-2156-13-28.

Howell, W.M. and Black, D.A. 1980. Controlling silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective al.oidal developer: step method. Experientia, 36, 1014–1015.

Kasahara, S. Silva A.P.Z. Gruber, S.L. Haddad, C.F.B. 2003. Comparative cytogenetic analysis on four tree frog species (Anura, Hylidae, Hylinae) from Brazil. Cytogenetic and Genome Research, 103: 155–162.

Nogueira, L. Paim F. Diniz, D. Solé, M. Affonso, P. R. A. D. M. Siqueira, S. e Sampaio, I. 2015. Cytogenetic analysis of *Scinax auratus* and *Scinax eurydice* (Anura, Hylidae) with emphasis on cytotaxonomy. Comparative Cytogenetics 9(2): 227–236.

Peixoto, O. L. 1987. Caracterização do grupo “*perpusillus*” e revalidação da posição taxonômica de *Ololygon perpusilla perpusilla* e *Ololygon perpusilla v-signata* (Amphibia, Anura, Hylidae). Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 10, 37–49.

Peixoto, M.A.A. Lacerda, J.V.A. Coelho-Augusto, C. Feio, R.N. Dergam, J.A. 2015. The karyotypes of five species of the *Scinax perpusillus* group (Amphibia, Anura, Hylidae) of southeastern Brazil show high levels of chromosomal stabilization in this taxon. Genetics 143 (6): 729-739.

Pyron, R. A. Wiens, J. J. 2011. A large- scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61(2), 543-583.

Schmid, M. 1978. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma*, 66:361-368.

Sumner, A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental cell research*, 75(1), 304-306.

CAPÍTULO II

CULTURA DE CÉLULAS EM ANFÍBIOS ANUROS E DESCRIÇÃO DO CARIÓTIPO DE *SCINAX* CF. *MACHADOI* (AMPHIBIA, ANURA, HYLIDAE)

Luísa de Paula Reis^{1,2}, Naiara P. Araújo¹, Paulo C. A. Garcia², Marta Svartman¹

¹Laboratório de Citogenômica Evolutiva, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

²Laboratório de Herpetologia, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

RESUMO

A obtenção de preparações cromossômicas a partir de cultura celular resulta em maior quantidade e melhor qualidade de metáfases em relação às obtidas através de preparações diretas. Como consequência, é possível obter melhores resultados após a aplicação das técnicas de bandeamento cromossômico, como por exemplo, o bandeamento CBG e a marcação das regiões organizadoras de nucléolos pelo nitrato de prata (AgNOR). Neste trabalho, testamos as condições para o estabelecimento de cultura de fibroblastos em três espécies de *Scinax*. Além disto, o cariótipo de *Scinax* cf. *machadoi* foi descrito e analisado a partir de fibroblastos cultivados. Esta espécie apresentou o número diplóide $2n=24$ e o número fundamental $NF=48$, com fórmula cromossômica $8m+6sm+10st$. O padrão de bandeamento CBG revelou a presença de heterocromatina constitutiva na região pericentromérica de todos os cromossomos e a AgNOR mostrou a presença de NOR no braço curto do par 6.

Palavras-chave: cultura de fibroblastos, bandeamento CBG, AgNOR.

ABSTRACT

Chromosome preparations obtained from cultured cells result in a higher quantity of better quality metaphases than those obtained by direct preparations. Consequently, it is possible to obtain better results after the application of chromosome banding techniques such as CBG banding and staining of the nucleolus organizers regions with silver nitrate (AgNOR). In the present study, we tested the conditions for cell culture in three *Scinax* species. In addition, we describe for the first time the karyotype of *Scinax* cf. *machadoi* (Amphibia, Anura, Hylidae), obtained from cultured fibroblasts. This species presented a diploid number $2n=24$ and fundamental number $NF=48$, with a karyotypic formula $8m+6sm+10st$. The CBG banding revealed the presence of constitutive heterochromatin in the pericentromeric region of all chromosomes and the AgNOR was located at the short arm of pair 6.

Keywords: Fibroblast culture, CBG- banding, AgNOR.

INTRODUÇÃO

O cultivo celular é muito útil em diversas áreas de estudo, já que permite a análise *in vitro* de propriedades e processos biológicos difíceis de estudar *in vivo* (Nishikawa *et al.* 1990), além da possibilidade de manutenção de linhagens celulares para as mais diversas aplicações, sem a necessidade de se realizar repetidos procedimentos invasivos no organismo (Kasahara, 2009).

Para o sucesso na obtenção de uma cultura primária de células é muito importante simular as condições mais próximas às das células no organismo, que variam para cada grupo. Dessa forma, fatores tais como a temperatura de incubação, meios de cultura, concentrações de nutrientes, pH e osmolaridade devem ser cuidadosamente controlados. O meio de cultura é uma mistura de vários componentes dissolvidos em meio aquoso, como aminoácidos, vitaminas e sais, suplementados pela adição de soro fetal bovino e antibióticos para evitar contaminação bacteriana (Kasahara, 2009). A cultura é classificada como de longa duração quando obtida através da biópsia do tecido animal: coração, rim, pulmão, etc. Isso porque, desde a obtenção de fragmentos de órgãos ou biópsias até o estabelecimento da monocamada e disponibilidade de células para as primeiras preparações cromossômicas, leva-se pelo menos dez dias (Kasahara, 2009). As preparações cromossômicas resultantes apresentam maior quantidade de metáfases de melhor qualidade do que as obtidas através de preparações diretas, já que é possível controlar melhor fatores bióticos e abióticos. Consequentemente é possível obter melhores resultados após a aplicação das técnicas de bandeamento cromossômico, como por exemplo, o bandeamento CBG, que detecta regiões de heterocromatina constitutiva ricas

em DNA repetitivo e a marcação das regiões organizadoras de nucléolo por nitrato de prata (AgNOR) (Stanyon e Galleni, 1991).

O conhecimento de condições ótimas para o cultivo celular em Amphibia, como nutrientes necessários, fisiologia e metabolismo das células, é muito restrito quando comparado ao conhecimento sobre cultivo de células de mamíferos. Por isso, a maioria dos métodos de cultura de células de anfíbios vêm sendo adaptados com algumas modificações a partir dos utilizados para cultura de células humanas (Kasahara, 2009).

O objetivo deste trabalho foi testar e definir as condições ideais para o estabelecimento de culturas de células primárias de anuros, utilizando material de espécies de *Scinax*. Este gênero ainda apresenta muitos problemas taxonômicos e parte de suas espécies ainda não foram alocadas a nenhum grupo. Até o momento, foram descritos os cariótipos de 43 das 113 espécies de *Scinax* (Bogart, 1973; Cardozo *et al.* 2011; Peixoto *et al.* 2015; Nogueira *et al.* 2015 a, b). Todas apresentaram números diplóides $2n=24$, números fundamentais $NF=48$ e ausência de cromossomos sexuais reconhecíveis (Tabela 1, Anexo 1).

Utilizando fibroblastos cultivados, analisamos citogeneticamente *Scinax* cf. *machadoi*, uma espécie pertencente ao grupo *Scinax catharinae*, dentro do clado *Scinax catharinae* (Faivovich *et al.* 2005), descrita por Bokermann e Sazima (1973) em registro na Serra do Cipó, Minas Gerais.

OBJETIVOS

Estabelecer o protocolo de condições ótimas para a obtenção de cultura de células de anfíbios anuros, usando como material, espécies de *Scinax*. Mais especificamente, objetivou-se:

- I. Reportar as condições ideais para cultura de células de anfíbios anuros.
- II. Obter preparações cromossômicas a partir de cultura de fibroblastos.
- III. Descrever o cariótipo das espécies do gênero *Scinax*, incluindo o padrão de bandeamento CBG, bandeamento GTG, a marcação das AgNOR e a hibridação *in situ* fluorescente (FISH), usando como sonda o DNA telomérico.

MATERIAL E MÉTODOS

Girinos de *Scinax cf. machadoi*, *Scinax insperatus* e *Scinax belloni* foram coletados em Mariana (Minas Gerais), Miguel Pereira (Rio de Janeiro) e Castelo (Espírito Santo), respectivamente (Tabela 1). Eles foram mantidos em aquários por alguns dias até o início da metamorfose. Quando os girinos atingiram o estágio 42 (Gosner, 1960), os exemplares foram passados para um recipiente que continha 5mL da água do aquário e colchicina 0,1%, por um período de 4 horas e foram posteriormente eutanasiados com lidocaína a 5% e lavados com hipoclorito 10% e álcool 70%. Tiveram depois seus tecidos seccionados e transferidos para uma placa de Petri, picotados com tesouras e bisturis estéreis e incubados em 2 mL de uma solução de colagenase (1 mg/mL) 40% (v/v). No caso de *Scinax cf. machadoi*, foram retirados apenas

partes dos membros posteriores, e nas outras duas espécies, retirou-se também o pulmão e o rim.

As amostras foram incubadas em colagenase à temperatura ambiente (~23°C) ou a 37°C, por 2 horas, 4 horas ou overnight. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 1000rpm e o sobrenadante foi descartado.

Tabela 1 Exemplares de *Scinax* analisados.

Espécie	Número de exemplares	Procedência (coordenadas)
<i>Scinax cf. machadoi</i>	5 (UFMG 1857)	Mariana, MG (43°31'14" W, 20°09'12" S)
<i>Scinax insperatus</i>	5 (JVAL 466)	Miguel Pereira, RJ (22°30'39.59"S, 43°25'36.62"W)
<i>Scinax belloni</i>	5 (JVAL 356)	Castelo, ES (20°30'28.63"S, 41° 5'11.32"W)

* Coordenada aproximada. Coletado nas proximidades do Parque Estadual Serra da Tiririca.

Diferentes condições de ensaio foram testadas (Tabela 2). As células foram ressuspensas em solução aquosa composta por 50% standard MEM medium (DMEM), 50% de meio enriquecido L15, 20% soro fetal bovino (SFB), 1% penicilina/ streptomycin/ glutamina - 1U/mL (100x) e 1% fungizon e colocadas em frascos de cultura, mas o pH ideal do meio de cultura não se manteve. O DMEM foi testado sem a complementação do meio L15, diluído em água destilada estéril a 40%, 50%, 60% e 70%, com adição de 10% de SFB, 1% de antibiótico e 1% de fungizon. As células começaram a se dividir quando a amostra ficou por 4 horas na colagenase e posteriormente foi colocada em meio DMEM 50% (v/v). Entretanto, devido à estagnação do crescimento das células, a seguinte fórmula foi utilizada: DMEM diluído a 60% com água

destilada estéril, 6% SFB e 1% penicilina/ streptomicona/ glutamina - 1U/mL (100x). O pH do meio foi ajustado para 7,5 com Hepes sempre que necessário.

As amostras foram mantidas em frascos de cultura à temperatura ambiente (~23°C).

Tabela 2 Condições experimentais testadas para cultura primária de fibroblastos de *Scinax*.

Temperatura da collagenase	Temperatura ambiente (~23°C)
	Estufa a 37°C
Tempo da collagenase	2 horas
	4 horas
	Overnight
Composição do meio de cultivo	50% DMEM, 50% L15, 10%SFB, 1% antibiótico, 1% fungizon
	40% DMEM, 60% água destilada estéril, 10% SFB, 1% antibiótico, 1% fungizon
	50% DMEM, 50% água destilada estéril, 10% SFB, 1% antibiótico, 1% fungizon
	60% DMEM, 40% água destilada estéril, 10% SFB, 1% antibiótico, 1% fungizon
	70% DMEM, 30% água destilada estéril, 10% SFB, 1% antibiótico, 1% fungizon
	60% DMEM, 40% água destilada estéril, 6% SFB, 1% antibiótico
Temperatura de incubação das células	Temperatura ambiente (~23°C)
	Estufa a 37°C

Os frascos com as células continham 5 mL de meio de cultura que era trocado a cada dois ou três dias. Quando as células se apresentavam confluentes (Figura 1), procedia-se à tripsinização para repicá-las. Para a obtenção das preparações cromossômicas, era adicionada colcemida (0,01 µL/mL) ao frasco de cultura. Após 1 hora de incubação, as células eram lavadas com solução salina PBS duas vezes e adicionava-se tripsina (0,05% em tampão Dulbecco pH 7,0) por 7–14 segundos. Após a tripsinização, as células eram transferidas para um tubo Falcon de 15 mL e centrifugadas a 1000 rpm por 7 min. O sobrenadante era retirado e adicionava-se 10 mL de solução hipotônica KCl 0,075 M à temperatura ambiente (~23°C). Após 8 minutos de incubação, adicionava-se 0,5 mL de fixador (3:1 metanol: ácido acético) e procedia-se à centrifugação a 800 rpm, por 8 min. O sobrenadante era descartado e adicionava-se 5 mL de fixador. Após a fixação por 20 minutos à temperatura ambiente, as amostras eram centrifugadas por 5 min a 800 rpm, descartava-se o sobrenadante e as células eram ressuspensas em 5 mL de fixador. Esta última etapa era repetida duas vezes. As suspensões celulares eram pingadas sobre lâminas para microscopia pré-lavadas e coradas com uma solução de corante Giemsa diluído a 5% em tampão fosfato pH 6,8 à temperatura ambiente por 10 minutos para posterior análise. Também era possível manter as preparações em fixador a -4°C para análise posterior.

O bandeamento CBG foi feito de acordo com Sumner (1972), a marcação das NORs pelo nitrato de prata, segundo Howell e Black (1980), os testes de bandeamento GTG segundo Seabright (1971). Também testamos a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda de DNA telomérico (Anexo II).

As análises e captura de imagens foram feitas sob um fotomicroscópio de epifluorescência Zeiss Axioimager 2 equipado com uma câmera de CCD. Os cariótipos foram montados utilizando os softwares Adobe Photoshop v.2 e ImageJ e os cromossomos foram classificados segundo Green e Session (1991) em metacêntricos, submetacêntricos, subtelocêntricos e acrocêntricos e alinhados em ordem decrescente de tamanho.

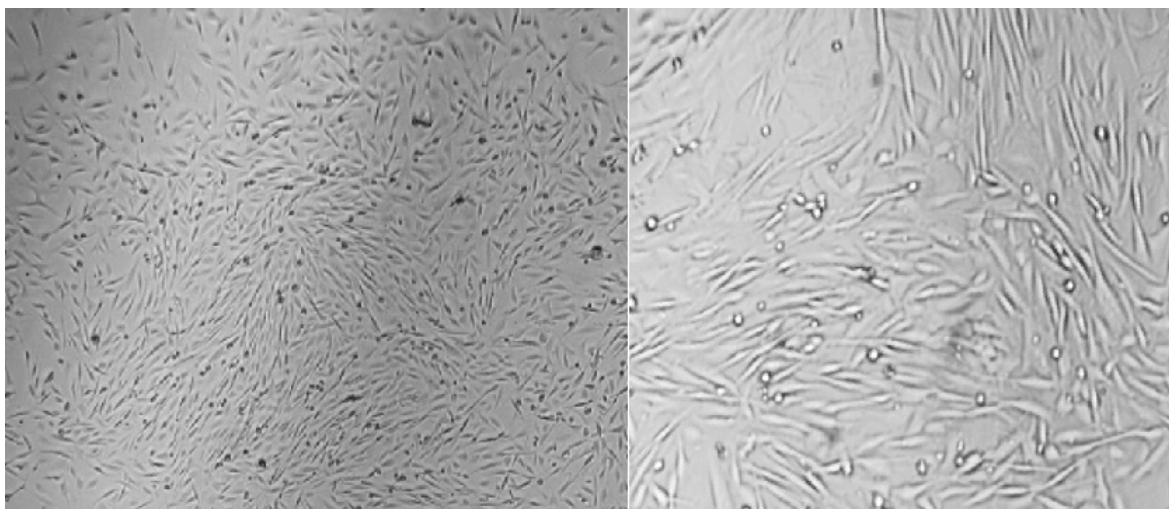


Figura 1 Cultivo primário de fibroblastos a partir de membros posteriores de imagos de *Scinax cf. machadoi* após cinco dias. Barra = 10 μ M.

Recentemente, foi publicado o artigo intitulado “Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae)” por Duellman, Marion & Hedges (2016). Optou-se por não usar a nomenclatura proposta pelo Duellman porque ela ainda é muito recente e há pesquisadores trabalhando em novas filogenias do grupo (Comunicação pessoal Paulo C. A. Garcia – Departamento de Zoologia, UFMG). e, portanto, usar a nomenclatura do Duellman neste momento poderia criar instabilidade nomenclatural desnecessária.

O trabalho não publicado “Sistemática das espécies do grupo *Scinax catharinae* (Anura, Hylidae)” realizado por Ana Carolina Calijorne Lourenço, sugeri que *Scinax cf. machadoi*, encontrado na região do Quadrilátero Ferrífero (MG), pode ser considerado outra espécie, uma vez que a localidade- tipo é na Serra do Cipó (MG). Por isso, neste presente trabalho, consideramos *Scinax cf. machadoi*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo material de boa qualidade foi obtido para análise, dispensando o sacrifício de vários exemplares de uma espécie (Figura 1). Após a multiplicação das células, pode-se proceder à sua colheita ou congelamento em nitrogênio líquido para uso futuro. Metáfases bem definidas, com cromossomos alongados, foram obtidas a partir da cultura de fibroblastos (Figura 2).

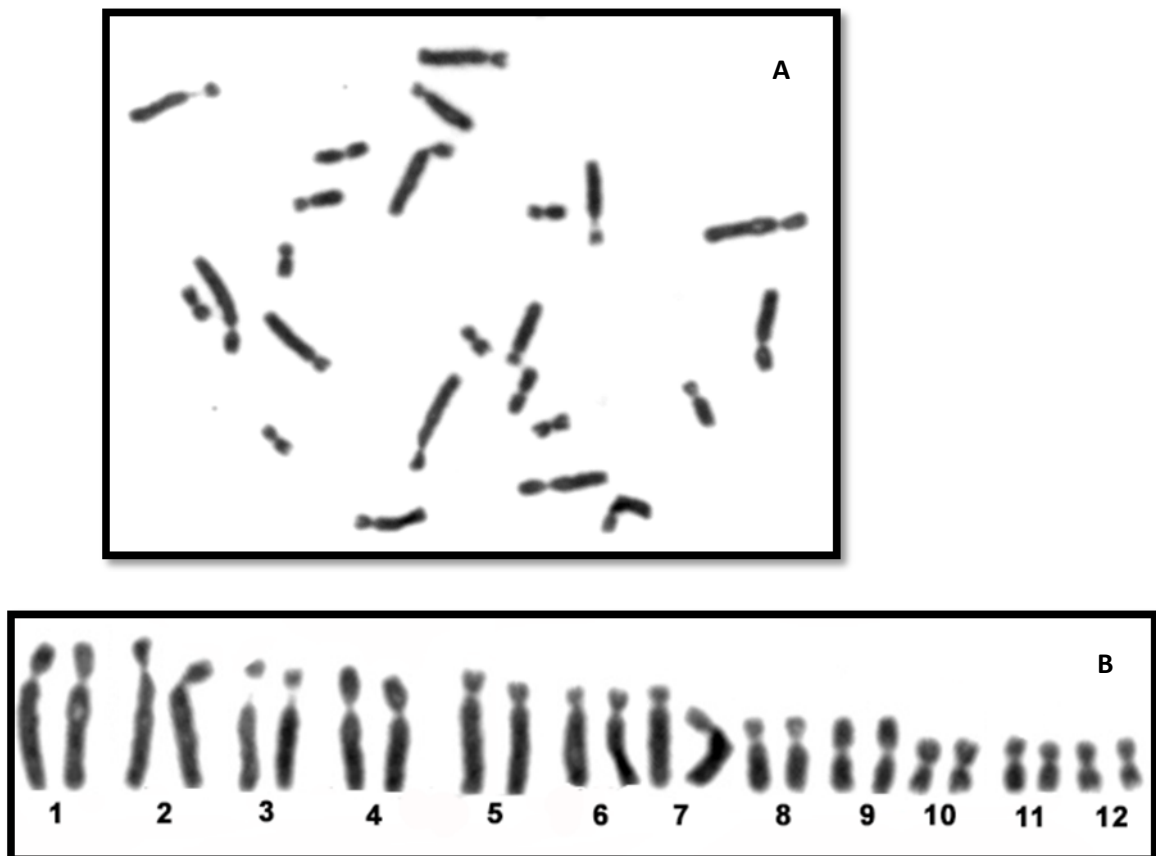


Figura 2 (A) Metáfase e **(B)** cariótipo ($2n=24$, $NF=48$) de *Scinax cf. machadoi*. Barra = $10\mu\text{M}$.

Os testes realizados demonstraram que a colagenase à temperatura ambiente (~23°C) por 4 horas e posteriormente a incubação em meio 60% (v/v) DMEM, 40% água destilada estéril, 6% SFB e 1% antibiótico forneceram o melhor resultado. Por resultar em boas preparações cromossômicas, o material obtido por cultura celular é ideal para a aplicação de padrões de bandeamento cromossômico.

As espécies *Scinax belloni* e *Scinax insperatus* cresceram e se dividiram por algumas semanas, porém não o suficiente para repicar, congelar ou colher as células. Posteriormente, as duas sofreram uma contaminação fúngica, devido ao uso de SFB contaminado.

O cariótipo de *Scinax cf. machadoi* apresentou o padrão típico de *Scinax*: número diplóide $2n=24$, número fundamental $NF=48$ e ausência de cromossomos sexuais. O cariótipo é composto por quatro pares de cromossomos metacêntricos (pares 9, 10, 11 e 12), três pares de submetacêntricos (pares 2, 3 e 8) e cinco pares subtelocêntricos (pares 1, 4, 5, 6 e 7), com a seguinte fórmula cromossômica: $8m+6sm+10st$. Esta fórmula difere da encontrada na maioria das espécies do grupo de *Scinax catharinae*, que apresentam a fórmula $10m+12sm+2st$, como as espécies do grupo de *S. catharinae*, *S. argyreornatus*, *S. ariadne*, *S. aromothyella*, *S. berthae*, *S. hiemalis*, *S. littoralis*, *S. longilineus*, *S. obstriangulatus* e *S. rizibilis*, e *Scinax* sp. 2 (gr. *perpusillus*) (Cardozo et al. 2011). O cariótipo de *Scinax cf. machadoi* é semelhante aos das espécies *Scinax* sp. e *S. v-signatus* (Cardozo et al. 2011; Peixoto et al. 2015).

Além disso, *Scinax cf. machadoi* apresenta o par 1 subtelocêntrico, que também é diferente do descrito para o clado *S. catharinae* (Cardozo *et al.* 2011), que apresenta como sinapomorfias os pares 1 e 2 submetacêntricos (Faivovich, 2002) (Tabela 3).

Tabela 3 Análises morfométricas dos cromossomos de *Scinax cf. machadoi*.

		Pares de cromossomos											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Scinax cf. machadoi</i>	CR	13,12	12,68	10,70	10,49	10,40	9,49	8,31	6,70	5,90	4,70	3,86	3,64
	MC	st	sm	sm	st	st	st	St	sm	m	m	m	m

CR: comprimento relativo; MC: morfologia cromossômica; m: metacêntrico; sm: submetacêntrico; st: subtelocêntrico.

A presença de heterocromatina constitutiva nas regiões pericentroméricas de todos os cromossomos foi visualizada após o bandeamento CBG (Figura 3). Este padrão é o mesmo já descrito para as espécies do clado *S. catharinae*. (Cardozo *et al.* 2011). A coloração com DAPI (Figura 3) mostrou marcação mais brilhante nas mesmas regiões mais coradas após o bandeamento CBG, sugerindo riqueza em AT. A coloração com o nitrato de prata revelou a presença de NORs nos braços curtos dos homólogos do par 6 (Figura 4). Este é o padrão presente na maioria das espécies do clado de *Scinax catharinae*, com exceção de *S. canastrensis*, que apresenta marcação adicional de NOR no par 11 (Cardozo *et al.* 2011). A caracterização citogenética detalhada de *Scinax cf. machadoi* mostrou que a espécie compartilha algumas características cromossômicas com a maioria das espécies pertencentes ao clado *S. catharinae*.

Após vários testes para obter bandeamento GTG e a hibridação *in situ* fluorescente (FISH) não foi possível obter bons resultados. Novos testes serão realizados.

Neste trabalho, apresentamos os primeiros dados cromossômicos de *Scinax cf. machadoi*, obtidos através da cultura celular. A realização de cultura celular forneceu material de qualidade e o protocolo estabelecido deve se mostrar útil em estudos cariotípicos de outras espécies deste gênero e outros anuros.

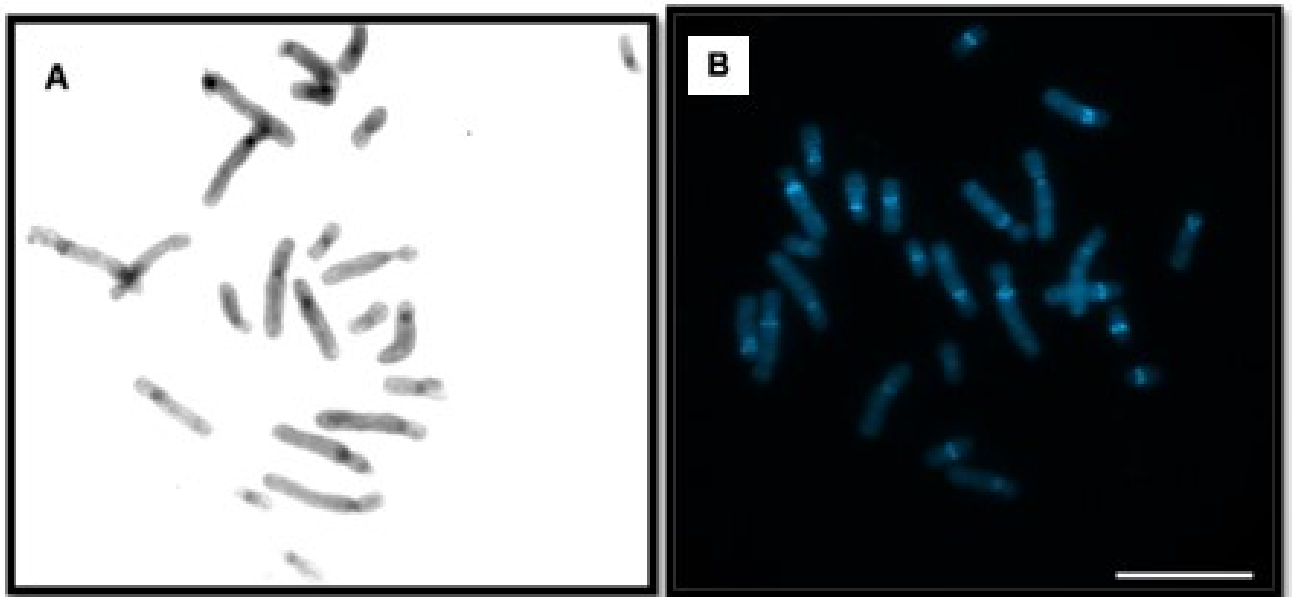


Figura 3 (A) Metáfase de *Scinax cf. machadoi* após bandeamento CBG. **(B)** Coloração com DAPI, coincidente com a marcação obtida após bandeamento CBG. Barra = 10 μ M.



Figura 4 Metáfase de *Scinax* cf. *machadoi* após marcação das regiões organizadoras de nucléolo pela prata. As setas indicam marcações no par 6. Barra = 10 μ M.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bogart, J. P. 1973. Evolution of anuran karyotypes, p. 337–349. In: Evolutionary Biology of the Anurans. J. L. Vial (ed.). University of Missouri Press, Columbia, Missouri.
- Cardozo, D.E. Leme, D.M. Bortoleto, J.F. Catroli, G.F. Baldo, D. Faivovich, J. Kolenc, F. Silva, A.P.Z. Borteiro, C. Haddad, C.F.B. Kasahara, S. 2011. Karyotypic Data on 28 Species of *Scinax* (Amphibia: Anura: Hylidae) Diversity and Informative Variation. *Copeia*, 2: 251–263.

- Lourenço, A.C.C. 2013. Sistemática das espécies do grupo *Scinax catharinae* (Anura, Hylidae). Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Duellman, W.E. Marion, A.B Hedges, S.B. 2016. Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). *Zootaxa*, 4104(1), 1-109.
- Faivovich, J. 2002. A cladistic analysis of *Scinax* (Anura: Hylidae). *Cladistics*, 18: 367-393.
- Faivovich, J. Haddad, C.F.B. Garcia, P.C.A. Frost, D.R. Campbell, J.A. Wheeler, W.C. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to the Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of American Museum of Natural History*, Nova Iorque, 294: 1–240.
- Gosner, K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, v.16, p.183-190.
- Green, D.M. Sessions, S.K. (eds) 1991. Nomenclature for chromosomes. In: *Amphibian cytogenetics and evolution*. Academic Press, San Diego, p 223
- Helgason, C.D. e Miller, C.L. 2005. *Basic cell culture protocols*. Totowa, NJ. Humana Press.
- Howell, W.M. and Black, D.A. 1980. Controlling silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective aldehydic developer: step method. *Experientia*, 36, 1014–1015.
- Kasahara, S. 2009. *Introdução à pesquisa em citogenética de vertebrados*. Ed. Sociedade Brasileira de Genética. 1ªed. 160 pp.
- Nishikawa, A. Shimizu-Nishikawa, K. Miller, L. 1990. Isolation, characterization, and in vitro culture of larval and adult epidermal cells of the frog *Xenopus laevis*. *In Vitro Cell Dev Biol* 26:1128–1134.

Nogueira, L. Zanoni, J. B. Solé, M. Affonso, P. R. A. D. M. Siqueira, S. e Sampaio, I. 2015a. Cytogenetic studies in six species of *Scinax* (Anura, Hylidae) clade *Scinax ruber* from northern and northeastern Brazil. *Genetics and molecular biology*, 38 (2), 156-161.

Nogueira, L. Paim F. Diniz, D. Solé, M. Affonso, P. R. A. D. M. Siqueira, S. e Sampaio, I. 2015b. Cytogenetic analysis of *Scinax auratus* and *Scinax eurydice* (Anura, Hylidae) with emphasis on cytotaxonomy. *Comparative Cytogenetics* 9(2): 227–236.

Peixoto, M.A.A. Lacerda, J.V.A. Coelho-Augusto, C. Feio, R.N. Dergam, J.A. 2015. The Karyotypes of Five species of the *Scinax perpusillus* group (Amphibia, Anura, Hylidae) of southeastern Brazil show high levels of chromosomal stabilization in this taxon. *Genetics* 143 (6): 729-739.

Seabright, M. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. *The Lancet*, 298(7731), 971-972.

Stanyon, R. e Galleni, L. 1991. A rapid fibroblast culture technique for high resolution karyotypes. *Italian Journal of Zoology*, 58(1), 81-83.

Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental cell research*, 75(1), 304-306.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho desenvolvido nesta dissertação contribuiu para o conhecimento sobre anfíbios anuros, levando a uma maior compreensão sobre o gênero *Scinax*, um grupo taxonomicamente complexo. Os dados obtidos foram comparados com os já publicados para outras espécies de *Scinax*, que apresentaram o mesmo número diplóide $2n=24$ e número fundamental $NF=48$. Quanto às fórmulas cromossômicas encontradas nas espécies de *Scinax* estudadas neste trabalho, as de *Scinax* sp. 6 (cf. *arduous*) e *Scinax* sp. 2 foram iguais: $10m+4sm+10st$. *Scinax insperatus*, *Scinax* sp. 3 (cf. *perpusillus*), *S. arduous* e *S. cosenzai*, também apresentaram a mesma fórmula: $8m+8sm+8st$. Em contrapartida, os espécimes de *S. belloni* analisados neste estudo apresentaram fórmula distinta dos indivíduos de *S. belloni* analisados por Peixoto *et al.* (2015), $10m+10sm+4st$ e $10m+4sm+10st$, respectivamente. *Scinax* sp. 5 (gr. *perpusillus*) e *Scinax* sp. 4 (cf. *cosenzai*) apresentaram fórmula diferente das que já foram descritas para este gênero: $12m+12sm$. E, finalmente, *S. littoreus* apresentou a fórmula igual a $8m+4sm+12st$.

A marcação das regiões organizadoras de nucléolos (AgNOR) nas espécies do grupo de *S. perpusillus* confirmou dados já obtidos para outras espécies do clado *S. catharinae*, no qual as NORs estão presentes no par 6. Novos testes para obtenção dos padrões de bandeamento CBG e GTG devem ser feitos, assim como tentativas de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) a fim de se obter outros caracteres que possam ser incluídos em uma futura filogenia do grupo de *Scinax*.

Enfim, estabeleceu-se também as condições ótimas para a obtenção de culturas primárias de fibroblastos de *Scinax*, que possivelmente fornecerão bons resultados em outros anuros. As preparações cromossômicas obtidas apresentaram quantidade e qualidade superiores do que as obtidas por preparações diretas, facilitando a obtenção de padrões de bandeamento.

ANEXO I

Tabela 1 Dados de espécies de *Scinax* analisadas citogeneticamente, como fórmula cromossômica (FC), bandeamento CBG, marcação das regiões organizadoras de nucléolo com nitrato de prata (AgNOR) e localidade dos exemplares das espécies do gênero *Scinax* que possuem estudo citogenético.

Clado (Grupo)	Espécie	FC	AgNOR (Par)	Bandeamento CBG	Localidade	Referência
S. catharinae (S. catharinae)	<i>S. albicans</i> Bokermann, 1967	10m+4sm+10st	6	Centromérico	Petrópolis (RJ)	Cardozo <i>et al.</i> 2011
	<i>S. argyreornatus</i> Miranda-Ribeiro, 1926	10m+12sm+2st			Ilha do Cardoso (SP) Guarapari (ES)	Nunes e Fagundes, 2008
	<i>S. ariadne</i> Bokermann, 1967	10m+12sm+2st	6	Centromérico	Ilha do Cardoso (SP) São José do Barreiro (SP) Misiones (ARG)	Cardozo <i>et al.</i> 2011
	<i>S. aromothyella</i> Faivovich, 2005	10m+12sm+2st	6	Centromérico e pericentromérico	Trienta y Tres (URU)	Cardozo <i>et al.</i> 2011
	<i>S. berthae</i> Barrio, 1962	10m+12sm+2st	6	Centromérico e pericentromérico	Corrientes (ARG); Misiones(ARG); Itirapina (SP); Rocha (URU)	Cardozo <i>et al.</i> 2011

Reis, LP. CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO SCINAX (ANURA: HYLIDAE)

Tabela 1. Continuação						
	<i>S. brieni</i> De Witte, 1930		5		Sudeste do Brasil	Bogart (1973)
	<i>S. canastrensis</i> Cardoso & Haddad, 1982	12m+12sm	11/6	Centromérico e pericentromérico	Furnas (MG)	Cardozo <i>et al.</i> 2011
	<i>S. catharinae</i> Boulenger, 1888				Sudeste do Brasil	Bogart (1973)
	<i>S. hiemalis</i> Haddad & Pombal, 1987	10m+12sm+2st	6	Centromérico	Jundiaí (SP)	Cardozo <i>et al.</i> 2011
	<i>S. littoralis</i> Pombal & Gordo, 1991	10m+12sm+2st	6	Centromérico e pericentromérico	Ubatuba (SP)	Cardozo <i>et al.</i> 2011
	<i>S. longilineus</i> Lutz, 1968	10m+12sm+2st	6	Centromérico e pericentromérico	Poços De Caldas (MG)	Cardozo <i>et al.</i> 2011
	<i>S. obtriangulatus</i> Lutz, 1973	10m+12sm+2st	6	Centromérico	São José do Barreiro (SP)	Cardozo <i>et al.</i> 2011
	<i>S. rizibilis</i> Bokermann, 1964	10m+12sm+2st	6	Centromérico	Ribeirão Branco (SP)	Cardozo <i>et al.</i> 2011
	<i>S. trapicheiroi</i> Lutz & Lutz, 1954	10m+12sm+2st	6	Centromérico	Ubatuba (SP)	Cardozo <i>et al.</i> 2011
<i>S. catharinae</i> (<i>S. perpusillus</i>)	<i>S. belloni</i> Faivovich, Gasparini & Haddad, 2010	10m+4sm+10st	6	Centromérico	Castelo (ES)	Peixoto <i>et al.</i> 2015
	<i>S. arduous</i> Peixoto, 2002	8m+8sm+8st	6	Centromérico	Santa Teresa (ES)	Peixoto <i>et al.</i> 2015
	<i>S. cosenzai</i> Lacerda,	8m+8sm+8st	6	Centromérico e com	Ervália (ES)	Peixoto <i>et al.</i>

Peixoto & Feio, 2012

marcações terminais nos
braços longos

2015

Reis, LP. CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO SCINAX (ANURA: HYLIDAE)

Tabela 1. Continuação						
	<i>Scinax signatus</i> Lutz, 1968	8m+6sm+10st	6	Centromérico	São Pedro da Serra (RJ)	Peixoto <i>et al.</i> 2015
	<i>Scinax</i> sp.	8m+6sm+10st	6	Centromérico	Procrane (MG)	Peixoto <i>et al.</i> 2015
	<i>Scinax</i> sp. 1 Cardozo, 2011	10m+12sm+2st	6	Centromérico	Parati (RJ)	Cardozo <i>et al.</i> 2011
	<i>Scinax</i> sp. 2 Cardozo, 2011	10m+4sm+10st	6	Centromérico	Ilha do Cardoso (SP)	Cardozo <i>et al.</i> 2011
	<i>Scinax perpusillus</i>				Sudeste do Brasil	Bogart (1973)
S. ruber (S. rostratus)	<i>S. Boulengeri</i> Cope, 1887				Darien (PAN) Herdia (COR)	Duellman (1967)
	<i>S. garbei</i> Miranda-Ribeiro, 1926	16m+8sm	8	Centromérico e terminal	Bragança (PA)	Nogueira <i>et al.</i> 2015 (a)
	<i>S. garbei</i> Miranda-Ribeiro, 1926				Huanuco (PER)	Bogart e Bogart, 1971
	<i>S. rostratus</i> Peters, 1863				Peru	Bogart, 1973
S. ruber (não alocado em nenhum grupo)	<i>S. acuminatus</i> Cope, 1862	14m+10sm	11	Centromérico	Chaco (ARG)	Cardozo <i>et al.</i> 2011
	<i>S. alter</i> Lutz, 1973	16m+8sm	3	Centromérico	Ubatuba (SP)	Cardozo <i>et al.</i> 2011

Reis, LP. CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO SCINAX (ANURA: HYLIDAE)

	S. <i>alter</i> Lutz, 1973	16m+8sm	3	Centromérico	Rancho Queimado (SC)	Cardozo <i>et al.</i> 2011
--	----------------------------	---------	---	--------------	-------------------------	-------------------------------

Reis, LP. CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO SCINAX (ANURA: HYLIDAE)

Tabela 1. Continuação

	<i>S. alter</i> Lutz, 1973	12m+10sm+2st			Santa Teresa (ES)	Nunes e Fagundes (2008)
	<i>S. alter</i> Lutz, 1973	12m+10sm+2st			Guarapari (ES)	Nunes e Fagundes (2008)
	<i>S. alter</i> Lutz, 1973	12m+10sm+2st			Anchieta (ES)	Nunes e Fagundes (2008)
	<i>S. auratus</i> Wied-Neuwied, 1821	16m+8sm	11	Centromérico	Jequié (BA)	Nogueira <i>et al.</i> 2015 (b)
	<i>S. boesemani</i> Goin, 1966	14m+10sm	8	Centromérico e telomérico	Bragança (PA)	Nogueira <i>et al.</i> 2015 (a)
	<i>S. camposseabrai</i> Bokermann, 1968	12m+12sm	11	Centromérico	Maracás (BA)	Nogueira <i>et al.</i> 2015 (a)
	<i>S. curicica</i> Pugliese, Pombal & Sazima, 2004	14m+10sm	11	Centromérico	Serra do Cipó (MG)	Cardozo <i>et al.</i> 2011
	<i>S. duartei</i> Lutz, 1951	16m+8sm	11	Centromérico	Itamonte (MG)	Cardozo <i>et al.</i> 2011
	<i>S. duartei</i> Lutz, 1951	16m+8sm	11	Centromérico	Petrópolis (RJ)	Cardozo <i>et al.</i> 2011
	<i>S. elaeochrous</i> Cope, 1875				Heredia (COR)	Duellman, 1967
	<i>S. eurydice</i> Bokermann, 1968	16m+8sm	11	Centromérico	Jequié (BA)	Nogueira <i>et al.</i> 2015 (b)

Reis, LP. CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO SCINAX (ANURA: HYLIDAE)

Tabela 1. Continuação						
<i>S. eurydice</i> Bokermann, 1968	14m+10sm	11	Centromérico	São José dos Campos (SP)	Cardozo <i>et al.</i> 2011	
<i>S. eurydice</i> Bokermann, 1968	14m+10sm	11	Centromérico	Jundiaí (SP)	Cardozo <i>et al.</i> 2011	
<i>S. funereus</i>				Huánuco (PER)	Duellman, 1967	
<i>S. fuscomarginatus</i> Lutz, 1925	12m+12sm	11	Centromérico	Corrientes (ARG)	Cardozo <i>et al.</i> 2011	
<i>S. fuscovarius</i> Lutz, 1925	12m+12sm	11	Centromérico	Catamarca (ARG)	Cardozo <i>et al.</i> 2011	
<i>S. fuscovarius</i> Lutz, 1925	12m+12sm	11	Centromérico	Jujuy (ARG)	Cardozo <i>et al.</i> 2011	
<i>S. fuscovarius</i> Lutz, 1925	12m+12sm	11	Centromérico	Misiones (ARG)	Cardozo <i>et al.</i> 2011	
<i>S. fuscovarius</i> Lutz, 1925	12m+12sm	11	Centromérico	Condoi (PR)	Cardozo <i>et al.</i> 2011	
<i>S. fuscovarius</i> Lutz, 1925	12m+12sm	11	Centromérico	Salta (ARG)	Cardozo <i>et al.</i> 2011	
<i>S. fuscovarius</i> Lutz, 1925	12m+12sm	11	Centromérico	Socorro (SP)	Cardozo <i>et al.</i> 2011	
<i>S. fuscovarius</i> Lutz, 1925	10m+10sm+4st	12	Centromérico	Rio Claro (SP)	Kasahara <i>et al.</i> 2003	
<i>S. fuscovarius</i> Lutz, 1925	10m+10sm+4st	12	Centromérico	Santa Maria da Serra (SP)	Kasahara <i>et al.</i> 2003	

Reis, LP. CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO SCINAX (ANURA: HYLIDAE)

S. fuscovarius Lutz, 1925

10m+10sm+4st

12

Centromérico

Itatiba (SP)

Kasahara *et al.*
2003

Reis, LP. CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO SCINAX (ANURA: HYLIDAE)

	<i>S. granulatus</i> Peters, 1871	14m+10sm	11	Centromérico	Misiones (ARG)	Cardozo <i>et al.</i> 2011
Tabela 1. Continuação	<i>S. granulatus</i> Peters, 1871	14m+10sm	11	Centromérico	San José (URU)	Cardozo <i>et al.</i> 2011
	<i>S. hayii</i> Barbour, 1909	14m+10sm	11	Centromérico	Camanducaia (MG)	Cardozo <i>et al.</i> 2011
	<i>S. hayii</i> Barbour, 1909	14m+10sm	11	Centromérico	Campos do Jordão (SP)	Cardozo <i>et al.</i> 2011
	<i>S. nasicus</i> Cope, 1862	12m+12sm	11	Centromérico	Misiones (ARG)	Cardozo <i>et al.</i> 2011
	<i>S. nasicus</i> Cope, 1862	12m+12sm	11	Centromérico	Salta (ARG)	Cardozo <i>et al.</i> 2011
	<i>S. nasicus</i> Cope, 1862	12m+12sm	11	Centromérico	Santa Fe (ARG)	Cardozo <i>et al.</i> 2011
	<i>S. nasicus</i> Cope, 1862	12m+12sm	11	Centromérico	Santiago Del Estero (ARG)	Cardozo <i>et al.</i> 2011
	<i>S. pachycrus</i> Miranda-Ribeiro, 1937	16m+8sm	11	Centromérico e terminal	Jequié (BA)	Nogueira <i>et al.</i> 2015 (a)

Reis, LP. CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO SCINAX (ANURA: HYLIDAE)

	<i>S. perereca</i> Pombal, Haddad & Kasahara, 1995	12m+12sm	11	Centromérico	Misiones (ARG)	Cardozo <i>et al.</i> 2011
	<i>S. perereca</i> Pombal, Haddad & Kasahara, 1995	12m+12sm	11	Centromérico	Ribeirão Branco (SP)	Cardozo <i>et al.</i> 2011
	<i>S. similis</i> Cochran, 1952	12m+12sm	11	Centromérico	Corrientes (ARG)	Cardozo <i>et al.</i> 2011

Tabela 1. Continuação

	<i>S. similis</i> Cochran, 1952	12m+12sm	11	Centromérico	Misiones (ARG)	Cardozo <i>et al.</i> 2011
	<i>S. squalirostris</i> Lutz, 1925	12m+12sm	11	Centromérico	Misiones (ARG)	Cardozo <i>et al.</i> 2011
	<i>S. squalirostris</i> Lutz, 1925	12m+12sm	11	Centromérico	Itirapina (SP)	Cardozo <i>et al.</i> 2011
	<i>S. x-signatus</i> Spix, 1824	12m+12sm	11	Centromérico e terminal	Bragança (PA)	Nogueira <i>et al.</i> 2015 (a)
	<i>S. x-signatus</i> Spix, 1824	12m+12sm	11		Jequié (BA)	Nogueira <i>et al.</i> 2015 (a)
<i>S. ruber</i> (<i>S. uruguayus</i>)	<i>S. uruguayus</i> Schmidt, 1944	12m+12sm	11	Centromérico	Treinta y Tres (URU)	Cardozo <i>et al.</i> 2011

m-metacêntrico; sm-submetacêntrico; st-subtelocêntrico

ANEXO II

Preparação direta

Técnica descrita por Schmid (1978), com modificações:

- Injetar intraperitonealmente colchicina a 0,1% ou 1% aquosa (0,10 mL por grama de peso do animal);
- Após um período entre 4 e 16 horas, sacrificar o animal com Lidocaína a 5%;
- Remover o intestino e os testículos;
- Colocá-los em KCl a 0,9% por 15 minutos. Se o testículo for grande, dividi-lo em partes;
- Transferi-los para o fixador (metanol-ácido acético - 3:1) e picotar (dilacerar) ao máximo com o auxílio de um bisturi;
- Fixar em Metanol: Ácido Acético 3:1 por 10 minutos e homogeneizar a suspensão por 5 minutos;
- Centrifugar a 800 rpm por 5 minutos;
- Descartar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em fixador. Repetir este procedimento duas vezes e armazenar a suspensão celular resultante a -20°C.
- Corar as lâminas com uma solução de corante Giemsa diluído a 5% em tampão fosfato pH 6,8 à temperatura ambiente por 10 minutos;
- Lavar bem as lâminas com água destilada e deixar secar.

Coloração das Regiões Organizadoras de Nucléolos pelo Nitrato de Prata

(AgNOR)

Foi utilizada a técnica de Howell e Black (1980), com modificações:

- Proceder à hidrólise, incubando a lâmina numa solução de HCl 1N a 60°C por 5 minutos. Lavar a lâmina com água destilada e deixá-la secar à temperatura ambiente;
- Pingar na lâmina uma gota de solução a 50% de nitrato de prata e duas gotas de gelatina. Cobrir com lamínula;
- Incubar a lâmina em câmara úmida a 60°C por cerca de 7 minutos (ou até adquirir cor caramelo). Lavar com água destilada;
- Corar com uma solução de Giemsa a 5% por 30 segundos. Lavar com água destilada.

Bandeamento CBG

Foi utilizada a técnica descrita por Sumner (1972), com modificações:

- Incubar as lâminas em numa solução de 2xSSC pH 7,0 a 60°C por 10 minutos.
- Hidrolisar as preparações cromossômicas em uma solução de HCl 0,2N por 10 minutos à temperatura ambiente. Lavar com água destilada;
- Mergulhar as lâminas numa solução de hidróxido de bário a 1% a 60° C por 25 segundos. Lavar com água destilada;
- Passar as lâminas por uma solução de HCL 1N a 60° C. Lavar com água destilada;
- Incubar as lâminas em numa solução de 2xSSC pH 7,0 a 60°C por 15 minutos. Lavar com água destilada e corar com Giemsa a 5% por 30 minutos.

Coloração com DAPI

- Pingar na lâmina 10µL de DAPI (0,8 ng/mL) em Slowfade (Invitrogen) após o processamento com bário para bandeamento CBG;
- Cobrir com lamínula e proteger da luminosidade.

Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) com sonda telomérica

- Passar as lâminas em ácido acético a 50% por 10 minutos, em temperatura ambiente;
- Passar as lâminas em etanol 100% por 3 minutos, em temperatura ambiente;
- Passar as lâminas em solução PBS por 5 minutos e repetir (temperatura ambiente);
- As lâminas passam por uma série alcoólica de 70%, 90% e 100%, 3 minutos cada;
- Esperar secar;
- Para desnaturaçãõ, passar as lâminas em formamida a 70%, a 75°C, por 90 a 120 segundos;
- Passar novamente por série alcoólica de 70%, 90% e 100%, 3 minutos cada;
- Esperar secar;
- Pingar na lâmina 8µl de sonda telomérica e 5µl de meio de hibridaçãõ e cobrir com lamínula.

Deixar por dois dias em um câmara úmida em uma estufa a 37°C.

Após dois dias, inicia-se o processo de lavagem:

- Passar as lâminas em solução 2xSSC, a 37°C, por 5 minutos;
- Passar as lâminas em solução PBT, a 37°C, por 5 minutos;

- Adicionar 180µl de anticorpo biotina em câmara úmida e fechar com parafilme. Levar câmara úmida para estufa a 37°C, por 45 minutos;
- Deixar as lâminas por 5 minutos em PBT, a temperatura ambiente. Repetir;
- Lavar lâminas com PBS;
- Pingar 15µl de DAPI na lâmina e cobrir com lamínula. Proteger da luz.

Bandeamento GTG

Técnica descrita por Seabright (1971), com modificações:

- Tratar as lâminas com 2xSSC a 60°C por 7 minutos;
- Mergulhar as lâminas em solução de tripsina (0,05% em tampão Dulbecco, pH 7,0) por 7-14 segundos, lavar com água destilada e deixar secar;
- Corar o material com Giemsa 2%, em tampão fosfato por dois minutos;
- Lavar com água destilada e deixar secar.