

MARINA PAULA DA CUNHA OLIVEIRA

VARIAÇÃO CITOGÊNÉTICA EM POPULAÇÕES DE *SCINAX TRIPUI*  
LOURENÇO, NASCIMENTO E PIRES, 2009 (ANURA, HYLIDAE): PRIMEIRA  
DETECÇÃO DE SISTEMA DE CROMOSSOMOS SEXUAIS NO GÊNERO

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

2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

O48v  
2013

Oliveira, Marina Paula da Cunha, 1987-

Varição citogenética em populações de *Scinax tripui*  
Lourenço, Nascimento e Pires, 2009 (Anura, Hylidae) :  
primeira detecção de sistema de cromossomos sexuais no  
gênero / Marina Paula da Cunha Oliveira. – Viçosa, MG,  
2013.

ix, 39f. : il. (algumas color.) ; 29cm.

Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Citogenética. 2. *Scinax tripui*. 3. Cromossomos sexuais.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia  
Animal. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.  
II. Título.

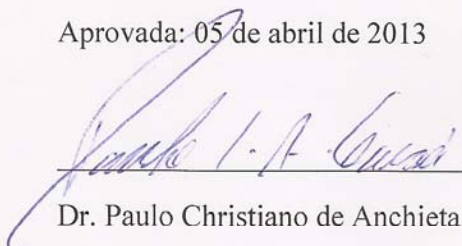
CDD 22. ed. 591.35

MARINA PAULA DA CUNHA OLIVEIRA

VARIAÇÃO CITOGENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *SCINAX TRIPUI*  
LOURENÇO, NASCIMENTO E PIRES, 2009 (ANURA, HYLIDAE): PRIMEIRA  
DETECÇÃO DE SISTEMA DE CROMOSSOMOS SEXUAIS NO GÊNERO

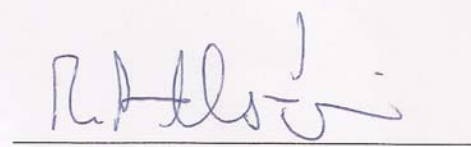
Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Animal, para obtenção  
do título de *Magister Scientiae*.

Aprovada: 05 de abril de 2013




---

Dr. Paulo Christiano de Anchieta Garcia



---

Dr. Renato Neves Feio  
(Co-orientador)



---

Dr. Jorge Abdala Dergam dos Santos  
(Orientador)

E como não podia deixar de ser, dedico esse trabalho àquela que dedica sua vida a mim! Mãe! Se não fosse por você, pelos seus sacrifícios, eu não seria a mulher que sou hoje, com meus valores e minhas vitórias!

*“Você só encontra uma perereca num riacho, se o chakra da perereca estiver alinhado com o chakra do riacho e em sintonia com o cosmos”* (Ensino de minha vida que aprendi com um morador do Tripuí, durante uma coleta em junho de 2012, em Ouro Preto).

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus por ter presenteado minha vida com pessoas que me apoiaram e deram forças em todos os momentos que precisei.

À minha mãe, Maria, por ter sido meu esteio maior, meu exemplo de determinação e amor.

Ao meu pai Rogério, pelo incentivo e interesse constante em minha vida acadêmica.

Ao Felipe, por ser esse companheiro tão carinhoso e prestativo. Você faz Viçosa ser meu paraíso!

Aos meus familiares, que mesmo sem entender o que é o meu trabalho, torceram e ainda torcem para que eu vença meus obstáculos e alcance meus objetivos.

À família do Felipe, em especial à Ana e ao Reginaldo, por me acolherem como uma filha e apoiarem meu trabalho e minha relação com o Felipe.

À Tequila, meu antidepressivo de quatro patas, que vem alegrando muito minha vida desde o início de 2012.

Ao Renato e ao Jorge, pela orientação desde a graduação. Por ajudarem a resolver os problemas que surgiram durante o mestrado e por serem amigos acima de tudo.

Aos professores Dr. Paulo Garcia, Dra. Gisele Lessa e Dr. Leandro Licursi por aceitarem participar da correção deste trabalho, como membros da banca.

Jhonny, Carol, Mário, Carlinha, Patricinha, Diegão e Clodoaldo por terem, ou me acompanhado nas coletas, ou trazido bichos para mim.

Ana Paula por ter feito o FISH e me acompanhado em Rio Paranaíba.

Aos professores Dra. Karine Kavalco e Dr. Rubens Pazza, bem como a equipe do LAGEEVO, por terem aberto as portas do laboratório.

Ao Wagner e à Patrícia pela hospitalidade em Rio Paranaíba.

À Larissa pela confecção do mapa.

À Caryne e ao Defunto por terem me recebido tão bem no Rio de Janeiro.

Aos professores Dra. Maria Rita (UFOP), Dr. Paulo Garcia (UFMG) por terem cedido o empréstimo dos espécimes de *Scinax tripui* e José Pombal Jr.(MN-UFRJ) por ter aberto as portas do Museu Nacional para que eu analisasse o material tombado lá.

Ao Ibama e IEF pela concessão das licenças de coleta.

Ao pessoal do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, Estação Ecológica do Tripuí e RPPN Mata do Sossego por terem permitido as coletas e auxiliado no que foi necessário para o êxito dessas.

Ao sr. Mário e dona Carmen, pais do Diego, por terem me acolhido em Muriaé.

Ao professor Dr. Pedro Romano, sempre solícito para tirar dúvidas e dar boas sugestões.

Ao professor Dr. Rômulo Ribon pela orientação durante a minha graduação.

Aos amigos que fiz em Viçosa, do Museu de Zoologia, do Beagle, da Bio-UFV, pelas ideias trocadas, artigos enviados, auxílios em coletas e estudos, por serem ótimas companhias no trabalho e em uma mesa de bar. Muito obrigada Pâm, Zizo, Raisal, Panda, Larissinha, Marquito, Dani, Charlene, Xibungo, Jussa, Finim, Elianinha, São Pedro, Sarah, Manu, Henrique, Eliza, Danilo, Ana Paula, Thiago, Rodolfo, Clara, Polly, Bizonho, Carla, Gis, Gilda, Camila, Léo, Frango, Travenzoli, Sanches, Marinhinha, Fred, Vinícius, Pri, Udson, Sil e quem mais eu não estiver lembrando. Foram muitas pessoas que passaram por esses lugares deixando como marca sorrisos, palavras e amizade!

Aos meus amigos da Comunicação e agregados, por me divertirem tanto com suas “conveniências” e “paporruindades”.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de fomento.

## Sumário

Lista de figuras e tabelas.....	vii
Resumo.....	viii
Abstract.....	ix
1. Introdução Geral.....	1
2. Objetivos.....	11
2.1. Objetivos gerais.....	11
2.2. Objetivos específicos.....	11
3 Introdução.....	14
4 Materiais e métodos.....	15
5 Resultados.....	17
6 Discussão.....	18
7 Referências.....	23

## Lista de tabelas e figuras

Tabela 1 Material depositado no Museu de Zoologia João Moojen (código MZUFV), de acordo com a localidade e o sexo.....	31
Tabela 2 Morfologia comparativa dos pares cromossômicos de <i>Scinax tripui</i> no estado de Minas Gerais, Brasil.....	32
Tabela 3 Morfologia comparativa dos pares cromossômicos das espécies do gênero <i>Scinax</i> com cariótipo descrito.....	33
Figura 1 Localização dos pontos de coleta de <i>Scinax tripui</i> no estado de Minas Gerais, Brasil.....	34
Figura 2 Cariótipo com coloração convencional (Giemsa) de indivíduos de <i>Scinax tripui</i> coletados no estado de Minas Gerais, Brasil.....	35
Figura 3 Padrão de distribuição de heterocromatina de macho de <i>Scinax tripui</i> da população da Usina da Fumaça, Minas Gerais, Brasil.....	37
Figura 4 Coloração por nitrato de prata evidenciando as regiões organizadoras do nucléolo (setas) de indivíduos de <i>Scinax tripui</i> coletados no estado de Minas Gerais, Brasil.....	37
Figura 5 Marcação de sondas 18rDNA fluorescentes (rosa) obtidas a partir de hibridização <i>in situ</i> (FISH) em populações de <i>Scinax tripui</i> coletados no Estado de Minas Gerais, Brasil.....	38

## Resumo

OLIVEIRA, Marina Paula da Cunha, M. Sc, Universidade Federal de Viçosa, abril de 2013. **Varição citogenética em populações de *Scinax tripui* Lourenço, Nascimento e Pires, 2009 (Anura, Hylidae): primeira detecção de sistema de cromossomos sexuais no gênero.** Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos. Co-orientador: Renato Neves Feio.

*Scinax tripui* é um hilídeo pertencente ao grupo *Scinax catharinae*, maior grupo do clado *Scinax catharine* e do gênero *Scinax*. Possui como localidade tipo a Estação Ecológica do Tripuí, em Ouro Preto, estado de Minas Gerais, Brasil. Alguns espécimes com características morfológicas externas comuns em *S. tripui* foram encontrados em outras localidades do estado de Minas Gerais, mas, devido à taxonomia complexa do grupo sua identificação não foi confirmada. A fim de aumentar o número de caracteres para auxiliar a identificação de populações de *S. tripui*, o objetivo desse estudo foi caracterizar e comparar o perfil citogenético: coloração convencional, bandamento C, NORs e hibridização fluorescente *in situ* (FISH) com sondas de rDNA 18S em exemplares da população topotípica de *S. tripui* e espécimes de populações de três outras localidades identificados como esta espécie. As outras três populações são: Usina da Fumaça em Muriaé, Parque Estadual da Serra do Brigadeiro em Araponga e RPPN Mata do Sossego em Simonésia, todas as localidades situadas no estado de Minas Gerais, Brasil. Os resultados mostraram que todos os indivíduos analisados possuem mesmo número diploide apresentado para o gênero *Scinax* ( $2n = 24$ ), mas há diferenças na morfologia dos cromossomos em relação a outras espécies do gênero. *S. tripui* apresentou um par de cromossomos heteromórfico entre os sexos, indicando a presença do sistema de determinação sexual XX/XY, registro inédito para o gênero *Scinax*. Diferenças na obtenção do padrão de banda C, nas marcações de Ag-NOR e FISH entre as populações de *S. tripui* indicam a ocorrência de rearranjos cromossômicos, gerando variações interpopulacionais.

## Abstract

OLIVEIRA, Marina Paula da Cunha, M.Sc, Universidade Federal de Viçosa, April, 2013. **Cytogenetic variation in populations of *Scinax tripui* Lourenço Nascimento and Pires, 2009 (Anura, Hylidae): first detection of sexual chromosomes in the genus.** Adviser: Jorge Abdala Dergam dos Santos. Co-adviser: Renato Neves Feio.

*Scinax tripui* is a treefrog hylid and is a member of the *Scinax catharinae* species group, the biggest group of the genus *Scinax* and the clade *Scinax catharinae*. Its type-locality is the Tripui Ecological Station, in the municipality of Ouro Preto, in the State of Minas Gerais, Brazil. Populations morphologically similar to this species have also been reported in other localities in Minas Gerais, but due to the complex taxonomy of this species group, their taxonomic status remains uncertain. In order to increase the number of characters to be used to identify populations of *S. tripui* this study aimed to test the species cytogenetic identity (Giemsa, C and NOR-banding, and FISH) in four populations of *S. tripui*. The following populations were analyzed: the type-locality “Tripui Ecological Station” in Ouro Preto city, samples from the “Serra do Brigadeiro State Park” in the municipality of Araponga; “RRPN Mata do Sossego” in the municipality of Simonésia, Fumaça Dam Reservoir in the municipality of Muriaé, all localities are in the State of Minas Gerais, Brazil. All specimens shared the same diploid number, but chromosome morphology differed among the species of the genus *Scinax*. *S. tripui* showed a XX/XY sex chromosome system, the first reported for *Scinax*. Consistent different patterns of C, NOR-banding and FISH between the populations of *S. tripui* indicate multiple chromosome rearrangements.

## 1. Introdução Geral

Os Amphibia atuais, ou Lissamphibia, são representados por três classes: Gymnophiona (cecílias ou cobra-cegas), Caudata (salamandras) e Anura (sapos, pererecas e rãs) [1]. Distribuem-se amplamente nas regiões tropicais e temperadas da Terra, exceto em algumas ilhas oceânicas, regiões de desertos com condições muito extremas e tundras subárticas [2].

No mundo, são conhecidas mais de 7000 espécies de anfíbios sendo que aproximadamente 6200 destas espécies pertencem à ordem Anura [3]. Até o momento estão descritas 946 espécies de anfíbios no Brasil, das quais 913 são anuros [4].

Hylidae é uma grande família de anuros com mais de 900 espécies conhecidas; é composta por três subfamílias: Pelodyadinae, Phyllomedusinae e Hylinae. A subfamília Hylinae possui atualmente 41 gêneros, divididos em três tribos, dentre eles o gênero *Scinax* [3].

O gênero *Scinax* Wagler, 1830 inclui, até o momento, mais de 110 espécies válidas [3], divididas em dois clados, cada um com dois grupos reconhecidos: o clado *S. catharinae*, com os grupos *S. catharinae* e *S. perpusillus*, e o clado *S. ruber*, com os grupos *S. rostratus*, *S. uruguayus*, além de outras espécies que não estão alocadas em nenhum destes grupos [5].

As sinapomorfias morfológicas do clado *S. catharinae* são: ausência do processo anterior da supraescápula, músculo *depressor mandibulae* sem origem na *fascia* dorsal que cobre a supraescápula, divisão distal do ramo medial do músculo *extensor digitorum comunis longus* e inserção do lado medial deste músculo no tendão do músculo *extensor brevis medius digiti IV*. O monofiletismo do grupo *S. catharinae*, excluindo-se *S. agilis*, que apresenta um mosaico de características comuns ao clado *S.*

*ruber*, foi fracamente suportado por cinco caracteres, sendo eles: forte inclinação da laringe em relação ao processo posteromedial, formato da aritenoide em visão dorsal, proeminência dorsal da aritenoide desenvolvida medialmente, nenhuma fibra do músculo *depressor mandibulae* originada no anel timpânico e presença lateral do músculo *extensor brevis distalis digiti I* [6].

O grupo *S. catharinae* é o maior do gênero, composto por mais de 30 espécies, dentre elas *Scinax tripui* Lourenço *et al.*, 2009 [7]. A identificação das espécies do grupo é complexa, por haver um grande número, muito semelhantes morfologicamente e com poucos dados sobre sua biologia, bioacústica e formas larvais [8, 9].

A localidade tipo de *Scinax tripui* é a Estação Ecológica do Tripuí em Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil. A espécie é caracterizada por apresentar focinho subovoide em vista dorsal, canto rostral ligeiramente côncavo e bem marcado, dorso marrom com superfície escura e manchas marrons e verdes, calos nupciais bem desenvolvidos, mas não hipertrofiados, mancha em forma de W na região interorbital, coloração verde nas regiões ocultas dos flancos e das coxas e ventre com coloração creme e região gular com muitos pontos marrons escuros [7].

Lourenço e colegas [7] indicam que, a identidade taxonômica de *S. tripui* era confusa, sendo identificada como *S. flavoguttatus* por alguns coletores. Após análises posteriores se observou que a espécie era ainda desconhecida pela Ciência e foi feito o trabalho de descrição do hólido da Estação Ecológica do Tripuí. Populações possivelmente pertencentes à espécie *S. tripui* foram encontrados em riachos no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, município de Araponga; na Reserva Particular do Patrimônio Natural Mata do Sossego, em Simonésia e na Usina da Fumaça, localizada no município de Muriaé, todas as localidades pertencentes ao estado de Minas Gerais [10, 11 12, e observações pessoais]. No entanto, devido à taxonomia complexa do

grupo, a confirmação da identidade taxonômica destas populações não foi concretizada nesses trabalhos, e os espécimes foram identificados como *Scinax cf. tripui*.

Poucos dados sobre a biologia de *S. tripui* são conhecidos. Lourenço e colaboradores [7] encontraram indivíduos da espécie principalmente na estação fria e seca, entre os meses de abril a setembro, período em que observaram machos vocalizando. Os machos vocalizam próximos uns dos outros, em raízes ou folhas de plantas nas bordas de córregos. As desovas desta espécie são encontradas em locais de fluxo mais lento e depositadas na parte inferior do substrato. Além disso, a equipe de Lourenço observou que os girinos são pouco ativos durante a noite, permanecendo escondidos sob rochas e folhas e surgindo perto da superfície durante o dia. Os girinos levam em média um mês para alcançar a fase juvenil, observada comumente no final do mês de agosto.

*Scinax* é um gênero muito diverso e taxonomicamente complexo. Ainda há muito para ser estudado sobre sua diversidade cariotípica e evolução, com muitas espécies sem o cariótipo descrito; tal é o caso de *S. tripui*. Estudos citogenéticos podem contribuir para compreender homologias cromossômicas e relações filogenéticas neste gênero [13], e trazer novas informações a respeito das relações taxonômicas e evolutivas das espécies, principalmente se considerarmos que em alguns anuros, há uma dificuldade em estabelecê-las com análises morfológicas [14, 15].

Nas décadas de 60 e 70 começaram os primeiros estudos citogenéticos com anuros. Inicialmente, os trabalhos se concentraram na descrição dos cariótipos das espécies, identificando o número e a morfologia dos cromossomos através de coloração convencional [16]. A partir da década de 70, foram desenvolvidos métodos e técnicas que permitiram observar marcações ao longo dos cromossomos, o que facilitou a identificação individual e permitiu a formulação de hipóteses sobre as relações

filogenéticas entre anuros e os mecanismos evolutivos envolvidos nas diferenciações cariotípicas [17]. Dentre estas técnicas encontram-se os métodos de Ag-NOR, bandamento C e hibridização *in situ* [18].

A análise do número e morfologia dos cromossomos pode ser útil para indicar relações filogenéticas e até mesmo, a ocorrência de processos de especiação [19]. Diferenças no número ou morfologia de cromossomos entre populações ou espécies, podem ser resultados de rearranjos cromossômicos como, inversões pericêntricas ou paracêntricas, fusões, fissões e translocações. Estes rearranjos podem ter papel crucial em eventos de especiação [20].

As regiões organizadoras do nucléolo (NOR's, sigla em inglês) são sequências de genes, de determinados cromossomos, responsáveis pela síntese de RNA ribossômico e outros componentes do nucléolo [21]. Proteínas associadas a genes ativos da NOR possuem propriedades argirofílicas reagindo com sais de prata (nitrato de prata, por exemplo) o que permite detectar a localização da NOR no cromossomo [22]. Este método pode constituir um excelente marcador citotaxonômico para alguns grupos, pois pode apresentar variação inter e intraespecífica quanto ao número, localização, intensidade e tamanho das marcações [23].

A heterocromatina pode ser definida genericamente como segmentos cromossômicos que permanecem fortemente condensados e sem atividade transcricional durante o ciclo celular [24]. A técnica de banda C consiste em reações químicas responsáveis pela depurinação e perda de DNA [25], produzindo coloração seletiva das regiões heterocromáticas, formando blocos escuros, presentes na maioria das vezes nas regiões centroméricas dos cromossomos [26]. Espécies muito próximas podem diferir na quantidade, número, localização e nas propriedades de coloração da heterocromatina [27]. Em alguns anfíbios, a diferença na quantidade de heterocromatina pode estar

associada à diferenciação dos cromossomos sexuais, que sofrem heterocromatização [28].

A técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) consiste na reação de sequências complementares de determinados segmentos de RNA ou DNA, diretamente com o DNA-alvo presente nos cromossomos metafásicos e nos núcleos interfásicos [29]. Além disso, a adição de moléculas de biotina ou digoxigenina à sonda permite a detecção destas regiões por anticorpos ligados a fluorocromos [17]. A técnica permite observar diferenças entre espécies e populações com maior acurácia, devido ao seu alto grau de especificidade [17, 26].

As análises citogenéticas tem permitido a caracterização de vários fenômenos cromossômicos que, ao contrário do observado em nível morfológico, tem mostrado grande variabilidade em Anura [14]. Alguns táxons possuem cariótipos com grande variabilidade, assim como a disposição de regiões organizadoras do nucléolo e as regiões heterocromáticas [30, 31] enquanto que para outros táxons, a evolução cariotípica tem se mostrado bastante conservativa [32].

O gênero *Scinax* possui atualmente pouco mais de 35 espécies com cariótipo descrito [8, 15, 16, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40]. Em todos estes estudos, as espécies deste gênero apresentam  $2n=24$ , mas com diferenças na morfologia de alguns pares cromossômicos entre as espécies [13, 40].

A Ag-NOR localiza-se no par 6 em *S. albicans*, *S. argyreornatus*, *S. ariadne*, *S. aromothyella*, *S. berthae*, *S. hiemalis*, *S. littoralis*, *S. longilineus*, *S. obtriangulatus*, *S. rizibilis*, *Scinax* sp. 1 (grupo *perpusillus*), e *Scinax* sp. 2 (grupo *perpusillus*) [13]; no par 11 em *S. acuminatus*, *S. canastrensis* (com registros de uma marcação adicional de Ag-NOR no par 6), *S. curicica*, *S. duartei*, *S. eurydice*, *S. fuscomarginatus*, *S. fuscovarius*,

*S. granulatus*, *S. hayii* (com marcação adicional no par 8), *S. nasicus*, *S. perereca*, *S. similis*, *S. squalirostris* e *S. uruguayus* [40] e no par 3 e 4 em *S. alter* [13, 40].

A heterocromatina se apresenta na região centromérica ou pericentromérica na maioria das espécies em que foi obtida, com marcações coincidentes com a Ag-NOR em alguns cariótipos [13, 15, 40].

A citogenética tem se mostrado uma ferramenta importante na caracterização de diversas espécies, se tornando ainda mais forte quando associada a outras metodologias, o que permite reconhecer e identificar algumas espécies crípticas e taxonomicamente problemáticas [41]. Além de apresentar importantes contribuições em estudos evolutivos, em determinar relações filogenéticas e identificar polimorfismos intra e interespecíficos [42].

#### Referências

1. Vitt LJ, Caldwell JP (2009) Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles. 3ª edição. Academic Press, 697pp.
2. Duellman WE, Trueb L (1994) Biology of amphibians. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 670 pp.
3. FROST DR (2013) Amphibian species of the world: an online reference. Version 5.6 Electronic Database. Disponível em: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. American Museum of Natural History, New York, USA. Acessado em: 01 de março de 2013.
4. Segalla MV, Caramaschi U, Cruz CAG, Garcia PCA, Grant T, Haddad CFB, Langone J (2012) Brazilian amphibians - List of species. Disponível em: <http://sbherpetologia.org.br>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Acessado em: 03 de janeiro de 2013.

5. Faivovich J, Haddad CFB, Garcia PCA, Frost DR, Campbell JA, Wheeler WC (2005) Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to the Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of American Museum of Natural History*, Nova Iorque, 294: 1–240.
6. Faivovich J (2002) A cladistic analysis of *Scinax* (Anura: Hylidae). *Cladistics*, 18: 367–393.
7. Lourenço ACC, Nascimento LB, Pires MRS (2009) A new species of the *Scinax catharinae* species group (Anura: Hylidae) from Minas Gerais, southeastern Brazil. *Herpetologica*, 65: 4: 468–479.
8. Pombal JP Jr, Haddad CFB, Kasahara S (1995) A new species of *Scinax* (Anura: Hylidae) from southeastern Brazil, with comments on the genus. *Journal of Herpetology*, 29: 1: 1–6.
9. Carvalho-e-Silva SP, Dos Reis Gomes MM, Peixoto OL (1995) Descrição dos girinos de *Scinax angrensis* (B. Lutz, 1973) e de *Scinax kautskyi* (Carvalho-e-Silva e Peixoto, 1991) (Amphibia, Anura, Hylidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 55: 1: 61–65.
10. Feio RN, Santos PS, Cassini CS, Dayrell JS, Oliveira EF (2008) Anfíbios da Serra do Brigadeiro – MG. *MG BIOTA*, Belo Horizonte, 1: 1 abr/maio.
11. Moura MR, Motta AP, Fernandes VD, Feio RN (2012) Herpetofauna from Serra do Brigadeiro, an Atlantic Forest remain in the state of Minas Gerais, southeastern Brazil. *Biota Neotropica*, 12: 1: 209–235.
12. Santana DJ, São Pedro VA, Hote PS, Roberti HM, Sant’Anna AC, Figueiredo-de-Andrade CA, Feio RN (2010) Anurans in the region of the High Muriaé River, state of Minas Gerais, Brazil. *Herpetology Notes*, 3: 1–10.
13. Cardozo DE, Leme DM, Bortoleto JF, Catroli GF, Baldo D, Faivovich J, Kolenc F, Silva APZ, Borteiro C, Haddad CFB, Kasahara S (2011) Karyotypic Data on 28

- Species of *Scinax* (Amphibia: Anura: Hylidae) Diversity and Informative Variation. *Copeia*, 2: 251–263.
14. Medeiros LR, Rossa-Feres DC, Recco-Pimentel SM (2003) Chromosomal differentiation of *Hyla nana* and *Hyla sanborni* (Anura, Hylidae) with a description of NOR polymorphism in *H. nana*. *Journal of Heredity*, 94: 2: 149–154.
  15. Nunes RRA, Fagundes V (2008) Cariótipos de oito espécies de anfíbios das subfamílias Hyliinae e Phyllomedusinae (Anura, Hylidae) do Espírito Santo, Brasil. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão*, 23: 21–36. Junho.
  16. Bogart JP (1973) Evolution of anuran karyotypes. In: Vial J.L (Ed.). *Evolutionary biology of anurans*. University Missouri Press, p. 337–349.
  17. Kasahara S (2009) *Introdução à pesquisa em citogenética de vertebrados*. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética, 160pp.
  18. Carvalho KA, Garcia PCA, Recco-Pimentel SM (2009) NOR Dispersion, Telomeric Sequence Detection in Centromeric Regions and Meiotic Multivalent Configurations in Species of the *Aplastodiscus albofrenatus* Group (Anura, Hylidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 126: 359–367.
  19. Faraut T (2008) Addressing chromosome evolution in the whole-genome sequence era. *Chromosome Research*, 16: 5–16.
  20. King M (1987) Chromosomal rearrangements, speciation and the theoretical approach. *Heredity*, 59: 1–6.
  21. Miller OL (1981) The nucleolus, chromosomes and visualization of genetic activity. *Journal of Cell Biology*, 91: 15–17.
  22. Zurita F, Jimenes R, Burgos M, Díaz de La Guardia R (1998) Sequential silver staining and in situ hybridization reveal a direct association between rDNA levels and the expression of homologous nucleolar organizing regions: a hypothesis for NOR structure and function. *Journal of Cell Science*, 111: 1433–1439.

23. Goodpasture C, Bloom SE (1975) Visualization of nucleolar organizer in mammalia chromosomes using silver staining. *Chromosoma*, 53: 37–50.
24. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2006) *Fundamentos de Biologia Celular*. Artmed, 2ª ed, 866p.
25. Holmquist G (1979) The mechanism of C-banding: depurination and  $\beta$ -elimination. *Chromosoma*, 72: 203–224.
26. Guerra M (1988) *Introdução à citogenética geral*. Rio de Janeiro: Guanabara, 154 pp.
27. Sumner AT (1990) C-banding and related methods. In: *Chromosome banding*. Unwin Hyman Ed. London, pp. 39–69.
28. Schmid M, Nanda I, Steinlei C, Kausch K, Haaf T (1991) Sex-determining mechanism and sex chromosome in Amphibia. In: Green MG, Sessions SK. Eds *Amphiban Cytogenetics and Evolution*. Academic Press, San Diego, pp. 393–430.
29. Guerra M (2004) Hibridização *in situ*: princípios básicos, p. 1–32. In: Guerra M (Ed.). *FISH Fluorescent in situ Hybridization: Conceitos e Aplicações na Citogenética*. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética, 184pp.
30. Busin CS, Vinciprova G, Recco-Pimentel SM (2001) Chromosomal rearrangements as the source of variation in the number of chromosomes in *Pseudis* (Amphibia, Anura). *Genetica*, 110: 131–141.
31. Aguiar-Jr O, Lima AP, Recco-Pimentel SM (2002) Cytogenetic analysis of four dart poison frogs of the *Epipedobates* genus (Anura, Dendrobatidae). *Herpetologica*, 58: 293–303.
32. Ananias F, Garcia PCA, Recco-Pimentel SM (2004) Conserved karyotypes in the *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). *Hereditas*, 140: 42–48.
33. Duellman WE (1967) Additional studies of chromosomes of anuran amphibians. *Systematic Zoology*, 16: 38–43.

34. Beçak ML (1968) Chromosomal analysis of eighteen species of Anura. *Caryologia*, 21: 3: 191–208.
35. Barrio A, Pistol de Rubel D (1970) Características del cariótipo de los pseudidos (Amphibian, Anura). *Physis*, 29: 505–510.
36. Rabello MN (1970) Chromosomal studies in Brazilian anurans. *Caryologia*, 23:45–49.
37. Anderson K (1991). Chromosome evolution in Holoartic *Hyla* treefrogs. In Green MG, Sessions SK (eds.). *Amphibian Cytogenetics and evolution*. Academic Press., San Diego, p. 299–331.
38. Kasahara S, Silva APZ, Gruber SL, Haddad CFB (2003) Comparative cytogenetic analysis on four tree frog species (Anura, Hylidae, Hylinae) from Brazil. *Cytogenetic Genome Research*, 103: 155–162.
39. Oliveira HHP, Souza CCN, Ribeiro CL, Cruz AD, Bastos RP, Melo e Silva D (2010) Citogenética comparativa das famílias Leptodactylidae e Hylidae do Cerrado goiano. *Estudos, Goiânia*, 37: 9/10: 725–735, set./out.
40. Oliveira AKC (2011) Estudo de comunidade de anuros e citogenética do gênero *Scinax* em área de ecótono no Paraná. Dissertação de mestrado Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR.
41. Silva EB (2004) Estudos citogenéticos comparativos entre espécies do gênero *Paradon* (Pisces, Parodontidae). Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
42. Pozzobom MT (2005) Caracterização citogenética de acessos de germoplasmas de espécies silvestres e semidomesticadas do gênero *Capsicum* (Solanaceae). Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivos gerais

Caracterizar a citogenética de populações de *Scinax tripui* que ocorrem na Estação Ecológica do Tripuí em Ouro Preto (localidade tipo), no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro em Araponga (Brigadeiro), na Reserva Particular do Patrimônio Natural Mata do Sossego em Simonésia (Sossego) e na Usina da Fumaça em Muriaé (Fumaça), todas as localidades no estado de Minas Gerais, Brasil.

### 2.2 Objetivos específicos

I. Caracterizar e comparar o cariótipo de populações de *Scinax tripui*, a fim de fornecer novos elementos para a identificação destas populações.

II. Avaliar se existem diferenças interpopulacionais quanto à variabilidade cariotípica, Ag-NORs, regiões heterocromáticas e 18S rDNA em *S. tripui*.

Varição citogenética em populações de *Scinax tripui* Lourenço, Nascimento e Pires,  
2009 (Anura, Hylidae): primeira detecção de sistema de cromossomos sexuais no  
gênero

Variação citogenética em populações de *Scinax tripui* Lourenço, Nascimento e Pires, 2009 (Anura, Hylidae): primeira detecção de sistema de cromossomos sexuais no gênero

Marina P. da C. Oliveira<sup>1, \*</sup>, Renato N. Feio<sup>2</sup>, Jorge A. Dergam<sup>1</sup>

1. Laboratório de Sistemática Molecular - Beagle, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000, Viçosa, Minas Gerais State, Brasil

2: Museu de Zoologia João Moojen, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000, Viçosa, Minas Gerais State, Brasil.

**\*E-mail: marinapco13@gmail.com**

### 3. Introdução

O gênero *Scinax* Wagler, 1830, pertencente à subfamília Hyliinae, inclui até o momento mais de 100 espécies descritas [1], divididas em dois clados, cada um com dois grupos taxonômicos reconhecidos: o clado *S. catharinae*, com os grupos *S. catharinae* e *S. perpusillus*, e o clado *S. ruber*, com os grupos *S. rostratus*, *S. uruguayus*, além de outras espécies que não estão alocadas em nenhum destes grupos [2].

O grupo *S. catharinae* é o maior do gênero, composto por aproximadamente 30 espécies, dentre elas *Scinax tripui*, Lourenço *et al.*, 2009 [3]. A identificação dos indivíduos pertencentes ao grupo é complexa, por haver um grande número de espécies que são muito semelhantes morfologicamente e que possuem poucos dados sobre sua biologia, bioacústica e formas larvais [4, 5].

A localidade tipo de *S. tripui* é a Estação Ecológica do Tripuí em Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil. A espécie é caracterizada por apresentar focinho subovoide em vista dorsal, canto rostral ligeiramente côncavo e bem marcado, dorso marrom com superfície escura e manchas marrons e verdes, calos nupciais bem desenvolvidos, mas não hipertrofiados, mancha em forma de W na região interorbital, coloração verde nas regiões ocultas dos flancos e das coxas e ventre com coloração creme e região gular com muitos pontos marrons escuros [3].

Lourenço e colegas [3] indicam que antes mesmo de ser descrita a identidade taxonômica de *S. tripui* era confusa, sendo identificada como *S. flavoguttatus* por alguns coletores. Após análises posteriores foi feito o trabalho de descrição do hólido da Estação Ecológica do Tripuí. Populações possivelmente pertencentes à espécie *S. tripui* foram encontrados em riachos no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, município de Araponga; na Reserva Particular do Patrimônio Natural Mata do Sossego, em Simonésia e na Usina da Fumaça, localizada no município de Muriaé, todas as

localidades pertencentes ao estado de Minas Gerais [6, 7, 8, e observações pessoais]. No entanto, devido à taxonomia complexa do grupo a confirmação sobre qual espécie estas populações pertencem não foi concretizada nesses trabalhos, e os espécimes foram identificados como *Scinax* cf. *tripui*.

*Scinax* é um gênero muito diverso e taxonomicamente complexo. Ainda há muito para ser estudado sobre sua diversidade cariotípica e evolução, com muitas espécies sem o cariótipo descrito; tal é o caso de *S. tripui*. Estudos citogenéticos poderão contribuir para compreender homologias cromossômicas e relações filogenéticas neste gênero [9], e trazer novas informações a respeito das relações taxonômicas e evolutivas das espécies [10, 11].

O gênero *Scinax* possui atualmente, pouco mais de 35 espécies com cariótipo descrito [4, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20]. Em todos estes trabalhos, as espécies do gênero apresentaram  $2n=24$ , mas com diferenças na morfologia de alguns pares cromossômicos entre as espécies [9, 20].

O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização citogenética da população topotípica de *Scinax tripui* da Estação Ecológica do Tripuí em Ouro Preto (Tripuí) e de outras três populações que ocorrem no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (Brigadeiro), na Reserva Particular do Patrimônio Natural Mata do Sossego (Sossego) e na Usina da Fumaça no município de Muriaé (Fumaça), todas as localidades no estado de Minas Gerais, Brasil, a fim de fornecer novos elementos para a identificação destas populações e avaliar as diferenças interpopulacionais quanto à variabilidade citogenética.

#### **4. Materiais e métodos**

Foram analisados neste estudo quatro espécimes machos da população topotípica de *Scinax tripui* (S 20°23'17.3"/W 043°31'31.3") e 22 espécimes machos e oito fêmeas de outras três populações de espécimes atribuídos a *Scinax tripui* (Tabela 1) da Serra do

Brigadeiro em Araponga (S 20°43'19"/W 42°28'43"); da RPPN Mata do Sossego em Simonésia (S 20°04'22.1"/W 42°04'12.8") e da cachoeira Usina da Fumaça em Muriaé (S 21°03'17.7"/W 042°26'41.3"), todas as localidades no estado de Minas Gerais Brasil (Figura 1) (Licenças IBAMA/ICMBIO-26525-1, IEF-040/11 e 041/11). Todos os exemplares foram depositados na coleção herpetológica do Museu de Zoologia João Moojen, da Universidade Federal de Viçosa (MZUFV).

Os procedimentos citogenéticos foram realizados no Laboratório de Sistemática Molecular da Universidade Federal de Viçosa. Os cromossomos mitóticos foram obtidos a partir de células do epitélio intestinal, conforme técnica descrita em Schmid, 1978 [21]. Em cada espécime foi injetada intraperitonealmente solução de 0,1% de colchicina (0,1 mL para cada 10 g de peso do animal), por 4 horas antes da eutanásia dos animais (feito com Lidocaína 5%). Após os procedimentos de obtenção das suspensões de células, as preparações contendo os cromossomos metafásicos foram examinadas em microscópio óptico, para determinação do valor modal (2n) e do número fundamental (NF) de cada espécime. As melhores metáfases foram fotografadas em sistema digital do fotomicroscópio Olympus BX50 equipado com epifluorescência, com a objetiva de imersão de 100x, para aumento de 1000x. O pareamento e ordenação dos cromossomos se basearam na observação visual, auxiliada por medições diretas com o auxílio do software Image Pro Plus (IPP versão 4.5). Os homólogos foram pareados e agrupados de acordo com a posição do centrômero, em ordem decrescente de tamanho. Os cromossomos foram classificados de acordo com seus índices centroméricos [22] em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e telocêntricos (t). Posteriormente, o material foi processado para obtenção de banda-C (heterocromatina constitutiva) [23] e bandamento Ag-NOR, visando evidenciar as regiões organizadoras do nucléolo por impregnação por nitrato de prata [24]. A técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) foi realizada segundo Pinkel e colaboradores

[25], utilizando sondas 18S rDNA [26]. As sondas foram marcadas por nick-translation com biotina-14-dATP. A detecção do sinal e amplificação foi realizada utilizando sonda de isotiocianato de fluoresceína-avidina conjugada (FITC) e anti-avidina-biotina.

## 5. Resultados

Todos os espécimes analisados neste estudo apresentaram um número diplóide  $2n = 24$  e número fundamental  $NF = 48$ , em ambos os sexos. Os maiores cromossomos corresponderam aos pares 1-7, enquanto que os cromossomos menores foram representados pelos pares cromossômicos 8 a 11. Os pares 1, 2, 3, 5 e 8 foram submetacêntricos; 4, 6 e 7 subtelocêntricos e 9 a 12 metacêntricos. O terceiro par apresentou heteromorfia entre os sexos pelo método de coloração convencional. Em todas as amostras, um cromossomo do par nos machos foi representado por um cromossomo submetacêntrico e o outro subtelocêntrico, enquanto que nas fêmeas, o par equivalente foi representado por dois cromossomos submetacêntricos. Na Estação Ecológica de Tripuí, a amostra foi composta apenas por machos e neles, o heteromorfismo do par cromossômico foi também confirmado (Figura 2) (Tabela 2).

A heterocromatina constitutiva foi detectada nas regiões centroméricas e pericentroméricas de alguns cromossomos dos espécimes provenientes da população do município de Muriaé. Não foi observado heteromorfismo nas bandas de heterocromatina entre os sexos. O protocolo de Banda C deu resultados satisfatórios apenas para a amostra de Muriaé (Figura 3).

A NOR foi detectada na região pericentromérica do braço curto do quinto par de cromossomos em todos os espécimes analisados, mas a marcação nem sempre ocorreu em ambos os homólogos do par de cromossomos. Além da marcação no quinto par cromossômico, a população da Estação Ecológica do Tripuí mostrou uma marcação adicional de NOR na região telomérica do braço longo do cromossomo submetacêntrico do terceiro par (par heteromórfico) (Figura 4). Foi detectada a presença de constrição

secundária associada com a NOR no quinto par, nem sempre visualizada em ambos os homólogos (Figura 2).

Foram detectadas marcações da sonda 18S rDNA coincidindo com a constrição secundária e as marcações de Ag-NOR na região pericentromérica do braço curto do quinto par de cromossomos para os machos das populações do PESB e de Muriaé, e para as fêmeas da RPPN Mata do Sossego e do PESB, sendo que nesta última foi visualizada a marcação em apenas em um dos homólogos do par. No macho da população da Estação Ecológica do Tripuí foram encontradas marcações múltiplas para o FISH 18S rDNA. Além das marcações do quinto par, foi encontrada uma pequena marcação telomérica no braço longo do cromossomo submetacêntrico do terceiro par, coincidindo com a marcação de Ag-Nor e uma marcação na região intersticial do braço longo de um dos cromossomos do quarto par (Figura 5).

## 6. Discussão

O cariótipo com  $2n = 24$  e  $NF = 48$  apresentado pelos indivíduos de todas as populações de *Scinax tripui*, analisados neste trabalho, é característico de todas as outras espécies do gênero [4, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20]. Por outro lado, diferenças na morfologia de alguns pares de cromossomos foram observadas entre os indivíduos analisados nesse estudo e outras espécies de *Scinax* do grupo *catharinae*. A diferença em relação a *S. albicans* ocorre no terceiro e quinto pares de cromossomos que são subtelocêntricos nessa espécie, enquanto no presente estudo esses cromossomos foram submetacêntricos [9]. Os espécimes aqui estudados diferem de *S. argyreornatus*, *S. ariadne*, *S. aromothyella*, *S. berthae*, *S. hiemalis*, *S. littoralis*, *S. longilineus*, *S. obtriangulatus*, *S. rizibilis* e *S. trapicheiroi* na morfologia dos quarto e sétimo pares de cromossomos, que são submetacêntricos nessas espécies e subtelocêntricos em *S. tripui* [9, 20]. *S. tripui* difere de *S. canastrensis* pelos quarto, sexto e sétimo pares que foram subtelocêntricos nas populações da primeira espécie e submetacêntricos na segunda, e

pelo quinto par que foi submetacêntrico nesse estudo e é metacêntrico em *S. canastrensis* [9]. Os quarto, sexto e sétimo pares cromossômicos subtelocêntricos nos indivíduos deste estudo diferem dos pares submetacêntricos em *S. catharinae* [9, 20]. Todos os espécimes de *S. tripui* apresentaram o oitavo par de cromossomos submetacêntricos, diferentemente de todas as espécies de *Scinax* do grupo *catharinae* que o apresenta metacêntrico [9, 20].

Diferenças na morfologia dos cromossomos entre as espécies, sem alterar o número cromossômico, pode ser resultado de inversões pericêntricas, em que há uma quebra do cromossomo e inversão da posição do centrômero, alterando a classificação do cromossomo, mas mantendo o  $2n$  [27]. Essas inversões podem ter participado dos eventos de especiação entre as espécies do gênero *Scinax* na medida em que podem dificultar o fluxo gênico devido à supressão da recombinação durante a meiose [28, 29].

Assim como as outras espécies de *Scinax* do grupo *catharinae* com o cariótipo descrito, os espécimes aqui estudados apresentaram os pares cromossômicos 1 e 2 submetacêntricos com tamanho parecido, características estas consideradas sinapomórficas para o grupo e que podem indicar seu monofiletismo [9]. Os pares 9 a 11 são metacêntricos em todas as espécies do grupo e em muitas outras do gênero [9, 11, 20]. No entanto, *Scinax tripui* apresenta o terceiro par heteromórfico nos machos (submetacêntrico e subtelocêntrico) e submetacêntrico nas fêmeas, caráter derivado para a espécie e que pode caracterizar o sistema de determinação sexual XX/XY. Assim, as evidências indicam que os cromossomos sexuais surgiram de cromossomos de membros do terceiro par em espécies sem sistema de cromossomos sexuais evidentes (Figura 2, Tabela 3).

A presença de cromossomos sexuais em *S. tripui* é registro inédito para o gênero. Não existe um padrão genético para determinação sexual em anfíbios, sendo poucas espécies em que os cromossomos sexuais são reconhecidos por coloração

convencional com Giemsa. Em muitos casos a detecção destes sistemas ocorre através da utilização de algum método de coloração diferencial dos cromossomos [30]. A caracterização dos cromossomos sexuais em espécies proximalmente relacionadas pode auxiliar na inferência de possíveis fenômenos relevantes no processo de acúmulo de diferenças entre os cromossomos sexuais [31]. Em anfíbios são conhecidos sistemas de determinação sexual em que o sexo heterogamético pode ser o macho (XX/XY) ou a fêmea (ZZ/ZW ou OO/OW). Análises filogenéticas mostram que a evolução desses sistemas ocorreu independentemente inúmeras vezes durante a história evolutiva das espécies [32]. Heterogamia masculina (XY/XX) é encontrada em poucas espécies de anuros, como: *Bufo melanostictus* [33], *Eleutherodactylus riveroi* [34], *E. maussi* [35] *Eupsophus migueli* [36], *Gastrotheca riobambae* [37], *Hyla femoralis* [38], *Phasmahyla exilis* [11], *Physalaemus petersi* [39], *Pseudis tocantins* [30], *Pseudopaludicola saltica* [40], *Rana esculenta* [41], *Rana rugosa* [42]. O número global é reduzido, sendo menos de 50 espécies com algum tipo aparente de determinação sexual [43].

O sistema de determinação sexual XY provavelmente ocorreu através de algum evento de inversão cromossômica, e o efeito consequente de supressão de recombinação, que manteve um cromossomo em um estado inalterado ou basal e o invertido, configurando um heterozigoto. A partir desta condição, alterações moleculares podem se acumular até o ponto de se tornarem perceptíveis a nível citológico. Duas dessas alterações são mais comuns: o acúmulo de heterocromatina ou o encurtamento do cromossomo heterogamético por perda de material genético [44], o que provavelmente ocorreu durante a evolução do cromossomo Y em *Scinax tripui*. Além disso, a presença de genes macho-específicos, ou que conferem benefícios ao macho garantiram a estabilidade e sobrevivência do cromossomo Y [45].

O padrão de heterocromatina analisado foi semelhante ao encontrado em outras espécies de *Scinax* do grupo *catharinae* e que é comum em outras espécies de anuros,

com marcações centroméricas e pericentroméricas presentes em vários cromossomos, [9, 20, 45, 46, 47]. A ausência de padrão de bandamento C entre machos e fêmeas reforça a hipótese de que a evolução do cromossomo Y envolveu o processo de encurtamento e não de heterocromatização, como ocorre em outras espécies de anuros [48, 49]. Muitas espécies de anuros mostram diversidade interespecífica na quantidade e distribuição de heterocromatina, sugerindo que a amplificação destas regiões é uma tendência evolutiva no grupo [50]. Os resultados contrastantes observados nas diferentes amostras e obtidos com o mesmo protocolo de banda C podem refletir diferenças reais no conteúdo de heterocromatina em populações de *Scinax tripui*.

As marcações das Regiões Organizadoras do Nucléolo utilizando Ag-NOR foram encontradas no sexto par de cromossomos, na maioria das espécies do grupo *Scinax catharinae* [9, 11, 20]. Em *Scinax rizibilis*, as marcações estão presentes no quinto e sexto pares de cromossomos nas populações de Quatro Barras (município do Paraná) e do estado de São Paulo, respectivamente, [9, 20]. Marcações de NOR múltipla foram observadas em *S. canastrensis* (sexto e décimo primeiro pares) [98] e em *S. catharinae* (quarto e quinto pares) [20]. Na maioria das espécies de outros grupos do gênero *Scinax*, a NOR encontra-se no décimo primeiro par, caráter considerado ancestral para o gênero, enquanto a NOR no sexto par é considerada uma sinapomorfia para o grupo *S. catharinae* [9]. Assim, a presença de NOR no quinto par de cromossomos nas populações de *S. tripui* do Brigadeiro, do Sossego e da Fumaça e as marcações múltiplas nos terceiro e quinto pares de *S. tripui* da localidade topotípica, podem ser consideradas características derivadas para essas populações.

A constrição secundária associada à NOR foi encontrada na região intersticial próxima à região centromérica do quinto par cromossômico, mas nem sempre foi visível nos dois homólogos. Em anuros esta associação é frequente [46] e ocorre também em

outras espécies do grupo *S. catharinae* [9, 20]. As constrições detectadas com nitrato de prata estão associadas a genes com atividades ribossomais na última intérfase [51].

As marcações fluorescentes obtidas através da hibridização *in situ* das sondas de rDNA 18S confirmaram a diferença citogenética entre a população topotípica do Tripuí e as outras populações analisadas, e houve correlação parcial entre a marcação FISH com o padrão Ag-NOR. Essa correlação foi completa nas populações do Brigadeiro, do Sossego e da Fumaça. Já na população do Tripuí, a FISH detectou cistrons de rDNA 18S no quarto par cromossômico, além daquelas detectadas por Ag-NOR no terceiro e quinto pares cromossômicos. A hibridização *in situ* detecta regiões de rDNA, independentemente da ativação desta região, permitindo detectar polimorfismos entre as populações ou espécies comparadas [53].

A análise do número e morfologia dos cromossomos tem sido útil para diferenciar espécies de anuros com morfologia externa muito semelhante [54, 55]. Em alguns casos, a diferença se restringe ao padrão de heterocromatina ou à posição da região organizadora do nucléolo. Populações de *Barycholos cf. ternetzi* possuem cariótipo muito parecido, mas NOR's em posições diferentes entre as populações, indicando que um incipiente processo de diferenciação pode ter ocorrido entre estas populações [56]. Variações interespecíficas na posição da NOR foram encontradas para outras espécies como no grupo de *Hypsiboas pulchellus* [57] e no gênero *Pseudopaludicola* [40] e usadas como critério para diferenciar espécies com morfologia externa muito semelhante.

A quebra de segmentos de rDNA de um cromossomo e sua reinserção em outro poderia explicar a mudança no número e localização das regiões organizadoras do nucléolo nos cromossomos entre as populações aqui estudadas, assim como em *Phyllomedusa rohdei* e *Physalaemus cuvieri* [46, 52]. Rearranjos cromossômicos, do tipo fissão e fusão, assim como as inversões pericêntricas, podem ter papel crucial nos

eventos de especiação, na medida em que contribuem para o isolamento reprodutivo ou do fluxo gênico entre as espécies, por supressão da recombinação [28, 29] ou causam a inviabilidade do heterozigoto cromossômico, devido à formação desigual de gametas durante a meiose [58, 59].

Os cariótipos das populações de *Scinax tripui* do Brigadeiro, Sossego e da Usina da Fumaça, apresentaram mesma morfologia, padrão de bandamento Ag-NOR e FISH indicando que essas populações possivelmente pertencem à mesma espécie ou tem parentesco muito próximo. Já a população da Estação Ecológica do Tripuí apresentou diferenças nas marcações de Ag-NOR e FISH em relação às outras três populações (Parque Estadual do Brigadeiro, RPPN Mata do Sossego e Usina da Fumaça) indicando a ocorrência de rearranjos cromossômicos, do tipo fissão e fusão envolvendo as regiões organizadoras do nucléolo entre essas populações, gerando as variações interpopulacionais.

## **7 Referências**

1. Lourenço ACC, Carvalho ALG, Baêta D, Pezzuti TL, Leite FSF (2013) A new species of the *Scinax catharinae* group (Anura, Hylidae) from Serra da Canastra, southwestern state of Minas Gerais, Brazil. *Zootaxa*, 6: 573–578.
2. Faivovich J, Haddad CFB, Garcia PCA, Frost DR, Campbell JA, Wheeler WC (2005) Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to the Hylinae: phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of American Museum of Natural History*, Nova Iorque, 294: 1–240.
3. Lourenço ACC, Nascimento LB, Pires MRS (2009) A new species of the *Scinax catharinae* species group (Anura: Hylidae) from Minas Gerais, southeastern Brazil. *Herpetologica*, 65: 4: 468–479.

4. Pombal JP Jr, Haddad CFB, Kasahara S (1995) A new species of *Scinax* (Anura: Hylidae) from southeastern Brazil, with comments on the genus. *Journal of Herpetology*, 29: 1: 1–6.
5. Carvalho-e-Silva SP, Dos Reis Gomes MM, Peixoto OL (1995) Descrição dos girinos de *Scinax angrensis* (B. Lutz, 1973) e de *Scinax kautskyi* (Carvalho-e-Silva e Peixoto, 1991) (Amphibia, Anura, Hylidae) *Revista Brasileira de Biologia*, 55: 1: 61–65.
6. Feio RN, Santos PS, Cassini CS, Dayrell JS, Oliveira EF (2008) Anfíbios da Serra do Brigadeiro – MG. *MG BIOTA*, Belo Horizonte, 1: 1 abr/maio.
7. Moura MR, Motta AP, Fernandes VD, Feio RN (2012) Herpetofauna from Serra do Brigadeiro, an Atlantic Forest remain in the state of Minas Gerais, southeastern Brazil. *Biota Neotropica*, 12: 1: 209–235.
8. Santana DJ, São Pedro VA, Hote PS, Roberti HM, Sant’Anna AC, Figueiredo-de-Andrade CA, Feio RN (2010) Anurans in the region of the High Muriaé River, state of Minas Gerais, Brazil. *Herpetology Notes*, 3: 1–10.
9. Cardozo DE, Leme DM, Bortoleto JF, Catroli GF, Baldo D, Faivovich J, Kolenc F, Silva APZ, Borteiro C, Haddad CFB, Kasahara S (2011) Karyotypic Data on 28 Species of *Scinax* (Amphibia: Anura: Hylidae) Diversity and Informative Variation. *Copeia*, 2: 251–263.
10. Medeiros LR, Rossa-Feres DC, Recco-Pimentel SM (2003) Chromosomal differentiation of *Hyla nana* and *Hyla sanborni* (Anura, Hylidae) with a description of NOR polymorphism in *H. nana*. *Journal of Heredity*, 94: 2: 149–154.
11. Nunes RRA, Fagundes V (2008) Cariótipos de oito espécies de anfíbios das subfamílias Hyliinae e Phyllomedusinae (Anura, Hylidae) do Espírito Santo, Brasil. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão*, 23: 21–36. Junho.

12. Bogart JP (1973) Evolution of anuran karyotypes. In: Vial J.L (Ed.). Evolutionary biology of anurans. University Missouri Press, p. 337–349.
13. Duellman WE (1967) Additional studies of chromosomes of anuran amphibians. *Systematic Zoology*, 16: 38–43.
14. Beçak ML (1968) Chromosomal analysis of eighteen species of Anura. *Caryologia*, 21: 3: 191–208.
15. Barrio A, Pistol de Rubel D (1970) Características del cariotipo de los pseudidos (Amphibian, Anura). *Physis*, 29: 505–510.
16. Rabello MN (1970) Chromosomal studies in Brazilian anurans. *Caryologia*, 23: 45–49.
17. Anderson K (1991) Chromosome evolution in Holartic *Hyla* treefrogs. In Green MG, Sessions SK (eds.). *Amphibian Cytogenetics and Evolution*. Academic Press., San Diego, p. 299–331.
18. Kasahara S, Silva APZ, Gruber SL, Haddad CFB (2003) Comparative cytogenetic analysis on four tree frog species (Anura, Hylidae, Hylinae) from Brazil. *Cytogenetics and Genome Research*, 103: 155–162.
19. Oliveira HHP, Souza CCN, Ribeiro CL, Cruz AD, Bastos RP, Melo e Silva D (2010) Citogenética comparativa das famílias Leptodactylidae e Hylidae do Cerrado goiano. *Estudos, Goiânia*, 37: 9/10: 725–735, set./out.
20. Oliveira AKC (2011) Estudo de comunidade de anuros e citogenética do gênero *Scinax* em área de ecótono no Paraná. Dissertação de mestrado Universidade Federal do Paraná. Curitiba.
21. Schmid M (1978) Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma*, 66: 361–388.

22. Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, Lund, 52: 201–220.
23. Schmid M, Olert J, Klett C (1979) Chromosome banding in Amphibia III. Sex chromosomes in *Triturus*. *Chromosoma*, 71: 29–55
24. Howell WM, Black DA (1980) Controlling silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a. 1-step method. *Experientia*, 36: 1014–1015.
25. Pinkel D, Straume T, Gray J (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 83: 2934–2938.
26. Cioffi MB, Martins C, Bertollo LAC (2009) Comparative chromosome mapping of repetitive sequences. Implications for genomic evolution in the fish, *Hoplias malabaricus*. *BMC Genetics*, 10: 34.
27. Imai HT, Maruyama T (1978) Karyotype evolution by pericentric inversion as a stochastic process. *Journal of Theoretical Biology*, 70: 253–261.
28. Searle, J.B. (1993) Chromosomal hybrid zones in eutherian mammals. In Harrison RG, editor. *Hybrid Zones and the Evolutionary Process*. New York, Oxford University Press, pp. 309–352.
29. Searle JB (1998) Speciation, chromosomes, and genomes. *Genome Research*, 8: 1–3.
30. Busin CS, Andrade GV, Bertoldo J, Del Grande ML, Uetanabaro M, Recco-Pimentel SM (2008) Cytogenetic analysis of four species of *Pseudis* (Anura, Hylidae), with the description of ZZ/ZW sex chromosomes in *P. tocantins*. *Genetica*, 133: 119–127.
31. Brito CPTA (2009) Estudo citogenético e das relações filogenéticas de *Engystomops petersi* e *Engystomops* sp. (Anura, Leiuperidae). Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 75pp.

32. Hillis DM, Green DM (1990) Evolutionary changes of heterogametic sex in the phylogenetic history of amphibians. *Journal of Evolutionary Biology*, 3: 49–64.
33. Siripiyasing P, Chulalaksananukul W, Pariyanonth P, Kaewsri S, Sittigul S, Seatung N, Tanomtong A (2008) The identification of the sex chromosome and karyotype of four toad species (Genus *Bufo*) in Thailand by t-lymphocyte cell culture. *Cytologia*, 73: 3: 229–241.
34. Schmid M, Feichtinger W, Steinlein C, Visbal García R, Fernández Badillo A (2003) Chromosome banding in Amphibia. XXVIII. Homomorphic XY sex chromosomes and a derived Y-autosome translocation in *Eleutherodactylus riveroi* (Anura, Leptodactylidae), *Cytogenetics and Genome Research*, 101: 1: 62–73.
35. Schmid M, Feichtinger W, Steinlein C, Haaf T, Scharl M, Visbal García R, Manzanilla Pupo J, Fernández Badillo A. (2002) Chromosome banding in Amphibia. XXVI. Coexistence of homomorphic XY sex chromosomes and a derived Y-autosome translocation in *Eleutherodactylus maussi* (Anura, Leptodactylidae). *Cytogenetics and Genome Research*, 99: 1–4: 330–343.
36. Iturra P, Veloso M (1981) Evidence for heteromorphic sex chromosomes in male amphibians (Anura: Leptodactylidae). *Cytogenetics and Genome Research*, 31: 108–110.
37. Schmid M, Haff T, Geile B, Sims S (1983) Chromosome banding in Amphibia. VIII. An unusual XY/XX sex chromosome system in *Gastrotheca riobambae* (Anura, Hylidae). *Chromosoma*, 88: 69–96.
38. Schmid M, Steinlein C (2003) Chromosome banding in Amphibia. XXIX. The primitive XX/XY sex chromosomes of *Hyla femoralis* (Anura, Hylidae). *Cytogenetics and Genome Research*, 101: 1: 74–79.

39. Lourenço LB, Recco-Pimentel SM, Cardoso AJ (1998) Two karyotypes, heteromorphic sex chromosomes in *Physalaemus petersi* (Leptodactylidae, Anura). Canadian Journal of Zoology. Canada, 77: 624–631.
40. Duarte TC, Veiga-Menoncello ACP, Lima JFR, Strüssmann C, Del-Grande ML, Giaretta AA, Pereira EG, Rossa-Feres DC, Recco-Pimentel SM (2010) Chromosome analysis in *Pseudopaludicola* (Anura, Leiuperidae), with description of sex chromosomes XX/XY in *P. saltica*. Hereditas, 147: 43–52.
41. Shempp W, Schmid M (1981) Chromosome banding in Amphibia. VI. BrdU-replication patterns in Anura and demonstration of XX/XY sex chromosomes in *Rana esculenta*. Chromosoma, 83: 5: 697–710.
42. Miura I, Ohtani H, Nakamura M, Ichikawa Y, Saitoh K (1998). The Origin and Differentiation of the Heteromorphic Sex Chromosomes Z, W, X and Y in the Frog *Rana rugosa*, Inferred from the Sequences of Sex-Linked Gene, ADP/ATP Translocase. Molecular Biology and Evolution, 15: 12: 1612–1619.
43. Uno Y, Nishida C, Oshima Y, Yokoyama S, Miura I, Matsuda Y, Nakamura M (2008) Comparative chromosome mapping of sex-linked genes and identification of sex chromosomal rearrangements in the Japanese wrinkled frog (*Rana rugosa*, Ranidae) with ZW and XY sex chromosome systems. Chromosome Research, 16: 637–647.
44. Schartl M (2004) Sex chromosome evolution in non-mammalian vertebrates. Current Opinion in Genetics & Development, 14: 634–641.
45. Gazoni T, Gruber SL, Silva APZ, Araújo OGS, Narimatsu H, Strüssmann C, Haddad CFB, Kasahara S (2012) Cytogenetic analyses of eight species in the genus *Leptodactylus* Fitzinger, 1843 (Amphibia, Anura, Leptodactylidae), including a new diploid number and a karyotype with multiple translocations. BMC Genetics, 13: 109.

46. Barth A, Solé M, Costa MA (2009) Chromosome Polymorphism in *Phyllomedusa rohdei* Populations (Anura: Hylidae). *Journal of Herpetology*, 43: 4: 676–679.
47. Carvalho KA, Garcia PCA, Recco-Pimentel SM (2009). NOR Dispersion, Telomeric Sequence Detection in Centromeric Regions and Meiotic Multivalent Configurations in Species of the *Aplastodiscus albofrenatus* Group (Anura, Hylidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 126: 359–367.
48. Ananias F, Modesto ADS, Mendes SC, Napoli MF (2007) Unusual primitive heteromorphic ZZ/ZW sex chromosomes in *Proceratophrys boiei* (Anura, Cycloramphidae, Alsodinae), with description of C-Band interpopulational polymorphism. *Hereditas*, 144: 5: 206–212.
49. Nascimento J, Quinderé YRSD, Recco-Pimentel SM, Lima JRF, Lourenço LB (2010) Heteromorphic Z and W sex chromosomes in *Physalaemus ephippifer* (Steindachner, 1864) (Anura, Leiuperidae). *Genetica*, 138: 1127–1132.
50. King M (1991) The evolution of the heterochromatin in the amphibian genome. In: Green DM, Sessions SK (eds) *Amphibian cytogenetics and evolution*. Academic Press, San Diego, 359–391.
51. Caperta AD, Neves N, Morais-Cecílio L, Malhó R, Viegas W (2002) Genome restructuring in rye affects the expression, organization and disposition of homologous rDNA loci. *Journal of Cell Science*, 115: 2839–2846.
52. Silva APZ, Haddad CFB, Kasahara S (1999) Nucleolus organizer regions in *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae), with evidence of a unique case of Ag-NOR variability. *Hereditas*, 131: 135–141.
53. Zurita F, Jimenes R, Burgos M, Díaz de La Guardia R (1998) Sequential silver staining and in situ hybridization reveal a direct association between rDNA levels and the expression of homologous nucleolar organizing regions: a hypothesis for NOR structure and function. *Journal of Cell Science*, 111: 1433–1439.

54. Cole CJ (1974) Chromosome evolution in selected treefrogs, including casque-headed species (*Pternohyla*, *Triprion*, *Hyla*, and *Smilisca*). American Museum Novitates, 2541:1–10.
55. Rosa C, Aguiar-Jr O, Giaretta AA, Recco-Pimentel SM (2003) Karyotypic variation in the genus *Megaelosia* (Anura, Hylodinae) with the first description of a B-chromosome in a leptodactylid frog. Copeia, 1: 166–174.
56. Siqueira S, Aguiar-Jr O, Pansonato A, Giaretta AA, Strüssmann C, Martins I, Recco-Pimentel SM (2009) The karyotype of three Brazilian Terrarana frogs (Amphibia, Anura) with evidence of a new *Barycholos* species. Genetics and Molecular Biology, 32: 3: 470–476.
57. Ananias F, Garcia PCA, Recco-Pimentel SM (2004) Conserved karyotypes in the *Hyla pulchella* species group (Anura, Hylidae). Hereditas, 140: 42–48.
58. Rieseberg LH (2001) Chromosomal rearrangements and speciation. Trends in Ecology and Evolution, 16: 351–358.
59. Lowry DB, Willis JH (2010) A widespread chromosomal inversion polymorphism contributes to a major life-history transition, local adaptation, and reproductive isolation. PLoSBiol 8(9): e1000500. doi:10.1371/journal.pbio.1000500

**Tabela 1** Material depositado no Museu de Zoologia João Moojen (código MZUFV), de acordo com a localidade e o sexo. Acompanham os números de registros no livro de citogenética (CT) do Laboratório de Sistemática Molecular – Beagle, onde foram realizados os estudos citogenéticos

Número de tombo	Sexo	Localidade	Código CT
MZUFV 9865	♂		CT 1717
MZUFV 9870	♂		CT 1723
MZUFV 9871	♂		CT 1724
MZUFV 9872	♂		CT 1725
MZUFV10294	♂	Parque Estadual da Serra do Brigadeiro	CT 1831
MZUFV 10299	♂		CT 1852
MZUFV 10300	♂		CT 1853
MZUFV 10301	♂		CT 1854
MZUFV 11421	♂		CT 2559
MZUFV 11511	♀	Parque Estadual da Serra do Brigadeiro	CT 2649
MZUFV 12103	♀		CT 2782
MZUFV 12104	♀		CT 2783
MZUFV 11441	♂	RPPN Mata do Sossego	CT 2567
MZUFV 11442	♂		CT 2568
MZUFV 11443	♂		CT 2569
MZUFV 12571	♂		CT 3025
MZUFV 12575	♂		CT 3029
MZUFV12576	♂		CT 3031
MZUFV 12573	♀	RPPN Mata do Sossego	CT 3027
MZUFV 12577	♀		CT 3032
MZUFV 11444	♂	Usina da Fumaça - Muriaé	CT 2573
MZUFV 11445	♂		CT 2574
MZUFV 11446	♂		CT 2575
MZUFV 11447	♂		CT 2579
MZUFV 11448	♂		CT 2580
MZUFV 11449	♂		CT 2581
MZUFV 11438	♀	Usina da Fumaça - Muriaé	CT 2570
MZUFV 11439	♀		CT 2571
MZUFV 11440	♀		CT 2572
-	♂	Estação Ecológica do Tripuí	CT 2606
-	♂		CT 2607
MZUFV 12447	♂		CT 3011
MZUFV 12448	♂		CT 3012
MZUFV12449	♂		CT 3015

**Tabela 2** Morfologia comparativa dos pares cromossômicos de *Scinax tripui* no estado de Minas Gerais, Brasil

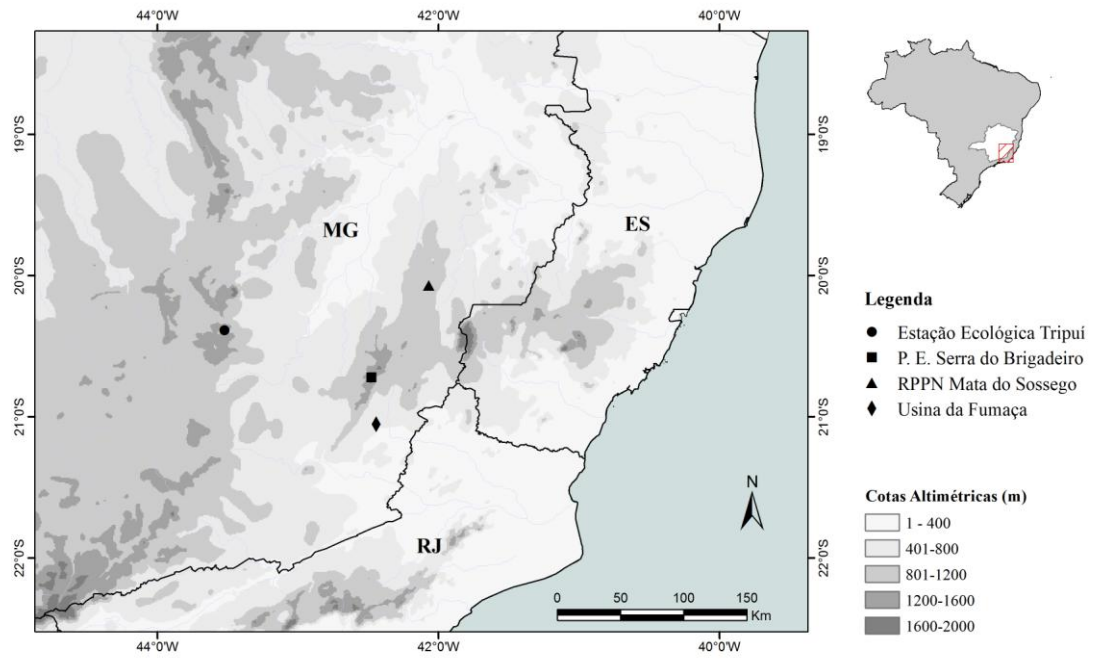
Localidade	Sexo		Pares cromossômicos											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Parque Estadual da Serra do Brigadeiro	Fêmea	IC	2,41	2,53	2	3,38	2,46	3,25	4,55	2,4	1,25	1,11	1,23	1,19
		NPC	SM	SM	SM	ST	SM	ST	ST	SM	M	M	M	M
	Macho	IC	2,11	2,32	2,3/3,3	3,57	1,99	3,4	3,19	2,31	1,1	1,1	1,1	1,17
		NPC	SM	SM	SM/ST	ST	SM	ST	ST	SM	M	M	M	M
Mata do Sossego	Fêmea	IC	2,38	2,28	2,41	3,91	2,04	3,96	3,63	2,17	1,49	1,35	1,15	1,26
		NPC	SM	SM	SM	ST	SM	ST	ST	SM	M	M	M	M
	Macho	IC	2,17	2,18	2,09/3,3	3,49	2,1	3,45	3,53	2,05	1,23	1,32	1,19	1,14
		NPC	SM	SM	SM/ST	ST	SM	ST	ST	SM	M	M	M	M
Muriaé	Fêmea	IC	2,58	2,62	1,97	3,68	2,56	3,66	3,53	2,13	1,45	1,33	1,28	1,16
		NPC	SM	SM	SM	ST	SM	ST	ST	SM	M	M	M	M
	Macho	IC	2,3	2,42	1,8/4,1	3,46	2,06	3,57	3,95	2,31	1,31	1,33	1,2	1,28
		NPC	SM	SM	SM/ST	ST	SM	ST	ST	SM	M	M	M	M
Tripuí	Macho	IC	2,39	2,44	2,51/3,23	3,76	2,31	3,67	3,67	1,81	1,35	1,19	1,15	1,14
		NPC	SM	SM	SM/ST	ST	SM	ST	ST	SM	M	M	M	M

IC = Índice Centromérico; NPC = Nomenclatura para Posição do Centrômero; M = Metacêntrico; SM = Submetacêntrico; ST = Subtelocêntrico.

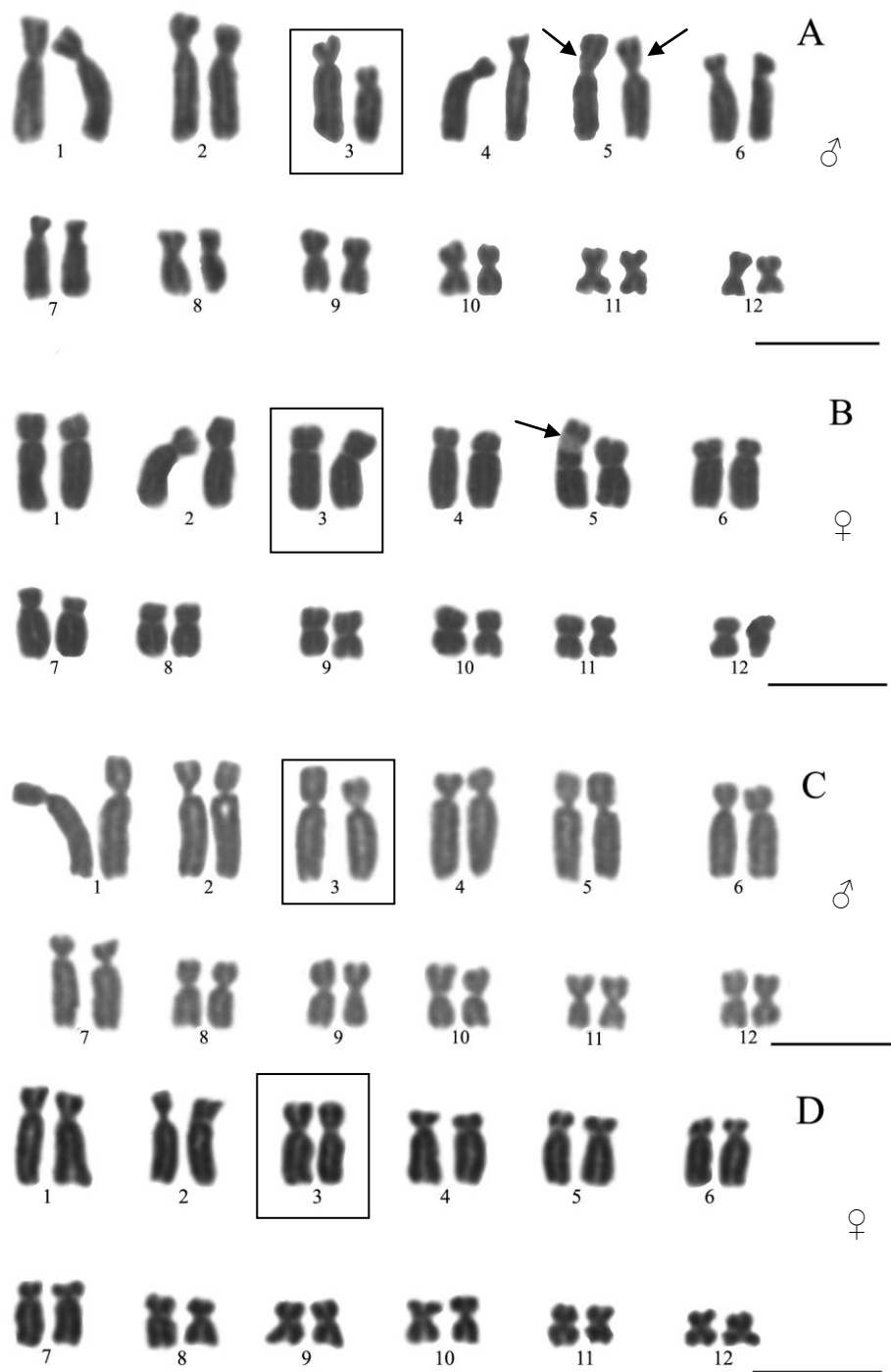
**Tabela 3** Morfologia comparativa dos pares cromossômicos das espécies do gênero *Scinax* com cariótipo descrito

Espécies de Scinax com cariótipo descrito	Referência	Classificação dos cromossomos											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>S. tripui</i>	Presente estudo	SM	SM	SM	ST	SM	ST	ST	SM	M	M	M	M
<i>S. albicans</i>	Cardozo <i>et al.</i> , 2011	SM	SM	ST	ST	ST	ST	ST	M	M	M	M	M
<i>S. argyreornatus</i>	Nunes e fagundes, Cardozo <i>et al.</i> , 2011	SM	SM	SM	SM	SM	ST	SM	M	M	M	M	M
<i>S. ariadne</i>	Cardozo <i>et al.</i> , 2011	SM	SM	SM	SM	SM	ST	SM	M	M	M	M	M
<i>S. aromothyella</i>	Cardozo <i>et al.</i> , 2011	SM	SM	SM	SM	SM	ST	SM	M	M	M	M	M
<i>S. berthae</i>	Cardozo <i>et al.</i> , 2011	SM	SM	SM	SM	SM	ST	SM	M	M	M	M	M
<i>S. canastrensis</i>	Cardozo <i>et al.</i> , 2011	SM	SM	SM	SM	M	SM	SM	M	M	M	M	M
<i>S. catharinae</i>	Adrielle Karlokoski, 2011; Bogart, 1973	SM	SM	SM	SM	SM	SM	SM	M	M	M	M	M
<i>S. hiemalis</i>	Cardozo <i>et al.</i> , 2011	SM	SM	SM	SM	SM	ST	SM	M	M	M	M	M
<i>S. littoralis</i>	Cardozo <i>et al.</i> , 2011	SM	SM	SM	SM	SM	ST	SM	M	M	M	M	M
<i>S. longilineus</i>	Cardozo <i>et al.</i> , 2011	SM	SM	SM	SM	SM	ST	SM	M	M	M	M	M
<i>S. obtriangulatus</i>	Cardozo <i>et al.</i> , 2011	SM	SM	SM	SM	SM	ST	SM	M	M	M	M	M
<i>S. rizibilis</i>	Adrielle Karlokoski, 2011; Cardozo <i>et al.</i> , 2011	SM	SM	SM	SM	SM	ST	SM	M	M	M	M	M
<i>S. trapicheiroi</i>	Cardozo <i>et al.</i> , 2011	SM	SM	SM	SM	SM	ST	SM	M	M	M	M	M

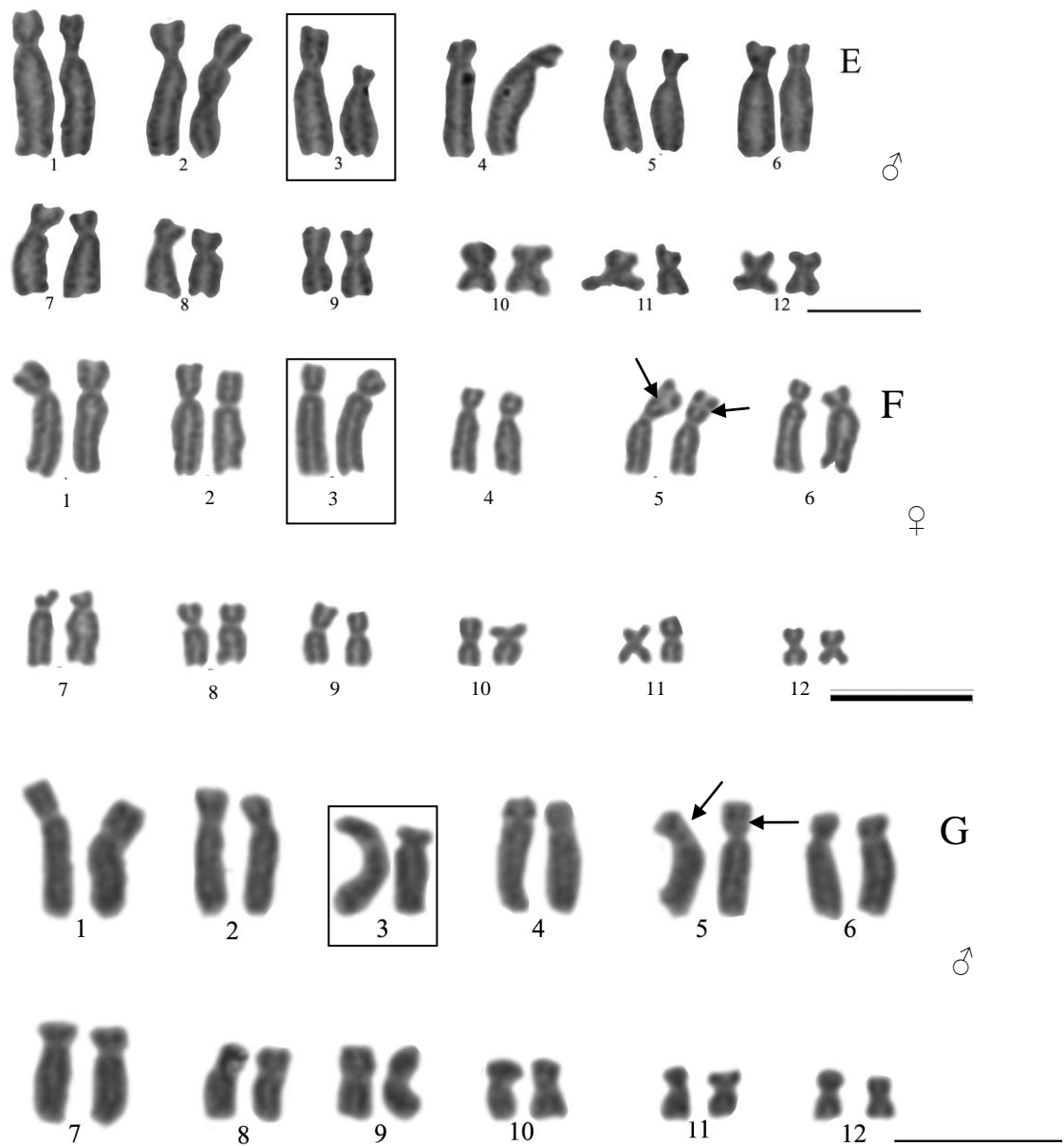
M = Metacêntrico; SM = Submetacêntrico; ST = Subtelocêntrico.



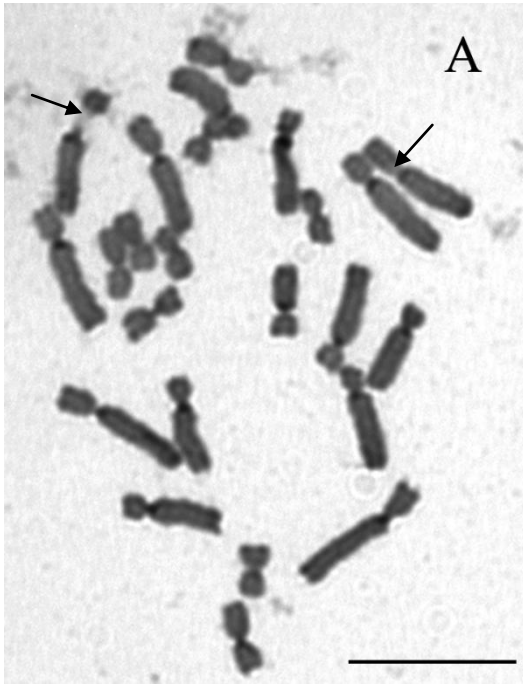
**Figura 1** Localização dos pontos de coleta de *Scinax tripui* no estado de Minas Gerais, Brasil.



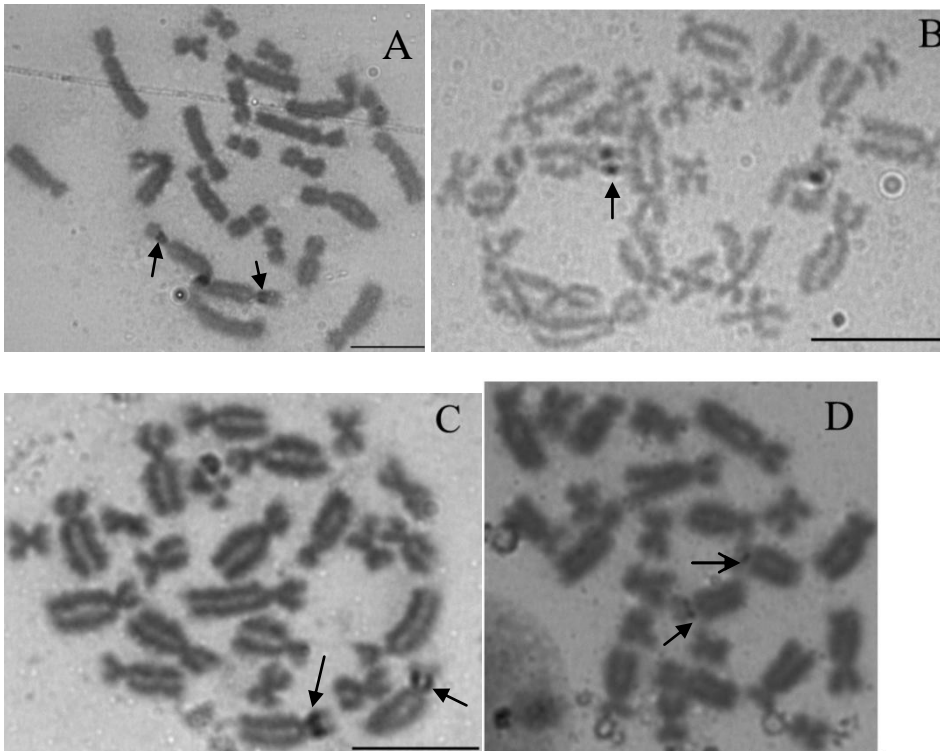
**Figura 2** Cariótipo com coloração convencional (Giemsa) de indivíduos de *Scinax tripui* coletados no estado de Minas Gerais, Brasil. A. CT1853, B. CT2649 (A e B – coletados no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro). C. CT2580, D. CT2572 (C e D – coletados na Usina da Fumaça). Setas indicam constrições secundárias. Par de cromossomos sexuais (3<sup>o</sup> par) em destaque. As barras correspondem à medida de 10µm.



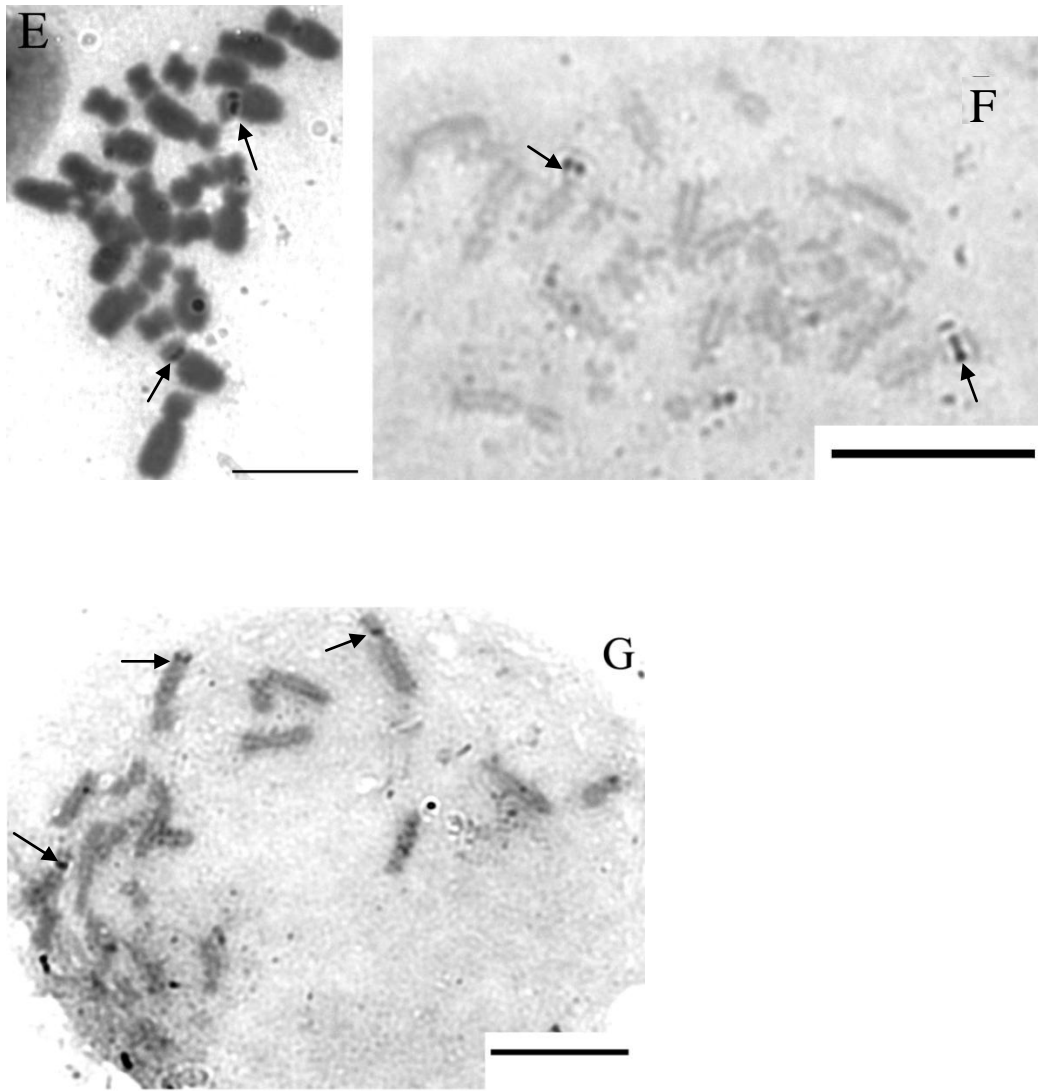
**Figura 2 (continuação)** Cariótipo com coloração convencional (Giemsa) de indivíduos de *Scinax tripui* coletados no estado de Minas Gerais, Brasil. E. CT2568, F. CT3027 (E e F – coletados na RPPN Mata do Sossego). G. CT2606 (coletado na Estação Ecológica do Tripuí). Setas indicam constrições secundárias. Par de cromossomos sexuais (3<sup>o</sup> par) em destaque. As barras correspondem à medida de 10 $\mu$ m.



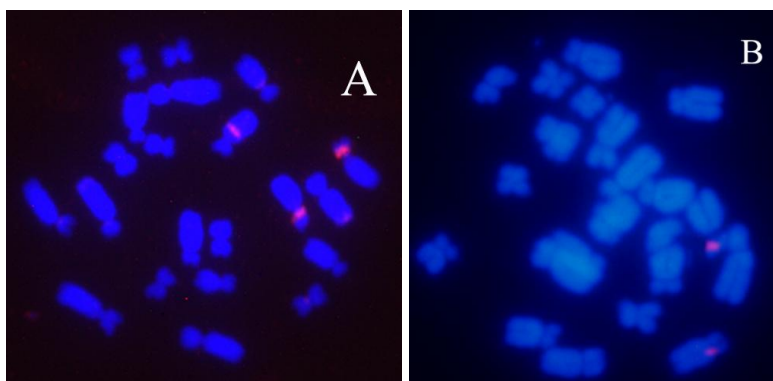
**Figura 3** Padrão de distribuição de heterocromatina de macho *Scinax tripui* da população da Usina da Fumaça - A. CT2574. Setas indicam constrições secundárias. As barras correspondem à medida de 10 $\mu$ m.



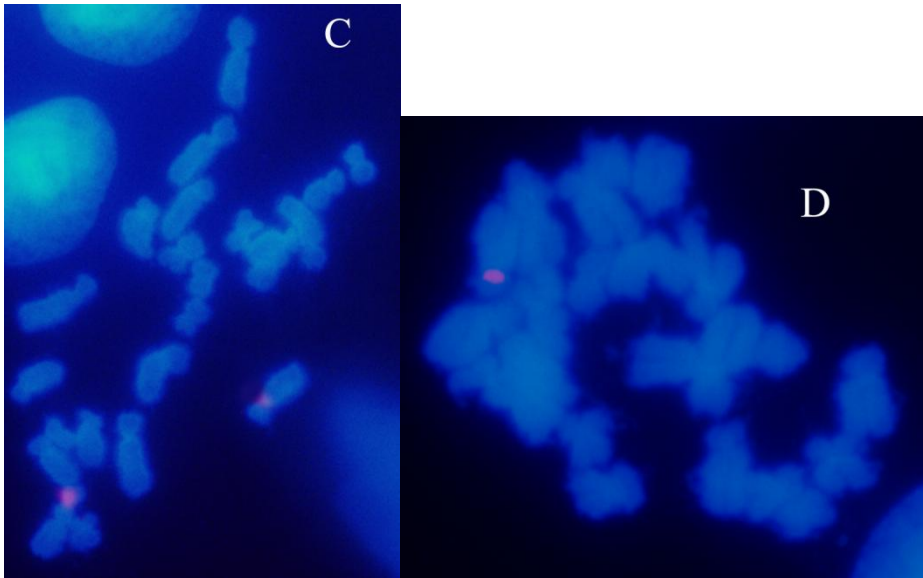
**Figura 4** Coloração por nitrato de prata evidenciando as regiões organizadoras do nucléolo (setas) de indivíduos de *Scinax tripui* coletados no estado de Minas Gerais, Brasil. A. CT2559 macho do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, B. CT2649 fêmea do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, C. CT2573 macho da Usina da Fumaça, D. CT2572 fêmea da Usina da Fumaça.



**Figura 4 (continuação)** Coloração por nitrato de prata evidenciando as regiões organizadoras do nucléolo (setas) de indivíduos de *Scinax tripui* coletados no estado de Minas Gerais, Brasil. E. CT2568 macho da RPPN Mata do Sossego, F. CT3027 fêmea da RPPN Mata do Sossego, G. CT2606 macho da Estação Ecológica do Tripuí. As barras correspondem à medida de 10µm.



**Figura 5** Marcação de sondas 18rDNA fluorescentes (rosa) obtidas a partir de hibridização *in situ* (FISH) em populações de *Scinax tripui* coletados no Estado de Minas Gerais, Brasil A Estação Ecológica do Tripuí (CT 2606); B. macho da Usina da Fumaça (CT 2574).



**Figura 5 (continuação)** Marcação de sondas 18rDNA fluorescentes (rosa) obtidas a partir de hibridização *in situ* (FISH) em populações de *Scinax tripui* coletados no Estado de Minas Gerais, Brasil: C. macho da RPPN Mata do Sossego (CT 3031); e D. fêmea do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (CT 2782).