

KÉSSIA LEITE DE SOUZA

**ANÁLISE CITOGENÉTICA COMPARATIVA DE TRÊS SUBFAMÍLIAS DE
HILÍDEOS (AMPHIBIA: ANURA) DO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S729a Souza, Késsia Leite de, 1994-
2019 Análise citogenética comparativa de três subfamílias de
hilídeos (Amphibia: Anura) do Estado de Minas Gerais / Késsia
Leite de Souza. – Viçosa, MG, 2019.
viii, 59 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Texto em português e inglês.

Inclui apêndice.

Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Hylidae. 2. Microssatélites (Genética). 3. Citogenética.
4. Cromossomos. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Animal. Programa de Pós-Graduação
em Biologia Animal. II. Título.

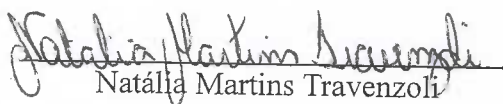
CDD 22. ed. 597.878

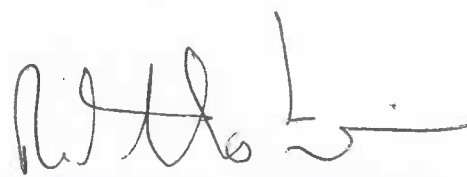
KÉSSIA LEITE DE SOUZA

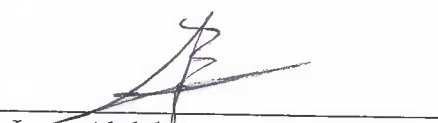
**ANÁLISE CITOGENÉTICA COMPARATIVA DE TRÊS SUBFAMÍLIAS DE
HILÍDEOS (AMPHIBIA: ANURA) DO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 22 de março de 2019.


Natália Martins Travenzoli


Renato Neves Feio
(Coorientador)


Jorge Abdala Dergam dos Santos
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me iluminado e me guiado durante esse caminho.

Aos meus pais, pelo carinho, acolhimento, cuidado e amor. Ao meu pai Paulo César, pelas palavras que me levantam e incentivam a todo o momento, você é fantástico homem! A minha mãe Ediana, pelo cuidado comigo, pelos diálogos de hora e pelo exemplo de amor próprio, mulher você é incrível! Sei que esses dois anos não foram fáceis para nossa família mas mesmo longe vocês foram às luzes que me guiaram até aqui!

Ao meu Igor, pelas palavras de luta, ensinamento e amizade. Nós resitiremos!

Ao meu namorado Alex pelos momentos de carinho, risadas que tiram a tristeza, paciência, aprendizado, cumplicidade e amor.

As pessoas da minha família que torceram por mim, muito obrigada!

Aos meus amigos que estão trilhando seus caminhos cheios de luz, em especial, Cynthia, Magrela, Silvana, Cristhian, Sanelly e Bisonho pelas risadas, muitos protocolos de FISH do sucesso, conversas no Beagle velho e novo, pelos momentos inesquecíveis e saudades eternas de vocês.

Aos meus amigos da BIO 12 que mesmo nos afastando vocês ainda são parte importante da minha vida.

Ao Marquito que mesmo depois de largar a citogenética ainda continuou auxiliando em tudo que precisasse, corrigindo textos, ajudando nas taxonomias, nos programas, e que por vezes foi um orientador e por outras um amigo querido que sempre vai ter um lugar cativo no meu coração. Te admiro muito!

Ao Beagle, pelas pessoas incríveis que conheci, continuo conhecendo e que virou uma verdadeira casa pra mim. Seja aprendendo sobre química analítica com a Simone, ou como consertar um destilador com o Bruno, passando por compreender sobre PCR com a Manu. Aos outros tripulantes a bordo, Lorene, Mariane, Lucas, Priscila, Victor, Igor, Cidmar, Larissa, Roberta, Karine compartilhar momentos diários por vezes mudaram o meu dia! A Natália Travenzoli, pelo incentivo e disposição nessa fase final, sua dedicação por aquilo que faz é lindo de se ver!

Ao MZUFV, lá conheci herpetólogos, mastozoólogos, ornitólogos que me fez admirar cada vez mais a profissão de biólogo. Em especial, ao Clodoaldo que sempre que ia pra campo trazia minhas encomendas saltantes, você foi essencial para esse trabalho. A Sofia, também pelas coletas e meiguice adorável. Ao Jhonny, por ser esse ser estranho que marca a gente e leva sempre uma palavra agradável ou de incentivo. As minhas queridas mastocitogeneticistas, Bianca e Fernanda pelo carinho!

Ao Renatão, que com um sorriso dos outros sempre traz felicidade e tira aquela dúvida de identificação sem nem piscar, você me fez amar a biologia animal desde o início da graduação!

Ao capitão Jorge, que comanda o Beagle a base de gargalhadas inconfundíveis e que com sua força, responsabilidade e esforço, transformou o laboratório em um laboratório de ponta. Nunca vou esquecer que mesmo sem me conhecer direito, você apostou em mim e sempre me apoiou com as pererecas, serei pra sempre grata pela oportunidade!

A Universidade Federal de Viçosa por me proporcionar conhecer profissionais maravilhosas e os ensinamentos diários.

Aos órgãos de fomento (CAPES e CNPq) pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO GERAL	1
ARTIGO I	10
ARTIGO II	47
CONCLUSÕES FINAIS.....	59

RESUMO

SOUZA, Késsia Leite, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2019. **Análise citogenética comparativa de três subfamílias de hilídeos (Amphibia: Anura) do Estado de Minas Gerais.** Orientador: Jorge Abdala Dergam. Coorientador: Renato Neves Feio.

Estudos citogenéticos com os gêneros *Aplastodiscus*, *Boana*, *Bokermannohyla*, *Ololygon*, *Scinax* e *Dendropsophus* envolvem a descrição de cariótipo explorando técnicas clássicas, como coloração convencional, banda-C, bandamento com fluorocromos (DAPI/CMA₃), NOR e técnicas moleculares, como o FISH com sondas teloméricas, sondas específicas, de rDNA 18S e poucos utilizando microssatélites. O objetivo desse estudo é a descrição do cariótipo de oito espécies ainda não cariotipadas, sendo essas: *Aplastodiscus cavicola*, *A. weygoldti*, *Aplastodiscus* sp. 4, *Aplastodiscus* sp. 6, *Bokermannohyla ibitipoca*, *Ololygon luizotavioi*, *Dendropsophus bipunctatus* e *D. ruschii*, identificação de NORs e o mapeamento físico dos microssatélites CA₍₁₅₎ e CAT₍₁₀₎, afim de inferir sobre a evolução cromossômica nas subfamílias Cophomantinae, Scinaxinae e Dendropsophinae. O número diploide $2n = 18$ cromossomos, assim como a marcação da NORs no par cromossômico 9, foi encontrado para *Aplastodiscus cavicola*, *Aplastodiscus* sp. 4 sendo que ambas tiveram fórmulas cariotípicas $6m+12sm$, ao passo que *Aplastodiscus* sp. 6 $4m+10sm+2st$, em oposição *A. weygoldti* mostrou $2n = 22$ cromossomos classificados em $14m+6sm+2st$ e a NOR evidenciada no par de cromossomos 6. Enquanto, as espécies *Bokermannohyla ibitipoca* e *Ololygon luizotavioi* apresentaram $2n = 24$ cromossomos, sendo suas fórmulas cariotípicas e marcações de NORs: $20m+2sm+2st$ / NOR: par cromossômico 12 e $8m+12sm+4st$ / NOR: par cromossômico 9, respectivamente. Enquanto as espécies com $2n = 30$ cromossomos, *Dendropsophus bipunctatus* e *D. ruschii* tiveram $12m+12sm+4st+2t$ e $10m+10sm+6st+4t$, nessa ordem e NORs no par de homólogos 13. Os microssatélites CA₍₁₅₎ e CAT₍₁₀₎ marcaram em blocos nas regiões centroméricas, pericentroméricas e terminais dos cromossomos em todas as espécies analisadas, sendo tais marcações pontuais nos cariótipos de algumas espécies, e em outras as marcações apresentaram-se dispersas ao longo dos cromossomos. Esses resultados demonstraram que esses microssatélites são marcadores para algumas espécies, como por exemplo, em *D. elegans*, *O. carnevalli* e *Boa. pardalis*, o que propiciou o entendimento de possíveis rearranjos cromossômicos. A inclusão de novos cariótipos em *Aplastodiscus* permitiu uma melhor caracterização dos números diploides e a visualização de um novo evento

de fissão cromossômica no gênero de $2n=18$ para $2n=22$ cromossomos. Desse modo, nosso estudo ampliou o conhecimento sobre a evolução cromossômica em Hylidae, compreendendo melhor as particularidades cariotípicas de cada espécie analisada devido a utilização de mais ferramentas citogenéticas.

ABSTRACT

SOUZA, Késsia Leite, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2019. **Comparative cytogenetic analysis of three hylid subfamilies (Amphibia: Anura) from the State of Minas Gerais.** Adviser: Jorge Abdala Dergam. Co-adviser: Renato Neves Feio.

Cytogenetic studies with the genera *Aplastodiscus*, *Boana*, *Bokermannohyla*, *Ololygon*, *Scinax* and *Dendropsophus* involve the description of karyotype exploring classical techniques such as conventional staining, C-band, fluorochrome banding (DAPI / CMA₃), NOR and molecular techniques such as FISH with telomeric probes, 18S rDNA probes, and a few using microsatellites. The objective of this study is to describe the karyotype of eight species not yet karyotyped, such as: *Aplastodiscus cavicola*, *A. weygoldti*, *Aplastodiscus* sp. 4, *Aplastodiscus* sp. 6, *Bokermannohyla ibitipoca*, *Ololygon luizotavioi*, *Dendropsophus bipunctatus* and *D. ruschii*, identification of NORs and physical mapping of the microsatellites CA₍₁₅₎ and CAT₍₁₀₎, in order to infer chromosome evolution in the subfamilies Cophomantinae, Scinaxinae and Dendropsophinae. The diploid number $2n=18$ chromosomes, as well as the NORs marking on the chromosomal pair 9, was found for *Aplastodiscus cavicola*, *Aplastodiscus* sp. 4 being both had karyotypic formula $6m+12sm$, whereas *Aplastodiscus* sp. 6 had karyotypic formula $4m+10sm+2st$. In opposition, *A. weygoldti* showed $2n=22$ chromosomes classified in $14m+6sm+2st$ and the NOR showed in the pair of chromosomes 6. Meanwhile, the species *Bokermannohyla ibitipoca* and *Ololygon luizotavioi* presented $2n=24$ chromosomes, its karyotype formulas and NORs markers: $20m+2sm+2st$ /NOR: chromosomal pair 12 and $8m+12sm+4st$ /NOR: chromosomal pair 9, respectively. While species with $2n=30$ chromosomes, *Dendropsophus bipunctatus* and *D. ruschii* had $12m+12sm+4st+2t$ and $10m+10sm+6st+4t$, in that order and NORs in the pair of homologues 13. The microsatellites CA₍₁₅₎ and CAT₍₁₀₎ marked in blocks in the centromeric, pericentromeric and terminal regions of the chromosomes in all species analyzed, being such punctual markings in the karyotypes of some species, and in others the markings were scattered along the chromosomes. These results demonstrated that these microsatellites are markers for some species, as for example, in *D. elegans*, *O. carnevalli* and *Boa pardalis*, which allowed the understanding of possible chromosomal rearrangements. The inclusion of new karyotypes in *Aplastodiscus* allowed a better characterization of the diploid numbers and the visualization of a new event of chromosome fission in the

genus of $2n=18$ for $2n=22$ chromosomes. Thus, our study increased the knowledge about chromosome evolution in Hylidae, better understanding the karyotypic peculiarities of each species analyzed due to the use of more cytogenetic tools.

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Conhecendo a taxonomia e habitat:

A classe Amphibia é representada por 7961 espécies descritas de anfíbios, dessa fauna conhecida 1080 espécies ocorrem dentro das fronteiras do Brasil, sendo essas majoritariamente da Ordem Anura, com 1039 espécies apontando o país como o mais biodiverso na riqueza de anfíbios anuros (Segalla et al., 2016; Frost, 2019)

Os hilídeos conhecidos como ‘tree-frogs’ ou pererecas, são animais que se distinguem pela presença de discos adesivos nos dedos e comportamento principalmente arborícola (Pough et al., 2008). A família Hylidae ainda se destaca por ser a mais diversa com 718 espécies descritas, distribuídas em 49 gêneros e sete subfamílias, sendo elas: Acridinae, Hylinae, Pseudinae, Dendropsophinae, Lophohylineae, Scinaxinae e Cophomantinae (Fig. 1) (Duellman et al., 2016). A distribuição desses animais é cosmopolita, habitando as Américas, a região Australo-Papua, ocorrendo também na Europa, extremo norte da África, oeste e leste da Ásia, e no Arquipélago Japonês (Frost, 2019).

A taxonomia e a sistemática ainda são controversas devido à riqueza de espécies e a ampla distribuição geográfica das subfamílias, portanto estudos de revisões filogenéticas buscam investigar o monofiletismo e a validação das espécies que as compõem (Faivovich et al., 2005; Wiens et al., 2005). A título de exemplo, durante mais de 150 anos, o gênero *Hyla* Laurenti, 1768 alocava a maioria das espécies de pererecas da Eurásia, das Américas e da região Australo-Papua, devido a esses trabalhos que levaram em consideração caracteres moleculares, morfológicos e até citogenéticos, mais de 10 gêneros novos foram reconhecidos ou revalidados, dentre eles *Bokermannohyla* Faivovich, Haddad, Garcia, Frost, Campbell, e Wheeler, 2005; *Boana* Gray, 1825; *Dendropsophus* Fitzinger, 1843; *Ololygon* Fitzinger, 1843; e *Scinax* Wagler, 1830, que serão abordadas nesse estudo (Fig. 2) (Faivovich et al., 2005; Wiens et al., 2005; Duellman et al., 2016).

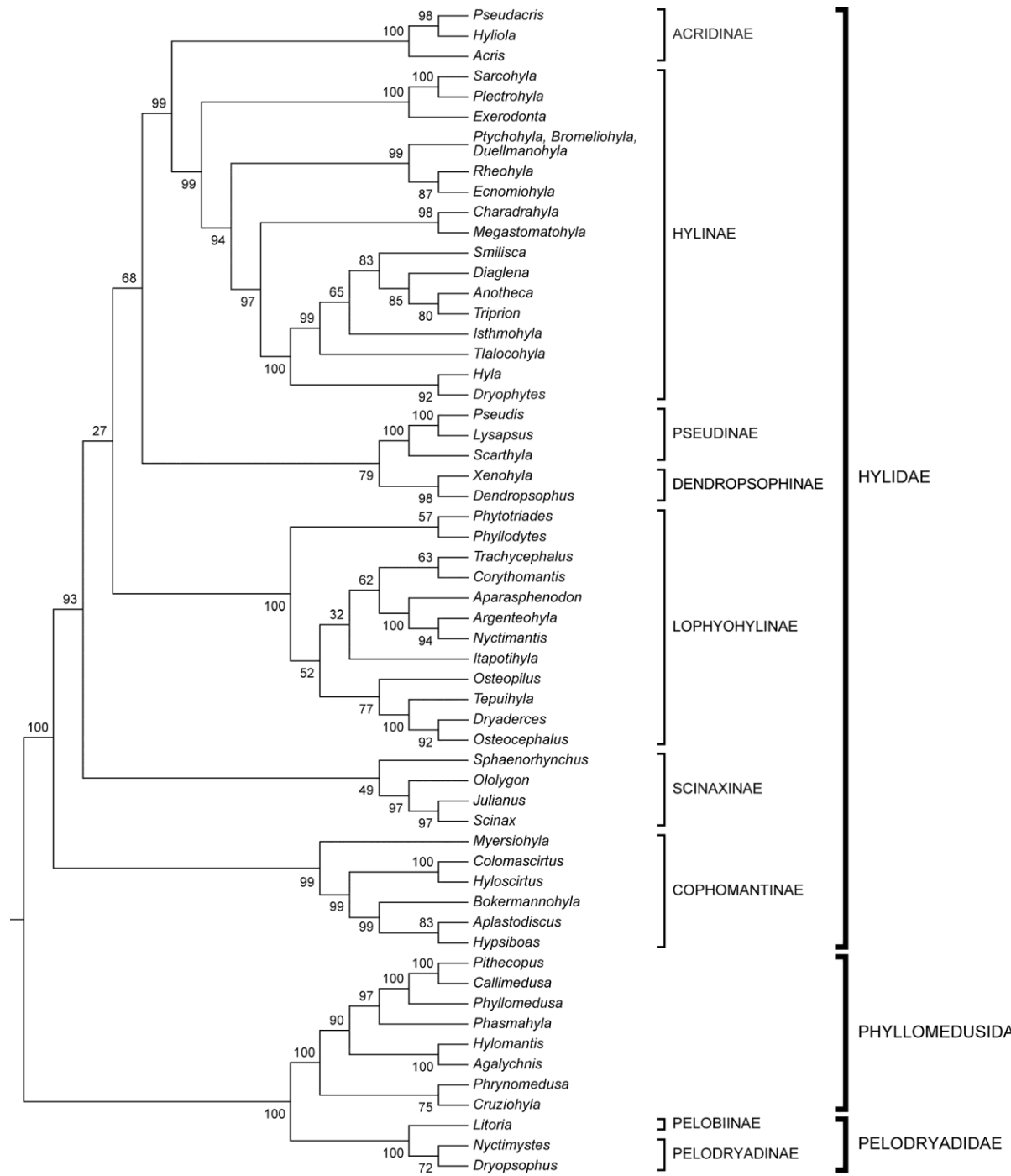


Fig. 1: Filogenia da família Hylidae proposta por Duellman et al., 2016.

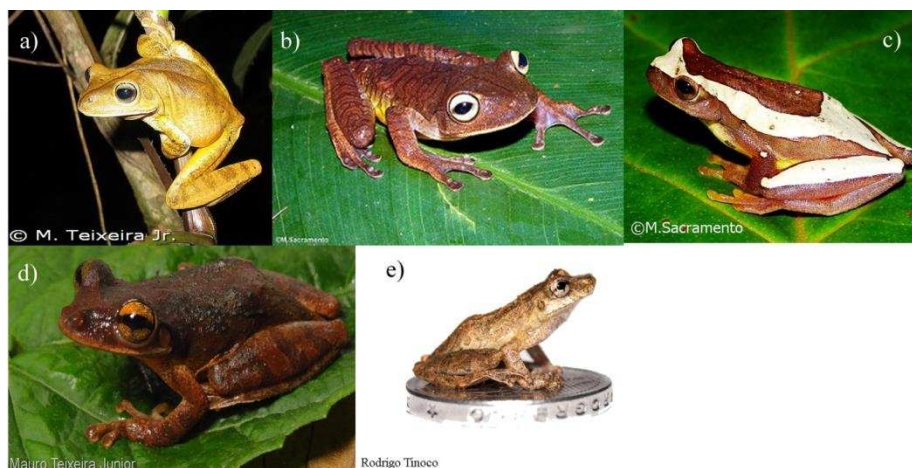


Fig. 2: Imagens das espécies: (a) *Boana faber*, (b) *Bokermannohyla luctuosa*, (c) *Dendropsophus elegans*, (d) *Scinax eurydice* e (e) *Ololygon luizotavioi*. Fonte: AmphibiaWeb¹ e Herpeto.org²

1.2 Citogenética de anuros:

Os estudos com citogenética de anfíbios iniciaram na década de 60 com descrições simples das morfologias cromossômicas e números diploides, sem classificações objetivas para fins taxonômicos (Duellman, 1967; Beçak, 1968; Rabello, 1970). A partir desses estudos preliminares apareceram novas técnicas que permitiram a caracterização de regiões cromossômicas que auxiliaram no entendimento das relações filogenéticas entre os anuros, tal como os mecanismos evolutivos envolvidos nos processos de diferenciação cariotípica (Catroli e Kasahara, 2009).

Dentre essas técnicas estão bandamento C, que propicia a identificação de regiões heterocromáticas, bandamentos obtidos com enzimas de restrição como a bromodeoxiuridina (BrdU) que facilita a identificação de graus de bandamento para fins comparativos, a técnica de Ag-NOR que permite identificar as regiões organizadoras de nucléolos, bandamento com coloração de fluorocromos (DAPI/CMA₃) que evidenciam regiões com riqueza de adenina e timina (AT) ou de citosina e guanina (CG) e a hibridização *in situ* que possibilita o mapeamento de sítios ribossomais, assim como de sequências de DNA repetitivo, que facilita uma melhor caracterização da constituição dos cromossomos (Lourenço, 1996). Contudo, a maioria dessas técnicas citogenéticas se restringe a padrões de marcações ao longo dos braços dos cromossomos que de certa

¹ Disponível em: <<https://amphibiaweb.org/>>

² Disponível em: <<http://herpeto.org/>>

forma limita entendimento da evolução cromossômica das espécies (Martins et al., 2011).

1.3 Citogenética clássica:

Estudos citogenéticos com Hylidae mostram que majoritariamente o número diploide é $2n= 24$ cromossomos, como visto nos gêneros *Bokermannohyla*, *Boana*, *Scinax* e *Oololygon* sendo uma característica marcante e sugerida como uma possível sinapomorfia da família (Faivovich et al., 2005). Apesar disso, números diploides maiores ou menores já foram encontrados como $2n= 18$ cromossomos em *Aplastodiscus leucopgygius* (Cruz and Peixoto, 1985) e $2n= 30$ cromossomos, no gênero *Dendropsophus* (Medeiros et al., 2006; Carvalho et al., 2009a; Carvalho et al., 2009b; Gruber et al., 2012; Medeiros et al., 2013; Suárez et al., 2013, Oliveira et al., 2016; Teixeira et al., 2016). Por outro lado, as fórmulas cariotípicas apresentam uma grande variabilidade entre as espécies de um mesmo gênero. Nos gêneros analisados nesse estudo, podemos perceber que a presença de cromossomos telocêntricos é uma característica marcante do gênero *Dendropsophus* (Gruber et al., 2005; Medeiros et al., 2013; Suárez et al., 2013).

Nas subfamílias Cophomantinae, Dendropsophinae e Scinaxinae, uma das técnicas empregadas é o bandamento C que marca predominantemente blocos heterocromáticos na região do centrômero, podendo ocorrer também nas regiões intersticiais e terminais como em *Scinax pachycrus* (Miranda-Ribeiro, 1937) e *Dendropsophus marmoratus* (Laurenti, 1768) (Tabela 1, material suplementar) (Gruber et al., 2012; Suárez et al., 2013; Peixoto et al., 2015; Nogueira 2015). Essas análises permitiram concluir que a quantidade de heterocromatina constitutiva é pequena nos cromossomos de anuros (Lourenço et al., 1996 e Schmid, 1978).

Em adição, as regiões organizadoras de nucléolos (NORs) também são utilizadas para caracterizar os cariótipos, e geralmente são mais estáveis e conservadas por marcarem predominantemente um único par de cromossomos e/ou o mesmo par cromossômico em diferentes espécies de um mesmo grupo, mas com algumas exceções (Peixoto et al., 2015; Oliveira et al., 2016; Ferro et al., 2018). E.g.: espécies do clado *Scinax catharinae* apresentam na maioria, marcações no par cromossômico 6, enquanto as espécies do clado *Scinax ruber* mostram marcações nos pares cromossômicos 11 (Tabela 1, material suplementar) (Catroli et al., 2011, Peixoto et al., 2015).

1.4 Citogenética molecular:

O principal avanço da citogenética ocorreu nas últimas duas décadas, iniciando a “era da citogenética molecular” com os métodos de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) que proporcionou a detecção de sequências de DNA nos cromossomos a partir de fragmentos de DNA, chamadas de sondas (Martins et al., 2011). Dessa forma, a informação molecular das sequências de DNA se integrou a localização física das mesmas nos cromossomos e nos genomas (Martins et al., 2011).

O genoma de eucariotos tem como característica comum uma grande quantidade de sequências repetitivas, podendo compor cerca de 80% do conteúdo genômico. Apesar de serem chamadas de “DNA lixo” ou sequências não codificantes, essas sequências são reconhecidas por sua alta variabilidade e por serem bons marcadores cromossômicos para estudos de estrutura e função, identificação de rearranjos nos cromossomos, evolução, cromossomos supranumerários e cromossomos sexuais (Martins et al., 2011).

As sequências de DNA repetitivos *in tandem* podem ser classificadas de acordo com o seu tamanho em: minissatélites (1 a 6 bp), microsatélite (10 a 100 bp) e satélite (100 a 300pb), e que podem ocorrer em todo cromossomo, nos centrômeros e telômeros, em braços específicos ou dispersos ao longo de todo cromossomo (Martins et al., 2011) (Fig. 3).

Estudos com sequências repetitivas ajudam a elucidar possíveis rearranjos cromossômicos, entre espécies do mesmo gênero e na diferenciação de cromossomos sexuais em diversos grupos (Matsubara et al., 2006; Pokorná et al., 2011; Conde-Saldaña et al., 2017; Conde-Saldaña et al., 2018). Em hilídeos, estudos com utilizando a técnica de FISH são restritos a sondas teloméricas, rDNA, e sondas específicas, enquanto estudos com sondas de microsatélites são escassos sendo reportado duas vezes no gênero *Scinax* (Peixoto et al., 2015; Peixoto et al., 2016).

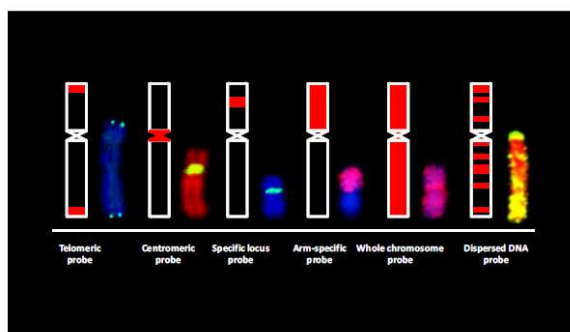


Fig. 3: Principais padrões de marcações com sondas de sequências de DNA repetitivo. Fonte: Martins et al., 2011.

Portanto, tendo em vista a importância da citogenética na compreensão de como da evolução cromossômica nas subfamílias Cophomantinae, Dendropsophinae e Scinaxinae, os objetivos desse estudo são: 1) descrever pela primeira vez, os cariótipos das espécies *Bokermannohyla ibitipoca*, *Ololygon luizotavioi*, *Dendropsophus bipunctatus* e *Dendropsophus ruschii*; 2) identificar o padrão dos sítios de marcação das regiões organizadoras de nucléolos; 3) identificar e comparar os padrões de distribuição das sondas de microssatélites através da técnica de FISH com as sondas CA₍₁₅₎ e CAT₍₁₀₎ nas diferentes subfamílias Cophomantinae, Dendropsophinae e Scinaxinae; 5) compreender a relação filogenética proposta a partir dos dados citogenéticos obtidos, a fim de inferir sobre a evolução cromossômica nas subfamílias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beçak ML: Chromosomal Analysis of Eighteen Species of Anura. *Caryologia*;21: 191-208 (1968)
- Carvalho KA, Garcia PCA, Recco-Pimentel SM: NOR dispersion, telomeric sequence detection in centromeric regions and meiotic multivalent configurations in species of the *aplastodiscus albofrenatus* group (Anura, Hylidae). *Cytogenet Genome Res*;126:359–367 (2010a).
- Carvalho CA, Garcia PC, Recco-Pimentel SM: Cytogenetic comparison of tree frogs of the genus *Aplastodiscus* and the *Hypsiboas faber* group (Anura, Hylidae). *Genet Mol Res*;8:1498–1508 (2009b).
- Catrolí GF, Kasahara S: Cytogenetic data on species of the family Hylidae (Amphibia: Anura): results and perspectives. *Publ UEPG Ciencias Biol e da Saude* 1:067–086 (2009).

Catrolí GF, Faivovich J, Haddad CFB, Kasahara S: Conserved Karyotypes in Cophomantini: Cytogenetic Analysis of 12 Species from 3 Species Groups of *Bokermannohyla* (Amphibia: Anura: Hylidae). *J Herpetol*;45:120–128 (2011).

Conde-Saldaña CC, Barreto CAV, Villa-Navarro FA, Dergam JA: An Unusual Accumulation of Ribosomal Multigene Families and Microsatellite DNAs in the XX/XY Sex Chromosome System in the Trans-Andean Catfish *Pimelodella* cf. *chagresi* (Siluriformes:Heptapteridae) . *Zebrafish*;15:55–62 (2017).

Conde-Saldaña CC, Cunha MS, Barreto CAV, Albornoz-Garzón JG, Ibagón N, Villa-Navarro FA, et al.: Karyotypic Divergence of Two Co-Occurring Species of Andean Climbing Catfishes (Siluriformes: Loricarioidei: Astroblepidae). *Zebrafish*;16:106–114 (2018).

Duellman WE: Additional Studies of Chromosomes of Anuran Amphibians. *Systematic Zoology*; 16:38–43 (1967).

Duellman WE, Marion AB, Hedges SB: Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). *Zootaxa*; 4104:001-109 (2016).

Faivovich J, Haddad CFB, Garcia PCA, Frost DR, Campbell JA, Wheeler WC: Systematic Review of the Frog Family Hylidae, With Special Reference To Hylinae: Phylogenetic Analysis and Taxonomic Revision. *Bull Am Museum Nat Hist*; 11:10-2 (2005).

Ferro JM, Cardozo DE, Suárez P, Boeris JM, Blasco-Zúñiga A, Barbero G, et al.: Chromosome evolution in Cophomantini (Amphibia, Anura, Hylinae). *Plos One*;13:1-29 (2018).

Ferro JM, Cardozo DE, Suaárez P, Boeris JM, Blasco-Zuñiga A, Barbero G, et al. Chromosome evolution in Cophomantini (Amphibia, Anura, Hylinae). *PLoS ONE*;13: 1-29 (2018).

Frost DR. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0. American Museum of Natural History, New York, USA. <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html> (Acesso em 17 de Março 2019).

Gruber SL, Zina J, Narimatsu H, Fernando C, Haddad B, Kasahara S: Comparative karyotype analysis and chromosome evolution in the genus *Aplastodiscus*. *Folia Biol*; 51:68-75 (2012).

Lourenço LB: Estudo citogenético comparativo de *Edalorhina perezii* e *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). Dissertação de Mestrado (p.

100p). Campinas: Universidade Estadual de Campinas (1996).

Martins C, Cabral-de-Mello DC, Valente GT, Mazzuchelli J, Oliveira SG De: Cytogenetic Mapping and Contribution to the Knowledge of Animal Genomes Chromosomes as a Tool for Understanding. in *Advances in Genetics Research*, K. V. Urbano, Ed., p. 82, Nova Science Publishers, New York, NY, USA (2010).

Matsubara K, Tarui H, Toriba M, Yamada K, Nishida-Umehara C, Agata K, et al.: Evidence for different origin of sex chromosomes in snakes, birds, and mammals and step-wise differentiation of snake sex chromosomes. *Proc Natl Acad Sci*;103:18190–18195 (2006).

Medeiros LR, Rossa-Feres DC, Jim J, Recco-Pimentel SM: B-chromosomes in two Brazilian populations of *Dendropsophus nanus* (Anura, Hylidae). *Genet Mol Biol*; 29:257–262 (2006).

Medeiros LR, Lourenço LB, Rossa-Feres DC, Lima AP, Andrade GV, Giaretta AA, et al.: Comparative cytogenetic analysis of some species of the *Dendropsophus microcephalus* group (Anura, Hylidae) in the light of phylogenetic inferences. *BMC Genet*;14:59 (2013).

Nogueira L, Zanoni JB, Solé M, De Mello Affonso PRA, Siqueira S, Sampaio I: Cytogenetic studies in six species of *Scinax* (Anura, Hylidae) clade *Scinax ruber* from northern and northeastern Brazil. *Genet Mol Biol*;38:156–161 (2015).

Oliveira IS, Bueno Noleto R, Karlokoski Cunha de Oliveira A, Toledo LF, Cestari M: Comparative cytogenetic analysis of four species of *Dendropsophus* (Hylinae) from the Brazilian Atlantic forest. *J Genet*;95:349–355 (2016).

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

Peixoto MAA, Oliveira MPC, Feio RN, Dergam JA: Karyological study of *Ololygon tripui* (Lourenço, Nascimento and Pires, 2009), (Anura, Hylidae) with comments on chromosomal traits among populations. *Comp Cytogenet*;10:505–516 (2016).

Pokorná M, Kratochvíl L, Kejnovský E: Microsatellite distribution on sex chromosomes at different stages of heteromorphism and heterochromatinization in two lizard species (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*). *BMC Genetics*;12:90 (2011).

Pough FH, Janis CM, Heiser JB: A vida dos vertebrados. 4ª edição, p. 228, Ed.

Atheneu, São Paulo (2008).

Rabello MN: Chromosomal studies in brazilian anurans. *Caryologia*;23:45–59 (1970).

Schmid M. Chromosome Banding in Amphibia I. Constitutive Heterochromatin and Nucleolus Organizer Regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma*;66:361-88 (1978).

Segalla MV, Caramaschi U, Cruz CAG, Grant T, Haddad CFB, Garcia PCA, Berneck BVM, Langone JA: Brazilian Amphibians: List of Species. *Herpeto Brasil*;5:34-46 (2016).

Suárez P, Cardozo D, Baldo D, Pereyra MO, Faivovich J, Orrico VGD, et al.: Chromosome evolution in Dendropsophini (Amphibia, Anura, Hyalinae). *Cytogenet Genome Res*;141:295–308 (2013).

Wiens JJ, Fetzner JW, Parkinson CL, Reeder TW: Hylid frog phylogeny and sampling strategies for speciose clades. *Syst Biol*;54:719–748 (2005).

ARTIGO I

Citogenética comparativa dos gêneros *Boana*, *Bokermannohyla*, *Ololygon*, *Scinax* e *Dendropsophus* (Anura: Hylidae)

RESUMO

As subfamílias Cophomantinae, Scinaxinae e Dendropsophinae são pertencentes à família Hylidae, são anuros com distribuição ampla nas regiões tropicais e subtropicais, devido a isso a taxonomia e sistemática ainda são conflitantes. As análises citogenéticas com os gêneros *Boana*, *Bokermannohyla*, *Ololygon*, *Scinax* e *Dendropsophus* envolvem a descrição de cariótipo explorando técnicas clássicas, como coloração convencional, banda-C e NOR e moleculares, utilizando FISH com sondas teloméricas, sondas específicas e de rDNA, não utilizando outros marcadores como microssatélites para o entendimento da diferenciação e estruturação cromossômica. Portanto, o objetivo desse estudo é a descrição dos cariótipos e identificação das NORs de dez espécies, em especial as *Bokermannohyla ibitipoca*, *Ololygon luizotavioi*, *Dendropsophus bipunctatus* e *D. ruschii*, pela primeira vez, e o mapeamento físico dos microssatélites CA₍₁₅₎ e CAT₍₁₀₎ afim de investigar sobre a evolução cromossômica nas subfamílias. Duas espécies, *Bok. ibitipoca* e *O.luizotavioi* tiveram $2n= 24$ cromossomos, e fórmulas cariotípicas $20m+2sm+2st$ e $8m+12sm+4st$, respectivamente, enquanto *D. bipunctatus* e *D. ruschii* apresentaram $2n= 30$ cromossomos e fórmulas cariotípicas, $12m+12sm+4st+2t$ e $10m+10sm+6st+4t$. Os microssatélites com as sondas CA₍₁₅₎ e CAT₍₁₀₎ tiveram marcações em blocos nas regiões centroméricas, pericentroméricas e terminais, que foram pontuais em algumas espécies, além de marcações dispersas ao longo dos cromossomos. Os números diploides encontrados foram iguais aos já reportados para essas espécies, as fórmulas cariotípicas foram semelhantes aquelas encontradas para as outras espécies do grupo, exceto *Bok. ibitipoca* que apresentou cerca de 10 cromossomos a mais do que é encontrado no gênero. Os microssatélites se mostraram bons marcadores para algumas espécies e propiciou o entendimento de possíveis rearranjos cromossômicos e ampliou o conhecimento sobre a evolução cromossômica em Hylidae.

Palavras chave: Cophomantinae, Dendropsophinae, DNA repetitivo, evolução cromossômica, FISH, Scinaxinae,

1. INTRODUÇÃO

As subfamílias Cophomantinae, Dendropsophinae e Scinaxinae são distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, do México até a Argentina e são pertencentes à família Hylidae, e apresentam uma grande diversidade de animais (Segalla et al., 2016 e Frost, 2019). Por isso, a taxonomia e a sistemática dessas subfamílias ainda são conflitantes embora estudos tenham elucidado as filogenias e validação de espécies (Faivovich et al., 2005; Wiens et al., 2005; Duellman et al., 2016). A diversidade da família é composta por cerca de 430 espécies válidas e por 12 gêneros, *Aplastodiscus* Lutz, 1950, *Boana* Gray, 1825, *Bokermannohyla* Faivovich, Haddad, Garcia, Frost, Campbell, and Wheeler, 2005, *Hyloscirtus* Peters, 1882, *Myersiohyla* Faivovich, Haddad, Garcia, Frost, Campbell, and Wheeler, 2005 e *Nesorohyla* Pinheiro, Kok, Noonan, Means, and Haddad, 2018, (subfamília Cophomantinae); *Dendropsophus* Fitzinger, 1843 e *Xenohyla* Izecksohn, 1998 (subfamília Dendropsophinae); *Julianus* Duellman, Marion, and Hedges, 2016, *Ololygon* Fitzinger, 1843, *Scinax* Wagler, 1830 e *Sphaenorhynchus* Tschudi, 1838 (subfamília Scinaxinae) (Frost, 2019).

Citogeneticamente, as análises com hilídeos têm abordado essencialmente a descrição do número diploide, morfologia cromossômica, regiões organizadoras de nucléolos e padrões de heterocromatina, mapeamento com sondas teloméricas e do gene ribossomal 18S (Tabela 1, material suplementar). Estudos comparativos utilizando técnicas de citogenética clássica e molecular têm sido de suma relevância para a compreensão dos processos de diferenciação cariotípica em determinados grupos ou até mesmo subfamílias (Suárez et al., 2013; Ferro et al., 2018).

As espécies que compõem essas subfamílias, ainda que muitas tenham sido alocadas antigamente no gênero *Hyla* Laurenti, 1768, se mostram ao mesmo tempo semelhantes e diferentes quanto a caracteres citogenéticos, e. g. espécies dos gêneros *Bokermannohyla*, *Boana*, *Ololygon* e *Scinax* apresentam número diploide $2n = 24$ cromossomos enquanto as espécies de *Dendropsophus* têm $2n = 30$ cromossomos (Gruber et al., 2005; Catroli et al., 2011; Oliveira et al., 2016; Ferro et al., 2018).

Em adição, a hibridização fluorescente *in situ* (FISH) com sondas de microssatélites tem se mostrado promissora devido a sua alta dinamicidade que permite

estudos sobre evolução cromossômica das espécies (Cioffi et al., 2010; Martins et al., 2011). Peixoto e colaboradores (2015) mostraram que o conservado padrão de distribuição das sondas CAT₍₁₀₎ e CA₍₁₅₎ em espécies do gênero *Scinax* tem alguma relevância funcional mas estudos utilizando esses microssatélites são escassos e pouco conclusivos.

Por conseguinte, esse estudo visa a descrição dos cariótipos de espécies dos gêneros *Boana*, *Bokermannohyla*, *Dendropsophus*, *Ololygon* e *Scinax*, através do número diploide e morfologia cromossômica, regiões organizadoras de nucléolos, assim como o mapeamento físico dos microssatélites CA₍₁₅₎ e CAT₍₁₀₎, e com o intuito de investigar sobre a evolução cromossômica nas subfamílias Cophomantinae, Dendropsophinae e Scinaxinae.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram amostrados 40 indivíduos adultos de 10 espécies dos gêneros *Bokermannohyla*, *Boana*, *Dendropsophus*, *Ololygon* e *Scinax* de várias localidades no estado de Minas Gerais, Brasil (Tabela 1). Todos os animais coletados passaram pelos procedimentos previstos no Conselho de Ética no Uso de Animais, da Universidade Federal de Viçosa sob o processo (26/2018). Os espécimes foram fixados em formol 10%, depois transferidos para solução alcóolica a 70% e depositados na coleção herpetológica do Museu de Zoologia João Moojen (MZUFV) na Universidade Federal de Viçosa e na coleção de anfíbios da Universidade Federal de Minas Gerais, ambos no estado de Minas Gerais, Brasil.

As suspensões citogenéticas foram obtidas por raspagem das células do epitélio intestinal das espécies seguindo o protocolo de Schmid (1978). Os animais receberam injeção de colchicina a 0,1% na proporção de 0,1 ml/ 10 g do peso do animal, 4 horas antes da eutanásia. O processo de eutanásia consiste na aplicação de lidocaína gel 2% no interior da boca, na barriga e na região inguinal. Após a retirada e lavagem do intestino, as células foram incubadas em solução hipotônica com citrato de sódio 0,9% e fixadas em solução de Carnoy (metanol:ácido acético, 3:1).

As lâminas com as suspensões celulares foram coradas com Giemsa 5% diluídas em tampão Sorensen. Os cromossomos foram pareados e medidos usando o software Image Pro Plus® (IPP Version 4.5) para determinação do índice centromérico. Os cromossomos homólogos foram arranjados em ordem decrescente e classificados de

acordo com seus índices centroméricos em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e telocêntricos (t), segundo a nomenclatura de Green e Sessions (1991). As regiões ativas de NORs em processo de intérfase foram identificadas pela precipitação de nitrato de prata (Ag-NOR) seguindo (Howel e Black, 1980). As melhores metáfases foram fotografadas em fotomicroscópio de luz Olympus BX53 com a câmera DP73 Olympus. A Hibridização fluorescente *in situ* (FISH) foi feita com sondas de DNA repetitivos microssatélites CA₍₁₅₎ e CAT₍₁₀₎ marcadas com o fluorocromo Cy3 na terminação 5' (Sigma- St. Louis, MO, EUA), seguindo o protocolo de Pinkel et al. (1986) com modificações. As fotografias do FISH foram obtidas por fotomicroscópio de fluorescência BX53 Olympus e câmera XM10 Olympus.

3. RESULTADOS

A coloração convencional evidenciou que o número diploide de $2n= 24$ cromossomos e número fundamental $NF= 48$ foram observados em sete espécies analisadas, com variação na fórmula cariotípica, sendo: *Boa. faber* 10m+6sm+8st, *Boa. pardalis* 10m+10sm+4st, *Bok. ibitipoca* 20m+2sm+2st e *Bok. luctuosa* 12m+6sm+6st, *O. carnevalli* 8m+8sm+8st, *O. luizotavioi* 8m+12sm+4st, *S. eurydice* 14m+8sm+2st (Fig. 1 e 2). Por outro lado, as três espécies do gênero *Dendropsophus* apresentaram número diploide $2n= 30$ cromossomos, mas diferiram quanto ao número fundamental e fórmulas cariotípicas, respectivamente: *D. bipunctatus*, $NF= 58$ e 12m+12sm+4st+2t, *D. elegans*, $NF= 56$ e 8m+10sm+8st+4t, *D. ruschii*, $NF= 56$ e $FC= 10m+10sm+6st+4t$ (Fig. 3). Em nenhuma das espécies, foram observados cromossomos supranumerários, tal como cromossomos sexuais.

As NORs foram identificadas na porção terminal dos braços longos dos pares 11 para *Boa. pardalis* e *Boa. faber*, coincidente com a constrição secundária na última espécie e nos pares 12 em *Bok. ibitipoca* e *Bok. luctuosa*. A espécie, *Bok. ibitipoca* destacou-se por apresentar marcação em apenas um cromossomo homólogo em cerca de 15 metáfases mitóticas analisadas (Fig. 1). Em adição, as espécies da subfamília Scinaxinae tiveram marcação na região pericentromérica do par 6 em *O. carnevalli* e na região pericentromérica no braço curto do para *O. luizotavioi* e na região terminal do braço longo em *S. eurydice*, sendo ambas no par cromossômico 9 (Fig. 2). Por fim, as espécies de Dendropsophinae, em *D. bipunctatus*, as marcações ocorreram na região pericentromérica do par 13 e na região terminal do braço longo dos pares telocêntricos de número 13 em *D. elegans* e 10 em *D. ruschii*, enquanto em (Fig. 3).

Na subfamília Cophomantinae, a sonda CA₍₁₅₎ marcou as regiões terminais dos braços cromossômicos em todas as espécie, com marcações mais evidentes no gênero *Boana*, nos cromossomos de *Bokermannohyla*, o acúmulo dessa sonda ocorreram nas regiões centroméricas e pericentroméricas. Em evidência, podem-se salientar as marcações pontuais nos pares de cromossomos número sete em sua região terminal, em *Boa. faber* e *Boa. pardalis*, sendo que na última espécie somente um homólogo apresentou marcação (Fig. 1e, f). Na espécie *Bok. luctuosa*, o par cromossômico 9 apresentou marcações na região intersticial do braço longo (Fig. 1h). A sonda CAT₍₁₀₎ apresentou padrão semelhante a CA₍₁₅₎, exceto no gênero *Boana* onde as marcações apresentaram em blocos, já no gênero *Bokermannohyla* as sondas hibridizaram nos cromossomos de forma menos conspícuas (Fig. 1i, 1j, 1k e 1l). Em adição, em *Boa. faber* os pares de cromossomos quatro e sete apresentaram marcações pericentroméricas mais evidentes (Fig. 1i).

Diferentemente da subfamília Cophomantinae, as espécies de Scinaxinae apresentaram padrões mais claros para as sondas CA₍₁₅₎ e CAT₍₁₀₎, com marcações majoritariamente nas regiões terminais, centroméricas e pericentroméricas dos pares de cromossomos. Destacando, as marcações com a sonda CA₍₁₅₎ na região pericentromérica do par de cromossomos sete em *O. carnevalli* e com a sonda CAT₍₁₀₎ na porção terminal do braço do par cromossômico cinco (Fig. 2d). Em ressalva, podemos observar que essas sondas nessa subfamília hibridizaram menos na espécie *Scinax eurydice* do que nas espécies de *Ololygon* (Fig. 2).

Por fim, em Dendropsophinae as duas sondas analisadas marcaram predominantemente nas regiões terminais dos braços de todos os cromossomos. Entretanto, em *D. bipunctatus* a sonda CA₍₁₅₎ exibiu marcações na região pericentromérica do primeiro par do cariótipo, o que não foi observado em outras espécies. Já em *D. elegans*, um grande bloco marcando o braço longo do par telocêntrico 13 foi coincidente com a região de NOR nessa espécie (Fig. 3d, e).

Marcações com o fluorocromo DAPI foram observadas nas regiões centroméricas dos cromossomos, após a desnaturação com formamida 70% na técnica de FISH, em alguns espécimes de *Dendropsophus ruschii* e *Boana faber*, não sendo observado esse resultado em outros indivíduos (Fig. 4).

4. DISCUSSÃO

O número diploide $2n = 24$ e $NF = 48$ encontrados para as espécies dos gêneros *Boana*, *Bokermannohyla*, *Ololygon*, *Scinax* já foram reportados em diversos trabalhos com esses gêneros (Beçak, 1968; Bogart, 1973; Nunes e Fagundes, 2008; Carvalho et al., 2009; Schmid e Steinlein, 2016; Oliveira et al., 2016; Gruber et al., 2017; Ferro et al., 2018). Em contraste, as espécies de *Dendropsophus* analisadas mostraram $2n = 30$, sustentando a hipótese já levantada que essa característica seja uma sinapomorfia do gênero, uma vez que o gênero *Xenohyla*, também da subfamília Dendropsophinae, apresenta $2n = 24$ cromossomos (Faivovich et al., 2005; Suárez et al., 2013).

A maioria das espécies já cariotipadas pertencentes à família Hylidae apresentam o número diploide igual a 24 cromossomos, o que permitiu apontar tal como um número diploide ancestral para os hílideos (Faivovich et al., 2005; Gregory, 2019; Ruiz-Herrera et al., 2012,). Desse modo, é notável que os cromossomos do gênero *Dendropsophus* em morfologia são menores, além disso, a presença de cromossomos telocêntricos comparados aos outros gêneros aqui analisados propicia uma investigação quanto a processos de fissão cromossômicas ao longo da evolução cariotípica na família Hylidae.

A variabilidade cariotípica da família pode ser comprovada pelas diferentes fórmulas cariotípicas encontradas: a fórmula cariotípica para *Boa. pardalis* é igual a encontrada por Nunes e Fagundes (2008). Assim como, *O. carnevalli* compartilha a mesma fórmula cariotípica com outras espécies do gênero, como *O. cosenzai* e *O. arduos* ($8m+8sm+8st$) (Peixoto et al., 2015), enquanto o cariótipo de *O. luizotavioi* é marcado por menos cromossomos metacêntricos e o aumento de um par de cromossomos subtelocêntricos comparada as outras espécies o gênero (Nunes e Fagundes, 2008; Cardozo et al., 2011; Targueta et al., 2018). Nas espécies com cariótipos descritos pela primeira vez, *Bok. ibitipoca* mostrou a particularidade de ter dez cromossomos metecêntricos a mais do que geralmente é encontrado para as espécies desse gênero (Catroli et al., 2011). As outras espécies de *Bokermannohyla* diferem quanto às fórmulas cariotípicas encontradas em estudos citogenéticos com essas espécies, podendo ser devido a própria diferenciação cromossômica das populações analisadas (Catroli et al., 2011).

As regiões organizadoras de nucléolo observadas nos cariótipos obtidos nesse trabalho tiveram correspondência quanto com outras espécies dos grupos aos quais

estão alocadas, como a marcação na região terminal do par 11 das espécies *Boa. faber* e *Boa. pardalis*, já reportado em *Boa. crepitans* e diferindo de outras que marcam o par cromossômico 2 em *Boa albomarginata* (Gruber et al. 2007; Nunes e Fagundes, 2008). A marcação da NOR no par cromossômico 12 nas espécies de *Bokermannohyla* não foi coincidente com outras do gênero que se apresentam no par de cromossomos 11, uma possível explicação é a ordenação dos pares por outros autores ou até mesmo o nível de condensação dos cromossomos (Catroli et al., 2011). Em especial, a marcação de somente um homólogo em *Bok. ibitipoca* pode indicar a inativação dessas regiões ou a baixa precipitação de nitrato de prata de forma imperceptível, sendo que o outro homólogo pode ser marcado após FISH com sonda de rDNA 18S para confirmação de sítios de atividade ribossomal, por exemplo.

O sexto par cromossômico de *O. carnevalli* com marcação de NOR é igual as outras espécies grupo *O. catharinae* onde estão designados, dentre elas *O. rizibilis* e *O. albicans* (Nunes e Fagundes, 2008; Cardozo et al., 2011). Ao contrário disso, *O. luizotavioi* obteve marcação no par nove, semelhante a encontrada no cromossomo de *S. eurydice*, o que não foi equiparável com outras espécies desses gêneros.

A localização das NORs na região terminal do braço longo do par cromossômico 13 foi encontrada em outras espécies do gênero *Dendropsophus*, nas espécies *D. minutus*, *D. werneri*, *D. phlebotes*, *D. nanus* e *D. microcephalus*, mas as NORs na região pericentromérica encontrada em *D. bipunctatus* foi relatada somente mais uma vez em espécimes *D. ebraccatus* das planícies do Pacífico, tal rearranjo cromossômico sugere um possível evento de inversão paracentromérica nessas duas espécies (Kaiser et al., 1996). Em adição, *D. ruschii* marcou o mesmo par telocêntrico de número 10 que *D. microps* (Gruber et al., 2005; Oliveira et al., 2016).

A técnica de FISH com sondas de microssatélite CA₍₁₅₎ e CAT₍₁₀₎ foi utilizada pela primeira vez nas espécies analisadas, e demonstrou ser promissora por apresentar uma dinamicidade dentro dos gêneros e entre as espécies, podendo ser explicadas pelos diferentes modos de organização que essas sequências repetitivas no genoma (Martins et al., 2011). Ainda sim, foram observadas marcações nas regiões terminais e centroméricas em todas espécies analisadas, esse padrão já foi reportado para espécies do gênero *Scinax* e *Ololygon* e para outros grupos, como lagartos e peixes, onde essas sondas foram empregadas (Porkoná et al., 2011; Cioffi et al., 2012; Peixoto et al., 2015; Utsomia et al., 2018). A abundância de sequências repetitivas está geralmente

relacionada a regiões de heterocromatina, embora os padrões encontrados estejam localizados em regiões tanto heterocromáticas como eucromáticas observadas após revisão sobre as informações citogenéticas disponíveis para os gêneros analisados (Cioffi et al., 2010; Yano et al., 2014) (Tabela 1, material suplementar).

Por outro lado, a sonda CA₍₁₅₎ destacou-se por apresentar um grande bloco marcado e que foi coincidente com a NOR em *D. elegans*, assim como regiões ricas GC como visto no trabalho de Oliveira et al. (2016), logo, válida a hipótese que o acúmulo de microssatélites não é de maneira aleatória dentro do genoma de eucariotos (Charleswoeth et al., 1994; Utsomia et al., 2018).

Na família Scinaxinae houve diferença na organização genômica dos dois gêneros quanto a utilização das duas sondas analisadas, com marcações principalmente terminais, centroméricas e pericentroméricas para as sondas CA₍₁₅₎ e CAT₍₁₀₎ em *Ololygon* enquanto a espécie do gênero *Scinax* as marcações foram termais e dispersas ao longo dos cromossomos. Além disso, a diferenciação morfológica dos dois primeiros pares cromossômicos nesses gêneros levou a sugestão dos mecanismos responsáveis por essas mudanças como inversões pericentroméricas, adição/perda de sequências repetitivas ou alterações cromossômicas estruturais não identificadas, o nosso estudo respalda a adição de sequências repetitivas como um dos processos dessa diferenciação cariotípica (Cardozo et al., 2011; Gruber et al., 2017).

As espécies da subfamília Cophomantinae também mostraram que a relação filogenética entre os gêneros reflete nos padrões citogenéticos encontrados com as sondas CA₍₁₅₎ e CAT₍₁₀₎ como marcações em regiões terminais e pericentroméricas em *Boana* e centroméricas e dispersas nas espécies de *Bokermannohyla*.

As marcações de DAPI⁺ foram semelhantes aos padrões de heterocromatina centroméricas já relatados para a espécie *Boa. faber* e da mesma forma para outras espécies do grupo *D. microcephalus*, grupo ao qual *D. bipunctatus* pertence.

Por fim, com base em nossas análises podemos ampliar o conhecimento sobre espécies ainda não cariotipadas e demonstrando as semelhanças cariotípicas das espécies dos gêneros que pertencem. A utilização de microssatélites se mostrou um bom marcador citogenético para algumas populações de espécies analisadas, além do que permitiu entender possível eventos de organização genômica e compreender mais sobre a evolução cromossômica na família Hylidae.

5. AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro. Ao Clodoaldo Assis pelas coletas e identificação das espécies.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Beçak ML: Chromosomal Analysis of Eighteen Species of Anura. *Caryologia*; 21: 191-208 (1968).

Bogart JP: Evolution of anuran karyotypes. In: Vial JL (ed) *Evolutionary biology of the anurans*. University of Missouri Press, Columbia, pp 337–349 (1973).

Cardozo DE, Leme DM, Bortoleto JF, Catroli GF, Baldo D, Faivovich J, Kolenc F, Silva APZ, Borteiro C, Haddad CFB, Kasahara S Karyotypic data on 28 species of *Scinax* (Amphibia: Anura: Hylidae) diversity and informative variation. *Copeia*. 2011:251–263 (2011).

Carvalho CA, Garcia PC, Recco-Pimentel SM: Cytogenetic comparison of tree frogs of the genus *Aplastodiscus* and the *Hypsiboas faber* group (Anura, Hylidae). *Genet Mol Res*;8:1498–1508 (2009).

Catroli GF, Faivovich J, Haddad CFB, Kasahara S: Conserved Karyotypes in Cophomantini: Cytogenetic Analysis of 12 Species from 3 Species Groups of *Bokermannohyla* (Amphibia: Anura: Hylidae). *J Herpetol*;45:120–128 (2011).

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

Cioffi MB, Kejnovsky E, Bertollo LAC: The Chromosomal Distribution of Microsatellite Repeats in the Genome of the Wolf Fish *Hoplias malabaricus* , Focusing on the Sex Chromosomes. *Cytogenet Gen Res*; 132:289-296 (2010).

Cioffi MB, Kejnovsky E, Marquioni V, Poltronieri J, Molina WF, Diniz D, Bertollo LAC: The key role of repeated DNAs in sex chromosome evolution in two fish species with ZW sex chromosome system. *Mol Cytogenet* 5:28 (2012).

Duellman WE, Marion AB, Hedges SB: Phylogenetics, classification, and biogeography of the treefrogs (Amphibia: Anura: Arboranae). *Zootaxa*; 4104: 001-109 (2016).

Faivovich J, Haddad CFB, Garcia PCA, Frost DR, Campbell JA, Wheeler WC: Systematic Review of the Frog Family Hylidae, With Special Reference To Hylinae: Phylogenetic Analysis and Taxonomic Revision. Bull Am Museum Nat Hist; 11:10-2 (2005).

Ferro JM, Cardozo DE, Suárez P, Boeris JM, Blasco-Zúñiga A, Barbero G, et al.: Chromosome evolution in Cophomantini (Amphibia, Anura, Hylinae). Plos One; 13:1-29 (2018).

Ferro JM, Cardozo DE, Suárez P, Boeris JM, Blasco-Zúñiga A, Barbero G, et al. Chromosome evolution in Cophomantini (Amphibia, Anura, Hylinae). PLoS ONE 13: 1-29 (2018).

Frost DR. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0. American Museum of Natural History, New York, USA. <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html> (Acesso em 17 de Março 2019) (2019).

Green DM, Sessions SK (eds): Nomenclature for chromosomes. In: Amphibian cytogenetics and evolution. Academic Press, San Diego, p 223 (1991).

Gregory, T.R: Animal Genome Size Database. <http://www.genomesize.com> (Acesso em 13 de março de 2019) (2019).

Gruber SL, Haddad CF, Kasahara S: Evaluating the karyotypic diversity in species of *Hyla* (Anura; Hylidae) with $2n=30$ chromosomes based on the analysis of ten species. Folia Biol; 51:68–75 (2005).

Gruber SL, Haddad CFB, Kasahara S: Chromosome banding in three species of *Hypsiboas* (Hylidae, Hylinae), with special reference to a new case of B-chromosome in anuran frogs and to the reduction of the diploid number of $2n=24$ to $2n=22$ in the genus. Genetica; 130:281–291(2007).

Gruber SL, Zina J, Narimatsu H, Fernando C, Haddad B, Kasahara S: Comparative karyotype analysis and chromosome evolution in the genus *Aplastodiscus*. Folia Biol; 51: 68-75 (2012).

Gruber SL, de Oliveira GIG, Silva APZ, Narimatsu H, Haddad CFB, Kasahara S: Comparative analysis based on replication banding reveals the mechanism responsible for the difference in the karyotype constitution of treefrogs *Oedipoda* and *Scinax* (Arboranae, Hylidae, Scinaxinae). Comparative Cytogenetics 11: 267–283 (2017).

Howell WM, Black DA: Controlling silver-staining of nucleolus organizer

regions with a protective colloidal developer: step method. *Experientia* 36:1014–1015 (1980).

Martins C, Cabral-de-Mello DC, Valente GT, Mazzuchelli J, Oliveira SG De: Cytogenetic Mapping and Contribution to the Knowledge of Animal Genomes Chromosomes as a Tool for Understanding. in *Advances in Genetics Research*, K. V. Urbano, Ed., p. 82, Nova Science Publishers, New York, NY, USA (2011).

Medeiros LR, Rossa-Feres DC, Jim J, Recco-Pimentel SM: B-chromosomes in two Brazilian populations of *Dendropsophus nanus* (Anura, Hylidae). *Genet Mol Biol*; 29:257–262 (2006).

Medeiros LR, Lourenço LB, Rossa-Feres DC, Lima AP, Andrade GV, Giaretta AA, et al.: Comparative cytogenetic analysis of some species of the *Dendropsophus microcephalus* group (Anura, Hylidae) in the light of phylogenetic inferences. *BMC Genet*;14: 59 (2013).

Nogueira L, Zanoni JB, Solé M, De Mello Affonso PRA, Siqueira S, Sampaio I: Cytogenetic studies in six species of *Scinax* (Anura, Hylidae) clade *Scinax ruber* from northern and northeastern Brazil. *Genet Mol Biol*;38:156–161 (2015).

Nunes RRA, Fagundes V: Cariótipos de oito espécies de anfíbios das subfamílias Hylinae e Phyllomedusinae (Anura, Hylidae) do Espírito Santo, Brasil. *Bol Mus Biol Mello Leitão* 23:21–36 (2008).

Oliveira IS, Bueno Noleto R, Karlokoski Cunha de Oliveira A, Toledo LF, Cestari M: Comparative cytogenetic analysis of four species of *Dendropsophus* (Hylinae) from the Brazilian Atlantic forest. *J Genet*; 95:349–355 (2016).

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

Pinkel D, Straume T, Gray JW: Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci* 83:2934–2938 (1986).

Pokorná M, Kratochvíl L, Kejnovský E: Microsatellite distribution on sex chromosomes at different stages of heteromorphism and heterochromatinization in two lizard species (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*). *BMC Genetics*; 12: 90 (2011).

Ruiz-Herrera A, Farre M, Robinson TJ: Molecular cytogenetic and genomic insights into chromosomal evolution. *Heredity*; 108: 28–36 (2012).

Schmid M. Chromosome Banding in Amphibia I. Constitutive Heterochromatin and Nucleolus Organizer Regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma*; 66:361-88 (1978).

Schmid M, Steinlein C: Chromosome Banding in Amphibia. XXXIV. Intrachromosomal Telomeric DNA Sequences in Anura. *Cytogenet Genome Res.*; 148:211-26 (2016).

Segalla MV, Caramaschi U, Cruz CAG, Grant T, Haddad CFB, Garcia PCA, Berneck BVM, Langone JA: Brazilian Amphibians: List of Species. *Herpeto Brasil*; 5: 34-46 (2016).

Suárez P, Cardozo D, Baldo D, Pereyra MO, Faivovich J, Orrico VGD, et al.: Chromosome evolution in Dendropsophini (Amphibia, Anura, Hylineae). *Cytogenet Genome Res*;141:295–308 (2013).

Targueta CP, Guerra V, Gambale PG, Bastos RP, Silva DM, Telles MPC: Cytogenetics of two hylid frogs from Brazilian Cerrado. *Genet Mol Biol*; 41: 814-819 (2018).

Teixeira LSR, Seger KR, Targueta CP, Orrico VGD, Lourenço LB: Comparative cytogenetics of tree frogs of the *Dendropsophus marmoratus* (Laurenti, 1768) group: Conserved karyotypes and interstitial telomeric sequences. *Comp Cytogenet*;10:753–767 (2016).

Utsunomia R, Melo S, Scacchetti PC, Oliveira C, Machado MA, Pieczarka J C, Nagamachi CY, Foresti F: Particular Chromosomal Distribution of Microsatellite in Five Species of the Genus *Gymnotus* (Teleostei, Gymnotiformes). *Zebrafish*. 00:16 (2018).

Wiens JJ, Fetzner JW, Parkinson CL, Reeder TW: Hylid frog phylogeny and sampling strategies for speciose clades. *Syst Biol*;54:719–748 (2005).

Yano CF, Poltronieri J, Bertollo LAC, Artoni RF, Liehr T, Cioffi MB: Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in *Triportheus trifurcatus* (Characidae, Characiformes): Insights into the Differentiation of the Z and W Chromosomes. *PLoS ONE*. 9: e90946 (2014).

Lista de tabelas:

Tabela 1: Número de indivíduos analisados das subfamílias por sexo (macho e fêmea), localidade (cidade e estado) e voucher de identificação.

Subfamília	Espécie	N	Sexo	Localidade	Voucher
Cophomantinae	<i>Boana faber</i>	2	Fêmea	PESB – Ervália (MG)	MZUFV 19262, 19263
		1	Macho	Santa Rita de Jacutinga (MG)	MZUFV 18822
		1	Fêmea	Cataguases (MG)	MZUFV 18656
		1	Macho	Mata da Biologia – Viçosa (MG)	MZUFV 19269
	<i>Boana pardalis</i>	2	Macho	Mata da Biologia – Viçosa (MG)	MZUFV 12623, 12624
		1	Fêmea		MZUFV 12622
		1	Macho	Santa Rita de Jacutinga (MG)	MZUFV 18825
	<i>Bokermannohyla ibitipoca</i>	2	Macho	PESB – Araponga (MG)	MZUFV 9439 e 9440
	<i>Bokermannohyla luctuosa</i>	1	Macho	Santa Rita de Jacutinga (MG)	MZUFV 18829
		1	Fêmea		MZUFV 18828
Scinaxinae	<i>Ololygon carnevalli</i>	3	Macho	Caratinga e Cataguases (MG)	MZUFV 11512, 11513, 18825
		1	Fêmea		MZUFV 12622
	<i>Ololygon luizotavioi</i>	5	Macho	PESB – Araponga (MG)	MZUFV 9884, 9886, 9887, 9888, 9889, 10557
		1	Fêmea		MZUFV 9885
	<i>Scinax eurydice</i>	2	Macho	Mata da Biologia (MG)	MZUFV 19267, 19268
Dendropsophinae	<i>Dendropsophus bipunctatus</i>	4	Macho	Cataguases (MG)	MZUFV 18657, 18658, 18659, 18660
	<i>Dendropsophus elegans</i>	2	Macho	Mata da Biologia – Viçosa (MG)	MZUFV 19265, 19266
		2	Macho	Cataguases (MG)	MZUFV 18653, 18654
	<i>Dendropsophus ruschii</i>	4	Macho	Pedra Dourada (MG)	MZUFV 14712, 12938, 12939, 16751
		2	Fêmea		MZUFV 14535, 14532

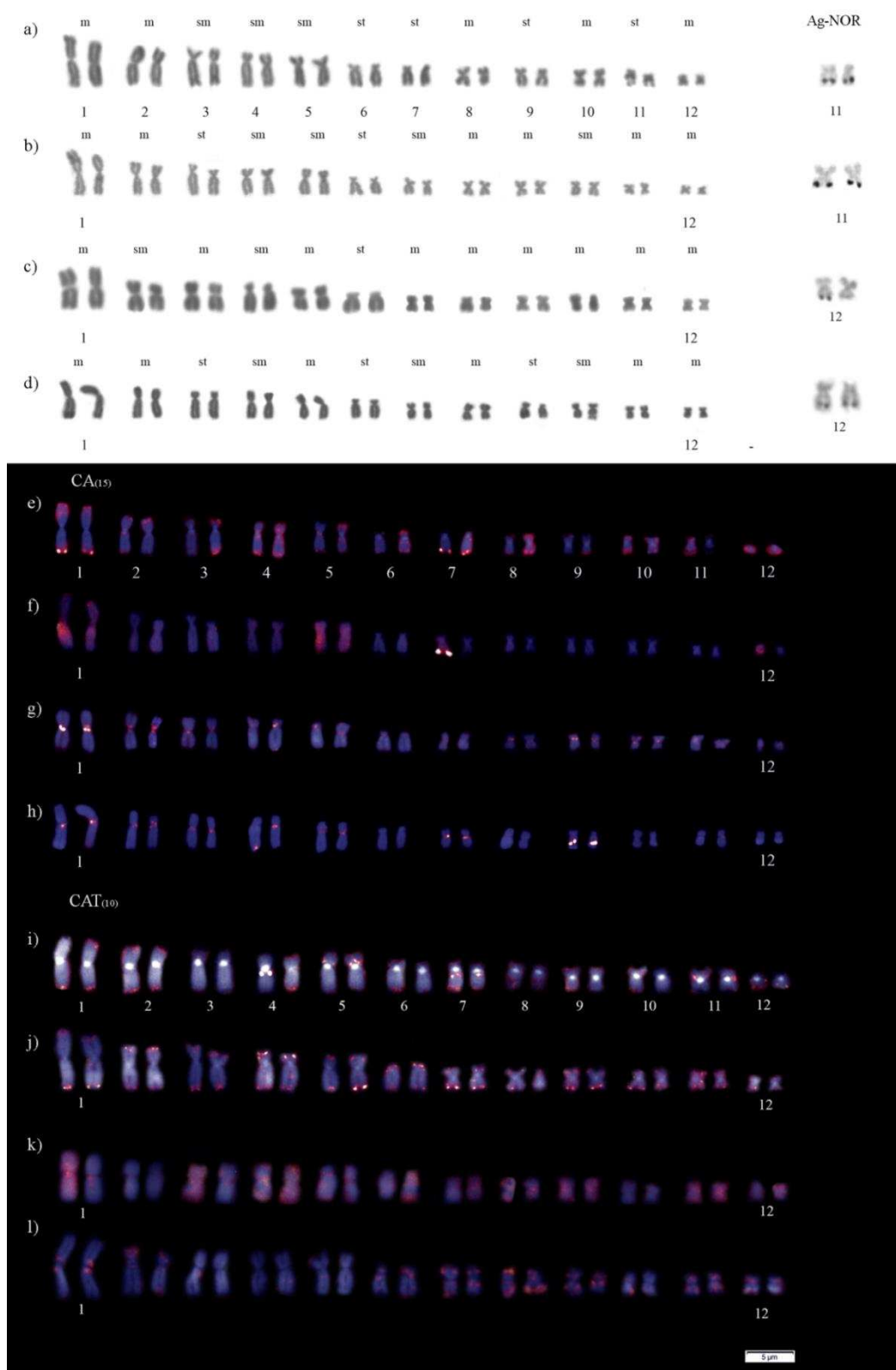


Fig. 1: Cariótipo das espécies da subfamília Cophomantinae: Giemsa e Ag-NOR (a-d) e FISH com as sondas CA₁₀ (e-h) e CAT₁₅ (i-l). *Boa. faber* (a,e,i); *Boa. pardalis* (b, f, j); *Bok. ibitipoca* (c, g, k) e *Bok. luctuosa* (d, h, l). Em azul, cromossomos corados com DAPI e em vermelho, região hibridizada com a sonda. Barra 5 µm.

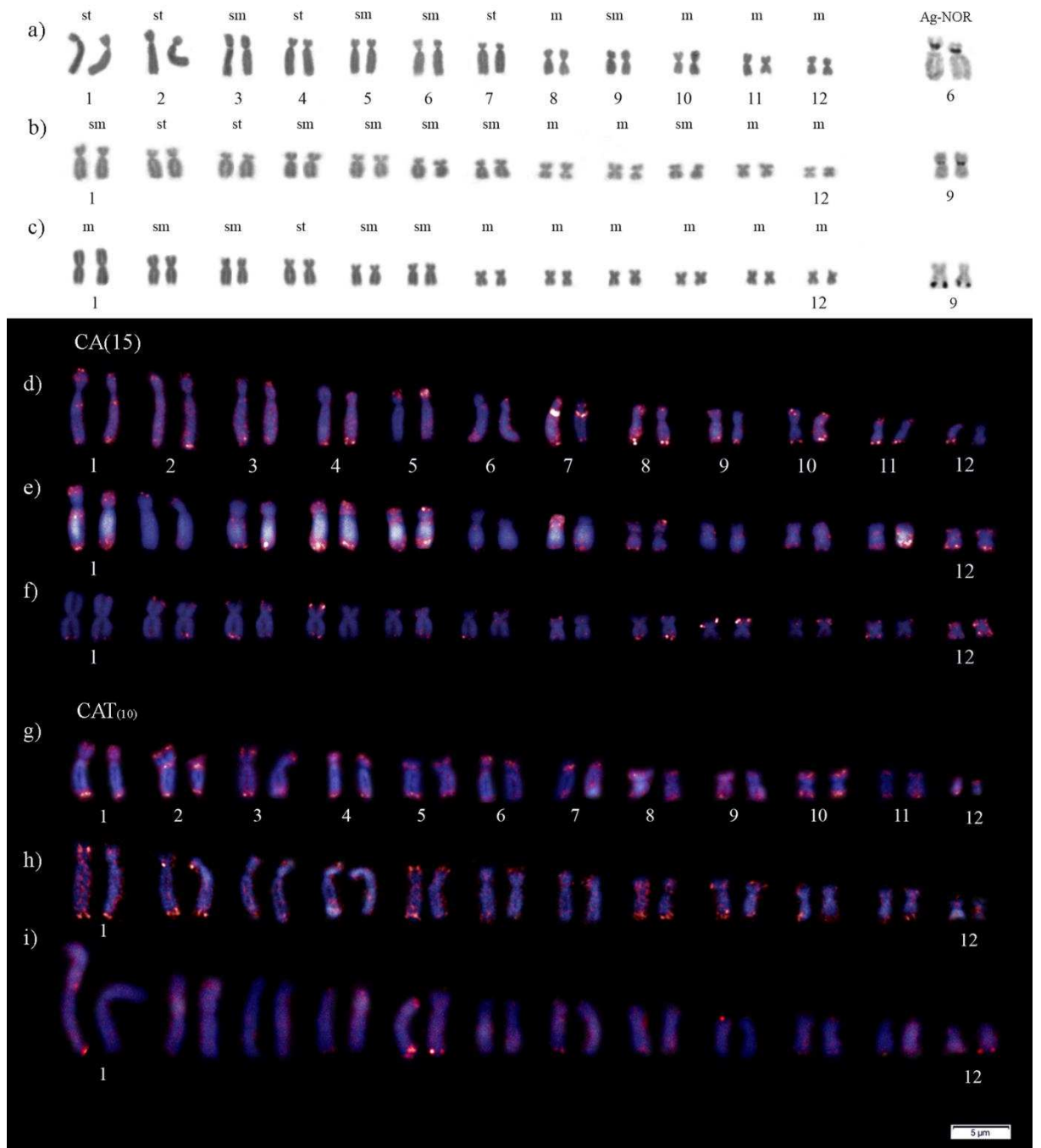


Fig. 2: Cariótipo das espécies da subfamília Scinaxinae: Giemsa e Ag-NOR (a-c) e FISH com as sondas CA₍₁₀₎ (d-f) e CAT₍₁₅₎ (g-i). *O. carnevalli* (a,d, g); *O. luizotavioi* (b, e, h) e *S. eurydice* (c, f, i). Em azul, cromossomos corados com DAPI e em vermelho, região hibridizada com a sonda. Barra 5 µm.

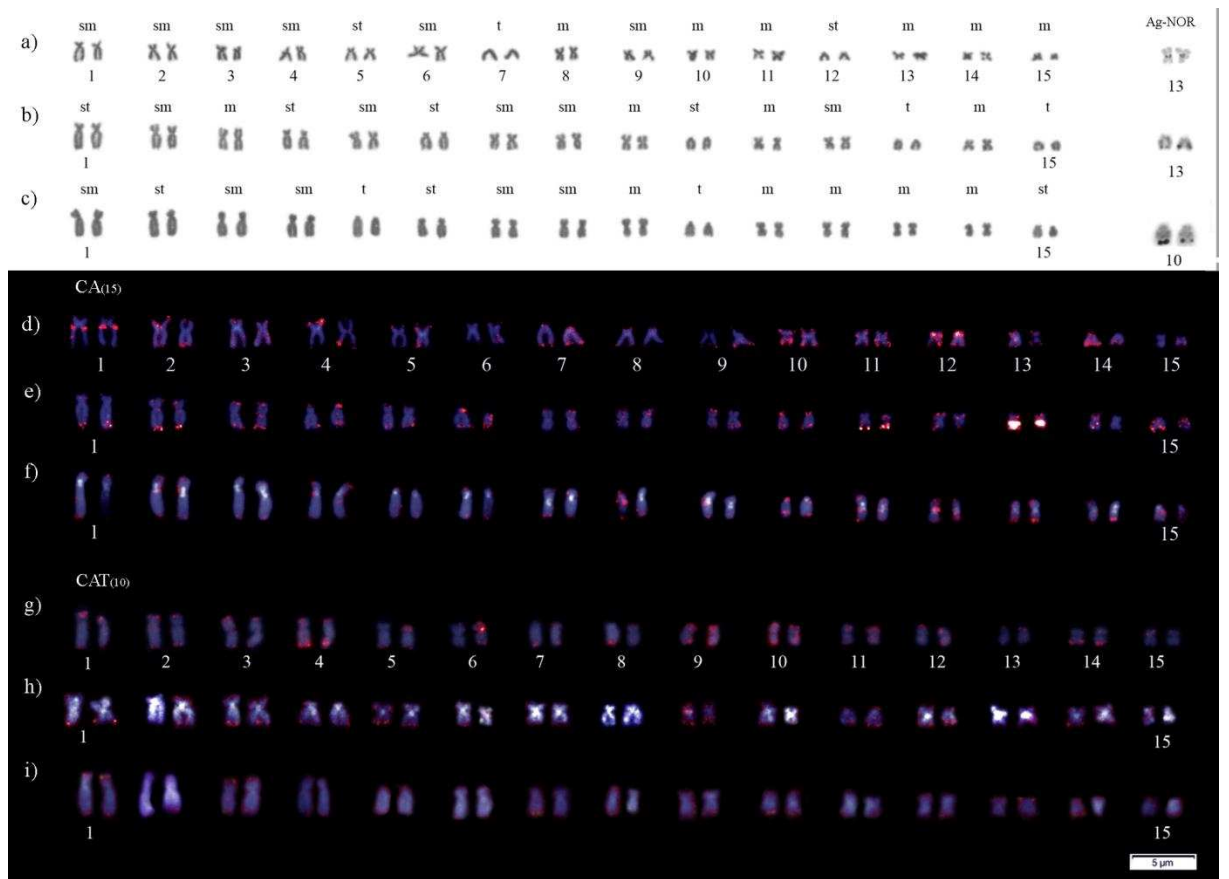


Fig. 3: Cariótipo das espécies da subfamília Dendropsophinae: Giemsa e Ag-NOR (a-c) e FISH com as sondas CA₍₁₀₎ (d-f) e CAT₍₁₅₎ (g-i). *D. bipunctatus* (a,d, g); *D. elegans* (b, e, h) e *D. ruschii* (c, f, i). Em azul, cromossomos corados com DAPI e em vermelho, região hibridizada com a sonda. Barra 5 μ m.

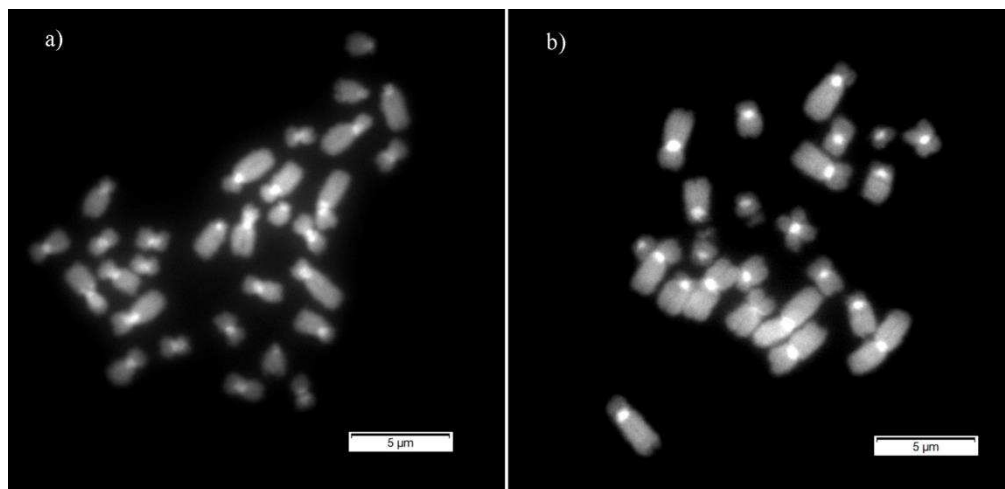


Fig. 4: Metáfases coradas com DAPI depois de desnaturação com formamida usando a técnica de FISH: (a) *D. ruschii* (b) *Boa. faber*. Barra 5 μ m.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela 1. Síntese das informações citogenéticas disponíveis para os gêneros *Bokermannohyla*, *Boana*, *Scinax*, *Ololygon* e *Dendropsophus*: localidade (cidade e estado), número diploide ($2n$), número fundamental (NF), fórmula cariotípica (FC), localização das NORs (indicando os pares), padrão da heterocromatina e FISH (indicando as sondas utilizadas).

Grupo de espécies	Espécie	Localidade	$2n$	NF	FC	NOR (pares marcados)	Heterocromatina	FISH	Referências
Gr. <i>Bokermannohyla circumdata</i>	<i>Bokermannohyla ahenea</i>	São José do Barreiro (SP)	24	48	12m+8sm+4st	11	Centromérica e pericentromérica	-	Catrolí et al., 2011
		Salesópolis (SP)	24	48	10m+10sm+4st	11	Centromérica e pericentromérica	-	Catrolí et al., 2011
	<i>Bokermannohyla circumdata</i>	Campos do Jordão (SP)	24	48	10m+10sm+4st	11	Centromérica	-	Catrolí et al., 2011
		Camanducaia (MG)	24	48	10m+10sm+4st	11	Centromérica	-	Catrolí et al., 2011
	<i>Bokermannohyla hylax</i>	Salesópolis (SP)	24	48		11	-	-	Catrolí et al., 2011
	<i>Bokermannohyla luctuosa</i>	Jundiaí (SP)	24 + B	48	12m+8sm+4st	11	Centromérica	-	Catrolí et al., 2011
		Santa Rita de Jacutinga (MG)	24	48	12m+6sm+6st	12	-	CA ₍₁₅₎ /CAT ₍₁₀₎	Presente estudo
	<i>Bokermannohyla ibitipoca</i>	Araponga (MG)	24	48	20m+2sm+2st	12	-	CA ₍₁₅₎ /CAT ₍₁₀₎	Presente estudo
	<i>Bokermannohyla ravedea</i> (como sp. 1)	Furnas (MG)	24	48	10m+10sm+4st	11	-	-	Catrolí et al., 2011
	<i>Bokermannohyla</i> sp.2	Morretes (PR)	24	48	10m+10sm+4st	11	Centromérica	-	Catrolí et al., 2011
	<i>Bokermannohyla</i> sp. 3	Nova Lima (MG)	24	48	10m+10sm+4st	11	Centromérica	-	Catrolí et al., 2011
	<i>Bokermannohyla</i> sp.4	Santa Bárbara (MG)	24	48	10m+10sm+4st	11	-	-	Catrolí et al., 2011
Gr.	<i>Bokermannohyla</i>	Congonhas do Norte	24	48	12m+8sm+4st	4	Centromérica,	-	Catrolí et al.,

<i>Bokermannohyla pseudopseudis</i>	<i>alvarengai</i>	(MG)					intersticial e pericentromérica		2011
	<i>Bokermannohyla ibitiquara</i>	Furnas (MG)	24	48	10m+10sm+4st	1	Centromérica	-	Catrolí et al., 2011
	<i>Bokermannohyla saxicola</i>	Serra do Cipó (MG)	24	48	12m+8sm+4st	11	Centromérica, e intersticial	-	Catrolí et al., 2011
Gr. <i>Bokermannohyla martinsi</i>	<i>Bokermannohyla martinsi</i>	Nova Lima (MG)	24	48	10m+10sm+4st	11	Centromérica, intersticial e pericentromérica	-	Catrolí et al., 2011
Gr. <i>Boana albopunctata</i>		São Paulo (SP)	22	44	8m+14sm	-	-	-	Beçak, 1968
		Brasil	22	44	-	-	-	-	Bogart, 1973
		Pirenópolis (GO)	22	44	-	-	-	-	de Oliveira et al., 2012
	<i>Boana albopunctata</i>	Rio Claro (SP)	22+1B		8m+14sm	8	Centromérica e intersticial	-	Gruber et al., 2007
		Corrientes e Misiones (ARG)	22+1B/ 22+2B/ 22+3B	44	10sm+10m+2st	8	Centromérica e intersticial	tel/rDNA	Ferro et al., 2012
		Rio Claro (SP)	22+1B	44	-	-	-	Sonda-B	Gruber et al., 2014
	<i>Boana cf. alfaroi</i>	Dique (PA)	22	44	10m+8sm+4st	-	-	rDNA	Ferro et al., 2018
	<i>Boana almendarizae</i>	Tungurahua (ECU)	24	48	12m+12sm	8	Centromérica	-	Ferro et al., 2018
	<i>Boana calcarata</i>	Pastaza (ECU)	24	48	16m+8sm	-	Centromérica	-	Ferro et al., 2018
	<i>Boana fasciata</i>	-	24	-	-	-	-	-	Bogart e Bogart. 1971
	<i>Boana leucocheila</i>	Juruti (PA)	22+ 1B	44	12m+10sm	8	-	rDNA	Ferro et al., 2018
	<i>Boana lanciformis</i>	Manaus (AM)	22	44	8m+ 6sm+ 8st	11	Centromérica	tel	Mattos et al., 2014
	<i>Boana cf. lanciformis</i>	São Gabriel da Cachoeira (AM)	24	48	10m+10sm+4st	11	-	-	Ferro et al., 2018
	<i>Boana multifasciata</i>	Serranópolis (GO)	24	48	-	-	-	-	de Oliveira et al., 2012
		Irاندuba (AM)	24	48	10m+ 6sm+ 8st	11	Intertsticial	tel	Mattos et al., 2014

Gr. <i>Boana faber</i>		Igarapé-Miri (PA)	22	48	10m+8sm+4st	8	Intertsticial e pericentromérica	rDNA	Ferro et al., 2018
	<i>Boana heilprini</i>	-	24	48	12m+12sm	11	-	-	Ferro et al., 2018
		-	24	48	-	-	-	-	Rabello, 1970
		Rio Verde (GO)	24	48	-	-	-	-	de Oliveira et al., 2012
		Brasilândia (MT)	24	48	8m+18sm	11	Centromérica e intersticial	-	Gruber et al., 2007
	<i>Boana raniceps</i>	Irاندوبا (AM)	24	48	10m + 6sm + 8st	11	Pericentromérica	tel	Mattos et al., 2014
		Ilha do Bananal (GO)	24	48	-	-	-	Sonda-B	Gruber et al., 2014
		Santa Rita doTrivelato (MT)	24	48	-	-	-	Sonda-B	Gruber et al., 2014
		Misiones (ARG)/ Soure (PA)	24	48	14m+8sm+2st	11	Intertsticial e pericentromérica	-	Ferro et al., 2018
		Praia Grande (SP)	24	46	10m+12sm+2a	-	-	-	Beçak, 1968
		Paranapiacaba (SP)	24	46	10m+12sm+2a	-	-	-	Beçak, 1968
		Floresta da Tijuca (RJ)	24	48	-	-	-	-	Bogart, 1973
		Anchieta (ES)	24	48	12m+10sm+2st	2	-	-	Nunes e Fagundes, 2008
	<i>Boana albomarginata</i>	Cariacica (ES)	24	48	12m+10sm+2st	2	-	-	Nunes e Fagundes, 2008
		Bertioga (SP)	24	48	18m+6sm	2	Centromérica	rDNA	Carvalho et al., 2009b
		Pincinguaba (SP)	24	48	18m+6sm	2	Centromérica	rDNA	Carvalho et al., 2009b
		-	24	-	-	-	-	-	Duellman e Cole, 1965
		-	24	-	-	-	-	-	Rabello, 1970
	<i>Boana crepitans</i>	Argentina	24	48	-	-	-	-	Bogart, 1973
		Piranhas (AL)	24	48	6m+18sm	11	Centromérica e intersticial	-	Gruber et al., 2007
		Wenceslau Guimarães	24	48	12m+10sm+2st	7	Centromérica	-	Carvalho et al.,

		(BA)							2014
<i>Boana faber</i>	Terezópolis (RJ)	24	48	6m+14sm+4a	-	-	-	Beçak, 1968	
	São Roque (SP)	24	48	6m+14sm+4a	-	-	-	Beçak, 1968	
	Pedra Azul (ES)	24	48	8m+8sm+8st	11	-	-	Nunes e Fagundes, 2008	
	(perto de) Itanhaém (SP)	24	48	-	11	Centromérica	tel	Schmid e Steinlein, 2016	
	Mogi das Cruzes (SP)	24	48	14m+10m	11	-	rDNA	Carvalho et al., 2009	
	Biritiba Mirim (SP)	24	48		11	-	rDNA	Carvalho et al., 2009	
	Misiones (ARG)	24	48	10m+8sm+6st	11	Centromérica	rDNA	Ferro et al., 2018	
	Ervália (MG)	24	48	10m+6sm+8st	11	-	CA ₍₁₅₎ /CAT ₍₁₀₎	Presente estudo	
	Cataguases (MG)	24	48	10m+6sm+8st	11	-	CA ₍₁₅₎ /CAT ₍₁₀₎	Presente estudo	
	Santa Rita de Jacutinga (MG)	24	48	10m+6sm+8st	11	-	CA ₍₁₅₎ /CAT ₍₁₀₎	Presente estudo	
	Viçosa (MG)	24	48	10m+6sm+8st	11	-	CA ₍₁₅₎ /CAT ₍₁₀₎	Presente estudo	
	<i>Boana lundii</i>	Serranópolis (GO)	24	48	-	-	-	-	de Oliveira et al., 2012
<i>Boana pardalis</i>	Brasil	24	48	-	-	-	-	Bogart, 1973	
	Cariacica (ES)	24	48	10m+10sm+4st	11	-	rDNA	Nunes e Fagundes, 2008	
	Viçosa (MG)	24	48	10m+10sm+6st	11	-	CA ₍₁₅₎ /CAT ₍₁₀₎	Presente estudo	
	Santa Rita de Jacutinga (MG)	24	48	10m+10sm+6st	11	-	CA ₍₁₅₎ /CAT ₍₁₀₎	Presente estudo	
<i>Boana rosenbergi</i>	-	24	48	-	-	-	-	Léon, 1970	
Gr. <i>Boana pulchella</i>	<i>Boana albonigra</i>	Jujuy (ARG)	24	48	12m+8sm+4st	11	Centromérica e intersticial	-	Ferro et al., 2018
	<i>Boana bischoffi</i> (como <i>Hyla multilineata</i>)	Itapeceirica da Serra (SP)	24	48	10m+14sm	-	-	-	Beçak, 1968

	São Francisco de Paula (RS)	24	48	10m+10sm+4st	10	Pericentromérica e intersticial	-	Raber et al., 2004
	Apiáí (SP)	24	48	12m+8sm+4st	11	Centromérica	-	Ferro et al., 2018
<i>Boana caingua</i>	Misiones (ARG)	24	48	14m+6sm+4st	12	Centromérica e intersticial	-	Ferro et al., 2018
<i>Boana cipoensis</i>	Serra Do Cipó (MG)	24	48	12m+8sm+4st	1	Centromérica e pericentromérica	rDNA	Ferro et al., 2018
	Córdoba (ARG)	24	48	14m+6sm+4st	1	Centromérica e intersticial	-	Ferro et al., 2018
<i>Boana cordobae</i>	Córdoba (ARG)	24	48	12m+12sm	-	Centromérica, intersticial e pericentromérica	-	Baraquet et al., 2013
	San Luís (ARG)	24	48	12m+12sm	-	Centromérica, intersticial e pericentromérica	-	Baraquet et al., 2013
<i>Boana curupi</i> (como <i>Hyla</i> aff. <i>semiguttata</i>)	Argentina	24	48	10m+10sm+4st	1		-	Ananias et al., 2004
	Misiones (ARG)	24	48	12m+8sm+4st	1	Centromérica, intersticial e pericentromérica	-	Ferro et al., 2018
<i>Boana guentheri</i>	Rancho Queimado (SC)	24	48	10m+10sm+4st	10	Pericentromérica e intersticial	-	Raber et al., 2004
	Terra de Areia (RS)	24	48	10m+10sm+4st	10	Pericentromérica e intersticial	-	Raber et al., 2004
<i>Boana joaquinii</i> (como <i>Hyla semiguttata</i>)	Cabará do Sul (RS)	24	48	10m+10sm+4st	10	Centromérica e intersticial	-	Ananias et al., 2004
	São Francisco de Paula (RS)	24	48	10m+10sm+4st	10	Centromérica e intersticial	-	Ananias et al., 2004
<i>Boana marginata</i>	São Francisco de Paula (RS)	24	48	10m+10sm+4st	10	Centromérica e intersticial	-	Ananias et al., 2004
<i>Boana marianitae</i>	Salta (ARG)	24	48	12m+8sm+4st	11	Centromérica	-	Ferro et al., 2018
<i>Boana polytaenia</i>	Brasil	24	48	-	-	-	-	Bogart, 1973
	-	24	-	-	-	-	-	Rabelo, 1970
	Pedra Azul (ES)	24	48	12m+10sm+2st	-	-	-	Nunes e

								Fagundes, 2008b
<i>Boana prasina</i>	Campos do Jordão (SP)	24	-	8m+14sm+2a	-	-	-	Beçak, 1968
	São Paulo (SP)	24	-	8m+14sm+2a	-	-	-	Beçak, 1968
	Jundiaí (SP)	24	-	-	-	-	-	
<i>Boana pulchella</i>	Argentina	48		-	-	-	-	Bogart, 1973
	Córdoba (ARG)	24	48	12m+12sm	-	Centromérica	-	Baraquet et al., 2013
	Misiones (ARG)	24	48	14m+6sm+4st	12	Centromérica, intersticial e pericentromérica	-	Ferro et al., 2018
	Buenos Aires (ARG)	24	48	14m+6sm+4st	12	Centromérica, intersticial e pericentromérica	-	Ferro et al., 2018
	Entre Ríos (ARG)	24	48	14m+6sm+4st	12	Centromérica, intersticial e pericentromérica	-	Ferro et al., 2018
	Corrientes (ARG)	24	48	14m+6sm+4st	12	Centromérica, intersticial e pericentromérica	-	Ferro et al., 2018
	San luis (ARG)	24	48	14m+6sm+4st	12	Centromérica, intersticial e pericentromérica	-	Ferro et al., 2018
	Rocha (URU)	24	48	14m+6sm+4st	12	Centromérica, intersticial e pericentromérica	-	Ferro et al., 2018
	Flores (URU)	24	48	14m+6sm+4st	12	Centromérica, intersticial e pericentromérica	-	Ferro et al., 2018
	San José (URU)	24	48	14m+6sm+4st	12	Centromérica, intersticial e pericentromérica	-	Ferro et al., 2018
<i>Boana riojana</i>	La Rioja (ARG)	24	48	12m+8sm+4st	11	Centromérica e intersticial	rDNA	Ferro et al., 2018
	Salta (ARG)	24	48	12m+8sm+4st	11	Centromérica e	rDNA	Ferro et al., 2018

							intersticial			
		Catamarca (ARG)	24	48	12m+8sm+4st	11	Centromérica e intersticial	rDNA	Ferro et al., 2018	
		Tucumán (ARG)	24	48	12m+8sm+4st	11	Centromérica e intersticial	rDNA	Ferro et al., 2018	
<i>Boana semiguattata</i>		Piraquara (PR)	24	48	10m+10sm+4st	1	Centromérica e intersticial	-	Ananias et al., 2004	
<i>Boana stellae</i>		Misiones (ARG)	24	48	12m+8sm+4st	1	Centromérica e intersticial	rDNA	Ferro et al., 2018	
Gr. <i>Boana pellucens</i>	<i>Boana pellucens</i>	Esmeraldas (ECU)	24	48	12m+12sm	11	-	rDNA	Ferro et al., 2018	
	<i>Boana rufitela</i>	-	24	-	-	-	-	-	Duellman, 1967	
<i>Boana atlântica</i>		Itacaré (BA)	24	48	8m+10sm+6st	10 e 12	Centromérica	-	Carvalho et al., 2014	
		Peru	24	48	-	-	-	-	Bogart, 1973	
		Manaus (AM)	24	48	6m+12sm+6st	11	Centromérica	tel	Mattos et al., 2014	
Gr. <i>Boana punctata</i>	<i>Boana cinerascens</i> (como <i>Hyla granosa</i>)	Tungurahua (ECU)	24	48	12m+8sm+4st	11	Centromérica e pericentromérica	rDNA	Ferro et al., 2018	
		Santa Barbará do Pará (PA)	24	48	12m+8sm+4st	11	Centromérica e pericentromérica	rDNA	Ferro et al., 2018	
		São Gabriel da Cachoeira (AM)	24	48	12m+8sm+4st	11	Centromérica e pericentromérica	rDNA	Ferro et al., 2018	
		-	24	-	-	-	-	-	-	Bogart e Bogart, 1971
		<i>Boana punctata</i>	Peru	24	-	-	-	-	-	Bogart, 1973
		Marabá (PA)	24	48	10m+12sm+2st/ 8m+14sm+2st ⁽¹⁾	11	Centromérica e intersticial	rDNA	Ferro et al., 2018	
		São Sebastião do Uatumã (AM)	24	48	8m+6sm+10st	11	Centromérica e pericentromérica	tel	Mattos et al., 2014	
Gr. <i>Boana semilineata</i>	<i>Boana boans</i>	(perto de) Santa Elena de Uairén (VEN)	24	48	-	7	Centromérica e pericentromérica	tel	Schmid e Steinlein, 2016a	
		(perto de) Santa Elena de Uairén (VEN)	24	48	-	7	Centromérica, pericentromérica e intersticial	-	Schmid e Steinlein, 2016b	

		Melgaço (PA)	24	48	12m+10sm+2st	7	Centromérica, pericentromérica e intersticial	rDNA	Ferro et al., 2018
	<i>Boana geographica</i>	Santa Isabel do Rio Negro (AM)	24	48	10m+6sm+8st	1	Centromérica e pericentromérica	tel	Mattos et al., 2014
	<i>Boana pombali</i>	Wenceslau Guimarães (BA)	24	48	16m+8sm	7	Centromérica	-	Carvalho et al., 2014
	<i>Boana semilineata</i>	Santa Tereza (ES)	24	48	10m+6sm+8st	11	-	rDNA	Nunes e Fagundes, 2008a
		Wenceslau Guimarães (BA)	24	48	10m+6sm+8st	7	Centromérica	-	Carvalho et al., 2014
	<i>Boana cf. semilineata</i>	Juruti (PA)	24	48	10m+12sm+2st	7	Centromérica, pericentromérica e intersticial	rDNA	Ferro et al., 2018
	<i>Boana wavrini</i>	Santa Isabel do Rio Negro (AM)	24	48	10m+6sm+8st	11	Centromérica e pericentromérica	tel	Mattos et al., 2014
		São Sebastião do Uatumã (AM)	24	48	10m+6sm+8st	11	Centromérica e pericentromérica	tel	Mattos et al., 2014
		Melgaço (PA)	24	48	12m+10sm+2st	11	Centromérica e pericentromérica	rDNA	Ferro et al., 2018
Clado <i>Scinax ruber</i>									
	<i>Scinax uruguayus</i>	Treinta y Três (URU)	24	48	12m+12sm	11	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
Gr. <i>Scinax uruguayus</i>									
	<i>Scinax boulengeri</i>	Darien (PAN)	24	-	-	-	-	-	Duellman, 1967
		Heredia (COR)	24	-	-	-	-	-	Duellman, 1967
	<i>Scinax rostratus</i>	Peru	24	48	-	-	-	-	Bogart, 1973
	<i>Scinax garbei</i>	Huanuco (PER)	24	-	-	-	-	-	Bogart e Bogart, 1971
	<i>Scinax constrictus</i>	Barro Alto (GO)	24	48	12m+12sm	7	-	-	Targueta et al., 2018
		Goiânia (GO)	24	48	12m+12sm	7	-	-	Targueta et al., 2018

Espécies do clado <i>Scinax ruber</i> não atribuído a nenhum grupo de espécies	<i>Scinax acuminatus</i>	Chaco (ARG)	24	48	14m+10sm	11	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
	<i>Scinax alter</i>	Santa Teresa (ES)	24	48	12m+10sm+2st	-	-	-	Nunes e Fagundes, 2008
		Guarapari (ES)	24	48	12m+10sm+2st	-	-	-	Nunes e Fagundes, 2008
		Anchieta (ES)	24	48	12m+10sm+2st	-	-	-	Nunes e Fagundes, 2008
		Rancho Queimado (SC)	24	48	16m+8sm	3	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
		Ubatuba (SP)	24	48	16m+8sm	3	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
	<i>Scinax caldarum</i>	Poços de Caldas (MG)	24	48	18m+6sm	-	-	-	Gruber et al., 2017
	<i>Scinax crospedospilus</i>	Mogi das Cruzes (SP)	24	48	16m+8sm	-	Centromérica	tel	Gruber et al., 2017
	<i>Scinax curicica</i>	Serra do Cipó (MG)	24	48	14m+10sm	11	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
	<i>Scinax duartei</i>	Petrópolis (RJ)	24	48	16m+8sm	11	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
		Itamonte (MG)	24	48	16m+8sm	11	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
	<i>Scinax elaeochrous</i>	Heredia (COR)	24	-	-	-	-	-	Duellman, 1967
	<i>Scinax eurydice</i>	São José dos Campos (SP)	24	48	14m+10sm	11	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
		Jundiaí (SP)	24	48	14m+10sm	11	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
		Jundiaí (SP)	24	48	16m+8sm	-	-	-	Gruber et al., 2017
		Viçosa (MG)	24	48	14m+8sm+2st	9	-	CA ₍₁₅₎ /CAT ₍₁₀₎	Presente estudo
	<i>Scinax funereus</i>	Huánuco (PER)	24	-	-	-	-	-	Duellman, 1967
	<i>Scinax fuscomarginatus</i>	-	24	-	-	-	-	-	Rabello, 1970
		Corrientes (ARG)	24	48	12m+12sm	11	Centromérica	-	Cardozo et al.,

								2011
<i>Scinax fuscovarius</i>	Biritiba Mirim (SP)	24	48	14m+10sm	12	Centromérica	rDNA	Gruber et al., 2017
	Socorro (SP)	24	48	14m+10sm	12	Centromérica	rDNA	Gruber et al., 2017
	Jujuy (ARG)	24	48	12m+12sm	11	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
	Misiones (ARG)	24	48	12m+12sm	11	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
	Salta (ARG)	24	48	12m+12sm	11	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
	Condoi (PR)	24	48	12m+12sm	11	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
	Rio Claro (SP)	24	48	12m+12sm	11	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
	Santa Maria da Serra (SP)	24	48	12m+12sm	11	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
	Socorro (SP)	24	48	12m+12sm	11	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
	Rio Claro (SP)	24	48	10m+10sm+4st	12	Centromérica	rDNA	Kasahara et al., 2003
	Santa Maria da Serra (SP)	24	48	10m+10sm+4st	12	Centromérica	rDNA	Kasahara et al., 2003
	Itatiba (SP)	24	48	10m+10sm+4st	12	Centromérica	rDNA	Kasahara et al., 2003
	-	-	-	-	-	-	-	King, 1990
	-	-	-	-	-	-	-	Anderson, 1991
	Rio Casca (MG)	24	-	-	12	-	-	Baldissera et al., 1993
<i>Scinax granulatus</i>	-	24+B	-	-	-	-	-	Rabello, 1970
	Rio Claro (SP)	24		-	12		-	Baldissera et al., 1993
<i>Scinax granulatus</i>	Misiones (ARG)	24	48	14m+10sm	11	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011

<i>Scinax hayii</i>	San José (URU)	24	48	14m+10sm	11	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
	Camanducaia (MG)	24	48	14m+10sm	11\8	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
	Jundiaí (SP)	24	-	-	12	-	-	Baldissera et al., 1993
	Campos do Jordão (SP)	24	48	14m+10sm	11\8	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
	Itapecerica da Serra (SP)	24	-	14m+10sm	-	-	-	Beçak, 1968
	Campos do Jordão (SP)	24	-	14m+10sm	-	-	-	Beçak, 1968
	Biritiba Mirim (SP)	24	48	20m+4sm	-	Centromérica	tel	Gruber et l., 2017
	Mogi das Cruzes (SP)	24	48	20m+4sm	-	Centromérica	tel	Gruber et l., 2017
<i>Scinax nasicus</i>	Misiones (ARG)	24	48	12m+12sm	11	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
	Salta (ARG)	24	48	12m+12sm	11	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
	Santa Fe (ARG)	24	48	12m+12sm	11	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
	Santiago del Estero (ARG)	24	48	12m+12sm	11	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
<i>Scinax perereca</i>	Ribeirão Branco (SP)	24	48	-	12	-	-	Pombal e Haddad, 1995
	Misiones (ARG)	24	48	12m+12sm	11	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
	Ribeirão Branco (SP)	24	48	12m+12sm	11	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
<i>Scinax similis</i>	Misiones (ARG)	24	48	12m+12sm	11	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
	Corrientes (ARG)	24	48	12m+12sm	11	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
	Três Marias (MG)	24	48	12m+12sm	11	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011

Clado <i>Ololygon catharinae</i> Gr. <i>Ololygon catharinae</i>	<i>Scinax</i> sp.	Itirapina (SP)	24	48	12m+12sm	11	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
		Três Marias (MG)	24	-	16m+6sm++2st	-	-	-	Gruber et al., 2017
		Anchieta (ES)	24	48	8m+14sm+2st	-	-	-	Nunes e Fagundes, 2008
		Rio Claro (SP)	24	48	12m+12sm	11	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
	<i>Scinax squalirostris</i>	Misiones (ARG)	24	48	12m+12sm	11	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
		Itirapina (SP)	24	48	12m+12sm	11	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
		San Jose (URU)	24	48	12m+12sm	11	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
		-	24	48	-	-	-	-	Barrio e Pistol de Rubel, 1970
	<i>Scinax staufferi</i>	Rivas (NIC)	24	-	-	-	-	-	Duellman, 1967
	<i>Ololygon albicans</i>	Petrópolis (RJ)	24	48	10m+4sm+10st	6	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
		Petrópolis (RJ)	24	48	10m+10sm+4st	-	Centromérica	-	Gruber et al., 2017
	<i>Ololygon argyreornata</i>	Guarapari (ES)	24	48	10m+12sm+2st	-	-	-	Nunes e Fagundes, 2008b
		Ilha do Cardoso (SP)	24	48	10m+12sm+2st	6	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
		Ilha do Cardoso (SP)	24	48	10m+14sm	-	Centromérica	-	Gruber et al., 2017
	<i>Ololygon ariadne</i>	-	24	48	10m+12sm+2st	6	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
	<i>Ololygon aromothyella</i>	Uruguai	24	48	10m+12sm+2st	6	Centromérica e pericentromérica	-	Cardozo et al., 2011
	<i>Ololygon berthae</i>	Misiones (ARG)	24	48	10m+12sm+2st	6	Centromérica and pericentromérica	-	Cardozo et al., 2011
	<i>Ololygon brieri</i>	Brasil	24	48	-	-	-	-	Bogart, 1973

<i>Ololygon canastrensis</i>	Furnas (MG)	24	48	12m+12sm	11\06	Centromérica e pericentromérica	-	Cardozo et al., 2011
<i>Ololygon carnevalli</i>	Caratinga (MG)	24	48	8m+8sm+8st	6	-	CA ₍₁₅₎ /CAT ₍₁₀₎	Presente estudo
	Cataguases (MG)	24	48	8m+8sm+8st	6	-	CA ₍₁₅₎ /CAT ₍₁₀₎	Presente estudo
<i>Ololygon catharinae</i>	Brasil	24	48	-	-	-	-	Bogart, 1973
<i>Ololygon centralis</i>	Silvânia (GO)	24	48	10m+14sm	1			Targueta et al., 2018
<i>Ololygon hiemalis</i>	Jundiaí (SP)	24	48	10m+12sm+2st	6	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
	Mogi Guaçu (SP)	24	48	10m+14sm	-	-	rDNA	Gruber et al., 2017
<i>Ololygon littoralis</i>	Ubatuba (SP)	24	48	10m+12sm+2st	6	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
	Bertioga (SP)	24	48	10m+14sm	-	Centromérica	tel	Gruber et al., 2017
	Ubatuba (SP)	24	48	10m+14sm	-	Centromérica	tel	Gruber et al., 2017
<i>Ololygon longilinea</i>	Poços de Caldas (MG)	24	48	10m+12sm+2st	6	Centromérica and pericentromérica	-	Cardozo et al., 2011
<i>Ololygon luizotavioi</i>	Araponga (MG)	24	48	8m+12sm+4st	9	-	CA ₍₁₅₎ /CAT ₍₁₀₎	Presente estudo
<i>Ololygon obtriangulata</i>	São José do Barreiro (SP)	24	48	10m+12sm+2st	6	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
	Biritiba Mirim (SP)	24	48	10m+12sm+2st	6	-	rDNA/tel	Gruber et al., 2017
<i>Ololygon rizibilis</i>	Ribeirão Branco (SP)	24	48	10m+12sm+2st	6	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
<i>Ololygon trapicheiroi</i>	Ubatuba (SP)	24	48	10m+12sm+2st	-	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
	Misiones (ARG)	24	48	10m+12sm+2st	6	Centromérica	-	Cardozo et al., 2011
	Rocha (URU)	24	48	10m+12sm+2st	6	Centromérica e	-	Cardozo et al.,

							pericentromérica	2011
		Corrientes (ARG)	24	48	10m+12sm+2st	6	Centromérica e pericentromérica	- Cardozo et al., 2011
		Itirapina (SP)	24	48	10m+12sm+2st	6	Centromérica e pericentromérica	- Cardozo et al., 2011
Gr. <i>Ololygon</i> <i>perpusillus</i>	<i>Ololygon</i> aff. <i>arduous</i>	Pocrane (MG)	24	48	8m+6sm+10st	5	Centromérica	CA ₍₁₀₎ /CAT ₍₁₅₎ Peixoto et al., 2015
	<i>Ololygon arduous</i>	Santa Teresa (ES)	24	48	8m+8sm+8st	5	Centromérica	CA ₍₁₀₎ /CAT ₍₁₅₎ Peixoto et al., 2015
	<i>Ololygon belloni</i>	Castelo (ES)	24	48	10m+4sm+10st	5	Centromérica	CA ₍₁₀₎ /CAT ₍₁₅₎ Peixoto et al., 2015
	<i>Ololygon cosenzai</i>	Ervália (ES)	24	48	8m+8sm+8st	5	Centromérica	CA ₍₁₀₎ /CAT ₍₁₅₎ Peixoto et al., 2015
	<i>Ololygon</i> sp. 1	Paratí (RJ)	24	48	10m+4sm+10st	6	Centromérica	- Cardozo et al., 2011
	<i>Ololygon</i> sp. 2	Ilha do Cardoso (SP)	24	48	10m+12sm+2st	6	Centromérica	- Cardozo et al., 2011
	<i>Ololygon perpusilla</i>	Brasil	24	48	-	-	-	- Bogart, 1973
	<i>Ololygon tripui</i>	Ouro Preto (MG)	24	48	8m+10sm+6st	3 e 6	Centromérica e pericentromérica	GA ₍₁₀₎ /CAT ₍₁₅₎ /rDNA Peixoto et al., 2016
		Muriaé (MG)	24	48	8m+10sm+6st	6	Centromérica e pericentromérica	GA ₍₁₀₎ /CAT ₍₁₅₎ /rDNA Peixoto et al., 2016
		Ervália (MG)	24	48	8m+10sm+6st	6	Centromérica e pericentromérica	GA ₍₁₀₎ /CAT ₍₁₅₎ /rDNA Peixoto et al., 2016
		Simonésia (MG)	24	48	8m+10sm+6st	6	Centromérica e pericentromérica	GA ₍₁₀₎ /CAT ₍₁₅₎ /rDNA Peixoto et al., 2016
	<i>Ololygon v-signata</i>	São Pedro da Serra (RJ)	24	48	8m+6sm+10st	5	Centromérica	CA ₍₁₀₎ /CAT ₍₁₅₎ Peixoto et al., 2015
Gr. <i>Dendropsophus columbianus</i>	<i>Dendropsophus carnifex</i>	-	30	-	-	-	-	- Duellman e Trueb, 1983
Gr. <i>Dendropsophus labialis</i>	<i>Dendropsophus labialis</i>	Colômbia	30	-	-	-	-	- Bogart, 1973

Gr. <i>Dendropsophus leucophyllatus</i>	<i>Dendropsophus ebraccatus</i>	-	30	-	-	-	-	Duellman e Cole, 1965
		Valle de Talamanca (CRC)	30	58	8m+16sm+4st+2t	10	Centromérica e pericentromérica	Kaiser et al., 1996
		Valle de la Estrella (CRC)	30	58	8m+16sm+4st+2t	10	Centromérica e pericentromérica	Kaiser et al., 1996
		Quepos (CRC)	30	58	8m+16sm+4st+2t	13	Centromérica e pericentromérica	Kaiser et al., 1996
		Rincón (PUR)	30	58	8m+16sm+4st+2t	13	Centromérica e pericentromérica	Kaiser et al., 1996
	<i>Dendropsophus anceps</i>	Brasil	30	-	-	-	-	Bogart, 1973
	<i>Dendropsophus elegans</i>	Ubatuba (SP)	30	52	10m+12sm+8t	10	Centromérica	Gruber et al., 2005
		São José dos Pinhais (PR)	30	56	16m+6sm+4st+4t	13	Centromérica	tel/rDNA Oliveira et al., 2016
		Viçosa (MG)	30	56	8m+10sm+8st+4t	13	-	CA ₍₁₅₎ /CAT ₍₁₀₎ Presente estudo
		Cataguases (MG)	30	56	8m+10sm+8st+4t	13	-	CA ₍₁₅₎ /CAT ₍₁₀₎ Presente estudo
	<i>Dendropsophus leucophyllatus</i>	Peru	30	-	-	-	-	Bogart, 1973
Gr. <i>Dendropsophus marmoratus</i>	<i>Dendropsophus marmoratus</i>	Peru	30	-	-	-	-	Bogart, 1973
		Juruti (PA)	30	50	14m+6sm+10t	9	Centromérica e intersticial	rDNA Suárez et al., 2013
		Platô Capiiranga (PA)	30	50	14m+6sm+10t	9	Centromérica e intersticial	rDNA Suárez et al., 2013
		Igarapé Prudêncio (PA)	30	50	14m+6sm+10t	9	Centromérica e intersticial	rDNA Suárez et al., 2013
	<i>Dendropsophus melanargyreus</i>	Belém (PA)	30	50	14m+6sm+4st+6t	9	Centromérica e intersticial	rDNA Suárez et al., 2013
		Carajás (PA)	30	50	14m+6sm+4st+6t	9	Centromérica e intersticial	rDNA Suárez et al., 2013
	<i>Dendropsophus nahdereri</i>	Rancho Queimado (SC)	30	50	14sm+6sm+10t	1	Centromérica	- Gruber et al., 2005

Gr. <i>Dendropsophus</i> <i>microcephalus</i>	<i>Dendropsophus novaisi</i>	Jequié (BA)	30	50	14m+6sm+10t	9	Centromérica	tel	Teixeira et al., 2016
	<i>Dendropsophus seniculus</i>	Ribeirão Grande (SP)	30	50	14m+6sm+10t	9	Centromérica	tel	Teixeira et al., 2016
	<i>Dendropsophus soaresi</i>	Barreiras (BA)	30	50	14m+6sm+10t	9	Centromérica	tel	Teixeira et al., 2016
	<i>Dendropsophus berthaltutze</i>	Guaraqueçaba (PR)	30	52	12m+10sm+8t	15	Centromérica	-	Gruber et al., 2005
	<i>Dendropsophus bipunctatus</i>	Cataguases (MG)	30	58	12m+12sm+4st+2t	13	-	CA ₍₁₅₎ /CAT ₍₁₀₎	Presente estudo
	<i>Dendropsophus cruzi</i>	Mossâmedes (GO)	30	54	14m+10sm+6st	14	Centromérica	-	Gruber et al., 2005
	<i>Dendropsophus decipiens</i>	Brasil	30	-	-	-	-	-	Bogart, 1973
	<i>Dendropsophus elianeae</i>	Rio Claro (SP)	30	54	16m+8sm+6st	11	Centromérica	-	Gruber et al., 2005
	<i>Dendropsophus jimi</i>	Uberlândia (MG)	30	50	12m+8sm+10t	12	Centromérica	rDNA	Medeiros et al., 2013
	<i>Dendropsophus leali</i>	-	30	-	-	-	-	-	Bogart e Bogart, 1971
		Peru	30	-	-	-	-	-	Bogart, 1973
	<i>Dendropsophus microcephalus</i>	-	30	-	-	-	-	-	Duellman e Cole, 1965
		-	30	-	-	-	-	-	Léon, 1970
		Quepos (CRC)	30	58	4m+22sm+4st	13	Centromérica e pericentromérica	-	Kaiser et al., 1996
		Argentina	30	-	-	-	-	-	Bogart, 1973
	<i>Dendropsophus nanus</i>	Nova Itapirema (SP)	30	52	12m+10sm+8t	1 e 13	Centromérica	rDNA	Medeiros et al., 2003
		Nova Aliança (SP)	30/ 30 +1B		-	13	Pericentromérica	rDNA	Medeiros et al., 2006
		Botucatu (SP)	30/ 30 + 1B/ 30	52	-	13	Pericentromérica	rDNA	Medeiros et al., 2006

		+2B/ 30 + 3B						
	Rio Claro (SP)	30	52	12m+10sm+8t	1 e 13	Centromérica	-	Gruber et al., 2005
	Botucatu (SP)	30	52	12m+10sm+8t	13	Centromérica	rDNA	Medeiros et al, 2013
	Serra da Bodoquena (MS)	30	53	12m+11sm+7t	13	Centromérica	rDNA	Medeiros et al, 2013
	Telêmaco Borba (PR)	30	52	12m+10sm+8t	13	Centromérica e pericentromérica	rDNA	Medeiros et al, 2013
<i>Dendropsophus phlebodes</i>	-	30	-	-	-	-	-	Duellman e Cole, 1965
	-	30	-	-	-	-	-	Duellman, 1967
	Tanque, Fortuna (CRC)	30	56	4m+14sm+8st+4t	13	Centromérica e pericentromérica	-	Kaiser et al., 1996
<i>Dendropsophus rhodopeplus</i>	Peru	30	-	-	-	-	-	Bogart, 1973
<i>Dendropsophus rubicundulus</i>	-	30	-	-	-	-	-	Rabello et al., 1970
	São João d'Aliança (GO)	30	54	16m+8sm+6t	7	Centromérica	-	Gruber et al., 2005
<i>Dendropsophus saborni</i>	Nova Itapirema (SP)	30	50	12m+8sm+10t	12	Centromérica	rDNA	Medeiros et al., 2003
	Rio Claro (SP)	30	50	12m+8sm+10t	14	Centromérica	-	Gruber et al., 2005
	Salesópolis (SP)	30	50	12m+8sm+10t	12	Centromérica	rDNA	Medeiros et al., 2013
	Botucatu (SP)	30	50	12m+8sm+10t	12	Centromérica	rDNA	Medeiros et al., 2013
	Torres (RS)	30	50	12m+8sm+10t	12	Centromérica	rDNA	Medeiros et al., 2013
<i>Dendropsophus walfordi</i>	Guajará Mirim (RR)	30	52	12m+10sm+8st	13	Centromérica	rDNA	Medeiros et al., 2013

	<i>Dendropsophus weneri</i>	São José dos Pinhais (PR)	30	60	16m+4sm+10st	13	Centromérica	rDNA	Oliveira et al., 2016
Gr. <i>Dendropsophus minutus</i>	-	-	30	60	-	-	-	-	Rabello et al., 1970
	Brasil	-	30	-	-	-	-	-	Bogart, 1973
	Peru	-	30	-	-	-	-	-	Bogart, 1973
	<i>Dendropsophus minutus</i>	São Carlos (SP)	30	60	18m+12sm	13	Centromérica	-	Gruber et al., 2005
		Ubatuba (SP)	30	60	18m+12sm	13	Centromérica	-	Gruber et al., 2005
		São José dos Pinhais (PR)	30	60	14m+14sm+2st	13	Centromérica e intersticial	tel/rDNA	Oliveira et al., 2016
Gr. <i>Dendropsophus parviceps</i>	Brasil	-	30	-	-	-	-	-	Bogart, 1973
		Campos do Jordão (SP)	30	52	14m+8sm+8st	10	Centromérica	-	Gruber et al., 2005
	<i>Dendropsophus microps</i>	São Bento do Sul (SC)	30	52	14m+8sm+2st+6t	10	Centromérica	-	Gruber et al., 2005
		São José dos Pinhais (PR)	30	52	16m+4sm+2st+8t	10	Centromérica e intersticial	tel/rDNA	Oliveira et al., 2016
	<i>Dendropsophus parviceps</i>	-	30	-	-	-	-	-	Bogart e Bogart, 1971
		Peru	30	-	-	-	-	-	Bogart, 1973
	<i>Dendropsophus ruschii</i>	Pedra Dourada (MG)	30	56	10m+10sm+6st+4t	10	-	CA ₍₁₅₎ /CAT ₍₁₀₎	Presente estudo
	<i>Dendropsophus subocularis</i>	-	30	-	-	-	-	-	Duellman, 1970

(1) Duas fórmulas cariotípicas para espécie nessa localidade.

m = metacêntrico, **sm** = submetracêntrico, **st** = subtelocêntrico, **t** = telocêntrico, **a** = acrocêntrico.

tel = sonda telomérica.

rDNA = sonda de DNA ribossomal.

sonda-B = sonda obtida através da microdissecção de cromossomos B.

Referências Lista 1, material suplementar:

- Ananias F, Garcia PCA, Recco -Pimentel SM. Conserved karyotypes in the *Hyla pukhella* species group (Anura, Hylidae). *Brain.*; 140(1):42–8 (2004).
- Anderson K. Chromosome evolution in Holartic *Hyla* treefrogs. In: Green DM, Sessions SK. *Amphibian Cytogenetics and Evolution*. San Diego, Academic Press. 299–331 (1991)
- Baldissera JR FA, Oliveira PSL, Kasahara S. Cytogenetic of four brazilian *Hyla* species (Amphibia – Anura) and description of a case with supernumerary chromosome. *Rev Bras Genética* 16(2): 335–45. (1993).
- Baraquet M, Salas NE, Martino AL. C-banding patterns and meiotic behavior in *Hypsiboas pulchellus* and *H. Cordobae* (anura, hylidae). *BAG - J Basic Appl Genet*. 24(1): 32–9 (2013).
- Barrio A, Pistol De Rubel D. Características del cariotipo de los pséuidos (Amphibian, Anura). *Physis* 29:505–510 (1970).
- Beçak ML. Chromosomal Analysis of Eighteen Species of Anura. *Caryologia*. 21(3): 191–208 (1968).
- Bogart JP, Bogart JE. Genetic compatibility experiments between some south American anuran amphibians. *Herpetolog*. 27:229–235 (1971).
- Bogart JP. Evolution of anuran karyotypes. En: Vial JL (Ed.) *Evolutionary Biology of the Anurans*. University of Missouri Press, USA. Pp. 337–349 (1973).
- Cardozo DE, Leme DM, Bortoleto JF, Catroli GF, Baldo D, Faivovich J, Kolenc F, Silva APZ, Borteiro C, Haddad CFB, Kasahara S Karyotypic data on 28 species of *Scinax* (Amphibia: Anura: Hylidae) diversity and informative variation. *Copeia*. 2011:251–263 (2011)
- Carvalho KA, Garcia PCA, Recco-Pimentel SM (a). NOR Dispersion, Telomeric Sequence Detection in Centromeric Regions and Meiotic Multivalent Configurations in Species of the *Aplastodiscus albofrenatus* Group (Anura, Hylidae). *Cytogenet Genome Res* (2009a).
- Carvalho KA, García PCA, Recco-Pimentel SM, Garcia PCA. Cytogenetic comparison of tree frogs of the genus *Aplastodiscus* and the *Hypsiboas faber* group (Anura, Hylidae). *Genetics and Molecular Research*. 8(4):1498–508 (2009 b).
- Carvalho MA, Rodrigues MT, Siqueira S, Garcia C. Dynamics of chromosomal evolution in the genus *Hypsiboas* (Anura: Hylidae). *Genet Mol Res*. 13(3):7826–38 (2014).
- Catroli GF, Faivovich J, Haddad CFB, Kasahara S. Conserved Karyotypes in Cophomantini: Cytogenetic Analysis of 12 Species from 3 Species Groups of *Bokermannohyla* (Amphibia: Anura: Hylidae). *J Herpetol*. 45(1):120–8 (2011).
- de Oliveira HHP, Souza CCN, Ribeiro CL, Bastos RP, Da Cruz AD, Silva DM. Citogenética comparativa das famílias Leptodactylidae e Hylidae do cerrado goiano. *Estudos*. 2012; 339(2):123–31
- Duellman WE, Cole CJ. Studies of Chromosomes of Some Anuran Amphibians (Hylidae and Centrolenidae). *Systematic Zoology*. 14(2) 139–143 (1965).
- Duellman WE, De la Riva I, Wild ER. Frogs of the *Hyla armata* and *Hyla pulchella* group in the Andes of South America, with definitions and analyses of phylogenetic relationships of Andean group of *Hyla* . *Scientific Papers. Natural History Museum, University of Kansas*. 3: 1–41 (1997).

Duellman WE, Trueb L: Frogs of the *Hyla columbiana* group: taxonomy and phylogenetic relationships, in Rhodin AGJ, Miyata K (eds): Advances in Herpetology and Evolutionary Biology , pp 33-51 (Museum of Comparative Zoology, Harvard University, Cambridge, MA 1983).

Duellman WE. Additional studies of chromosomes of anuran amphibians. Sytematic Zoology. 16: 38–43 (1967).

Ferro JM, Marti D, Bidau C, Suárez P, Nagamachi C, Pieczarka JC, et al. B chromosomes in the tree frog *Hypsiboas albopunctatus* (Anura: Hylidae). Herpetologica. 68(4):482–90 (2012).

Gruber SL, Diniz D, Sobrinho-Scudeler PE, Foresti F, Haddad CFB, Kasahara S. Possible interspecific origin of the B chromosome of *Hypsiboas albopunctatus* (Spix, 1824) (Anura, Hylidae), revealed by microdissection, chromosome painting, and reverse hybridization. (2014).

Gruber SL, Haddad CF, Kasahara S: Evaluating the karyotypic diversity in species of *Hyla* (Anura; Hylidae) with 2n= 30 chromosomes based on the analysis of ten species. Folia Biol; 51:68–75 (2005).

Gruber SL, Haddad CFB, Kasahara S. Chromosome banding in three species of *Hypsiboas* (Hylidae, Hyalinae), 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 (2007).

Gruber SL, Zina J, Narimatsu H, Haddad CFB, Kasahara S. Comparative karyotype analysis and chromosome evolution in the genus *Aplastodiscus* (Cophomantini, Hyalinae, Hylidae). BMC Genet. 13(1):28 (2012).

Kaiser H, Mais C, Bolanos F, Steinlein C, Feichtinger W, Schmid M: Chromosomal investigation of three Costa Rican frogs from the 30-chromosome radiation of *Hyla* with the description of a unique geographic variation in nucleolus organizer regions. Genetica 98:95–102 (1996).

Kasahara S, Silva APZ, Gruber S, Haddad CFB: Comparative cytogenetic analysis on four tree frog species (Anura, Hylidae, Hyalinae) from Brazil. Cytogenet Genome Res 103:155–162 (2003).

King M: Amphibia. In: Jhon B, Gwent C (eds) Animal cytogenetics. Gebruder Borntraeger, Berlin, pp 1–241(1990).

León PE. Report of the chromosome numbers of some Costa Rican anurans. Revista de Biologia Tropical. 17: 119–124 (1970).

Mattos TL, Coelho A, Schneider CE, Telles DOC, Menin M, Gross MC. Karyotypic diversity in seven Amazonian anurans in the genus *Hypsiboas* (family Hylidae). BMC Genet. 15(1):43 (2014).

Medeiros LR, Lourenço LB, Rossa-Feres DC, Lima AP, Andrade GV, Giaretta AA, et al.: Comparative cytogenetic analysis of some species of the *Dendropsophus microcephalus* group (Anura, Hylidae) in the light of phylogenetic inferences. BMC Genet;14: 59 (2013).

Medeiros LR, Rossa-Feres DC, Jim J, Recco-Pimentel SM: B-chromosomes in two Brazilian populations of *Dendropsophus nanus* (Anura, Hylidae). Genet Mol Biol; 29:257–262 (2006).

Medeiros LR, Rossa-Feres DC, Jim J, Recco-Pimentel SM: B-chromosomes in two Brazilian populations of *Dendropsophus nanus* (Anura, Hylidae). Genet Mol Biol; 29:257–262 (2006).

Nunes RRA, Fagundes V. Cariótipos de oito espécies de anfíbios das subfamílias Hyalinae e Phyllomedusinae (Anura, Hylidae) do Espírito Santo, Brasil Bol. Mus. Biol. Mello Leitã (N. Sér.). 23: 21–36 (2008).

Nunes RRA, Fagundes V. Patterns of ribosomal DNA distribution in hylid frogs from the *Hypsiboas faber* and *H. semilineatus* species groups. Sociedade Brasileira de Genética. 31(4): 982–987 (2008).

Oliveira IS, Bueno Noleto R, Karlokoski Cunha de Oliveira A, Toledo LF, Cestari M: Comparative

cytogenetic analysis of four species of *Dendropsophus* (Hylinae) from the Brazilian Atlantic forest. J Genet; 95:349–355 (2016).

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

Peixoto MAA, Oliveira MPC, Feio RN, Dergam JA: Karyological study of *Oloolygon tripui* (Loureço, Nascimento and Pires, 2009), (Anura, Hylidae) with comments on chromosomal traits among populations. Comp Cytogenet;10:505–516 (2016).

Pombal JP, Haddad CFB, Kasahara S A new species of *Scinax* (Anura: Hylidae) from southeastern Brazil with comments on the genus. J Herpetol 29:1–6 (1995).

Rabello MN, Beçak ML, Beçak W. Contribuição a Citotaxonomia da Família Hylidae. Arquivos do Museu Nacional. 50: 285–286 (1971);.

Rabello MN. Chromosomal studies in Brazilian anurans. Caryologia. 23(1): 45–59 (1970).

Raber SC, Carvalho KA, Garcia PCA, Vinciprova G, Recco-Pimentel SM. Chromosomal characterization of *Hyla bischoffi* and *Hyla guentheri* (Anura, Hylidae). Phyllomedusa. 3:43–9 (2004).

Schmid M, Steinlein C (a). Chromosome Banding in Amphibia. XXXIV. Intrachromosomal Telomeric DNA Sequences in Anura. Cytogenet Genome Res. 148(2–3):211–26 (2016).

Schmid M, Steinlein C (b). Chromosome Banding in Amphibia. XXXIII. Demonstration of 5-Methylcytosine-Rich Heterochromatin in Anura. Cytogenet Genome Res. 148(1): 35–43 (2016).

Suárez P, Cardozo D, Baldo D, Pereyra MO, Faivovich J, Orrico VGD, et al.: Chromosome evolution in *Dendropsophini* (Amphibia, Anura, Hylinae). Cytogenet Genome Res;141:295–308 (2013).

Targueta CP, Guerra V, Gambale PG, Bastos RP, Silva DM, Telles MPC: Cytogenetics of two hylid frogs from Brazilian Cerrado. Genet Mol Biol; 41: 814-819 (2018).

Teixeira LSR, Seger KR, Targueta CP, Orrico VGD, Lourenço LB: Comparative cytogenetics of tree frogs of the *Dendropsophus marmoratus* (Laurenti, 1768) group: Conserved karyotypes and interstitial telomeric sequences. Comp Cytogenet;10:753–767 (2016).

ARTIGO II

Comparative karyotypes analyses on four species of the *Aplastodiscus* Lutz, 1950 (Anura: Cophomantinae): new chromosomal insights on the green clade

ABSTRACT

Aplastodiscus is a neotropical genus that occurs in the forested areas within the biomes mainly Atlantic forests and one isolated case in Cerrado, composed by 15 species described. Cytogenetically, only eight species were karyotyped and showed a high variation in the diploid number with $2n=24$, $2n=22$, $2n=20$ and $2n=18$ allowing the separation of these species into groups. The study aims to characterize four species through classic and molecular cytogenetic techniques, besides that to increase the knowledge about the evolution of karyotypes within the species groups. *A. weygoldti* showed $2n=22$, Ag-NOR and FISH 18S rDNA in the interstitial region of the short arms of the pair 6. In contrast, the species *A. cavicola*, *Aplastodiscus* sp. 4 and *Aplastodiscus* sp. 6 had $2n=18$, Ag-NOR regions and FISH with probe 18S rDNA markings in the terminal region of the long arms of the pair 9. Our results confirm that the genus *Aplastodiscus*, along the evolution, passed through probable independent events of chromosome fusion in the groups *A. albofrenatus* and *A. albosignatus*. However, our sample effort evidenced a new chromosome fission event in the clade of *A. albosignatus*. Further, the markings showed by Ag-NOR and FISH rDNA 18S techniques in the small pairs and congruent in the different species of the same group directs to a high conservatism on these regions, such as, the similarity of the chromosome morphologies between the genus in Cophomantinae. Lastly, the description of the karyotypes of more species of the genus *Aplastodiscus* could be the key to give more support to our notes, as well as the inclusion of the new tools classical and molecular cytogenetics.

Key words: *Aplastodiscus*; chromosomal rearrangements.; chromosomes; FISH; green clade; karyotypes; NOR.

1. INTRODUCTION

The tree-frogs *Aplastodiscus* (Lutz, 1950), informally called ‘green clade’, belongs to Cophomantinae. The genus, is neotropical mainly distributed in Atlantic Forest, in northeast, southeast and southern regions of Brazil, expanding to adjacent areas in Argentina, with one species reaching riparian forests in the Cerrado domain. *Aplastodiscus* includes 15 species in four monophyletic groups: *A. perviridis*, *A. albosignatus*, *A. albofrenatus*, *A. sibilatus*, which are supported by morphological characters, molecular data, and more recently, cytogenetic characters (Berneck et al., 2016; Cruz and Peixoto, 1984; Cruz and Peixoto, 1985; Cruz et al., 2003; Faivovich et al., 2005; Ferro et al., 2018; Frost, 2018; Garcia et al., 2001).

The phylogenetic position of Hylidae (*sensu* Duellman et al. 2016) suggests a possible synapomorphy of the diploid number $2n = 24$ for the Family, since it is the most commonly found species (Faivovich et al., 2005 and Catroli and Kasahara, 2009), with some exceptions like the presence of B-chromosomes in species *Bokermannohyla luctuosa* e *Boana albopunctata*. Among the genera of Hylidae, *Aplastodiscus* stands out for having a high karyotypic diversity $2n = 24$ chromosomes, $2n = 22$, $2n = 20$ and $2n = 18$, allowing the separation of the groups based on these cytogenetic characters, being monophyletism also found in other phylogenies been proposed to *Aplastodiscus*. In addition, mechanisms responsible for the karyotypic diversity found above were proposed, as well as independent chromosomal rearrangements like chromosomal reductions, in the three clades of the genus (Gruber et al., 2012; Berneck et al., 2016).

The two species karyotyped of *Aplastodiscus perviridis* group showed $2n = 24$, C-banding pattern was centromeric, pericentromeric and interstitial in all chromosome pairs, while the nucleolar organizer regions (NORs) occurred in the terminal region of the long arm of the chromosome pair 12 in *A. cochranae* and in pairs 11 and 12 in *A. perviridis*. (Carvalho et al., 2009b; Gruber et al., 2012). The group *A. albofrenatus* had four species analyzed, presented diploid number $2n = 22$. The heterochromatic blocks were detected in the centromeric and interstitial regions. The NORs was observed in the end of the chromosomes, as seen in *A. albofrenatus*, in chromosome pairs 1 and 6; *A. arildae*, in chromosome pairs 10 or 11; *A. eugenioi* in pairs 6 or 7, and *A. ehrhardti*, on chromosome pairs 6 and 10 (Carvalho et al., 2009a; Gruber et al., 2012).

In opposition, the group *A. albosignatus* is the least studied and which has greater ambiguity as for cytogenetic data of groups separation, due to the specie *A.*

albosignatus (sensu Berneck et al., 2016) show $2n = 20$ chromosomes and *A. leucopygius*, a diploid number $2n = 18$ chromosomes. C-banding markings predominantly centromeric in all chromosomes and NORs evidenced in the terminal region in chromosome pair 9 (Carvalho et al., 2009b; Gruber et al., 2012; Berneck et al., 2016). Finally, the group *A. sibilatus*, recently proposed, does not present any species karyotyped yet (Berneck et al., 2016).

In this present study, we propose to increase the knowledge of *Aplastodiscus*, characterizing for the first time the karyotype of four species throughout classical and molecular techniques, such as Ag-NOR impregnation and Fluorescent in situ Hybridization (FISH) with probe of 18S rDNA. In addition, we discuss about the hypothesis of independent chromosome reduction in the groups and better understand the evolution of the green clade.

2. MATERIALS AND METHODS

In total, 17 adult specimens belonging to four *Aplastodiscus* species were collected from various localities in Minas Gerais State, Brazil (Table 01). From *Aplastodiscus albofrenatus* group, we sampled one species (*A. weygoldti*). From the *Aplastodiscus albosignatus* group, the species *A. cavicola*, *Aplastodiscus* sp. 4 and *Aplastodiscus* sp. 6 (sensu Berneck et al. 2016) were analyzed. All vouchers were housed in the herpetological collection of Museu de Zoologia João Moojen from Universidade Federal de Viçosa (MZUFV) and amphibian collection from the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG-A), both in the Minas Gerais State, Brazil.

Mitotic chromosomes were obtained from gut epithelial cells of the specimens according to Schmid (1978). Each specimen was injected intraperitoneally with 0.1% solution of colchicine (0.1 ml per 10 g of body weight) for 4 hours before euthanasia (carried out with 5% lidocaine). The cells were incubated in hypotonic solution (0.9% sodium citrate) and fixed in Carnoy's solution (methanol:acetic acid 3:1). The slides with cells suspensions were stained using conventional protocols (5% Giemsa diluted in Sorensen buffer). Best metaphases were photographed in digital Olympus BX53 light microscope with a DP73 Olympus camera. Chromosome pairing and measurements were performed using Image Pro Plus® (IPP Version 4.5) to determine the modal value ($2n$) and the FN for each population. Homologs were paired and grouped according to the centromere position, in decreasing size order. Finally, the chromosomes were

classified according to their centromeric indices in metacentric (m), submetacentric (sm) and subtelocentric (st) following Green and Sessions (1991).

Active NORs in the preceding interphase were identified using silver nitrate precipitation (Ag-NORs) (Howell and Black 1980). The technique of FISH was performed according to Pinkel et al. (1986) with modifications (desnaturation with formamide 70% at 75 °C from 5 minutes). The 18S rDNA probe was obtained by Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification using the primers 18SF (5'-CCGAGGACCTCACTAAACCA) 18SR (5'-CCGCTTTGGTGACTCTTGAT) and it was labeled by nick-translation with digoxigenin 11-dUTP. Signal detection and amplification were performed using isothiocyanate probe, fluorescein-conjugated anti-digoxigenin-rhodamine. FISH images were captured in a BX53 Olympus microscope with a XM10 camera.

3. RESULTS

All species analyzed from the *A. albosignatus* group (*A. cavicola*, *Aplastodiscus* sp. 4 and *Aplastodiscus* sp. 6) had a complement of 18 chromosomes (Table 2). All chromosomes were biamed and their FN was 36, with chromosomes pairs 1 to 7 of larger size, slight variations between chromosomes pairs 2 to 7, chromosome pair 8 of medium size and only the last chromosome pair of small. Of these three species, only *Aplastodiscus* sp. 6 had chromosomal formulae $4m+10sm+2st$, by showing two subtelocentric pairs (Fig. 1c). On the other hand, *Aplastodiscus cavicola* and *Aplastodiscus* sp. 4 had $6m+12sm$ chromosomal formulae (Fig. 1a and 1b). The representative of *Aplastodiscus albofrenatus* group (*A. weygoldti*) showed $2n= 22$ chromosomes and their FN was 44, and the chromosomes pairs 1 to 5 of large size, chromosomes pairs 6 and 5 of medium size and chromosomes pairs of 8 to 11 of small size (Fig. 1d). The chromosomal formulae was $14m+6sm+2st$. Heteromorphic sex chromosomes or supernumerary elements were not detected in any of these species (Figure 1).

The first pairs of all species are clearly metacentric, as well as the smaller pairs being the last four in *A. weygoldti* and the last one in the three species from *A. albosignatus* group. In addition to this, chromosome pairs of 2 to 7 resemble morphology and relative size in all species.

Secondary constrictions were observed in the long arms of the chromosome pair number 6 in *A. weygoldti* and Ag-NORs occurred on the interstitial region of the short arm in the same chromosome pair. On the other three species (*Aplastodiscus cavicola*, *Aplastodiscus* sp. 4, and *Aplastodiscus* sp. 6), the Ag-NORs occurred on the terminal region of the short arms on the chromosome pair 9. FISH showed 18S rDNA sites in the terminal region of the long arms on both homologs of chromosome pair 9 in *Aplastodiscus cavicola*, *Aplastodiscus* sp. 4, and *Aplastodiscus* sp. 6. On *A. weygoldti* the sites of 18S rDNA were observed in the interstitial region of the short arms on both homologs of chromosome pair 6.

Based on optimization by Berneck et al. (2016), we added the diploid numbers of the species analyzed in the present study, and it is possible to fill in the gaps and propose a new chromosomal rearrangement event that occurs in the group *A. albosignatus*, using the software TNT and Adobe Illustrator for reconstruction and editing of the tree (Fig. 2).

4. DISCUSSION

The species analyzed in this study confirm a karyotypic variability of *Aplastodiscus*, showing a disparity from $2n = 24$ chromosomes mostly found in hylids. However, those diploid number are similar to those found on other species of Cophomantinae, (i. g. *Boana albopunctata* with $2n = 22$, $2n = 22 + 1B$, $2n = 22 + 2B$ chromosomes and *Bokermannohyla luctuosa* $2n = 24 + 1B$ chromosomes) which are also discrepant from other species of Hylidae (Beçak 1968; Bogart 1973; Baldissera et al. 1993; Gruber et al. 2006; Ferro et al., 2012). Counting on the information of *Aplastodiscus* sp. 5 (see comments below), totalizing 13 species of the genus (between valid and putative, *sensu* Berneck et al., 2016) with available karyotype data. The group of species *A. sibilatus* is the only one that does not present any karyotype described. Our analyses confirm a diploid number for the groups *A. albofrenatus* ($2n = 22$ chromosomes) and *A. albosignatus* ($2n = 18$ chromosomes) previously indicated by the other authors (Carvalho et al. 2009a; Carvalho et al. 2009b; Gruber et al. 2012).

Thus, our results for *A. albosignatus* group and the reidentification of the population of *Aplastodiscus* sp. 5 under the name *A. albosignatus* (Carvalho et al., 2009b; Berneck, B. 2018, pers. comm.), add new information that makes it possible to reformulate hypotheses of the chromosomal events. The events of chromosomal fusion reduced the diploid number from $2n = 24$ to $2n = 22$ in the group (Gruber et al., 2012), in

the same way occurred for *A. weygoldti* and, more parsimoniously, it will probably be the same for the species *Aplastodiscus* sp. 2. These results further support the hypothesis of independent fusion occurred in *A. albofrenatus* and *A. albosignatus* groups (Gruber et al., 2012; Berneck et al., 2016).

In addition, the data found indicates chromosomal rearrangements (fusion) leading to a reduction from $2n=24$ to $2n=18$ chromosomes in the first node of the group *A. albosignatus*. In the context of our hypothesis, other type of chromosomal rearrangements occur in the node *Aplastodiscus* sp. 5+*A. flumineus*+*A. albosignatus*, an event of chromosomal fission reversing the diploid number from $2n=18$ to $2n=20$ in *Aplastodiscus* sp. 5, *A. albosignatus*. Parsimoniously, we infer the same for *A. flumineus*, it may be a possible synapomorphy of the clade. Thus, multiple chromosomal rearrangements determine the dynamics of the diploid number in the genus. It is necessary to reiterate the need for a future cytogenetic analyses of the clade *A. sibilatus* to confirm the plesiomorphic condition of $2n=24$ indicated for the genus.

Our results showed differences between the karyotype formulae described here with the karyotype formulae from other species of the group with described data. Those rearrangements tend to play an important role in the evolution of species, since they make the viability of the offspring difficult between species with different chromosomal arrangements, besides being a consequence of multidisciplinary character and of difficult evaluation (Sites and Moritz, 1987; Guerra, 1988). *A. cavicola* and *Aplastodiscus* sp. 4 exhibit karyotypic formulae equal to those of *A. albosignatus* and *A. leucopygius* being perhaps a possible synapomorphy for these species.

The increase in the number of smaller pairs in species of the group *A. albofrenatus*, as for example, *A. weygoldti* and *A. eugenioi* in relation to those of the group *A. albosignatus* suggest that the events of fission and chromosomal fusion involve the pairs of larger size. The chromosomal evolution from an ancestor $2n=24$, for the species analyzed here, traverses the two proposed pathways of chromosomal rearrangement events: chromosome pairs 6 and 7 in the species with $2n=18$, *A. cavicola*, *Aplastodiscus* sp. 4 and *Aplastodiscus* sp. 6, were originated from the merger of the small pairs 7, 8, 9 and 10. Like *A. weygoldti* with $2n=22$, which would have its large chromosome pair 2 as a result of the merging of small chromosome pair 12 and the large chromosome pair 3 (Gruber et al., 2012).

The markings of Ag-NORs and FISH with probe of 18S rDNA in chromosome pairs 6 in *A. weygoldti* are the same as other species in the group, but differ because they present multiple NORs as *A. albofrenatus* and *A. ehrhardti* (Carvalho et al., 2009b). The group *A. albosignatus* present simple NOR in the species *A. cavicola*, *Aplastodiscus* sp. 4 and *Aplastodiscus* sp. 6 had impregnation in chromosome pair 9, as already noted in *A. albosignatus* and *A. leucopygius* indicating a high degree of conservation these regions that have vital importance. Therefore, as in groups of species of *Boana* by Ferro et al. (2018), as markings observed in the species of *Aplastodiscus* in the study and others (Carvalho et al., 2009a; Gruber et al., 2012), noticed a homology assumption among the chromosomes that present these markings.

Our study allowed a deepening in the knowledge about the evolutionary processes regarding the cytogenetics of the genus *Aplastodiscus*. The karyotype diversity within the genus shows an intriguing change in the conservative view of hyliid karyotypes. However, congruent markers of NOR and 18S rDNA show the stability of these regions within the groups to which each species belongs and the gene in clusters of vertebrates. The remaining species of the group that are not yet karyotyped can bring new insights and further corroborate our theory of chromosome fission for the group *A. albosignatus*. New molecular techniques, once employed, can also help elucidate the patterns found.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior” (CAPES) for financial support. KLS is grateful to Patricia Santos and Marina Cunha for the collection of some specimens.

6. STATEMENT OF ETHICS

Proceedings were carried out according to the regulations of the ethics committee on the use of animals in research of the Universidade Federal of Viçosa and the current Brazilian laws (CONCEA 1153/95).

7. DISCLOSURE STATEMENT

The authors have no conflict of interest to declare.

8. REFERENCES

- Baldissera FA, Oliveira PSL, Kasahara S: Cytogenetics of four Brazilian *Hyla* species (Amphibia - Anura) and description of a case with a supernumerary chromosome. *Rev Bras Genética* 16:335–345 (1993).
- Beçak ML: Chromosomal Analysis of Eighteen Species of Anura. *Caryologia* 21:191–208 (1968).
- Berneck BVM, Haddad CFB, Lyra ML, Cruz CAG, Faivovich J: The Green Clade grows: A phylogenetic analysis of *Aplastodiscus* (Anura; Hylidae). *Mol Phylogenet Evol* 97:213–223 (2016).
- Bogart JP: Evolution of anuran karyotypes. In: Vial JL (ed) *Evolutionary biology of the anurans*. University of Missouri Press, Columbia, pp 337–349 (1973).
- Carvalho KA, Garcia PCA, Recco-Pimentel SM: NOR dispersion, telomeric sequence detection in centromeric regions and meiotic multivalent configurations in species of the *Aplastodiscus albofrenatus* group (Anura, Hylidae). *Cytogenet Genome Res* 126:359–367 (2009a).
- Carvalho KA, Garcia PC, Recco-Pimentel SM: Cytogenetic comparison of tree frogs of the genus *Aplastodiscus* and the *Hypsiboas faber* group (Anura, Hylidae). *Genet Mol Res* 8:1498–1508 (2009b).
- Cruz CAG and Peixoto AL: Espécies verdes de Hyla: o complexo “Albosignata” (Amphibia, Anura, Hylidae). *Arq. Univ. Fed. Rur. Rio de Janeiro* 7: 31-47 (1984).
- Cruz CAG and Peixoto AL: Espécies verdes de Hyla: o complexo “albofrenata” (Amphibia, Anura, Hylidae). *Arq. Univ. Fed. Rur. Rio de Janeiro* 8: 59-70 (1985).
- Cruz CAG, Pimenta BVS, Silvano DL: Duas novas espécies pertencentes ao complexo de *Hyla albosignata* lutz & lutz, 1938, do leste do Brasil (Amphibia, Anura, Hylidae). *Boletim do Museu Nacional* 503:1-13 (2003).
- Faivovich J, Haddad CFB, Garcia PCA, Frost DR, Campbell JA, Wheeler WC: Systematic Review of the Frog Family Hylidae, With Special Reference To Hylinae: Phylogenetic Analysis and Taxonomic Revision. *Bull Am Museum Nat Hist* 294:1–240 (2005).

Ferro JM, Marti DA, Bidau CJ, Suárez P, Nagamachi CY, Pieczarka JC, Baldo D: B Chromosomes in the Tree Frog *Hypsiboas albopunctatus* (Anura: Hylidae). *Herpetologica*, 68: 482–490 (2012).

Ferro JM, Cardozo DE, Suárez P, Boeris JM, Blasco-Zúñiga A, Barbero G, et al.: Chromosome evolution in Cophomantini (Amphibia, Anura, Hylinae). *Plos one* 13:1–29 (2018).

Frost DR: Amphibians of the world: an on-line reference. V.6.0. [<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>].

Garcia PCA, Caramaschi U, Kwet A: O status taxonômico de *Hyla cochranae* Mertens e recaracterização de *Aplastodiscus* A. Lutz (Anura, Hylidae). *Rev Bras Zool* 18:1197–1218 (2001).

Guerra M. Introdução à citogenética geral. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro 1-142 (1988).

Gruber SL, Haddad CFB, Kasahara S: Chromosome banding in three species of *Hypsiboas* (Hylidae, Hylinae), with special reference to a new case of B-chromosome in anuran frogs and to the reduction of the diploid number of $2n = 24$ to $2n = 22$ in the genus. *Genetica* 130:281–291 (2007).

Gruber SL, Zina J, Narimatsu H, Fernando C, Haddad B, Kasahara S: Comparative karyotype analysis and chromosome evolution in the genus *Aplastodiscus*. *BMC Genetics* 13:1–9 (2012).

Howell WM and Black DA Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015 (1980).

Pinkel D, Straume T, Gray JW: Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci* 83:2934–2938 (1986).

Schmid M: Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma* 66: 361–388 (1978).

Sites JW, Moritz C: Chromosomal evolution and speciation revisited. *Syst. Zool* 36:153-174 (1987).

Figure and table captions

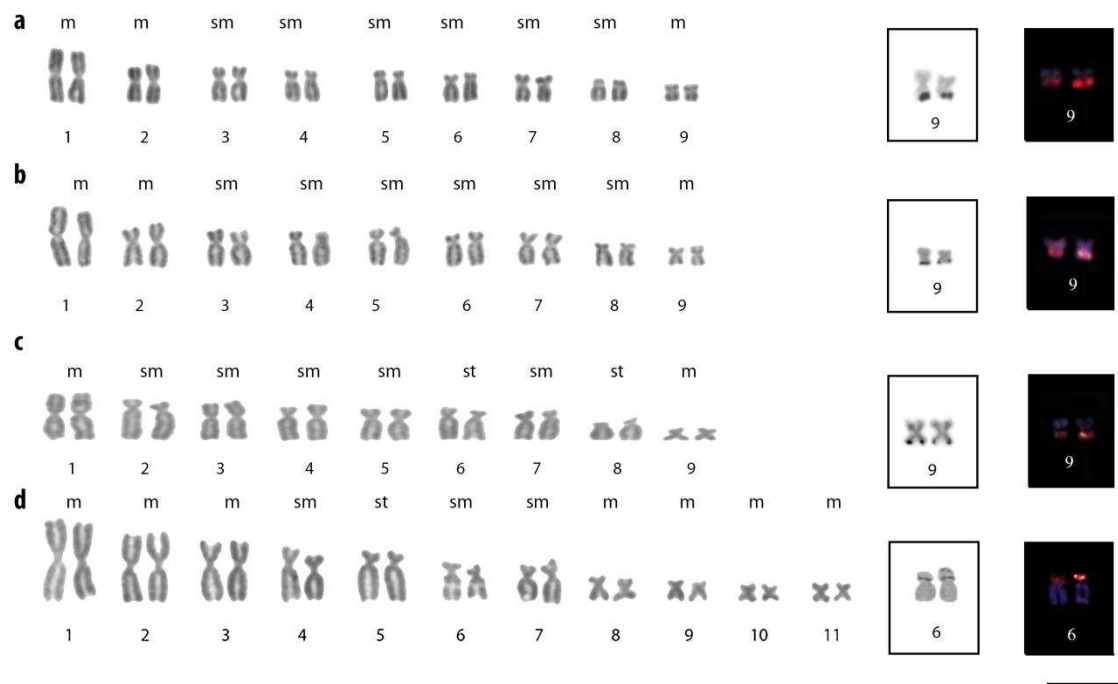


Fig. 1. Giemsa karyotype, Ag-NOR staining, probe 18S rDNA labeled red and DAPI in blue. **a.** *Aplastodiscus cavicola*, **b.** *Aplastodiscus* sp. 4, **c.** *Aplastodiscus* sp. 6, **d.** *Aplastodiscus weygoldti*. Bar 5μm.

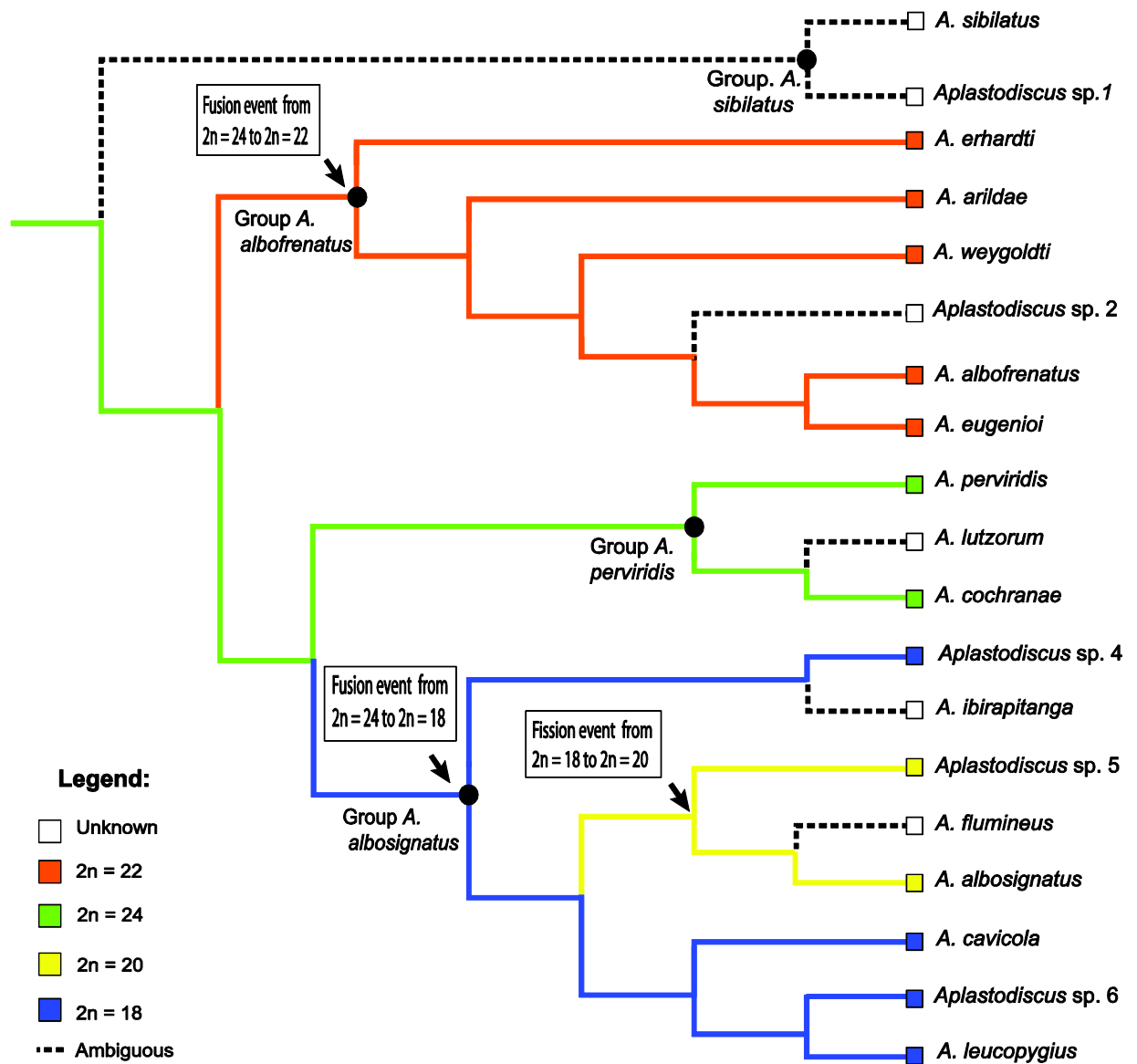


Fig. 2. Optimization of the diploid number in *Aplastodiscus* showing the chromosomal events as synapomorphies based on Berneck et al. (2016)

Table 1. Sample size (n) per species (male and female), sample locality (city and state) and voucher identification.

Species	N	Gender	Sample locality	Voucher
<i>Aplastodiscus weygoldti</i>	2	Male	RPPN Miguel Feliciano Abdala, Caratinga (MG)	MZUFV 15935, UFMG-A 13166
	1	Female		UFMG-A 13167
<i>Aplastodiscus cavicola</i>	4	Male	Viçosa (MG)	MZUFV 15924, 15925, 15926, 15927
	1	Male	Cataguases (MG)	MZUFV 16762
<i>Aplastodiscus</i> sp. 4	7	Male	Alvorada de Minas (MG)	MZUFV 15928, 15929, 15930, 15931, 15932, 15933 and 15934
<i>Aplastodiscus</i> sp. 6	2	Male	Pedra Dourada (MG)	MZUFV 14528 and 14527

Table 2. Comparative morphology and measurements of chromosome pairs. m = metacentric, sm = submetacentric, st = subtelocentric, CR = centromeric ratio, CT = chromosome type.

Species	Chromosome pairs											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>Aplastodiscus cavicola</i>	CR	1.14	1.49	1.80	2.18	2.32	2.15	2.35	2.55	1.34	-	-
	CT	m	m	m	sm	sm	sm	sm	sm	m	-	-
<i>Aplastodiscus</i> sp. 4	CR	1.04	1.41	1.85	2.66	2.71	2.53	2.05	2.96	1.31	-	-
	CT	m	m	sm	sm	sm	sm	sm	sm	m	-	-
<i>Aplastodiscus</i> sp. 6	CR	1.17	2.13	2.13	2.18	1.82	3.04	2.38	3.06	1.27	-	-
	CT	m	sm	sm	sm	sm	st	sm	st	m	-	-
<i>Aplastodiscus weygoldti</i>	CR	1.05	1.09	1.63	2.59	3.04	2.94	2.26	1.29	1.48	1.27	1.34
	CT	m	m	m	sm	st	sm	sm	m	m	m	m

CONCLUSÕES GERAIS

- O cariótipo de *Ololygon luizotavioi* é caracterizado por $2n = 24$ cromossomos, $NF = 48$, fórmula cariotípica $8m+12sm+4st$ e NOR no par cromossômico 9;
- *Bokermannohyla ibitipoca* apresentou número diploide $2n = 24$, $NF = 48$ com fórmula cariotípica de $20m+2sm+2st$, mostrando dez cromossomos metacêntricos a mais que as outras espécies do gênero já cariotipadas e marcações de NOR nos pares de cromossomos 12;
- A região organizadora de nucléolo marcando a região pericentromérica em *D. elegans*, sugere uma possível inversão paracentromérica, uma vez que nas outras espécies as NORs estão localizadas nas regiões terminais dos braços dos cromossomos;
- Os microssatélites se mostraram bons marcadores para algumas espécies além de propiciar o entendimento de possíveis rearranjos cromossômicos;
- *A. cavicola*, *Aplastodiscus* sp. 4 e *Aplastodiscus* sp. 6 tiveram $2n = 18$, Ag-NOR e 18S rDNA marcando a região terminal dos braços longos do par cromossômico 9;
- As marcações das regiões organizadoras de nucléolo no mesmo par cromossômico em cada grupo de espécies se mostra um caráter bem conservado no gênero *Aplastodiscus*;
- Um novo evento de fissão cromossômica no clado *A. albosignatus* foi proposto, mostrando o número diploide de $2n = 18$ para $2n = 22$ envolvendo os pares de menor tamanho.