

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO**

**ANÁLISE CITOGENÉTICA DE CINCO ESPÉCIES DO
GÊNERO *Boana* (ANURA: HYLIDAE) E DUAS ESPÉCIES
DO GÊNERO *Rhinella* (ANURA: BUFONIDAE)**

Autora: Ana Caroline Cândida da Silva
Orientadora: Dr^a. Maria Andréia C. Mendonça
Coorientador: Dr. Tainã Lucas Andreani

RIO VERDE – GO
Março de 2025

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO CAMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO**

**ANÁLISE CITOGENÉTICA DE CINCO ESPÉCIES DO
GÊNERO *Boana* (ANURA: HYLIDAE) E DUAS ESPÉCIES
DO GÊNERO *Rhinella* (ANURA: BUFONIDAE)**

Autora: Ana Caroline Cândida da Silva
Orientadora: Dr^a. Maria Andréia C. Mendonça
Coorientador: Dr. Tainã Lucas Andreani

Dissertação apresentada como parte das exigências para
obtenção do título de MESTRE EM
BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO no Programa
de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação do
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia
Goiano – Campus Rio Verde - Área de Concentração:
Conservação dos Recursos Naturais.

RIO VERDE – GO
Março de 2025

**Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema Integrado de Bibliotecas do IF Goiano - SIBi**

S586 Cândia da Silva, Ana Caroline
Análise Citogenética de Cinco Espécies do Gênero Boana
(Anura:Hylidae) e Duas Espécies do Gênero Rhinella (Anura:
Bufonidae) / Ana Caroline Cândia da Silva. Rio Verde 2025.
93f. il.
Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Andréia Corrêa Mendonça.
Coorientador: Prof. Dr. Tainã Lucas Andreani.
Dissertação (Mestre) - Instituto Federal Goiano, curso de
0231084 - Mestrado em Biodiversidade e Conservação (Campus
Rio Verde).
I. Título.

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610, de 19 de fevereiro de 1998, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano a disponibilizar gratuitamente o documento em formato digital no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

IDENTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA

- | | |
|--|---|
| ☐ Tese (doutorado) | ☐ Artigo científico |
| ☒ Dissertação (mestrado) | ☐ Capítulo de livro |
| ☐ Monografia (especialização) | ☐ Livro |
| ☐ TCC (graduação) | ☐ Trabalho apresentado em evento |

☐ Produto técnico e educacional - Tipo:

Nome completo do autor:

Ana Caroline Cândida da Silva

Matrícula:

2023102310840003

Título do trabalho:

Análise Citogenética de Cinco Espécies do Gênero Boana (Anura: Hylidae) e Duas Espécies do Gênero Rhinella (Anura: Bufonidae)

RESTRIÇÕES DE ACESSO AO DOCUMENTO

Documento confidencial: ☒ Não ☐ Sim, justifique:

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 28 / 12 / 2025

O documento está sujeito a registro de patente? ☐ Sim ☒ Não O documento pode vir a ser publicado como livro? ☐ Sim ☒ Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O(a) referido(a) autor(a) declara:

- Que o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- Que obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autoria, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- Que cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Rio Verde, Goiás

Local

28 / 12 / 2025

Data

Ana Caroline Cândida da Silva

Assinatura do autor e/ou detentor dos direitos autorais

Ciente e de acordo:

Assinatura do(a) orientador(a)



Documento assinado digitalmente
MARIA ANDREIA CORREA MENDONÇA
Data: 18/12/2025 16:56:54 -0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Documentos 45/2025 - DPGPI-RV/CMPRV/IFGOIANO

ANÁLISE CITOGENÉTICA COMPARATIVA DE CINCO ESPÉCIES DO GÊNERO *BOANA* (ANURA: HYLIDAE) E DUAS ESPÉCIES DO GÊNERO *RHINELLA* (ANURA: BUFONIDAE)

Autora: Ana Caroline Cândida da Silva
Orientadora: Profª. Dra. Maria Andréia Corrêa Mendonça

TITULAÇÃO: Mestre em Biodiversidade e Conservação - Área de Concentração Conservação dos Recursos Naturais

APROVADA em 25 de março de 2025.

Prof. Dr. Werther Pereira Ramalho
Avaliador Interno
IFGOIANO / Rio Verde

Profª. Dra. Fernanda Aparecida Ferrari
Soares
Avaliadora Externa
Universidade Federal de Viçosa

Profª. Dra. Maria Andréia Corrêa Mendonça
Presidente da Banca
IFGOIANO / Rio Verde

Documento assinado eletronicamente por:

- Maria Andreia Correa Mendonca, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLÓGICO, em 25/03/2025 17:28:15.
- Werther Pereira Ramalho, 2021202343760001 - Discente, em 25/03/2025 18:49:08.
- Fernanda Aparecida Ferrari Soares, Fernanda Aparecida Ferrari Soares - Professor Avaliador de Banca - Universidade Federal de Viçosa (25944455000196), em 26/03/2025 12:04:34.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 28/02/2025. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 682541
Código de Autenticação: ccb55a6017



INSTITUTO FEDERAL GOIANO

Campus Rio Verde

Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, 01, Zona Rural, RIO VERDE / GO, CEP 75901-970

(64) 3624-1000

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus e a Nossa Senhora, por sempre ouvir minhas orações e me amparar em meio às diversas dificuldades. Aos meus queridos e amáveis pais, Lilian e Wantuil, pessoas de coração imensurável, que apesar da simplicidade e humildade, sempre me motivaram e ensinaram lições valiosas, e auxiliaram mesmo diante das dificuldades, não tenho palavras para expressar minha gratidão e amor. Aos meus irmãos, Raissa, Vinícius e Wantuil Júnior, que me apoiaram e estiveram presentes em tudo, obrigada por tanto. A minha querida avó, Maria, que me tratou como a neta Carolzinha estudiosa, com tanto amor e carinho, você é meu amor, vovó! A minha tia Ivone e meus primos Suzane, Kellen e Neto, que apesar da distância sempre encaminhavam aquela mensagem de apoio e saudades. Amo vocês família, obrigada por tudo e por tanto, sem vocês eu nada seria!

Não poderia deixar de registrar a minha querida orientadora Maria Andréia, que buscou o melhor e deu tudo de si, apresenta as melhores soluções e está sempre presente, motivando, auxiliando, indo a campo e a bancada também. Você, com certeza, é minha inspiração de profissional e ser humano. Obrigada por tudo e por tanto, Maria, você me fez amar ainda mais a genética, a biologia, a pesquisa científica. Aqui registro minha admiração e espero ser um pouco da incrível profissional e pessoa que és.

Ao meu coorientador Tainã Lucas que sempre me socorre e me acalma em meio ao caos, obrigada meu querido, você é incrível! Ao meu querido e grandioso Werther Ramalho, não tenho palavras para descrever minha gratidão, pelos ensinamentos em campo, na escrita e principalmente, na identificação dos bichos. Werther, você me fez amar a herpetologia de forma tão genuína e maravilhosa que nem sei descrever, obrigada, obrigada! Admiro-te muito como excelente pessoa e excelente pesquisador e por ter me ajudado tanto nessa trajetória. Ao meu querido Helbert, que também sempre me ajudou na identificação, ida aos campos. Sua humildade e proeza são características únicas, obrigada por tanto.

Ao meu companheiro de vida e de pesquisa, Marco Antônio, que tem sido meu alicerce durante essa trajetória. Indo aos campos, auxiliando na identificação e citogenética, mapas e escrita. Te admiro muito meu amor, obrigada por ser você e estar presente em todos os momentos, principalmente me fortalecendo e aconselhando nos momentos mais difíceis, te amo garoto!

Aos meus amigos de laboratório, Paulo, Juliane, Kaine, Emily, José Augusto e Beatriz, por tornar tudo mais leve e engraçado durante nossa rotina diária, mesmo quando nada sai

como o esperado. Ao pessoal do LEESV, pelos momentos únicos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida, ao PELD- EBMN pela oportunidade. Ao IF Goiano e ao quadro docente do PPGBio, por me proporcionarem conhecimentos únicos. Aqui deixo minha gratidão a todos.

BIOGRAFIA DA AUTORA

ANA CAROLINE CÂNDIDA DA SILVA, filha de Lilian Cristina Cândida da Silva e de Wantuil Cantalício de Melo, nascida em 25 de novembro de 1999, na cidade de Uruana- GO, Brasil. Em 2018, ingressei no curso de licenciatura em Ciências Biológicas no Instituto Federal Goiano campus Ceres. Durante a graduação fui bolsista do Programa Institucional de Iniciação Científica (PIBIC) com o projeto intitulado "Métodos de estudos: Organização de tempo e estratégias de aprendizagem desenvolvidas pelos estudantes do IF Goiano Campus Ceres" sob orientação da Professora Ms. Maria do Socorro Viana do Nascimento. Em 2020, fui bolsista Programa Programa Institucional de Bolsas de Iniciação à Docência (PIBID) sob orientação da Professora Ms. Renata Rolins da Silva Oliveira. Também participei de vários projetos, entre eles, atuando como professora de microscopia durante o “Férias Científica campus Ceres”. Atualmente, estou finalizando o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação no Instituto Federal Goiano campus Rio verde, sob a orientação da Profa. Dra. Maria Andréia Corrêa Mendonça, no qual desenvolvi a dissertação intitulada “ANÁLISE CITOGENÉTICA DE SEIS ESPÉCIES DO GÊNERO *Boana* (ANURA: HYLIDAE) E DUAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Rhinella* (ANURA: BUFONIDAE)”. Faço parte também do grupo de pesquisa PELD EBMN, contribuindo com conhecimentos sobre a citogenética de anfíbios anuros.

CAPÍTULO I

TRENDS AND INSIGHTS IN CYTOGENETIC RESEARCH IN BRAZILIAN ANURANS: A SCIENTOMETRIC ANALYSIS

(Artigo aceito pelo periódico Studies on Neotropical Fauna and Environment)

Discente: Ana Caroline Cândida da Silva
Orientadora: Dr^a. Maria Andréia C. Mendonça
Coorientador: Dr. Tainã Lucas Andreani

Rio Verde- GO
Março- 2025

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO GERAL	3
2. OBJETIVOS	6
2.1 Geral:	6
2.2 Específicos:	6
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	7
CAPÍTULO I	9
TRENDS AND INSIGHTS IN CYTOGENETIC RESEARCH IN BRAZILIAN ANURANS: A SCIENTOMETRIC ANALYSIS	9
ABSTRACT	9
INTRODUCTION	10
MATERIAL AND METHODS	13
Data collection.....	13
Data analysis.....	14
RESULTS	16
Research effort, taxonomic focus, and knowledge gaps	16
Studies published by region and biome.....	17
Temporal trend in article production	18
Journals and funding	18
Species threat categories.....	19
DISCUSSION	19
Research effort, taxonomic focus, and knowledge gaps	19
Studies published by region and biome.....	23
Temporal trend in article production	25
Journals and funding	29
Species threat categories.....	30
CONCLUSION	30
Acknowledgements	31
REFERENCES	31
CAPÍTULO II	44
ANÁLISE CITOGENÉTICA COMPARATIVA DE CINCO ESPÉCIES DO GÊNERO BOANA (ANURA: HYLIDAE) E DUAS ESPÉCIES DO GÊNERO RHINELLA (ANURA: BUFONIDAE)	44
RESUMO	45
1 INTRODUÇÃO	46

1.1	Taxonomia e o habitat.....	46
1.2	Citogenética de anfíbios anuros	47
1.3	Citogenética clássica de <i>Boana</i> (Hylidae) e <i>Rhinella</i> (Bufonidae).....	48
2	MATERIAL E MÉTODOS	50
2.1	Abordagem cienciométrica	50
2.2	Coleta e amostragem das espécies	50
2.3	Procedimentos para a obtenção dos cromossomos metafásicos	53
3	RESULTADOS	54
3.1	Abordagem cienciométrica	54
3.2	Cariótipos obtidos	62
3.2.1	<i>Boana albopunctata</i> (Spix, 1824)	62
3.2.2	<i>Boana crepitans</i> (Wied-Neuwied, 1824)	63
3.2.3	<i>Boana multifasciata</i> (Günther, 1859).....	64
3.2.4	<i>Boana paranaiba</i> (Carvalho, Giaretta, and Facure, 2010)	64
3.2.5	<i>Boana raniceps</i> (Cope, 1862).....	65
3.2.6	<i>Rhinella diptycha</i> (Cope, 1862).....	66
3.2.7	<i>Rhinella mirandaribeiroi</i> (Gallardo, 1965)	66
4	DISCUSSÃO	67
4.1	Redução do número cromossômico em <i>Boana albopunctata</i> (Spix, 1824).....	67
4.2	Cromossomo B em <i>Boana albopunctata</i>	68
4.3	<i>Boana crepitans</i> (Wied-Neuwied, 1824)	70
4.4	<i>Boana multifasciata</i> (Günther, 1859)	71
4.5	<i>Boana paranaiba</i> (Carvalho, Giaretta, and Facure, 2010).....	72
4.6	<i>Boana raniceps</i> (Cope, 1862)	73
4.7	<i>Rhinella diptycha</i> (Cope, 1862)	74
4.8	<i>Rhinella mirandaribeiroi</i> (Gallardo, 1965).....	75
5	CONCLUSÕES	76
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

ANÁLISE CITOGENÉTICA COMPARATIVA DE SEIS ESPÉCIES DO GÊNERO *BOANA* (ANURA: HYLIDAE) E DUAS ESPÉCIES DO GÊNERO *RHINELLA* (ANURA: BUFONIDAE)

RESUMO

SILVA, ANA CAROLINE CÂNDIDA DA. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – março de 2025. **Análise citogenética de seis espécies do gênero *Boana* (Anura: Hylidae) e duas espécies do gênero *Rhinella* (Anura: Bufonidae).** Orientadora: Dra. Maria Andréia Corrêa Mendonça. Coorientador: Dr. Tainã Lucas Andreani.

O Brasil abriga a maior diversidade de anfíbios do mundo, com aproximadamente 1.239 espécies, destacando-se a ordem Anura, que inclui sapos, rãs e pererecas. Apesar da riqueza de espécies, o aspecto genético desses animais tem sido pouco explorado, especialmente no que se refere à caracterização cariotípica. A citogenética tem sido uma ferramenta importante para complementar dados que auxiliam na identificação e classificação taxonômica de anuros, permitindo a detecção de variações cromossômicas e a compreensão da evolução do grupo. No entanto, persistem desafios, principalmente em relação às espécies ainda não cariotipadas. Diante disso, realizou-se um estudo cienciométrico sobre a citogenética de anuros no Brasil, utilizando as plataformas "Web of Science", "Scielo" e "Scopus", com palavras-chave relacionadas a cariótipos e cromossomos. Foram encontrados 163 artigos sobre 470 espécimes, revelando disparidades regionais nas pesquisas. A Mata Atlântica foi o bioma mais amostrado, enquanto biomas como o Pantanal, Caatinga e Pampa apresentam lacunas significativas. Foram identificadas diversas espécies com potencial para estudos de caracterização cariotípica e, destas, sete foram acessadas e realizada a cariotipagem. Portanto, sete espécies foram analisadas e cariotipadas, sendo cinco do gênero *Boana* (*B. albopunctata*, *B. crepitans*, *B. multifasciata*, *B. paranaiba*, *B. raniceps*) e duas do gênero *Rhinella* (*R. diptycha* e *R. mirandaribeiroi*). O cariótipo de *Boana paranaiba* e *Rhinella mirandaribeiroi* foi descrito pela primeira vez neste estudo, ambas apresentando $2n = 2x = 22$ cromossomos, assim como as demais espécies analisadas, com exceção de *B. crepitans* e *B. raniceps*, cujo número cromossômico encontrado foi $2n = 2x = 24$. Também foi identificada a presença de cromossomos B em *Boana albopunctata*, identificada pela primeira vez na porção central e cerrado brasileiro. Além disso, a uniformidade morfológica dos cromossomos na maioria, metacêntricos e/ ou submetacêntricos, evidencia a conservação cromossômica principalmente nas espécies pertencentes ao gênero *Rhinella*, reforçando como uma especificidade exclusiva do grupo. A continuidade dos estudos citogenéticos, especialmente em biomas pouco explorados, é crucial para preencher lacunas do conhecimento, resolver questões taxonômicas e subsidiar estratégias de conservação. Considerando as crescentes ameaças ambientais, os avanços nessa área são essenciais para evitar a perda de espécies antes mesmo de serem descritas citogeneticamente.

PALAVRAS-CHAVE: Brasil; Estudo Cienciométrico; cariótipos; anfíbios.

ABSTRACT

SILVA, ANA CAROLINE CÂNDIDA DA. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – March de 2025. **Cytogenetic analysis of six species of the genus *Boana* (Anura: Hylidae) and two species of the genus *Rhinella* (Anura: Bufonidae).** Orientadora: Dra. Maria Andréia Corrêa Mendonça. Coorientador: Dr. Tainã Lucas Andreani.

Brazil hosts the greatest diversity of amphibians in the world, with the order Anura, which includes toads, frogs, and tree frogs, standing out. Despite this richness, the genetic aspect of these animals has been poorly explored, especially in relation to karyotypic characterization. Cytogenetics has been an important tool for complementing data that aids in the identification and taxonomic classification of anurans, enabling the detection of chromosomal variations and understanding the evolution of the group. However, challenges remain, especially concerning species that have not yet been karyotyped. In this context, a scientometric study about the cytogenetics of anurans in Brazil was carried out, using the platforms "Web of Science," "Scielo," and "Scopus," with keywords related to karyotypes and chromosomes. There were found 163 articles about 470 specimens, revealing regional disparities in the research, with the Atlantic Forest being the most sampled biome, while biomes such as the Pantanal, Caatinga, and Pampa show significant gaps. Furthermore, based on the results obtained from the scientometric approach, species with potential for karyotypic characterization studies were identified. Therefore, seven species were analyzed and karyotyped, five of which belong to the genus *Boana* (*B. albopunctata*, *B. crepitans*, *B. multifasciata*, *B. paranaíba*, *B. raniceps*), and two to the genus *Rhinella* (*R. diptycha* and *R. mirandaribeiroi*). The karyotypes of *Boana paranaíba* and *Rhinella mirandaribeiroi* were described for the first time in this study, both showing $2n = 2x = 22$ chromosomes, like the other species analyzed, except for *B. crepitans* and *B. raniceps*, which had a chromosomal number of $2n = 2x = 24$. It was also identified the presence of B chromosomes in *Boana albopunctata*. Therefore, continuing cytogenetic studies, especially in underexplored biomes, is crucial to fill knowledge gaps, address taxonomic issues, and support conservation strategies. Given the growing environmental threats, advancements in this area are essential to prevent the loss of species before they are even cytogenetically described.

KEY WORDS: Brazil; Scientometric Study; karyotype; amphibians.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é reconhecido como o país que detém a maior diversidade de anfíbios do planeta (Guerra *et al.*, 2020). A anurofauna brasileira representa um patrimônio biológico de imenso valor científico e ecológico com aproximadamente 1.188 espécies descritas (Segalla *et al.*, 2021) e distribuídas em todos os biomas e suas transições (Delazeri *et al.*, 2019; Frost, 2024; Valdujo *et al.*, 2012). No entanto, apesar desse elevado número de espécies, ainda persistem lacunas significativas no conhecimento sobre a citogenética desses animais, especialmente no que diz respeito à caracterização cariotípica (Nunes e Fagundes, 2008; Hortal *et al.*, 2015; Targueta *et al.*, 2018). Das 7.823 espécies de anuros descritas no mundo, apenas 1.833 apresentam descrição cariotípica (Perkins *et al.*, 2019).

A citogenética desempenha papel fundamental na descrição e compreensão da diversidade genética e evolutiva das espécies. Por meio de técnicas convencionais, como a coloração de Giemsa, bandeamento C e Ag-NOR, e métodos citomoleculares, como a hibridização fluorescente *in situ* (FISH), é possível obter informações detalhadas sobre o número cromossômico, morfologia dos cromossomos, posição do centrômero, identificação de cromossomos sexuais, regiões heterocromáticas, e regiões específicas com genes ribossômicos (Cholak *et al.*, 2020). Esses dados são essenciais para entender os processos de rearranjos cromossômicos, a diversificação de linhagens e a identificação de sinapomorfias, contribuindo para revisões taxonômicas e filogenéticas (Kasahara *et al.*, 2003; Gruber *et al.*, 2012; Suárez *et al.*, 2013; Veiga-Menoncello *et al.*, 2014; Ferro *et al.*, 2018). Além disso, a citogenética fornece subsídios importantes para a conservação das espécies, através da identificação de características específicas encontradas nas espécies, como a presença de cromossomo B, cuja origem e funcionalidade permanece desconhecida (Ferro *et al.*, 2023), especialmente diante do crescente declínio populacional de anfíbios observado (Luedtke *et al.*, 2023; Anunciação *et al.*, 2024).

Uma maneira de quantificar o número de espécies estudadas e identificar lacunas de conhecimento é por meio de revisões bibliográficas e análises cienciométricas. Essas abordagens permitem revelar tendências na produção científica, identificar áreas prioritárias para pesquisa e subsidiar o planejamento de novos estudos (Borges *et al.*, 2015). No contexto da anurofauna brasileira, estudos cienciométricos já foram conduzidos com o objetivo de mapear a distribuição de espécies e identificar biomas com maior número de descrições taxonômicas, como a revisão de Guerra *et al.* (2020), que apontou áreas carentes de amostragem. Adicionalmente, Teixido *et al.* (2021) realizaram uma meta-análise para

investigar os padrões de estudos sobre o efeito da fragmentação na herpetofauna do Brasil. No campo da genética, D'ambrosio *et al.* (2017) utilizaram a cienciometria para compilar informações sobre cromossomos B (i.e., elementos extras, cuja origem e funcionalidade em anuros encontra-se desconhecida) em plantas, animais e fungos, criando uma base de dados (B-chrom) que facilita o acesso a informações sobre a presença e distribuição desses cromossomos. Porém, apesar desses avanços, ainda há carência de estudos cienciométricos focados na citogenética de anuros brasileiros, especialmente considerando a grande quantidade de espécies ainda não cariotipadas e a escassez de trabalhos nessa área.

Entre as famílias de anuros mais representativas no Brasil, destacam-se Hylidae e Bufonidae (SBH, 2025). A família Hylidae, com 1.062 espécies descritas, é a mais diversa, sendo amplamente distribuída nos biomas brasileiros. O gênero *Boana*, pertencente a essa família com 99 espécies organizadas em sete grupos taxonômicos (Faivovich *et al.*, 2005; Frost, 2025). Já a família Bufonidae, conhecida popularmente como "sapos", possui 658 espécies descritas no mundo, das quais 96 ocorrem no Brasil (Frost, 2025), distribuídas em nove gêneros, com destaque para o gênero *Rhinella*, que abriga 97 espécies válidas, com a ocorrência de 38 espécies em território brasileiro (Segalla *et al.*, 2021; Frost, 2025; SBH, 2025). Apesar da riqueza desses grupos, os estudos citogenéticos ainda são escassos, especialmente para o gênero *Rhinella*, que apresenta conservadorismo cromossômico notável, com $2n = 22$ e número fundamental (FN) de 44 (Bruschi *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2024).

A caracterização cariotípica de espécies de anuros brasileiros teve início na década de 1960, com o uso de técnicas convencionais de coloração (Becak, 1968). Desde então, avanços metodológicos, como o uso de colchicina e tratamento hipotônico, permitiram progresso significativo na identificação e análise de cromossomos (Schmid *et al.*, 1990). Atualmente, a integração de dados citogenéticos com informações morfológicas, bioacústicas e moleculares tem sido crucial para a elaboração de hipóteses taxonômicas mais robustas e para a compreensão da evolução cromossômica (Targueta *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2023).

Neste contexto, o presente estudo foi dividido em dois capítulos, o primeiro teve como objetivo realizar uma revisão sistemática da literatura científica sobre a citogenética da anurofauna brasileira, para compreender as tendências e lacunas de conhecimento do tema. O segundo capítulo teve como objetivo contribuir com novos dados cariotípicos para espécies ainda não estudadas, como *Boana paranaíba* e *Rhinella mirandaribeiroi*, conforme os resultados obtidos na cienciometria. Além disso, foi descrito o cariótipo de espécies já

cariotipadas, com o intuito de confirmar o número cromossômico e o padrão de morfologia cromossômica. Esses resultados não apenas ampliam o conhecimento citogenético desses grupos, mas também fornecem subsídios importantes para estudos futuros, além de destacar a importância da cienciometria como ferramenta para direcionar pesquisas em espécies ainda não cariotipadas.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

Evidenciar tendências e lacunas sobre a citogenética de anuros brasileiros através de uma abordagem cienciométrica, bem como descrever o cariótipo de espécies ainda não cariotipadas.

2.2 Específicos:

- (1) Desenvolver um estudo cienciométrico sobre a citogenética da anurofauna brasileira, com o propósito de listar espécies que apresentam descrições cromossômicas;
- (2) Caracterizar citogeneticamente tanto espécies de anuros brasileiros que ainda não possuem cariotipos descritos, assim como aquelas que já apresentam descrições prévias.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANUNCIAÇÃO, P. R. *et al.* Amphibian conservation status in Brazil: Spatial patterns, threats, and challenges. *Journal for Nature Conservation*, p. 126611, 2024.
- BEÇAK, M. L. Chromosomal analysis of eighteen species of Anura. *Caryologia*, v.21, n. 3, p. 191-208, jan, 1968.
- BORGES, P. P. *et al.* Trends and gaps of the scientific literature on the Cerrado biome: A scientometric analysis. *Neotropical Biology & Conservation*, v. 10, n. 1, 2015.
- BRUSCHI, D. P. *et al.* Comparative cytogenetics of nine populations of the *Rhinella* genus (Anura, Bufonidae) with a highlight on their conservative karyotype. *Genetics and Molecular Biology*, v. 42, p. 445-451, 2019.
- CHOLAK, L. R.; HADDAD, C. F. B.; PARISE-MALTEMPI, P. P. Cytogenetic analysis of the genus *Thoropa* Cope, 1865 (Anura-Cycloramphidae) with evolutionary inferences based on repetitive sequences. *Genetics and Molecular Biology*, v. 43, n. 3, p. e20190364, 2020.
- D'AMBROSIO, U. *et al.* B-chrom: a database on B-chromosomes of plants, animals and fungi. *New Phytologist*, v. 216, n. 3, p. 635-642, 2017.
- DELAZERI, F. *et al.* Estruturação Populacional de *Boana curupi* (Anura, Hylidae) revelada por variação haplotípica do Dna Mitocondrial. 2012.
- FERRO, J. M. *et al.* Chromosome evolution in Cophomantini (Amphibia, Anura, Hylinae). *PLoS One*, v. 13, n. 2, p. e0192861, 2018.
- FROST, D. R. *Amphibian Species of the World: an Online Reference*. Version 6.0. New York: American Museum of Natural History, 2025.
- GRUBER, S. L.; HADDAD, C. F. B.; KASAHARA, S. Karyotype analysis of seven species of the tribe Lophiohylini (Hylinae, Hylidae, Anura), with conventional and molecular cytogenetic techniques. *Comparative cytogenetics*, v. 6, n. 4, p. 409, 2012.
- GUERRA, V. *et al.* Knowledge status and trends in description of amphibian species in Brazil. *Ecological Indicators*, v. 118, p. 106754, 2020.
- HORTAL, J. *et al.* Seven shortfalls that beset large-scale knowledge of biodiversity. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, v. 46, n. 1, p. 523-549, 2015.
- KASAHARA, S. *et al.* Comparative cytogenetic analysis on four tree frog species (Anura, Hylidae, Hylinae) from Brazil. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 103, n. 1-2, p. 155-162, 2003.
- LUEDTKE, J. A. *et al.* Ongoing declines for the world's amphibians in the face of emerging threats. *Nature*, v. 622, n. 7982, p. 308-314, 2023.
- NUNES, R. R. A.; FAGUNDES, V. Cariótipos de oito espécies de anfíbios das subfamílias Hylinae e Phyllomedusinae (Anura, Hylidae) do Espírito Santo, Brasil. *Bol Mus Biol Mello*

Leitão, v. 23, p. 21-36, 2008.

SBH. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Brazilian amphibians – List of species. Lista de anfíbios. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/anfibios.htm>>. Acesso em: 01 dez. 2024.

SCHMID, M.; STEINLEIN, C.; NANDA, I.; EPPLEN, J.T. Chromosome banding in Amphibia. In: OLMO, E. (Ed.) Cytogenetics of Amphibians and Reptiles. Basel: Birkhauser Verlag, p. 21-45, 1990.

SEGALLA, M. V. *et al.* List of Brazilian amphibians. Herpetologia brasileira, v. 10, n. 1, p. 121-216, 2021.

SILVA, D. S. *et al.* Comparative molecular and conventional cytogenetic analyses of three species of Rhinella (Anura; Bufonidae). Plos one, v. 19, n. 8, p. e0308785, 2024.

SOUZA, K. L. *et al.* Repetitive DNA mapping in five genera of tree frogs (Amphibia: Anura) from the Atlantic Forest: new highlights on genomic organization in Hylidae. Cytogenetic and Genome Research 163.5-6: 317-326, 2023.

SUÁREZ, P. *et al.* Chromosome evolution in Dendropsophini (Amphibia, Anura, Hylinae). Cytogenetic and Genome Research, v. 141, n. 4, p. 295-308, 2013.

TARGUETA, C. P. *et al.* Cytogenetics of two hylid frogs from Brazilian Cerrado. Genetics and Molecular Biology, v. 41, p. 814-819, 2018.

TARGUETA, C. P.; RIVERA, M.; LOURENÇO, L. B. Karyotypic differentiation via 2n reduction and a finding of a case of triploidy in anurans of the genus *Engystomops* (Anura, Leiuperidae). Genetica 139:1339-1347, 2012.

TEIXIDO, A. L. *et al.* A meta-analysis of the effects of fragmentation on the megadiverse herpetofauna of Brazil. Biotropica, v. 53, n. 3, p. 726-737, 2021.

VALDUJO, P. H. *et al.* Anuran species composition and distribution patterns in Brazilian Cerrado, a Neotropical hotspot. South American Journal of Herpetology, v. 7, n. 2, p. 63-78, 2012.

VEIGA-MENONCELLO, A. C. P. *et al.* A phylogenetic analysis of *Pseudopaludicola* (Anura) providing evidence of progressive chromosome reduction. Zoologica Scripta, v. 43, n. 3, p. 261-272, 2014.

CAPÍTULO I

TRENDS AND INSIGHTS IN CYTOGENETIC RESEARCH IN BRAZILIAN ANURANS: A SCIENTOMETRIC ANALYSIS

Ana Caroline Cândida da Silva^{a,b}, Werther Pereira Ramalho^{a,c,d}, Marco Antônio Guimarães Silva^{c,e}, Alessandro Ribeiro de Moraes^{a,c}, Tainã Lucas Andreani^c, Maria Andréia Corrêa Mendonça^{a,b}

^a*Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, Goiás, Brazil;* ^b*Laboratório de Bioquímica e Genética, Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, Goiás, Brazil;* ^c*Laboratório de Ecologia, Evolução e Sistemática de Vertebrados, Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, Goiás, Brazil;* ^d*Instituto Boitatá de Etnobiologia e Conservação da Fauna, Goiânia, Goiás, Brazil;* ^e*Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, Instituto Oswaldo Cruz, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil*

*Corresponding Author: maria.andreia@ifgoiano.edu.br

Abstract

Cytogenetic studies are fundamental for understanding species identification, genetic variation, and chromosomal evolution in anurans, which include frogs, toads, and tree frogs. Despite progress, significant gaps remain in the cytogenetic knowledge of these species, particularly in high-biodiversity regions such as Brazil. We conducted a scientometric study using three major databases, focusing on studies of Brazilian-sampled anurans. A total of 163 papers reported data for 243 species. Families with the greatest species richness, including Hylidae and Leptodactylidae, were the most studied, whereas Neblinaphrynidae,

Eleutherodactylidae, and Ranidae remain uninvestigated. *Physalaemus ephippifer*, *Leptodactylus pentadactylus*, *L. fuscus*, *L. macrosternum*, *Proceratophrys boiei*, and *Pithecopus rohdei* were the most frequently analyzed species. The Atlantic Forest was the most studied region, while the Pantanal, Cerrado, and Pampa exhibited major knowledge gaps. Sampling efforts were largely regionalized. Investment in new cytogenetic techniques has increased over the past decades, but future efforts should focus on underrepresented species, families, and biomes to fill knowledge gaps, advance understanding of chromosomal evolution, and resolve taxonomic uncertainties in Brazilian anurans.

Keywords: Scientometrics, Anura, Karyotype, Brazil.

Introduction

Amphibians represent a class of vertebrates with high diversity, despite being one of the most threatened groups all over the world (Luedtke et al., 2023). Brazil holds the greatest diversity of these animals, with approximately 1,202 described species (considering only anurans; Segalla et al., 2021, Frost, 2025). These species inhabit all Brazilian biomes, including transitional areas (Valdujo et al., 2012; Azevedo, 2016; IUCN, 2025). Despite the high number of described species, there remains a significant gap in knowledge regarding their karyotypes, highlighting the need for additional cytogenetic studies (Nunes e Fagundes, 2008a; Targueta et al., 2018a). In this context, conventional methods (e.g., Giemsa staining, Ag-NOR, C-banding) together with cytomolecular approaches (e.g., fluorescence in situ hybridization [FISH] and DAPI) play a crucial role in filling gaps, as they not only support accurate species descriptions (Targueta et al., 2011) but also reveal essential patterns of chromosomal evolution over time (Ferro et al., 2018).

The conventional methods approach of chromosome number, fundamental number (i.e., total chromosomal arms), and centromere position, which allows the morphological characterization and potential classification of chromosomes (e.g., metacentric, submetacentric, subtelocentric, telocentric, acrocentric). These features contribute to our understanding of the role of chromosomal rearrangements in biological diversification and potential synapomorphies (Kasahara et al., 2003, Kasahara, 2009, Gruber et al., 2012, Suárez et al., 2013, Veiga-Menoncello et al., 2014, Ferro et al., 2018, Levan et al., 1964). Chromosomal rearrangements are structural changes in chromosomes that result from breaks occurring prior to DNA duplication (Kasahara, 2009). In anurans, such rearrangements can lead to various alterations, including inversions, fusions, and translocations. These mechanisms have been proposed to explain phenomena such as the chromosomal dynamics of the NOR (Venâncio et al., 2022), polymorphic inversions (Schmid et al., 1995), chromosomal homologies (Ferro et al., 2018), and the emergence of internal or intrachromosomal telomeric sequences (Schmid and Steinlein, 2016).

Thus, identifying variations in chromosome number and longitudinal differences through banding techniques have proven effective for taxonomic revisions and the elucidation of phylogenetic relationships among anuran species (Urdampilleta et al., 2013, Cassini et al., 2020, Dominato et al., 2022). These studies not only enhance our understanding of genetic and evolutionary diversity but also provide essential insights for determining species' conservation status (Bruschi et al., 2014, Potter and Deakin, 2018). Understanding this diversity becomes increasingly urgent given the fast decline rates of anuran populations over the years (Luedtke et al., 2023, Anunciação et al., 2024). Scientometrics is a way to quantify and qualify these data, e.g., the number of studied species, revealing trends in scientific production and existing knowledge gaps, which can guide potential research that expands the

frontiers of knowledge about the genetic heritage of of Brazilian anurans (Guerra et al., 2020; Parreira et al., 2022).

Some scientometric studies are focused on describing the diversity of amphibian species in Brazil. One example is the review paper by Guerra et al. (2020), which aimed to characterize the biomes according to the frequency of described amphibian species, in order to prioritize areas of highest incidence. Additionally, Teixido et al. (2021) conducted a meta-analysis to investigate study patterns on the effects of landscape fragmentation on Brazilian herpetofauna, including anurans. In the context of genetic studies, D'Ambrosio et al. (2017) provided an overview of B chromosomes (Bs) in plants, animals, and fungi and developed a database (B-chrom) with comprehensive information on the presence and number of Bs within the groups mentioned. Perkins et al. (2019) also created a database (karyotype.org) to streamline access to detailed information on chromosome numbers and sex determination systems in amphibians, establishing it as a valuable resource for research in cytogenetics and evolutionary biology. As such, this scientometric study serves as a crucial complement, offering a comprehensive analysis of trends, gaps, and the impact of scientific publications on the topic. It contributes to the advancement of knowledge and helps guide future research in this field.

Despite the progress in scientometric studies, understanding the scope of research on anuran cytogenetics in Brazil is still necessary, given the high number of brazilian species lacking karyotypic data and the scarcity of studies in this area. This study aimed to (i) conduct a systematic review of the scientific literature on the cytogenetics of Brazilian anurans, (ii) to list species with chromosomal descriptions, (iii) to map the geographic distribution and the regions where amphibian cytogenetics studies are concentrated, (iv) test whether there is a pattern associated with Brazilian biodiversity, (v) investigate the temporal variation in the production of scientific articles, (vi) identify the main journals and funding sources for

research, and the threat status of Brazilian species with described karyotypes. Together, all these objectives were essential for characterizing publication patterns and identifying knowledge gaps regarding anuran cytogenetics in Brazil.

Material and Methods

Data collection

We conducted a search for articles published in journals within the field of cytogenetics, indexed in scientific repositories, including the Web of Science, Scopus, SciELO, and the Capes Periodicals database (<https://www-periodicos-capes-gov-br.ez369.periodicos.capes.gov.br/index.php>). As such, we believe that any potential biases resulting from the exclusion of articles in non-indexed journals are likely to have a minimal impact on the results. The keywords used were: “Chromosome, anura”; “Cytogenetics, anura”; and “Karyotype, anura”. These combinations were chosen to capture as many relevant articles as possible in the field. The search was restricted to research conducted in Brazil, and data collection took place from May 2023 to April 2024. We performed three searches on each platform using the following keyword combinations in all fields, connected by the Boolean term “AND”: “Chromosome AND Anura”; “Cytogenetics AND Anura”; and “Karyotype AND Anura”. After each search, we applied filters within the respective databases to select studies focusing on species collected in Brazil. Additionally, we reviewed the full text of each article to ensure it met our selection criteria. Abstracts, extended abstracts, dissertations, theses, literature reviews, and other documents not published in scientific journals were excluded from our study.

The following information was extracted from each selected publication: journal name, article title, year of publication, funding source, keywords, federative unit (Brazilian

state), family, species studied, municipality, sampling region and biome, types of banding used, chromosome pair with Nucleolus Organizer Region (Ag-NOR), location, fundamental number, chromosomal count and classification of species according to their conservation status based on International Union for Conservation of Nature (IUCN) criteria (i.e., CR – Critically Endangered; EN – Endangered; VU – Vulnerable; NT – Near Threatened; LC – Least Concern; DD – Data Deficient; NE – Not Evaluated). All these features were essential for a better understanding of the patterns of cytogenetic research conducted on Brazilian anurans (Table S1).

We obtained a list of amphibian species and genera by family occurring in Brazil primarily from the Amphibian Species of the World database (Frost 2025) and Segalla et al. (2021). Updated species nomenclature, including recent taxonomic revisions, was also based on the Amphibian Species of the World database (Frost 2025), thereby minimizing the risk of errors and duplications in species identification. For some statistical analyses (see details below), we disregarded taxa not identified at the species level (e.g., described as “sp.”, “aff.”, or “cf.”) or those that, after taxonomic revision, could currently represent one or more different species. For example, in the case of *Odontophrynus americanus*, which constitutes a species complex that, following taxonomic revisions, resulted in the description of several species (e.g., *O. reigi*, *O. asper*, *O. toledo*, *O. juquinha*; Rosset et al., 2006; Rocha et al., 2017; Rosset et al., 2022; Moroti et al., 2022), we chose to retain the designation “*Odontophrynus gr. americanus*” to avoid potential misinterpretations.

Data analysis

To analyze the most frequently used keywords and the most cytogenetically studied species, we developed word clouds (Fellows, 2018), enabling a quick and intuitive visualization of the frequency with which each keyword and each species was cited in the selected studies. This

tool, which complements our dataset available in the Supplementary Material (Table S1), allowed us to identify the species most frequently reported in the publications. Additionally, we provide a dataset (Table S2) listing the families and genera of anurans recorded in Brazil, highlighting those with described karyotypes and those for which no cytogenetic data were available at the time of the search. For this compilation, we used Amphibian Species of the World database (Frost 2025).

For the creation of the heatmap, we compiled geographic coordinates of anuran specimen collection sites from the cytogenetic studies analyzed. When exact coordinates were not available, we used the centroid of the municipality reported in the article as a reference. The data were plotted on a map of Brazil using QGIS v. 3.32.2 to visualize the density of studies by region. Density was calculated based on the concentration of collection points, allowing the identification of areas with higher or lower representation of cytogenetic research. This approach enabled a spatial analysis of the distribution of studies, highlighting potential geographic gaps in the coverage of anuran research across the country.

To test whether there is a relationship between the species richness of anurans known for each family in Brazil (obtained from Frost, 2025) and the number of cytogenetic studies or the number of species with described karyotype data per family, we performed simple linear regressions, separately. In these analyses, the number of known species per family was used as the predictor variable, and either the number of studies or the number of species with cytogenetic data was used as the response variable. Additionally, we constructed scatterplots with trend lines to visualize families with higher or lower representation in research in Brazil.

To investigate the temporal trend in article production, we initially performed an exploratory descriptive analysis, during which we visually identified a structural change around the year 2000. This observation motivated the application of both a general linear regression and a segmented regression analysis (Wauchope et al., 2021). For the latter, the

dataset was then divided into two distinct periods (Pre-2000 and Post-2000), and independent linear regression models were fitted for each segment, allowing us to quantify differences in temporal trends, based on the premise that the number of publications should increase over time.

All data were analyzed using packages available in R software (R Core Team, 2025). Word clouds were generated with the *wordcloud* package (Fellows, 2018), linear regressions were performed with the base *stats* package, and plots were produced using *ggplot2* (Wickham, 2016).

Results

Research effort, taxonomic focus, and knowledge gaps

A total of 163 articles were selected, most of which originated from the Web of Science (119; 73%), followed by Scopus (43; 26.38%) and Scielo (1; 0.61%). A total of 501 researchers listed as authors or co-authors were identified. The most frequently used keywords were "Amphibia" and "Evolution," each mentioned 17 times, followed by "Nucleolus," which appeared 15 times. The terms "Organizer," "FISH," and "NOR" each appeared 14 times (Figure 1A).

A total of 243 Brazilian species had their karyotypes described (Table S1). The most frequently studied species was *Physalaemus ephippifer*, with seven articles, followed by *Leptodactylus pentadactylus* with six, and *L. fuscus*, *L. macrosternum*, *Pithecopus rohdei*, and *Proceratophrys boiei*, each with five articles. In addition, a wide diversity of studies was conducted on other species, including *Boana albopunctata* and *B. raniceps*, both with four

articles, and *Phyllomedusa bahiana*, *P. albifrons*, *P. albonotatus*, *P. cuvieri*, *Rhinella diptycha*, *Scinax fuscovarius*, and *S. hayii*, each with three articles (Figure 1B).

The known species richness of anuran families in Brazil explained a considerable proportion of both the number of studies ($\beta = 1.04$, $R^2 = 0.75$, $p < 0.01$) and the number of species ($\beta = 0.89$, $R^2 = 0.64$, $p < 0.01$) with described karyotypes per family (Figure 2). In summary, the richest families tend to have more cytogenetically studied species. Hylidae was the family with the highest number of studied species, followed by Leptodactylidae and Phyllomedusidae. On the other hand, families such as Bufonidae, Brachycephalidae, and Craugastoridae showed a low proportion of analyzed species despite their diversity. Families such as Ceratophryidae, Cycloramphidae, and Pipidae have all their genera already studied, whereas Allophrynidae, Neblinaphrynidae, Eleutherodactylidae, and Ranidae lack cytogenetic data for any of their genera. In contrast, there are genera still not studied even within species-rich families, such as Bufonidae (*Adherobufo* and *Frostius*), Microhylidae (*Elachistocleis* and *Otophryne*), and Hylidae (*Gabohyla* and *Tepuihyla*) (Table S2).

Studies published by region and biome

The distribution of cytogenetic study density was not homogeneous across the different regions and biomes of Brazil. A significant concentration of studies was found in the Southeast and South regions, where densities reached up to 9.14. In contrast, the North, Northeast, and Central-West regions showed lower densities, close to 0.001. Numerous sampling gaps are evident, corresponding to blank areas on the map (Figure 3).

The Atlantic Forest biome had the highest concentration of studies, with karyotypes described for 111 anuran species (44% of the total studied), followed by Amazon and Cerrado biomes, with 52 (21%) and 48 (19%) species studied, respectively (Figure 4). By contrast, the

Pantanal is the biome with the fewest described karyotypes, represented by a single published article on one species (*Pseudis paradoxa*) (Table S1).

Temporal trend in article production

The oldest article found in our research dates back to 1966, reflecting at least 58 years of scientific production on the cytogenetics of Brazilian anurans. The global linear regression analysis indicated a significant increase ($\beta = 0.13$, $R^2 = 0.34$, $p < 0.01$) in the number of publications over the years (1966–2024), although we identified an abrupt rise in production after 2000 rather than a continuous linear trend, with a publication peak of 12 articles in 2012. However, the segmented regression analysis revealed non-significant trends in both the pre-2000 period ($\beta = 0.01$, $R^2 = 0.24$, $p = 0.12$) and the post-2000 period ($\beta = 0.08$, $R^2 = 0.03$, $p = 0.42$), although the mean production was 5.5 times higher in the latter period (Figure 5).

Journals and funding

The analyzed articles were published across a total of 51 different journals. The journal with the highest publication rate for this type of study in Brazil is *Genetics and Molecular Biology*, with 15 publications, accounting for 29% of the total journals. This is followed by *Genetica* with 14 publications (24%), and both *Comparative Cytogenetics* and *Hereditas*, each with 12 published articles (24%) (Table S3).

The São Paulo Research Foundation (FAPESP) was the most frequently cited funding source, supporting 62 (32%) articles on anuran cytogenetics research. This was followed by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) with 51 (27%) articles, and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES),

with 41 (21%) articles. Other funding sources supported fewer than five articles each. Additionally, 17 (9%) studies did not specify the funding source (Figure 6).

Species threat categories

Most Brazilian anuran species are predominantly in the Least Concern (LC) category, which included 228 species. The other categories had much lower numbers, with five Endangered (EN), four Vulnerable (VU), two Near Threatened (NT), one Critically Endangered (CR), and one Data Deficient (DD). Two species have not had their threat status assessed and are in the Not Evaluated (NE) category (Figure 7).

Discussion

Research effort, taxonomic focus, and knowledge gaps

Our results highlight that, despite a broad scientific community (composed of at least 501 researchers), the topics investigated are concentrated in a few central themes (e.g., Amphibia, Evolution, and Nucleolus), reflecting a well-established methodological foundation, particularly through the use of NORs. However, it also indicates that other aspects of anuran cytogenetics, such as intraspecific chromosomal diversity, sex chromosome evolution, and conservation applications, remain largely unexplored.

Although Brazil hosts the largest diversity of anuran amphibians in the world (Segalla et al., 2021; Frost, 2025), our results indicate a notable gap in cytogenetic knowledge for this group, as only 20% of Brazilian anuran species have their karyotypes formally described. We also found a pattern of publications concentrated on a few species belonging to the most diverse families. Species such as *Leptodactylus pentadactylus*, *Physalaemus ephippifer*,

Leptodactylus fuscus, *Physalaemus cuvieri*, and *Proceratophrys boiei* are among the most frequently analyzed. This predominance may be associated with their wide geographic distribution and population abundance, which facilitate collection, as well as their relatively larger body size, a factor that favors field capture (Higgs and Attrill, 2015; Guerra et al., 2020). The genera *Physalaemus* and *Leptodactylus*, for example, are widely represented across all Brazilian biomes (Frost, 2025; IUCN, 2025).

The genus *Physalaemus* has been used to study lineage and cryptic diversity, transposable elements (TEs), sex chromosomes and nucleolus organizer region (NOR) polymorphisms, as observed in *P. cuvieri* and *P. ephippifer*, which show high variability within the taxa (Quinderé et al., 2009; Miranda et al., 2019; Nascimento et al., 2010, 2015, 2019; Gatto et al., 2021). Similarly, the genus *Leptodactylus* accounts for a large portion of karyotype descriptions and has been essential for understanding chromosomal evolution in the group, especially regarding diploid number, chromosome morphology, analysis of chromosomal rearrangements evident in the differentiation of some groups, as well as studies of sex chromosomes. This is particularly notable in *L. pentadactylus*, which exhibits a remarkable number of these chromosomes, highlighting a peculiar characteristic, since in most anuran species these chromosomes cannot be distinguished from autosomes (Coelho et al., 2016; Gazoni et al., 2018; Noronha et al., 2020; Silva et al., 2021). Moreover, Gazoni et al. (2012), when analyzing the karyotype of *L. pentadactylus*, identified a complex chromosomal constitution, as during karyotype assembly only chromosomes 1, 2, 6, 7, and 8 could be accurately paired. The remaining pairs did not show clearly identifiable homologues, which, according to the authors, may be explained by the occurrence of multiple translocations.

The prominence of species such as *Proceratophrys boiei* and *Pithecopus rohdei* is also associated with their historical use as model species in comparative studies involving satellite

DNA, analysis of variation in NOR numbers and positions, and banding techniques (e.g., C-banding) (Ananias et al., 2007; Barth et al., 2009; Silva et al., 2020; Silva et al., 2023). However, this concentration of efforts also highlights an important limitation: extrapolating evolutionary patterns based on a small and biased set of species may compromise the robustness of inferences at broader taxonomic levels, such as genus or family. Therefore, identifying the most studied species also serves as a starting point to redirect future research efforts. While these species remain important for methodological validations and phylogenetic comparisons, it is urgent to expand the scope to include species with restricted distributions and high conservation status, which have greater potential to reveal new karyotypic patterns.

The *Odontophrynus* gr. *americanus* group (currently comprising species such as *O. reigi*, *O. asper*, *O. toledo*, and *O. juquinha*) stands out as one of the first anuran groups to be cytogenetically investigated in Brazil, with studies dating back to 1967 (Beçak et al., 1967; Ruiz et al., 1981; Ruiz et al., 1984). Species within this group exhibit intrapopulational polymorphism, with chromosome numbers ranging from $2n = 22$ to $2n = 44$. The species initially referred to as *O. americanus* represents the first documented case of polyploidy in naturally occurring dioecious vertebrates (Beçak et al., 1966). This remarkable karyotypic complexity has inspired continuous research aimed at understanding tetraploid diversity. Recent studies have revealed not only significant differences in chromosome numbers associated with the emergence of new species but also, by focusing on polyploidy, have identified hybridization events, morphologically cryptic species across distinct populations, and the presence of B chromosomes (Rocha et al., 2017; Cianciarullo et al., 2019; Rosset et al., 2006; Pereyra et al., 2009; Moroti et al., 2022; Rosset et al., 2022; Souza et al., 2023). Given this context, the *Odontophrynus* gr. *americanus* group stands out as a unique model for advancing the understanding of speciation mechanisms driven by polyploidy and hybridization in vertebrates. The continuation of studies employing cytomolecular approaches

is therefore essential to elucidate the dynamic evolutionary history of this group, providing insights into how chromosomal rearrangements and genome duplication events drive the diversification of Neotropical lineages.

Despite advances in the number of studies in recent years, the development of cytogenetics applied to anurans has not proportionally matched the high diversity of the group in Brazil. This uneven pattern reflects both logistical and historical limitations in cytogenetics; factors such as restricted access to certain geographic regions, difficulty in collecting rare or cryptic species, and the prioritization of widely distributed groups or those easily maintained in the laboratory may direct research efforts toward a reduced set of taxa (King, 1990; Troudet et al., 2017). As a consequence, families such as Hylidae and Leptodactylidae, although well represented in the number of studies, still contain genera with no chromosomal data, which limits generalizations about evolutionary patterns within these groups.

The lack of cytogenetic data for genera from less diverse families, such as *Neblinaphryne* (Neblinaphrynidae) or *Limnomedusa* (Alsodidae), highlights persistent gaps in lineages that could be particularly informative for phylogenetic inferences and understanding karyotype evolution in anurans. The underrepresentation of these often endemic or narrowly distributed families constitutes a significant bottleneck for integrating molecular, morphological, and chromosomal data. Moreover, the focus on a few well-studied genera can create a biased perception of karyotype stability or variability across the group. For instance, the predominance of diploid numbers $2n = 22$ or $2n = 24$ (see Supplementary Material) in the literature may reflect sampling biases rather than true patterns, as unsampled genera might exhibit unexpected variations, including supernumerary chromosomes, rearrangements, or NOR relocations, which are valuable for comparative cytotaxonomic studies (Kasahara, 2009; Nogueira et al., 2015). Therefore, this compilation reinforces the importance of cytogenetics

as a complementary tool for taxonomy and systematics while emphasizing the need for a strategic approach that prioritizes neglected or threatened genera and those with complex taxonomic histories, in order to reduce historical biases and achieve a more representative view of Brazilian anuran cytogenetic diversity.

Studies published by region and biome

Brazilian anurans are distributed across six different biomes and can also be found in transition zones (Valdujo et al., 2012; IUCN, 2025). The biome with the highest sampling events for cytogenetic studies is the Atlantic Forest, characterized by having the highest species richness in Brazil and one of the highest rates of endemism (67.2%), which consequently favors species collection. The Amazon forest is second in amphibian diversity, and also has high rates of endemism (Haddad, 2013; Guerra et al., 2018). Therefore, the biomes with larger geographic extent and higher biodiversity are privileged in numbers of cytogenetic description of anurans, underscoring their importance in biodiversity research, but this does not diminish the importance of smaller ecosystems in area and with lower species richness.

The Cerrado is the second-largest biome in Brazil, encompassing most of the central region of Brazil and featuring transition areas with all other Brazilian biomes, recognized as biodiversity hotspots (Andrade et al., 2017). The Caatinga extends across all states in the Northeast region of Brazil, as well as northern Minas Gerais, the only state situated in the Southeast region (Loiola et al., 2012). Although the Cerrado and Caatinga are considered poor biomes in amphibian diversity due to their climatic characteristics, they harbor unique and endemic species (Santana et al. 2024). However, most of them are threatened by anthropogenic activities (Mittermeier et al., 2005; Ribeiro-júnior and Bertoluci, 2009; Medeiros et al., 2022). Additionally, the Cerrado houses almost half anuran species as

endemic, while the Caatinga has a much lower rate of endemism than that, but it is a poorly studied and neglected biome (Andrade et al., 2017; Guerra et al., 2020; Santana et al., 2024). The situation is even more concerning in cytogenetics, as it is one of the biomes with the greatest deficit of studies in this area. Therefore, there is an urgent need for genetic research in these regions to improve our understanding of anuran biodiversity.

The discrepancy in specimen sampling reveals an uneven representation of anuran diversity across the country, with high-biodiversity regions such as the Amazon and the Cerrado being significantly underrepresented. The concentration of research in more developed areas suggests that infrastructure and available resources play a role, while remote regions remain largely neglected. In other words, a significant portion of the country still lacks adequate sampling for cytogenetic studies. This imbalance may hinder our understanding of the karyotypic and evolutionary diversity of Brazilian anurans, impacting both taxonomic classification and conservation efforts. Therefore, it is crucial to expand research efforts into underrepresented regions to achieve a more comprehensive understanding of the cytogenetic diversity of anurans in Brazil.

There is a notable knowledge gap in the Pampa and Pantanal biomes, both of which have a low sampling rate for cytogenetic studies. The richness of amphibians in the Pantanal varies between 30 to 56 species (Souza et al., 2017; Neves et al., 2020; Melo et al., 2021). Even though the Pantanal is an environment with the presence of flooded areas, which constitutes an important environmental characteristic for the survival and reproduction of amphibians, it is one of the Brazilian regions with the greatest scarcity of information (Souza et al., 2017). The situation is even more critical in cytogenetics, as this biome has a low proportion of studies on anurans, making it more critical compared to others. In the same way, the Pampa also represents one of the biomes with the fewest cytogenetically studied species. This ecosystem is rich in fauna, including more than 50 species of amphibians (Garcia et al.,

2007), many of which are endemic (Pramuk et al., 2008). However, the lack of cytogenetic studies in these biomes limits the understanding of biodiversity and evolutionary chromosomal relationships, making it essential to intensify research to ensure the conservation of biodiversity. Therefore, expanding karyotypic knowledge in anurans, focusing on these urgent areas, could significantly contribute to advancing studies on the taxonomy and chromosomal evolution of Brazilian anurofauna, primarily targeting threatened and neglected biomes and isolated regions.

Temporal trend in article production

The first descriptions of anuran karyotypes in Brazil appeared around 1966 (Becak, 1968). Over the following decades, the number of publications remained relatively stable, followed by a significant increase starting in the 2000s, reflecting advancements in cytogenetic techniques and a growing interest in biodiversity studies. However, a decline in scientific output is observed after 2020, likely associated with the impact of the COVID-19 pandemic. This period posed significant challenges for the scientific community, leading to restrictions on fieldwork, budget cuts, and a reduction in the number of funded projects. While this trend reflects a global phenomenon, it was particularly pronounced in Brazil due to additional difficulties imposed by recent cuts to science and technology funding (Pena et al., 2022). Despite the setbacks, the technological advancements and the application of several “new” techniques in Brazilian studies over the past decades are remarkable.

Since the first cytogenetic studies, when Beçak (1968) described karyotypes using conventional staining, the field has evolved thanks to the improvement of chromosomal preparation techniques, such as the use of colchicine, hypotonic treatment, and banding techniques (e.g., C-banding and Ag-NOR) (Schmid et al., 1990, 2010). Through banding

techniques, such as C-banding, it becomes possible to highlight regions of constitutive heterochromatin, that is, DNA regions that remain throughout the entire cell cycle and are generally rich in repetitive sequences and poor in active genes (Sumner, 1972). In anurans, the standard characterization of these regions has proven to be a fundamental cytogenetic tool for comparative and evolutionary studies, especially regarding the presence of sex chromosomes, which is still little studied in this order (Miura, 2018).

Furthermore, according to several cytogenetic and molecular studies on the evolution of sex chromosomes, the morphological differentiation of heteromorphic chromosomes can begin with the accumulation of heterochromatin (Ray-Chaudhuri et al., 1971; Jones, 1984; Schmid and Steinlein, 2001; Schneider et al., 2021; Silva et al., 2024). Ananias et al. (2007) observed that in *Proceratophrys boiei*, females present a chromosome of pair 1 that is almost entirely heterochromatic, while in males the heterochromatin is restricted to the centromeric region. This atypical pattern led the authors to suggest a ZZ/ZW-type sex determination system, reporting the first record of ZZ/ZW sex chromosomes within Cycloramphidae. Schneider et al. (2021) also found a similar case in specimens of *Leptodactylus bufonius*, in which the presence of XY-type sex chromosomes was identified through C-banding, representing the second occurrence of these chromosomes in the genus and the fifth within the family Leptodactylidae.

Another informative chromosomal marker in studies of karyotypic diversification is the Nucleolus Organizer Regions (NORs), which are chromosomal segments responsible for the synthesis of ribosomal RNA (rRNA), highlighting the proteins involved in the transcription of this region during the cell cycle, and for the formation of the nucleolus, a structure essential for ribosome production (Schmid, 1980, 1982). In anurans, NORs are frequently studied using chromosomal banding techniques, such as silver nitrate staining (Ag-NOR), which allows the visualization of regions with active rRNA synthesis. Similar to C-

banding, several studies have reported the occurrence of heteromorphisms in these regions across different anuran genera.

In the genus *Boana*, for example, Nunes and Fagundes (2008b) described notable differences in species such as *B. semilineata*, *B. albomarginata*, and *B. faber*, including heteromorphisms in NOR size, as well as duplication of these sites on chromosome pair 2 in *B. semilineata*, representing the first record of this feature for the species. Similarly, Targueta et al. (2018b) identified divergence in NOR location in *Scinax constrictus*, observed on chromosome pair 7, differing from the pattern described for other species of the same genus, where NORs are located on pair 11 (Peixoto et al., 2016; Gruber et al., 2017). According to the authors, the NOR position found in *S. constrictus* resembles that of species from other genera more than that of species within *Scinax*, which may represent a plesiomorphic state retained by *S. constrictus*, or even a characteristic that reappeared during the evolution of the group. These examples highlight the relevance of these techniques for detecting chromosomal rearrangements, studying chromosomal evolution, and contributing to more accurate taxonomic analyses (Lourenço et al., 1998; Bruschi et al., 2019).

These advances, combined with the emergence of cytomolecular approaches such as fluorescence in situ hybridization (FISH), chromosome painting, and microdissection, have transformed cytogenetics into a complementary tool for investigating karyotypic evolution, identifying cryptic species, and understanding speciation processes through the analysis of specific genes (Koch et al., 2023; Silva et al., 2024). Studies on *Boana* and *Scinax* demonstrate that genetically differentiated populations may exhibit subtle or overlapping acoustic variations, making species delimitation based solely on bioacoustics difficult and highlighting the importance of integrating cytogenetic approaches as allies in distinguishing species (Magrini and Giaretta, 2013; Escalona et al., 2019; Teixeira et al., 2022). On the other hand, the study by Gazoni et al. (2021) on the *Leptodactylus melanonotus* group emphasized

that the combination of acoustic, molecular, cytogenetic, and phenotypic data allowed the recognition of distinct clades previously treated as a single taxon. The molecular data revealed the existence of separate clades, while the cytogenetic information corroborated these divergences by identifying chromosomal variations among populations, and the phenotypic data provided additional support for differentiation. Such examples reinforce that integrative approaches are essential for stronger foundations in taxonomic studies of anurans

In addition, recent studies have shown remarkable intra- and interspecific variations, such as in *Boana albopunctata*, which exhibits variation in diploid number ($2n = 22$) and the presence of B chromosomes (Ferro et al., 2012; Gruber et al., 2014; Venâncio et al., 2022). B chromosomes, supernumerary elements of still-debated origin, have been reported in at least 24 anuran species (Ferro et al., 2023) and may carry repetitive sequences and microsatellites, suggesting a potential role in genomic plasticity. Similar findings have been reported in other genera, such as *Dendropsophus* (Medeiros et al., 2006) and *Oreobates* (Ferro et al., 2016). The presence of these supernumerary elements warrants further investigation to clarify their origin and potential influence in anurans. According to Venâncio et al. (2022), these elements may have originated from an A-set chromosome enriched with microsatellites, such as pair 8, which carries the NOR in the species. In their studies using microdissection and chromosome painting, Ferro et al. (2023) identified sequence similarities among B chromosomes from populations separated by more than 1,000 km, suggesting a possible common evolutionary origin for these additional elements. In light of this and other studies investigating the presence of B chromosomes (Bs), D'Ambrosio et al. (2017) developed the online database B-chrom (www.bchrom.csic.es), which compiles information on the occurrence of these elements, as well as other cytogenetic data in plants, animals, and fungi, enabling data mining and comparative analyses.

In addition to the application of classical techniques, the use of cytomolecular methods, repetitive DNA probes, ribosomal gene mapping, and sex chromosome markers has proven decisive for clarifying chromosomal rearrangements, polyploidy events, and diploidization processes (Targueta et al., 2018a; Noronha et al., 2020; Souza et al., 2024). Overall, our data highlight the importance of cytogenetics as a complementary tool for understanding evolutionary processes and genomic diversity in anurans. Therefore, it is evident that cytogenetic studies must be expanded and continuously refined in order to fill significant knowledge gaps and contribute to a more integrated view of chromosomal, genetic, and taxonomic evolution in this group.

Journals and funding

The concentration of universities and research institutions in São Paulo, including some of the oldest and most prestigious in Brazil, such as the University of São Paulo (USP), founded 91 years ago, and the São Paulo State University (UNESP), with 49 years of history, along with the region's highest investment in science and technology, has attracted a significant number of studies and research projects over the years. It can be argued that this sociohistorical context has fostered the development of scientific expeditions (Guerra et al., 2020) and solidified São Paulo as one of the most important regions for cytogenetic studies in the country. Additionally, the state benefits from substantial support from the São Paulo Research Foundation (FAPESP), alongside federal agencies such as the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES). Expanding research in these unexplored areas could significantly contribute to understanding the genetic diversity and chromosomal evolution of anurans in the country.

Species threat categories

Most species currently described cytogenetically are classified as Least Concern (LC) according to the IUCN assessment (IUCN, 2025). In this context, efforts toward cytogenetic characterization should be directed toward species listed in higher extinction risk categories (e.g., NT, VU, CR) and also toward data-deficient species (DD) for which little information is available. The number of specimens collected is another factor that can influence this pattern. In other words, species classified as threatened are less likely to be included in such studies, unlike those categorized as LC, which tend to be more abundant. Nevertheless, even within this category, a large number of species still lack cytogenetic descriptions.

Conclusion

Our results are crucial for identifying gaps in knowledge regarding species groups, biomes, and geographic regions that require greater investment in cytogenetic research. The survey of cytogenetic studies on Brazilian anurans contributes to understanding the current state of knowledge for this group, highlighting the main approaches and characteristics addressed in previous research. Over the past two decades, there has been considerable progress in the cytogenetic study of anurans. Despite these advances, there remains a strong need to expand karyotypic research, given its biological and evolutionary importance.

Furthermore, it is essential to increase cytogenetic investigations in biomes and regions with limited information, such as the Cerrado, Pampa, and Pantanal. Focusing on the cytogenetics of Brazilian anurofauna is fundamental to addressing existing knowledge gaps in the coming decades. Establishing priority study areas, based on both political and ecosystem boundaries, will deepen our understanding of chromosomal evolution at intra- and interspecific levels. Such knowledge is key to resolving taxonomic uncertainties, particularly

among species initially assigned to the same genus or family but exhibiting distinct cytogenetic features. Finally, it is urgent to expand cytogenetic studies to include a greater number of species and populations of Brazilian anurans, as valuable genetic information is being lost alongside the destruction of natural habitats and the extinction of biodiversity.

Acknowledgements

This research was carried out within the context of long-term ecological research project, “Landscape composition and configuration effects on biodiversity: a multi-taxon analysis” (PELD EBMN), supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) (process n. 202110267000956) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (process n. 445982/2024-1). ARM thank CNPq for your research productivity. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

References

- Ananias F, Modesto ADS, Celi MS, Felgueiras NM. 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.
- Andrade EBD, Weber LN, Leite JRDSA. 2017. Anfíbios anuros do Parque Estadual do Mirador, um remanescente de Cerrado no estado do Maranhão, nordeste do Brasil. *Biota Neotropica*, 17, e20160260.
- Anunciação PR, Valencia-Zuleta A, Signorelli L, Martins M, Bastos RP, Bataus Y, Guidorizzi CE. 2024. Amphibian conservation status in Brazil: Spatial patterns, threats, and

challenges. *Journal for Nature Conservation*, 79, 126611.

Azevedo JAR. 2016. Endemismo, vicariância e padrões de distribuição da herpetofauna do Cerrado.

Barth A, Solé M, Costa MA. 2009. Chromosome polymorphism in *Phyllomedusa rohdei* populations (Anura: Hylidae). *Journal of Herpetology*, 43(4), 676-679.

Beçak ML. 1968. Chromosomal analysis of eighteen species of Anura. *Caryologia*, 21(3), 191-208.

Beçak ML, Beçak W, Rabello MN. 1966. Cytological evidence of constant tetraploidy in the bisexual South American frog *Odontophrynus americanus*. *Chromosoma*, 19(2), 188-193.

Beçak ML, Beçak W, Rabello, MN. 1967. Further studies on polyploid amphibians (Ceratophrydidae) I. Mitotic and meiotic aspects. *Chromosoma*, 22(2), 192-201.

Bogart JP. 1991. The influence of life history on karyotypic evolution in frogs. *Amphibian Cytogenetics and Evolution*, 233-258.

Bruschi DP, Busin CS, Toledo LF, Vasconcellos GA, Strussmann C, Weber LN, Recco-Pimentel SM. 2013. Evaluation of the taxonomic status of populations assigned to *Phyllomedusa hypochondrialis* (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae) based on molecular, chromosomal, and morphological approach. *BMC genetics*, 14(1), 70.

Bruschi DP, Rivera M, Lima AP, Zúñiga AB, Recco-Pimentel SM. 2014. Interstitial Telomeric Sequences (ITS) and major rDNA mapping reveal insights into the karyotypical evolution of Neotropical leaf frogs species (*Phyllomedusa*, Hylidae, Anura). *Molecular Cytogenetics*, 7(1), 22.

Bruschi DP, Sousa DY, Soares A, Carvalho KAD, Busin CS, Ficanha NC, Lima AP, Andrade GV, Recco-Pimentel SM. 2019. Comparative cytogenetics of nine populations of the *Rhinella* genus (Anura, Bufonidae) with a highlight on their conservative karyotype. *Genetics and Molecular Biology*, 42(2), 445-451.

Cassini CS, Taucce PP, Carvalho TR, Fouquet A, Sole M, Haddad CF, Garcia PC. 2020. One step beyond a broad molecular phylogenetic analysis: Species delimitation of *Adenomera marmorata* Steindachner, 1867 (Anura: Leptodactylidae). *PloS one*, 15(2), e0229324.

Cianciarullo AM, Bonini-Domingos CR, Vizotto LD, Kobashi LS, Beçak ML, Beçak W. 2019. Whole-genome duplication and hemoglobin differentiation traits between allopatric populations of Brazilian *Odontophrynus americanus* species complex (Amphibia, Anura). *Genetics and Molecular Biology*, 42(2), 436-444.

Coelho AC, Mattos TL, Viana P, Terencio ML, Schneider CH, Menin M, Gross MC. 2016. Intra-generic and interspecific karyotype patterns of *Leptodactylus* and *Adenomera* (Anura, Leptodactylidae) with inclusion of five species from Central Amazonia. *Genetica*, 144(1), 37-46.

- D'Ambrosio U, Alonso-Lifante MP, Barros K, Kovařík A, Xaxars GM, Garcia S. 2017. B-chrom: a database on B-chromosomes of plants, animals and fungi. *New Phytologist*, 216(3), 635-642.
- Dominato RC, Oliveira GC, Cassini CS, Orrico VGD, Mariano CDSF, Silva JG. 2022. First karyotype description of the species of *Adenomera* Steindachner, 1867 (Anura, Leptodactylidae) in the “thomei” clade. *Comparative Cytogenetics*, 16(3), 151.
- Escalona MDS, Juncá FA, Giaretta AA, Crawford AJ, Marca EL. 2019. Contrasting genetic, acoustic, and morphological differentiation in two closely related gladiator frogs (Hylidae: Boana) across a common Neotropical landscape. *Zootaxa*, 4609(3), 519-547.
- Ferro JM, Marti DA, Bidau CJ, Suárez P, Nagamachi CY, Pieczarka JC, Baldo D. 2012. B chromosomes in the tree frog *Hypsiboas albopunctatus* (Anura: Hylidae). *Herpetologica*, 68(4), 482-490.
- Ferro JM, Taffarel A, Cardozo D, Grosso J, Puig MP, Suárez P, Akmentins MS, Baldo D. 2016. Cytogenetic characterization and B chromosome diversity in direct-developing frogs of the genus *Oreobates* (Brachycephaloidea, Craugastoridae). *Comparative Cytogenetics*, 10(1), 141.
- Ferro JM, Cardozo DE, Suarez P, Boeris JM, Blasco-Zuniga A, Barbero G, Gomes A, Gazoni T, Costa W, Nagamachi CY, et al. 2018. Chromosome evolution in Cophomantini (Amphibia, Anura, Hylinae). *PLoS One*, 13(2), e0192861.
- Ferro JM, Taffarel A, Tomatis C, Borteiro C, Kolenc F, Gatto KP, Lourenço LB, Baldo D. 2022. Cytogenetics of four foam-nesting frog species of the *Physalaemus gracilis* group (Anura, Leptodactylidae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 94(1), e20200092.
- Ferro JM, Gatto KP, Netto F, Resquín JJ, Costa W, Martí DA, Lourenço LB, Baldo D. 2023. A single origin for the widely distributed B chromosomes of the gladiator frog *Boana albopunctata*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 139(1), 30-38.
- Frost DR 2025. Espécies de anfíbios do mundo: uma referência online. Versão 6.2. Banco de dados eletrônico. Museu Americano de História Natural, Nova York, EUA. Disponível em: <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/index.php>
- Garcia PC, Faivovich JN, Haddad CF. 2007. Redescription of *Hypsiboas semiguttatus*, with the description of a new species of the *Hypsiboas pulchellus* group. *Ichthyology & Herpetology*, 2007(4), 933-949.
- Garda AA, Stein MG, Machado RB, Lion MB, Juncá FA, Napoli MF. 2017. Ecology, biogeography, and conservation of amphibians of the Caatinga. In *Caatinga: The largest tropical dry forest region in South America* (pp. 133-149). Cham: Springer International Publishing.
- Gatto KP, Souza LH, Nascimento J, Suárez P, Lourenço LB. 2021. Comparative mapping of a new repetitive DNA sequence and chromosome region-specific probes unveiling rearrangements in an Amazonian frog complex. *Genome*, 64(9), 857-868.

Gazoni T, Gruber SL, Silva AP, Araújo OG, 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(1), 109.

Gazoni T, Haddad CFB, Narimatsu H, Cabral-de-Mello DC, Lyra ML, Parise-Maltempi PP. 2018. More sex chromosomes than autosomes in the Amazonian frog *Leptodactylus pentadactylus*. *Chromosoma*, 127(2), 269-278.

Gazoni T, Lyra ML, Ron SR, Strüssmann C, Baldo D, Narimatsu H, Pansonato A, Schneider RG, Giaretta AA, Haddad CFB, et al. 2021. Revisiting the systematics of the *Leptodactylus melanonotus* group (Anura: Leptodactylidae): Redescription of *L. petersii* and revalidation of its junior synonyms. *Zoologischer Anzeiger*, 290, 117-134.

Gruber SL, Haddad CFB, Kasahara S. 2012. Karyotype analysis of seven species of the tribe Lophiohylini (Hylinae, Hylidae, Anura), with conventional and molecular cytogenetic techniques. *Comparative cytogenetics*, 6(4), 409.

Gruber SL, Diniz D, Sobrinho-Scudeler PE, Foresti F, Haddad CFB, Kasahara S. 2014. Possible interspecific origin of the B chromosome of *Hypsiboas albopunctatus* (Spix, 1824)(Anura, Hylidae), revealed by microdissection, chromosome painting, and reverse hybridisation. *Comparative Cytogenetics*, 8(3), 185.

Gruber SL, Oliveira GIG, Silva APZ, Narimatsu H, Haddad CFB, Kasahara S. 2017. Comparative analysis based on replication banding reveals the mechanism responsible for the difference in the karyotype constitution of treefrogs *Ololygon* and *Scinax* (Arboranae, Hylidae, Scinaxinae). *Comparative Cytogenetics*, 11(2), 267.

Guerra V, Llusia D, Gambale PG, Morais ARD, Marquez R, Bastos RP. 2018. The advertisement calls of Brazilian anurans: Historical review, current knowledge and future directions. *PLoS One*, 13(1), e0191691.

Guerra V, Jardim L, Llusia D, Marquez R, Bastos RP. 2020. Knowledge status and trends in description of amphibian species in Brazil. *Ecological Indicators*, 118, 106754.

Haddad CF. (Ed.). 2013. *Guia dos anfíbios da Mata Atlântica: diversidade e biologia*. Anolis Books.

Higgs ND, Attrill MJ. 2015. Biases in biodiversity: wide-ranging species are discovered first in the deep sea. *Frontiers in Marine Science*, 2, 61..

IUCN SSC Amphibian Specialist Group & Instituto Boitatá de Etnobiologia e Conservação da Fauna. 2023. *Pithecopus oreades*. The IUCN Red List of Threatened Species 2023:e.T88417507A107299132.<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2023-1.RLTS.T88417507A107299132.en>. 2023b. Accessed on 16 August 2024.

IUCN SSC Amphibian Specialist Group. 2023. *Leptodactylus pentadactylus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2023: e.T57154A85888061.<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2023-1.RLTS.T57154A85888061.en>. Accessed on 11

August 2025.

Jones KW. 1984. The evolution of sex chromosomes and their consequences for the evolutionary process. In *Chromosomes Today: Volume 8 Proceedings of the Eighth International Chromosome Conference held in Lübeck, West Germany, 21–24 September 1983* (pp. 241-255). Dordrecht: Springer Netherlands.

Kasahara S, Zampieri Silva AP, Gruber SL, Haddad CFB. 2003. Comparative cytogenetic analysis on four tree frog species (Anura, Hylidae, Hylinae) from Brazil. *Cytogenetic and Genome Research*, 103(1-2), 155-162.

Kasahara S. 2009. *Introdução à pesquisa em citogenética de vertebrados*. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 160.

King M. 1990. *Animal Cytogenetics*. Amphibia, 4. Chordata 2. Berlin, John B.

Koch ED, Feldberg E, Pinangé DSDB, Viana P, Goll LG, Traldi JB. 2023. Chromosome and bands: comparative cytogenetics of the morphotypes of *Ameerega trivittata* (Anura: Dendrobatidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 138(3), 304-317.

Levan A, Fredga K, Sandberg AA. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes.

Loiola MIB, Roque ADA, OLIVEIRA AD. 2012. Caatinga: Vegetação do semiárido brasileiro. *Ecologia*, 4, 14-19.

Lourenço LB, Recco-Pimentel SM, Cardoso AJ. 1998. Polymorphism of the nucleolus organizer regions (NORs) in *Physalaemus petersi* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) detected by silver staining and fluorescence in situ hybridization. *Chromosome Research*, v. 6, p. 621-628.

Luedtke JA, et al. 2023. Ongoing declines for the world's amphibians in the face of emerging threats. *Nature*, v. 622, n. 7982, p. 308-314.

Magrini L, Giaretta AA. 2013. Caracterização acústica e padrão de evolução do canto de anúncio em pererecas neotropicais do clado *Scinax* (Hylidae): Implicações taxonômicas, sistemáticas e macro-evolutivas (Doctoral dissertation, Tesis de doctorado, Universidade de São Paulo). <https://doi.org/10.11606/T.59.2013.tde-03012014-160237>.

Medeiros LR, Rossa-Feres DC, Jim J, Recco-Pimentel SM. 2006. B-chromosomes in two Brazilian populations of *Dendropsophus nanus* (Anura, Hylidae). *Genetics and Molecular Biology*, 29, 257-262.

Medeiros NF, Fernandes GW, Rabello AM, Bahia TO, Solar RR. 2022. Can our current knowledge and practice allow ecological restoration in the Cerrado?. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 94(1), e20200665.

Melo MV, Landgref Filho P, Martins FI, Aoki C. 2021. Anfíbios e Répteis de Aquidauana, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Brazilian Journal of Development*, 7(1), 8174-8190.

- Miranda NEO, Maciel NM, Lima-Ribeiro MS, Colli GR, Haddad CFB, Collevatti RG 2019. Diversification of the widespread neotropical frog *Physalaemus cuvieri* in response to Neogene-Quaternary geological events and climate dynamics. *Molecular phylogenetics and evolution*, 132, 67-80.
- Mittermeier RA, Fonseca GA, Rylands AB, Brandon K. 2005. Uma breve história da conservação da biodiversidade no Brasil. *Megadiversidade*, 1(1), 14-21.
- Miura I. 2018. Sex determination and sex chromosomes in Amphibia. *Sexual Development*, 11(5-6), 298-306.
- Moroti MT, Pedrozo M, Severgnini MR, Augusto-Alves G, Dena S, Martins IA, Nunes I, Muscat E. 2022. A new species of *Odontophrynus* (Anura, Odontophrynidae) from the southern portion of the Mantiqueira mountains. *European journal of Taxonomy*, 847, 160-193.
- 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(11), 1127-1132.
- Nascimento J, Baldo D, Lourenço LB. 2015. First insights on the retroelement Rex1 in the cytogenetics of frogs. *Molecular cytogenetics*, 8(1), 86.
- Nascimento J, Lima JD, Suarez P, Baldo D, Andrade GV, Pierson TW, Fitzpatrick BM, Haddad CFB, Recco-Pimentel SM, Lourenco LB. 2019. Extensive cryptic diversity within the *Physalaemus cuvieri*–*Physalaemus ephippifer* species complex (Amphibia, Anura) revealed by cytogenetic, mitochondrial, and genomic markers. *Frontiers in genetics*, 10, 719.
- Neves MO, Cabral H, Pedrozo M, Ferreira VL, Moura MR, Santana DJ. 2020. Dataset of occurrences and ecological traits of amphibians from Upper Paraguay River Basin, central South America. *Nature Conservation*, 41, 71-89.
- Noronha RCR, Almeida BRR, Costa MJR, Nagamachi CY, Martins C, Pieczarka JC. 2020. Meiotic analyses show adaptations to maintenance of fertility in X1Y1X2Y2X3Y3X4Y4X5Y5 system of amazon frog *Leptodactylus pentadactylus* (Laurenti, 1768). *Scientific Reports*, 10(1), 16327.
- Nogueira L, Zanoni JB, Solé M, Affonso PRADM, Siqueira S, Sampaio I. 2015. Cytogenetic studies in six species of *Scinax* (Anura, Hylidae) clade *Scinax ruber* from northern and northeastern Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 38(2), 156-161.
- Nunes RRA, Fagundes V. 2008a. Cariótipos de oito espécies de anfíbios das subfamílias Hyalinae e Phyllomedusinae (Anura, Hylidae) do Espírito Santo, Brasil. *Bol Mus Biol Mello Leitão*, 23, 21-36.
- Nunes RRA, Fagundes V. 2008b. Patterns of ribosomal DNA distribution in hylid frogs from the *Hypsiboas faber* and *H. semilineatus* species groups. *Genetics and Molecular Biology*, 31(4), 982-987.
- Parreira MR, Soares PT, Nabout JC. 2022. Spatial Structure of National and International

Scientific Collaboration in the Brazilian Cerrado Research. *Fronteira: Journal of Social, Technological and Environmental Science*, 11(2), 83-95.

Peixoto MAA, Oliveira MP, Feio RN, Dergam JA. 2016. Karyological study of *Ololygon tripui* (Loureço, Nascimento and Pires, 2009), (Anura, Hylidae) with comments on chromosomal traits among populations. *Comparative cytogenetics*, 10(4), 505.

Pena S, Torres NR, Silva CR, Vieira TB. 2022. State of the art on the knowledge: a scientometric analysis of small non-volant mammals from Brazil (Didelphimorphia and Rodentia). *Brazilian Journal of Mammalogy*, 91, e91202277.

Pereyra M, Marti D, Lescano J, Rosset S, Baldo D. 2009. Natural interspecific hybridization in *Odontophrynus* (Anura: Cycloramphidae). *Amphibia-Reptilia*, 30(4), 571-575.

Perkins RD, Gamboa JR, Jonika MM, Lo J, Shum A, Adams RH, Blackmon H. 2019. A database of amphibian karyotypes. *Chromosome Research*, 27(4), 313-319.

Potter S, Deakin JE. 2018. Cytogenetics: an important inclusion in the conservation genetics toolbox. *Pacific Conservation Biology*, 24(3), 280-288.

Pramuk JB, Robertson T, Sites Jr JW, Noonan BP. 2008. Around the world in 10 million years: biogeography of the nearly cosmopolitan true toads (Anura: Bufonidae). *Global Ecology and Biogeography*, 17(1), 72-83.

Quinderé YRD, Lourenço LB, Andrade GV, Tomatis C, Baldo D, Recco-Pimentel SM. 2009. Polytypic and polymorphic cytogenetic variations in the widespread anuran *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae) with emphasis on nucleolar organizing regions. *Biological Research*, 42(1), 79-92.

Ray-Chaudhuri SP, Singh L, Sharma T. 1971. Evolution of sex-chromosomes and formation of W-chromatin in snakes. *Chromosoma*, 33(3), 239-251.

Ribeiro-Júnior JW, Bertoluci J. 2009. Anuros do cerrado da Estação Ecológica e da Floresta Estadual de Assis, sudeste do Brasil. *Biota Neotropica*, 9, 207-216.

Rocha PC, Sena LMFD, Pezzuti TL, Leite FSF, Svartman M, Rosset SD, Baldo D, Garcia PCDA. 2017. A new diploid species belonging to the *Odontophrynus americanus* species group (Anura: Odontophrynidae) from the Espinhaço range, Brazil.

Rosset SD, Baldo D, Lanzone C, Basso NG. 2006. Review of the geographic distribution of diploid and tetraploid populations of the *Odontophrynus americanus* species complex (Anura: Leptodactylidae). *Journal of Herpetology*, 40(4), 465-477.

Rosset SD, Baldo D, Borteiro C, Kolenc F, Cazzaniga NJ, Basso NG. 2022. Calling frogs by their name: Long-lasting misidentification of tetraploid frogs of the genus *Odontophrynus* (Anura: Odontophrynidae). *Herpetological Monographs*, 36(1), 80-98.

Ruiz IRG, Almeida TMB, Beçak W. 1984. Active nucleolar-organizer regions in polyploid populations of *Odontophrynus americanus* (Amphibia, Anura) from south Brasil. *Genetica*,

63(1), 31-37.

Ruiz IRG, Soma M, Beçak W. 1981. Nucleolar organizer regions and constitutive heterochromatin in polyploid species of the genus *Odontophrynus* (Amphibia, Anura). *Cytogenetic and Genome Research*, 29(2), 84-98.

Santana GL, Pantoja DL, Peloso P, Silva GF, Silva MS, Maschio GF. 2024. Endemic amphibians of the Cerrado and Caatinga: species richness, geographic range and conservation. *Herpetological Journal*, 34(2), 116-126.

Schneider RG, Ferro JM, Reinko IN, Boeris JM, Cardozo DE, Baldo D. 2021. Sex chromosomes in the Vizcacheras' White-lipped frog, *Leptodactylus bufonius* (Anura, Leptodactylidae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 93(2), e20190426.

Schmid M. 1980. Chromosome banding in Amphibia: IV. Differentiation of GC-and AT-rich chromosome regions in Anura. *Chromosoma*, 77(1), 83-103.

Schmid M. 1982. Chromosome banding in Amphibia: VII. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. *Chromosoma*, 87(3), 327-344.

Schmid M, Steinlein C, Nanda I, Epplen JT. 1990. Chromosome banding in Amphibia. In: OLMO, E. (Ed.) *Cytogenetics of Amphibians and Reptiles*. Basel: Birkhauser Verlag, p. 21-45.

Schmid M, Feichtinger W, Weimer R, Mais C, Bolaños F, León P. 1995. Chromosome banding in Amphibia: XXI. Inversion polymorphism and multiple nucleolus organizer regions in *Agalychnis callidryas* (Anura, Hylidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 69(1-2), 18-26.

Schmid M, Steinlein C. 2001. Sex chromosomes, sex-linked genes, and sex determination in the vertebrate class Amphibia. *Genes and mechanisms in vertebrate sex determination*, 143-176.

Schmid M, Bogart JP, Hedges SB. 2010. The chromosomes of terraranan frogs. Insights into vertebrate cytogenetics. *Cytogenetic and Genome Research*, 130(1-8), 1.

Schmid M, Steinlein C. 2016. Chromosome banding in Amphibia. XXXIV. Intrachromosomal telomeric DNA sequences in Anura. *Cytogenetic and Genome Research*, 148(2-3), 211-226.

Segalla MV, Berneck B, Canedo C, Caramaschi U, Cruz CG, Garcia PDA, Grant T, Haddad CFB, Lourenço ACC, Langone JA. 2021. List of Brazilian amphibians. *Herpetologia brasileira*, 10(1), 121-216.

Silva MJ, Destro RF, Gazoni T, Narimatsu H, Santos PSP, Haddad CFB, Parise-Maltempi PP. 2020. Great abundance of satellite DNA in *Proceratophrys* (Anura, Odontophrynidae) revealed by genome sequencing. *Cytogenetic and Genome Research*, 160(3), 141-147.

Silva DS, Silva Filho HF, Cioffi MB, Oliveira EH, Gomes AJ. 2021. Comparative cytogenetics in four *Leptodactylus* species (Amphibia, Anura, Leptodactylidae): Evidence of

inner chromosomal diversification in highly conserved karyotypes. *Cytogenetic and Genome Research*, 161(1-2), 52-62.

Silva MJD, Santos MD, Gazoni T, Cholak LR, Haddad CFB, Parise-Maltempi PP. 2021. Cytogenetic approaches provide evidence of a conserved diploid number and cytological differences between *Proceratophrys* species (Anura: Odontophrynidae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 93(4), e20201650.

Silva MJ, Gazoni T, Haddad CFB, Parise-Maltempi PP. 2023. Analysis in *Proceratophrys boiei* genome illuminates the satellite DNA content in a frog from the Brazilian Atlantic forest. *Frontiers in Genetics*, 14, 1101397.

Silva DSD, Sousa RPC, Vallinoto M, Lima MRDC, Costa RAD, Furo IDO, Gomes AJB, Oliveira EHCD. 2024. Comparative molecular and conventional cytogenetic analyses of three species of *Rhinella* (Anura; Bufonidae). *Plos one*, 19(8), e0308785.

Souza FL, Prado CP, Sugai JL, Ferreira VL, Aoki C, Landgref-Filho P, Strüssmann C, Ávila RW, Rodrigues DJ, Albuquerque NR, et al. 2017. Diversidade de anfíbios do estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Iheringia. Série Zoologia*, 107(suppl), e2017152.

Souza AL, Micalichen MAN, Rocha RA, Noletto RB. 2023. Revisiting the polyploidy in the genus *Odontophrynus* (Anura: Odontophrynidae). *Acta Herpetologica*, 18(1), 61-67.

Souza LH, Pierson TW, Tenório RO, Ferro JM, Gatto KP, Silva BC, Andrade GV, Suárez P, Haddad CFB, Lourenço LB. 2024. Multiple contact zones and karyotypic evolution in a neotropical frog species complex. *Scientific Reports*, 14(1), 1119.

Suárez P, Cardozo D, Baldo D, Pereyra MO, Faivovich J, Orrico VGD, Catroli GF, Grabiele M, Bernarde PS, Nagamachi CY, et al. 2013. Chromosome evolution in dendropsophini (amphibia, anura, hylinae). *Cytogenetic and Genome Research*, 141(4), 295-308.

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

Targueta CP, Rivera M, Lourenço LB. 2011. Karyotypic differentiation via 2n reduction and a finding of a case of triploidy in anurans of the genus *Engystomops* (Anura, Leiuperidae). *Genetica*, 139(10), 1339-1347.

Targueta CP, Vittorazzi SE, Gatto KP, Bruschi DP, Veiga-Menoncello ACP, Recco-Pimentel SM, Lourenço LB. 2018a. Anuran Cytogenetics: an overview. *An Essential Guide to Cytogenetics* (Charper 1). Nova Science Publishers, 1-64.

Targueta CP, Guerra V, Gambale PG, Bastos RP, Silva DDME, Telles MPDC. 2018b. Cytogenetics of two hylid frogs from Brazilian Cerrado. *Genetics and Molecular Biology*, 41(4), 814-819.

Teixeira AC, Marcelino VR, Alexandrino J, Haddad CFB, Giaretta AA. 2022. Populational differentiation in *Boana bischoffi* (Anura, hylidae): revisiting the issue using molecular, morphological, and acoustic data. *Journal of Herpetology*, 56(1), 110-119.

Teixido AL, Sehn H, Quintanilla LG, Gonçalves SR, Fernández-Arellano GJ, Dáttilo W, Izzo TJ, Layme VM, Moreira LFB. 2021. A meta-analysis of the effects of fragmentation on the megadiverse herpetofauna of Brazil. *Biotropica*, 53(3), 726-737.

Troudet J, Grandcolas P, Blin A, Vignes-Lebbe R, Legendre F. 2017. Taxonomic bias in biodiversity data and societal preferences. *Scientific reports*, 7(1), 9132.

Urdampilleta JD, Coulleri JP, Ferrucci MS, Forni-Martins ER. 2013. Karyotype evolution and phylogenetic analyses in the genus *C. ardiopersum* L.(P. aullinieae, S. apindaceae). *Plant Biology*, 15(5), 868-881.

Valdujo PH, Silvano DL, Colli G, Martins M. 2012. Anuran species composition and distribution patterns in Brazilian Cerrado, a Neotropical hotspot. *South American Journal of Herpetology*, 7(2), 63-78.

Veiga-Menoncello AC, Lourenco LB, Struessmann C, Rossa-Feres DC, Andrade GV, Giaretta AA, Recco-Pimentel SM. 2014. A phylogenetic analysis of *Pseudopaludicola* (Anura) providing evidence of progressive chromosome reduction. *Zoologica Scripta*, 43(3), 261-272.

Venâncio S, Noleto RB, Azambuja M, Gazolla CB, Santos BR, Nogaroto V, Vicari MR. 2022. Comparative cytogenetics among *Boana* species (Anura, Hylidae): focus on evolutionary variability of repetitive DNA. *Genetics and Molecular Biology*, 45, e20220203.

Wauchope HS, Amano T, Geldmann J, Johnston A, Simmons BI, Sutherland WJ, Jones JP. 2021. Evaluating impact using time-series data. *Trends in Ecology & Evolution*, 36(3), 196-205.

Wickham H. 2016. Programming with ggplot2. In *Ggplot2: elegant graphics for data analysis* (pp. 241-253). Cham: Springer International Publishing.

Figures captions

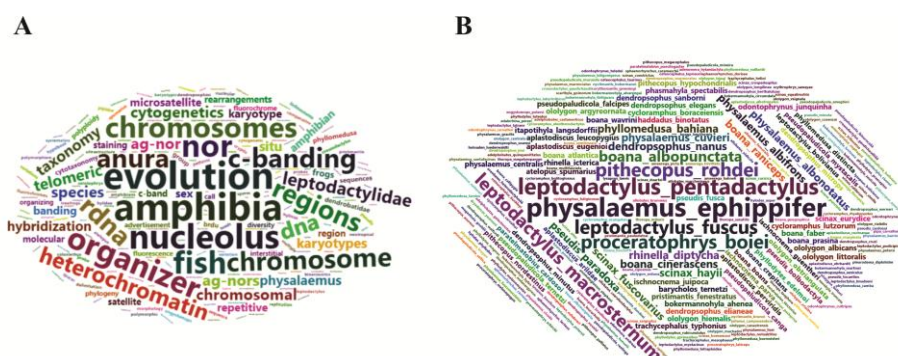


Figure 1. Most frequently used keywords (A) and Brazilian anuran species with described karyotypes (B) in cytogenetic studies conducted in Brazil from 1966 to 2024.

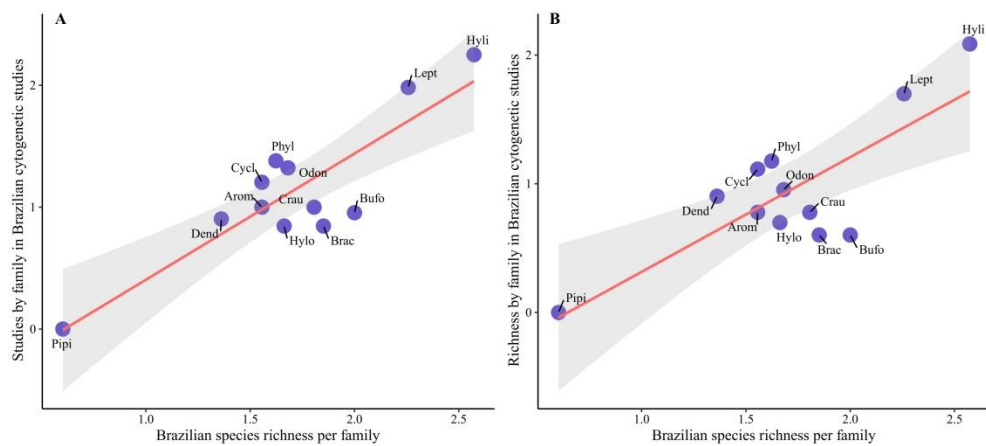


Figure 2. Number of cytogetic studies (A) and number of anuran species studied (B) between 1966 and 2024 in relation to species richness by family known for Brazil.

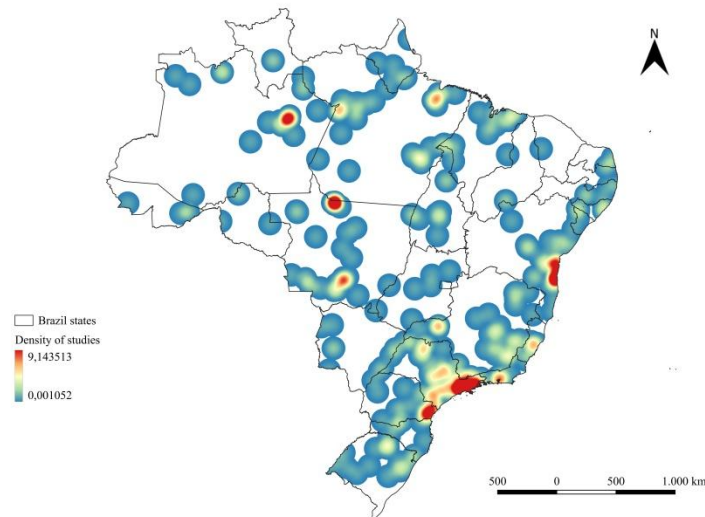


Figure 3. Heatmap of the distribution of cytogetic studies on anurans in Brazil from 1966 to 2024. Warmer colors (red) indicate localities or regions with a higher density of cytogetic studies, while cooler colors (blue) indicate areas with lower density. Unshaded areas indicate the absence of species sampled for cytogetic studies.

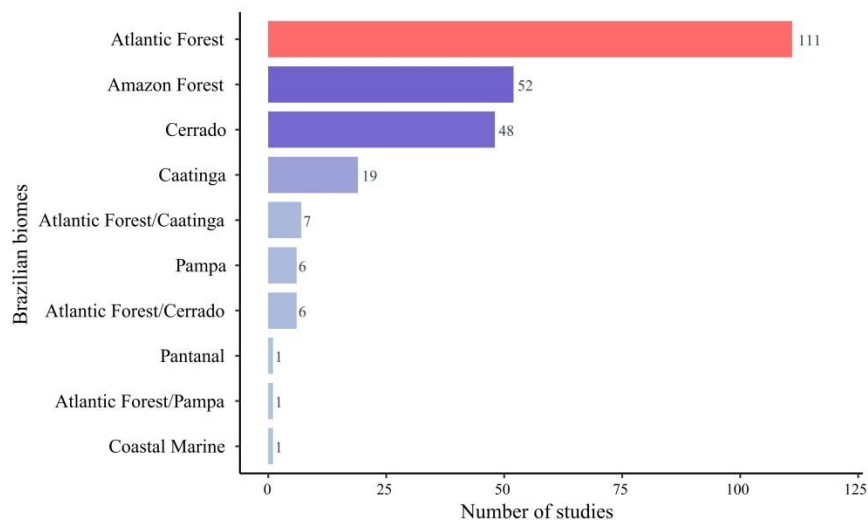


Figure 4. Number of cytogenetic studies conducted on anurans in the different Brazilian biomes between 1966 and 2024.

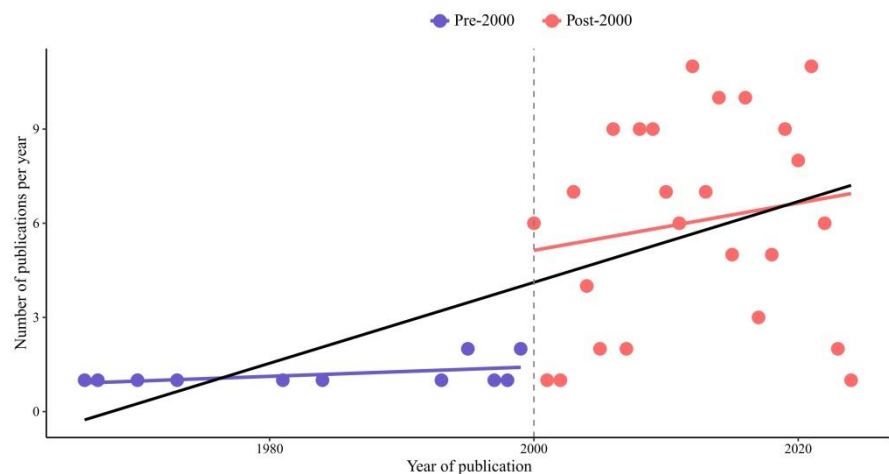


Figure 5. Variation in the number of publications on anuran cytogenetics between 1960 and 2024. The dark central trend line indicates the overall trend in the data, while the blue line represents the trend before 2000 and the red line represents the trend after 2000.

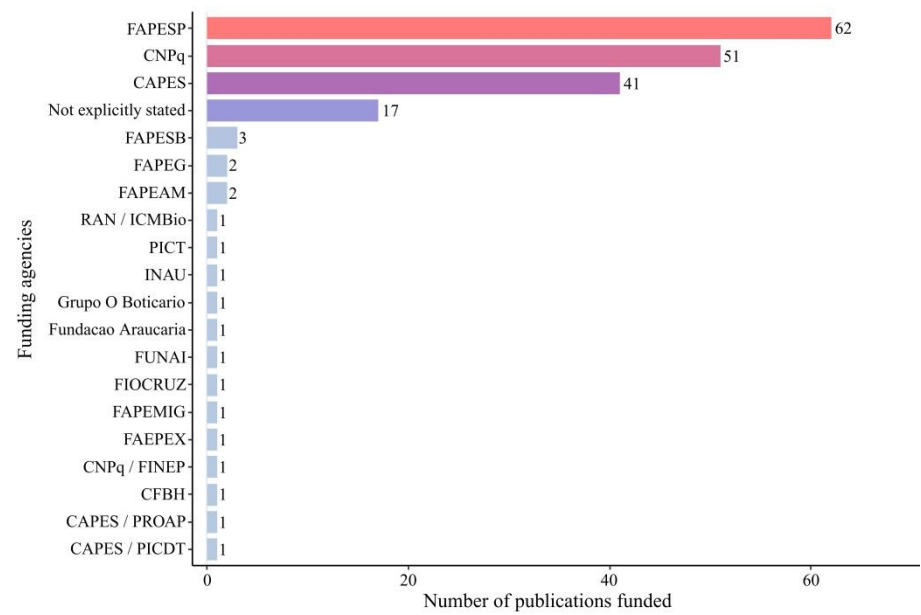


Figure 6. Main funding sources for cytogenetic studies of anurans in Brazil from 1966 to 2024.

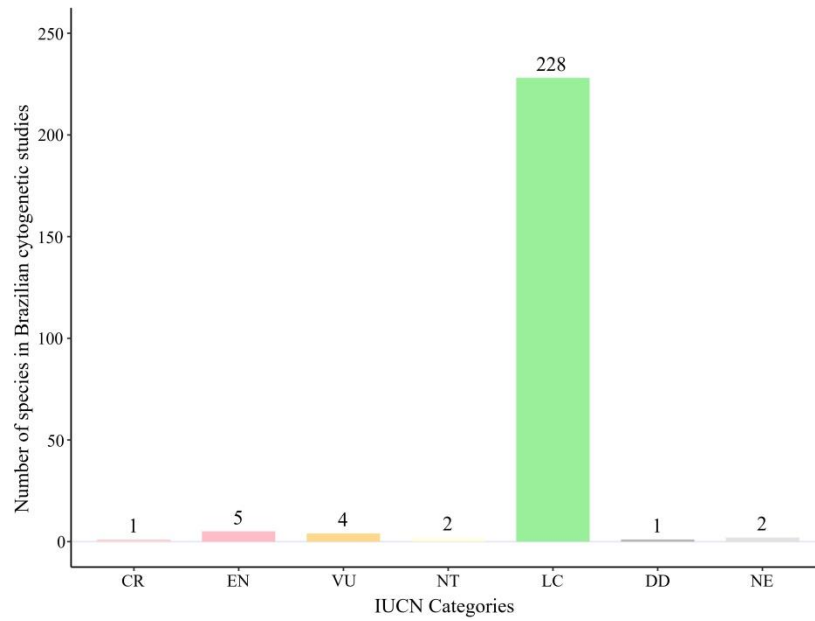


Figure 7. Number of Brazilian anuran species in each IUCN threat category with published cytogenetic descriptions from 1966 to 2024. Categories: DD = data deficient; EN = Endangered; LC = Least Concern; NE = Not Evaluated; NT = Near Threatened; CR = Critically Endangered; VU = Vulnerable.

CAPÍTULO II

ANÁLISE CITOGENÉTICA COMPARATIVA DE CINCO ESPÉCIES DO GÊNERO BOANA (ANURA: HYLIDAE) E DUAS ESPÉCIES DO GÊNERO RHINELLA (ANURA: BUFONIDAE)

Discente: Ana Caroline Cândida da Silva
Orientadora: Dr^a. Maria Andréia C. Mendonça
Coorientador: Dr. Tainã Lucas Andreani

Rio Verde- GO
Março- 2025

ANÁLISE CITOGENÉTICA COMPARATIVA DE CINCO ESPÉCIES DO GÊNERO *BOANA* (ANURA: HYLIDAE) E DUAS ESPÉCIES DO GÊNERO *RHINELLA* (ANURA: BUFONIDAE)

RESUMO

Os gêneros *Boana* (Hylidae) e *Rhinella* (Bufonidae) destacam-se pela alta diversidade entre os anfíbios anuros neotropicais. Esses animais são popularmente conhecidos como “pererecas” e “sapos”, respectivamente, e apresentam alta similaridade morfológica, o que é alvo de desafios na correta identificação e classificação taxonômica. Diferentes ferramentas citogenéticas, como dados cromossômicos e técnicas de bandamentos (i.e., Bandeamento C, Ag- NOR, técnicas citomoleculares) têm sido utilizadas como complemento para auxiliar na identificação taxonômica desses animais. Porém, mesmo com o avanço das técnicas citogenéticas, como a adição de dados moleculares, para conhecimento de sequências específicas, ainda persistem lacunas significativas desse conhecimento para espécies que integram os dois gêneros. O objetivo deste estudo é a descrição do cariótipo de sete espécies: cinco de *Boana* (*B. albopunctata*, *B. crepitans*, *B. multifasciata*, *B. paranaíba*, *B. raniceps*) e duas de *Rhinella* (*R. diptycha* e *R. mirandaribeiroi*), coletadas em diferentes localidades do Brasil. Pela primeira vez, são descritos os cariótipos de *Boana paranaíba* e *Rhinella mirandaribeiroi*, ambos apresentando $2n = 2x = 22$ e $NF = 44$, juntamente com as demais espécies analisadas, com exceção de *B. crepitans* e *B. raniceps*, que apresentaram o número cromossômico de $2n = 2x = 24$ e $NF = 48$. Foram utilizadas técnicas citogenéticas clássicas, incluindo coloração convencional com Giemsa, que permitiram identificar o número diploide, morfologia cromossômica e a presença de elementos supranumerários. Neste estudo, identificou-se a presença de cromossomos B em *Boana albopunctata*, representando a primeira evidência desses elementos no bioma Cerrado. Essa descoberta amplia o conhecimento sobre a distribuição e a dinâmica evolutiva desses cromossomos na espécie. As análises reforçam o conservadorismo cariotípico em *Rhinella*, enquanto em *Boana*, padrões de variação estrutural e elementos supranumerários destacam a complexidade evolutiva do grupo. Os resultados contribuem para a compreensão da evolução cromossômica nas espécies estudadas, além de evidenciar a importância de estudos citogenéticos como complemento para o esclarecimento de incertezas taxonômicas e sistemáticas. A continuidade de pesquisas no Cerrado e em outros biomas é essencial para preencher lacunas de conhecimento e subsidiar estratégias de conservação para esses anfíbios, especialmente frente às crescentes ameaças a seus habitats.

Palavras-chave: Anura; cariótipos; Brasil; cerrado.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Taxonomia e o habitat

No mundo são encontradas 7.823 espécies de anfíbios anuros, o Brasil por sua vez, possui a maior riqueza, com quase 1.193 espécies descritas, distribuídas em 107 gêneros, compreendendo espécies únicas e endêmicas (Segalla *et al.*, 2016; Frost, 2025). Esses animais desempenham papel ecológico importante no controle populacional de insetos, além de atuarem como bioindicadores dos ecossistemas aquáticos e terrestres (Gonçalves *et al.*, 2014).

Dentre as numerosas famílias encontradas na ordem anura, destaca-se a família Hylidae, sendo uma das mais representativas, com aproximadamente 1.062 espécies reconhecidas (Frost, 2025). No Brasil, ocorrem 433 espécies catalogadas em 27 gêneros e amplamente distribuídas nos biomas brasileiros (Segalla *et al.*, 2021; SBH, 2025). Uma das principais características que permite diferenciar os hílídeos, na maioria das espécies, é a presença de discos adesivos arredondados nas pontas dos dedos (Lima *et al.*, 2006). Seus membros são agrupados nas subfamílias Phyllomedusinae, Pelodyadinae e Hylinae, sendo esta última a maior delas, com 754 espécies (Faivovich *et al.*, 2005; Frost, 2025; SBH, 2025).

Outra família relativamente numerosa é a Bufonidae com 658 espécies descritas (Frost, 2025). Dessas, 96 espécies ocorrem em território brasileiro distribuídas em nove gêneros (i.e., *Adhaerobufo*, *Amazophrynella*, *Atelopus*, *Dendrophryniscus*, *Frostius*, *Melanophryniscus*, *Oreophrynella*, *Rhaebo* e *Rhinella*) (SBH, 2025). Os membros dessa família são conhecidos popularmente como “sapos”, preferem estar em terra firme, buscando ambientes com água apenas para reprodução, possuem tegumento rugoso e glândulas parótidas que produzem toxina (Lima *et al.*, 2019).

Entre os diversos gêneros que compõem essas duas famílias, *Boana* (Gray, 1825; Hylidae) e *Rhinella* (Fitzinger, 1826; Bufonidae) destacam-se com a maior riqueza de espécies (Frost, 2025). O gênero neotropical *Boana*, reúne atualmente 99 espécies, reorganizadas em sete grupos de espécies taxonômicas: *B. albopunctata*, *B. benitezi*, *B. faber*, *B. pellucens*, *B. pulchella*, *B. punctata* e *B. semilineata*, conforme dados genéticos, morfológicos, comportamentais e ecológicos (Faivovich *et al.*, 2005, 2021; Viena *et al.*, 2005, 2010; Pyron e Wiens, 2011; Pyron, 2014; Frost, 2025). Já o gênero *Rhinella* é composto por 97 espécies válidas com alta similaridade morfológica, a

maioria estão organizadas em grupos de espécies (e. g., *Rhinella crucifer*, *R. festae*, *R. granulosa*, *R. margaritifera*, *R. marina*, *R. Spinulosa* e *R. veraguensis*), sendo *R. margaritifera*, *R. granulosa* e *R. marina*, os três complexos mais representativos no Brasil (Chaparro *et al.*, 2007; Moravec *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2024).

1.2 Citogenética de anfíbios anuros

Os primeiros dados sobre os cromossomos da anurofauna brasileira foram obtidos por meio de coloração convencional (Becak, 1968). A partir da década de 1960, esta linha de pesquisa avançou significativamente graças ao desenvolvimento de metodologias e técnicas de preparação utilizando colchicina e tratamento hipotônico, além disso, houve progresso nos procedimentos de análises e identificação de cromossomos (Schmid *et al.*, 1990). Apesar deste potencial e da notável diversidade de espécies de anuros, com aproximadamente 7.825 espécies descritas no mundo (Frost, 2025), relativamente poucos estudos cariotípicos foram realizados (i.e., 1.833 espécies com registros citogenéticos, Perkins *et al.*, 2019), evidenciando a necessidade de pesquisas citogenéticas a fim de compreender melhor a evolução cromossômica e, conseqüentemente, ampliar o conhecimento genético dessa ordem. As informações cromossômicas contribuem na abordagem integrativa, em conjunto com dados bioacústicos, morfológicos e moleculares, para hipóteses taxonômicas mais bem fundamentadas, através da identificação de sinapomorfias (i.e., característica compartilhada entre organismos decorrente a partir de um ancestral comum) (Targueta *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2023) e homoplasias (i.e., desenvolvimento de características semelhantes em espécies diferentes, mas que não compartilham um ancestral comum) (Cardoso *et al.*, 2011), como um passo básico para o estabelecimento de estratégias de conservação. Somado a isso, por meio de abordagens citogenéticas torna-se possível compreender a evolução cromossômica ao longo do tempo, pois fornece informações importantes, através de análises convencionais (e.g., coloração de Giemsa, Ag- NOR, bandeamento C) e citomoleculares (e.g., hibridização fluorescente *in situ*- FISH e DAPI). Somado a isso, é possível verificar o número cromossômico, ou seja, quantidade de cromossomos (2n), número fundamental (FN), equivalente ao total de braços cromossômicos e identificação morfológica dos cromossomos com possível classificação (i.e., metacêntrico, submetacêntrico, subtelocêntrico, telocêntrico, acrocêntrico), contribuindo para a compreensão do papel dos rearranjos cromossômicos

na diversificação de uma linhagem (Kasahara *et al.*, 2003; Kasahara, 2009; Gruber *et al.*, 2012; Suárez *et al.*, 2013; Veiga-Menoncello *et al.*, 2014; Ferro *et al.*, 2018; Levan *et al.*, 1964). Sendo assim, a identificação de distinções no número cromossômico e de diferenças longitudinais por meio das técnicas de bandeamentos realizadas em estudos citogenéticos têm fornecido importantes *insights* para revisões taxonômicas e inferências filogenéticas em espécies de anuros (Lourenço *et al.*, 2008; Urdampilleta *et al.*, 2013; Cassini *et al.*, 2020; Dominato *et al.*, 2022).

Nesse contexto, diante da importância ecológica e grande diversidade dos anfíbios anuros, bem como o padrão de uniformidade morfológica observada nesses animais (Gazoni, 2011), a citogenética estabelece como uma abordagem complementar essencial e verificatória, auxiliando na elucidação do cenário evolutivo e na resolução de incertezas taxonômicas e sistemáticas (Funk *et al.*, 2012; Veiga-Menoncello *et al.*, 2014; Ferro *et al.*, 2022).

1.3 Citogenética clássica de *Boana* (Hylidae) e *Rhinella* (Bufonidae)

Quando comparados os dados citogenéticos disponíveis para Hylidae e Bufonidae, a família Hylidae destaca-se como uma das mais amplamente estudadas entre os anuros, com cerca de 340 espécies cariotipadas (Catroli e Kasahara, 2009; Paiva *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2016; Ferro *et al.*, 2018). As análises citogenéticas disponíveis até o momento para o gênero *Boana* apresentam variação no número cromossômico entre $2n = 2x = 22$ a $2n = 2x = 24$, baixa variabilidade com relação ao número fundamental (FN), além de achados de elementos supranuméricos como o cromossomo B, cuja origem e funcionalidade em anuros permanecem pouco compreendidas, tornando-se necessário maiores investigações para mitigar lacunas a respeito desse elemento extra (Ferro *et al.*, 2023), fortalecendo o pressuposto de que a organização cariotípica das espécies não pode ser considerada conservada (Mattos *et al.*, 2014; Venancio *et al.*, 2022). Espécies desse gênero demonstraram variação intrapopulacional com polimorfismos das regiões organizadoras de nucléolos (NORs), bem como na distribuição da heterocromatina constitutiva (Bandas C) (Mattos, *et al.*, 2014).

Em contrapartida, estudos citogenéticos sobre o gênero *Rhinella* ainda são escassos, concentrando-se principalmente em técnicas de coloração convencional, bandeamento cromossômico e análises moleculares limitadas (Silva *et al.*, 2024). Os

dados disponíveis para as espécies do gênero revelaram número cromossômico conservado de $2n = 2x = 22$ e 44 (FN), bem como uniformidade morfológica dos cromossomos (Bruschi *et al.*, 2019).

Apesar da alta incidência de espécies descritas, persistem lacunas significativas no conhecimento cariotípico das espécies pertencentes aos gêneros *Boana* e *Rhinella* (Venancio *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2024). Em adição, as ações antrópicas e as mudanças climáticas, que constantemente vêm influenciando no declínio populacional e em processos de extinção desses organismos, podem impactar diretamente a obtenção de informações citogenéticas destes grupos (Luedtke *et al.*, 2023; Anunciação *et al.*, 2024).

Dada essas considerações, este estudo teve como objetivo ampliar o conhecimento citogenético dos gêneros *Boana* e *Rhinella*, com marcadores citogenéticos clássicos (número diploide e morfologia cromossômica), com foco na caracterização e comparação dos cariótipos de diferentes espécies. Foi analisado o cariótipo de cinco espécies do gênero *Boana* e duas do gênero *Rhinella*. Fornecendo aqui, pela primeira vez, dados cromossômicos de *Boana paranaíba* e *Rhinella mirandaribeiroi*, contribuindo para o avanço do conhecimento citogenético e compreensão da evolução cromossômica nos grupos estudados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Abordagem cienciométrica

Foi realizada uma busca por artigos publicados em periódicos indexados em repositórios científicos, que compreendem as plataformas Web of Science, Scopus e Scielo, na base de dados Periódicos Capes (<https://www-periodicos-capes-gov-br.ez369.periodicos.capes.gov.br/index.php?>). As palavras-chave utilizadas para o gênero *Boana* foram: “Karyotype”, “*Boana* or *Hypsiboas*”; “Cytogenetics”, “*Boana* or *Hypsiboas*”; “Chromosome”, “*Boana* or *Hypsiboas*”, e para o gênero *Rhinella*: “Karyotype”, “*Rhinella* or “*Bufo*” or “*Chaunus*”; “Cytogenetics”, “*Rhinella* or “*Bufo*” or “*Chaunus*”; Chromosome, “*Rhinella* or “*Bufo*” or “*Chaunus*” Essas combinações foram empregadas a fim de se obter o maior número de artigos possíveis na área. Como filtro, limitou-se a busca a América do Sul, que por sua vez, abriga a maior diversidade de anfíbios anuros do mundo. Em cada publicação selecionada foram extraídas as seguintes informações: Grupo de espécies, espécie, localidade de coleta, número cromossômico (2n), par cromossômico portador de regiões organizadoras nucleolares (Ag-NOR) e referências com ano de publicação. Os dados foram dispostos em tabela a fim de analisar e comparar as espécies estudadas.

2.2 Coleta e amostragem das espécies

Foram coletados indivíduos pertencentes a cinco espécies do gênero *Boana*: *B. albopunctata*, *B. crepitans*, *B. multifasciata*, *B. paranaiba*, *B. raniceps* e duas espécies do gênero *Rhinella*: *R. diptycha* e *R. mirandaribeiroi* (Fig. 1; Tabela 1). As espécies foram selecionadas tendo em vista a riqueza e abundância, a fim de validar os dados cariotípicos já dispostos, bem como fornecer novos dados cromossômicos.

As espécies foram coletadas na porção central e norte do Brasil (Fig. 2 e Fig. 3). Utilizou-se o método de amostragem envolvendo buscas visuais e acústicas (Heyer *et al.*, 1994) para encontrar os indivíduos. Após serem encontrados, os indivíduos foram capturados com as mãos, identificados conforme morfologia e vocalização e colocados

cuidadosamente em sacos plásticos umedecidos. Posteriormente, foram transportados ao laboratório de Bioquímica e Genética (Labiogen), Rio Verde- GO, Brasil, para dissecação e extração das amostras biológicas. Os espécimes individuais foram eutanasiados com lidocaína a 5% e, posteriormente, retirado o fêmur para análise citogenética.

Por conseguinte, cada espécime foi fixado com formaldeído a 10%, preservado em álcool a 70% e depositados na Coleção de Anfíbios Alípio de Miranda-Ribeiro (CVAMR), no Laboratório de Ecologia, Evolução e Sistemática de Vertebrados do Instituto Federal Goiano- Campus Rio Verde- GO, Brasil. As datas de amostragem, captura e coleta de espécies foram autorizadas sob licença concedida pelo SISBIO sob licença nº 86813-2, e os experimentos foram autorizados pelo Comitê de Ética ao Uso de Animais do IF Goiano (nº 8431140823).

Tabela 1. Relação de espécies de anuros dos gêneros *Boana* e *Rhinella* analisadas citogeneticamente no presente estudo, com as respectivas coordenadas geográficas e número de voucher.

Espécie	Município de Coleta	Coordenadas	Nº de Voucher
<i>Boana albopunctata</i>	Rio Verde- GO, Brasil	17°44' 41.69" S, 51°0'1.64" W	RV 2380
<i>Boana albopunctata B</i>	Rio Verde- GO, Brasil	17°44' 35.00" S, 51°0'5.18" W	RV 2387
<i>Boana crepitans</i>	Flores de Goiás- GO, Brasil	14°27' 54.93" S, 47°14'59.29" W	RV 2499
<i>Boana multifasciata</i>	Moju- PA, Brasil	1°51' 48.96" S, 48°42'40.19" W	RV 2446
<i>Boana paranaíba</i>	Rio Verde- GO, Brasil	17°49' 22.01" S, 50°54'9.86" W	RV 2411
<i>Boana raniceps</i>	Maurilândia- GO, Brasil	17°57'43.0"S 50°21'25.0"W	RV 2454
<i>Rhinella diptycha</i>	Rio Verde- GO, Brasil	17°55' 22.12" S, 51°2'46.10" W	RV 2358
<i>Rhinella mirandaribeiroi</i>	Flores de Goiás- GO, Brasil	14°28' 3.41" S, 47°15'22.54" W	RV 2497

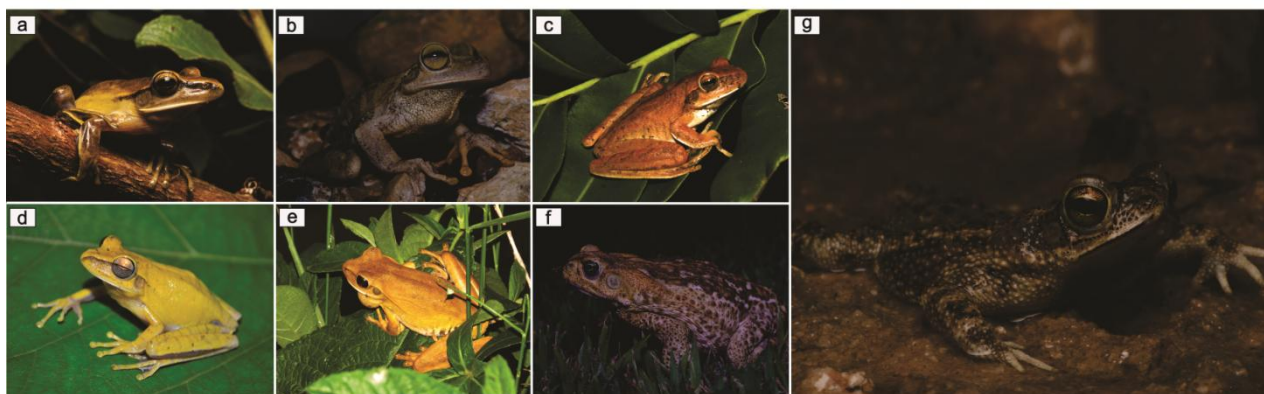


Figura 1. Fotografias de indivíduos das espécies de *Boana* (Anura, Hylidae) e *Rhinella* (Anura, Bufonidae) analisadas neste estudo: A- *B. albopunctata*; B- *B. crepitans*; C- *B. multifasciata*; D- *B. paranaíba*; E- *B. raniceps*; F- *R. diptycha*; G- *R. mirandaribeiroi*. Fotos: Teko Ambiental e Werther Ramalho.

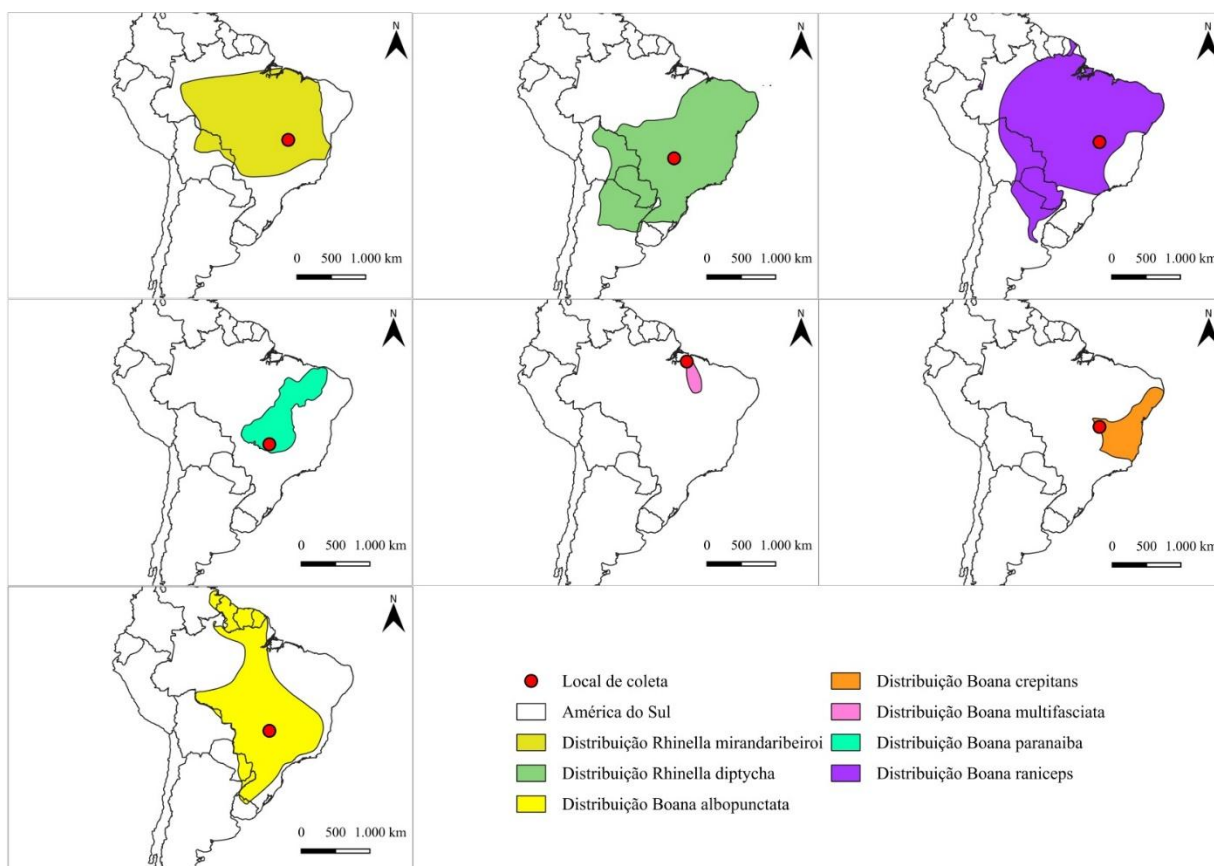


Figura 2. Locais de amostragem das espécies do gênero *Boana* (*B. albopunctata*, *B. crepitans*, *B. multifasciata*, *B. paranaíba*, *B. raniceps*) e *Rhinella* (*R. diptycha*, *R. mirandaribeiroi*) analisadas neste estudo, com indicação da distribuição geográfica baseada nos dados da International Union for Conservation of Nature (IUCN).

2.3 Procedimentos para a obtenção dos cromossomos metafásicos

Os cromossomos mitóticos foram obtidos por meio da adaptação dos protocolos descritos por Gold *et al.* (1990) e Baker *et al.* (2003). Esses protocolos incluem a adição de colchicina diretamente sobre os tecidos dos órgãos-alvo. Após a confirmação da morte do animal, foi realizada uma incisão ventral para a remoção do fêmur. Em seguida, a musculatura aderida ao osso foi retirada, as epífises do fêmur foram cortadas e o canal do fêmur foi imediatamente lavado com 10 mL de solução hipotônica de KCl (0,075 M) para evitar a coagulação da medula. Com o auxílio de uma pinça serrilhada para fixar o fêmur e de uma seringa, a solução hipotônica foi injetada no canal do fêmur até que toda a medula fosse extraída e coletada em uma placa de Petri. Esse procedimento foi repetido, utilizando o líquido já presente na placa, até que o osso estivesse completamente limpo. Após esses passos, o fêmur foi descartado.

Posteriormente, 400 µL (a cerca de 10 gotas) de solução de colchicina a 0,1% foram adicionados à medula para interromper a divisão celular na metáfase. A suspensão celular foi mantida em estufa a 37°C por 30 a 40 minutos. Em seguida, a solução foi transferida para um tubo Falcon de 15 mL ou um tubo de ensaio de 10 mL, e foram adicionados 400 µL (10 gotas) de fixador Carnoy (metanol: ácido acético – 3:1) previamente resfriado. O conteúdo foi homogeneizado invertendo-se delicadamente o tubo e, posteriormente, centrifugado a 900 rpm por 10 minutos.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e 10 mL de fixador Carnoy gelado (4°C) foram adicionados. Este procedimento de fixação foi repetido três vezes, com trocas sucessivas do fixador. Após a última troca, 1 a 2 mL de fixador Carnoy foram adicionados, e a amostra foi armazenada no freezer (-10°C) até o momento da preparação das lâminas. Para a confecção das lâminas, 2 a 3 gotas da amostra de medula óssea foram gotejadas sobre a lâmina limpa, a altura de 30 a 40 cm. Posteriormente, a lâmina foi agitada suavemente para espalhar o material e, em seguida, seca ao ar em uma placa aquecedora ajustada para 50°C. Foram selecionadas pelo menos 20 metáfases de cada espécime para fotografia e posterior montagem dos kariogramas. As imagens das metáfases selecionadas foram capturadas com um fotomicroscópio trinocular (Olympus BX61), equipado com uma câmera DP72 para captura de imagens e, posteriormente salvas. Na montagem dos kariogramas, os cromossomos foram emparelhados em ordem decrescente de tamanho e classificados de acordo com a

morfologia: metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e telocêntricos (t), seguindo os critérios de Green e Session (1991). O tamanho médio dos pares cromossômicos foi calculado, adotando os seguintes limites para a razão de braços (CR): m= 1.00-1.67, sm= 1.68-3.00, st= 3.01-7.00, t= 7.01- ∞ . Q corresponde ao comprimento do braço longo e p ao braço curto, já o índice centromérico (CI), reflete a posição do centrômero, dado o tamanho relativo do braço curto em relação ao tamanho total do cromossomo. Os cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocêntricos têm dois braços, os telocêntricos um único. Para essa classificação, utilizou-se um software de edição de imagens.

3 RESULTADOS

3.1 Abordagem cienciométrica

A abordagem cienciométrica permitiu analisar e comparar os dados citogenéticos disponíveis para os dois gêneros abordados no presente estudo (*Boana* e *Rhinella*) (Tabela 2). As espécies que integram o gênero *Boana* apresentam variações cromossômicas com $2n= 2x= 22$ a 24 cromossomos, presença de indivíduo triploide com $2n= 3x= 36$, bem como ocorrência de elementos supranuméricos (Cromossomo B) em algumas espécies. Além disso, outras diferenças são observadas na localização das regiões organizadoras nucleolares (Ag-NOR) e NF. Já o gênero *Rhinella*, apresenta alto padrão de conservação para essas características, apresentando o número cromossômico estável de $2n= 2x= 22$, NF= 44 e Ag-NOR, na maioria, localizado no par cromossômico 7.

Tabela 2. Planilha com os dados extraídos da análise dos estudos selecionados a partir da busca em bases de dados sobre citogenética de anfíbios anuros do gênero *Boana*: grupos de espécies, espécies, localidade, número diploide (2n), número fundamental (FN), localização das NORs (par cromossômico) e referências bibliográficas. Abreviações: “p” – braço cromossômico curto; “q” – braço cromossômico longo; “n.e” – não especificado

Grupo de espécies	Espécie	Localidade	2n	NF	NOR	Referências
<i>Boana albopunctata</i>	<i>Boana albopunctata</i>	União da Vitória, Paraná, Brasil	22+1B	44	8p	VENANCIO, S. <i>et al.</i> (2022)
	<i>Boana albopunctata</i>	Puerto Andresito (Argentina), Ka'I Rague (Paraguai), Rio Claro (SP)	22 e 22 + 1-3 Bs	44	8q	FERRO <i>et al.</i> (2023)
	<i>Boana albopunctata</i>	Santo Domingo, Posadas, Itacarua, Corpus, Iguaçu, Península Andresito, Puerto Andresito, Arroio Lobo, Argentina	22 e 22 + 1-3 Bs	n.e.	8	FERRO <i>et al.</i> (2012)
	<i>Boana albopunctata</i>	Rio Claro, São Paulo, Brasil	22+B	n.e.	n.e.	GRUBER <i>et al.</i> (2014)
	<i>Boana albopunctata</i>	Rio Claro, São Paulo, Brasil	22 e 23	n.e.	8	GRUBER <i>et al.</i> (2007)
	<i>Boana albopunctata</i>	Rio Verde, Goiás, Brasil	22 e 22 +1B	44	n.e.	Presente estudo
	<i>Boana albopunctata</i>	Pirenópolis, Goiás, Brasil	22	44	8p	OLIVEIRA <i>et al.</i> (2012)
	<i>Boana almendarizae</i>	Equador. Carchi, Morán	24	n.e.	12p	FERRO <i>et al.</i> (2018)
	<i>Boana calcarata</i>	Quador. Pastaza, Centro Etnoturístico Indichuris	24	n.e.	n.e.	FERRO <i>et al.</i> (2018)
	<i>Boana heilprini</i>	Pet trade	24	n.e.	n.e.	FERRO <i>et al.</i> (2018)
	<i>Boana leucocheila</i>	Brasil. Pará, Juriti, Acampamento Barroso; Mutúm	22+1B	n.e.	8p	FERRO <i>et al.</i> (2018)
	<i>Boana multifasciata</i>	Irاندوبا- MA	24	48	11	MATTOS <i>et al.</i> (2014)

Grupo de espécies	Espécie	Localidade	2n	NF	NOR	Referências
	<i>Boana multifasciata</i>	Brasil. Pará, Igarapé-Miri, Vila Maiauata; Curuçá, Ilha Pedras Grandes	22	n.e.	8p	FERRO <i>et al.</i> (2018)
	<i>Boana multifasciata</i>	Serranópolis, Goiás, Brasil	24	48	8p	OLIVEIRA <i>et al.</i> (2012)
	<i>Boana multifasciata</i>	Moju, Pará, Brasil	22	44	n.e.	Presente estudo
	<i>Boana paranaíba</i>	Rio Verde, Goiás, Brasil	22	44	n.e.	Presente estudo
	<i>Boana.cf. alfaroi</i>	Brasil. Pará, Dique, Carajas	22	n.e.	8p	FERRO <i>et al.</i> (2018)
	<i>Boana lanciformis</i>	Manaus, Amazonas, Brasil	22	44	1, 11	MATTOS <i>et al.</i> (2014)
	<i>Boana.cf. lanciformis</i>	Brasil. Amazonas, São Gabriel da Cachoeira	24	n.e.	11q	FERRO <i>et al.</i> (2018)
	<i>Boana raniceps</i>	Rio Verde, Goiás, Brasil	24	48	n.e.	Presente estudo
	<i>Boana raniceps</i>	Iranduba- MA	24	48	11	MATTOS <i>et al.</i> (2014)
	<i>Boana raniceps</i>	Ilha do Bananal, GO, Santa Rita do Trivelato, Mato Grosso, Brasil	24	n.e.	n.e.	GRUBER <i>et al.</i> (2014)
	<i>Boana raniceps</i>	Brasilândia- MS	24	n.e.	11	GRUBER <i>et al.</i> (2007)
	<i>Boana raniceps</i>	Rio Verde, Goiás, Brasil	24	48	10q	OLIVEIRA <i>et al.</i> (2012)
	<i>Boana raniceps</i>	Argentina. Misiones, Capital, Posadas. Chaco, San Fernando; General Guemes, naer Mision Nueva Pompeya. Salta, Orán, near Pichanal. Corrientes: San Miguel, Estero Carambola; Brasil: Piauí, PNSC- PI; Nazaré-PA,Soure	24	n.e.	11q	FERRO <i>et al.</i> (2018)
<i>Boana pulchella</i>	<i>Boana albonigra</i>	Argentina. Jujuy	24	n.e.	11q	FERRO <i>et al.</i> (2018)
	<i>Boana bischoffi</i>	Brasil. São Paulo, Apiaí, Morro do Ouro	24	n.e.	11q	FERRO <i>et al.</i> (2018)

Grupo de espécies	Espécie	Localidade	2n	NF	NOR	Referências
	<i>Boana caingua</i>	Argentina. Misiones, Cainguás, Balneario Arroyo Cuña Pirú. Parque Provincial Salto Encantado	24	n.e.	12q	FERRO <i>et al.</i> (2018)
	<i>Boana cipoensis</i>	Brasil. Minas Gerais, Serra do Cipó; Diamantina	24	n.e.	1p	FERRO <i>et al.</i> (2018)
	<i>Boana cordobae</i>	Argentina. Córdoba, San Luis	24	n.e.	11q	FERRO <i>et al.</i> (2018)
	<i>Boana cordobae</i>	Províncias de Córdoba e San Luis, Argentina	24	48	n.e.	BARAQUET <i>et al.</i> (2013)
	<i>Boana curupi</i>	Argentina. Misiones	24	n.e.	1p	FERRO <i>et al.</i> (2018)
	<i>Boana marianitae</i>	Argentina. Salta, Santa Victoria, Parque Nacional Baritú	24	n.e.	11q	FERRO <i>et al.</i> (2018)
	<i>Boana prasina</i>	União da Vitória, Paraná, Brasil	24	48	12q	VENANCIO, S. <i>et al.</i> (2022)
	<i>Boana pulchella</i>	Província de Córdoba, Argentina	24	48	n.e.	BARAQUET <i>et al.</i> (2013)
	<i>Boana pulchella</i>	Argentina. Buenos Aires, Misiones, Entre Ríos, Corrientes, San Luis. Uruguai. Rocha, Flores, San José	24 e 2n=3x=36	n.e.	12q	FERRO <i>et al.</i> (2018)
	<i>Boana riojama</i>	Argentina. La Rioja, Salta, Catamarca, Tucumán	24	n.e.	11q	FERRO <i>et al.</i> (2018)
	<i>Boana stellae</i>	Argentina. Misiones,	24	n.e.	1p	FERRO <i>et al.</i> (2018)
<i>Boana punctata</i>	<i>Boana altlantica</i>	Alagoas-AL, Pernambuco-PE, Amazonas- AM	24	n.e.	10q	LIMA, L.R. <i>et al.</i> (2019)
	<i>Boana altlantica</i>	Itacaré, Bahia, Brasil	24	48	10 e 12	CARVALHO <i>et al.</i> (2014)
	<i>Boana cinerascens</i>	Manaus, Amazonas, Brasil	24	48	11	MATTOS <i>et al.</i> (2014)

Grupo de espécies	Espécie	Localidade	2n	NF	NOR	Referências
	<i>Boana cinerascens</i>	Equador. Tungurahua, Rio Negro. Brasil, Pará, Amazonas	24	n.e.	11q	FERRO <i>et al.</i> (2018)
	<i>Boana punctata</i>	Brazil. Pará, Marabá	24	n.e.	11q	FERRO <i>et al.</i> (2018)
<i>Boana pellucens</i>	<i>Boana pellucens</i>	Equador	24	n.e.	11q	FERRO <i>et al.</i> (2018)
<i>Boana semilineata</i>	<i>Boana boans</i>	Brasil. Pará, Melgaço, Caxiauna; Carajás; Marabá, Piçarreira	24	n.e.	7q	FERRO <i>et al.</i> (2018)
	<i>Boana boans</i>	El Dorado para Santa Elena de Uairén, Estado de Bolívar, Venezuela	24	48	7	SCHMID <i>et al.</i> (2016)
	<i>Boana boans</i>	São Sebastião do Uatumã, Amazonas, Brasil	24	48	11	MATTOS <i>et al.</i> (2014)
	<i>Boana geographica</i>	Santa Isabel do Rio Negro, Amazonas, Brasil	24	48	n.e.	MATTOS <i>et al.</i> (2014)
	<i>Boana pombali</i>	Wenceslau Guimarães, Bahia, Brasil	24	48	7	CARVALHO <i>et al.</i> (2014)
	<i>Boana semilineata</i>	Wenceslau Guimarães, Bahia, Brasil	24	48	7	CARVALHO <i>et al.</i> (2014)
	<i>Boana semilineata</i>	Santa Teresa, Espírito Santo, Brasil	24	n.e.	7q	NUNES <i>et al.</i> (2008)
	<i>Boana wavrini</i>	São Sebastião do Uatumã, Santa Isabel do Rio Negro, Amazonas, Brasil	24	48	11	MATTOS <i>et al.</i> (2014)
	<i>Boana wavrini</i>	Brasil. Pará, Melgaço, Caxiauna	24	n.e.	11q	FERRO <i>et al.</i> (2018)
	<i>Boana.cf.semilineata</i>	Brasil. Pará: Juriti, Mutúm; Marabá	24	n.e.	7q	FERRO <i>et al.</i> (2018)
<i>Boana faber</i>	<i>Boana albomarginata</i>	Santa Teresa, Anchieta, Espírito Santo, Brasil	24	n.e.	2p	NUNES <i>et al.</i> (2008)
	<i>Boana albomarginata</i>	Bertioga, Picinguaba, Mogi das Cruzes, São Paulo, Brasil	24	n.e.	9q	CARVALHO <i>et al.</i> (2009)
	<i>Boana crepitans</i>	Flores de Goiás, Goiás, Brasil	24	48	n.e.	Presente estudo

Grupo de espécies	Espécie	Localidade	2n	NF	NOR	Referências
	<i>Boana crepitans</i>	Piranhas, Alagoas, Brasil	24	n.e.	11	GRUBER <i>et al.</i> (2007)
	<i>Boana crepitans</i>	Wenceslau Guimarães, Bahia, Brasil	24	48	7	CARVALHO <i>et al.</i> (2014)
	<i>Boana faber</i>	União da Vitória, Paraná, Brasil	24	48	11q	VENANCIO, S. <i>et al.</i> (2022)
	<i>Boana faber</i>	Misiones, Cainguás, Aristóbulo del Valle, Balneario Arroyo Cuña Pirú; San Pedro, Tobuna	24	n.e.	11q	FERRO <i>et al.</i> (2018)
	<i>Boana faber</i>	Parque Estadual da Serra do Brigadeiro – Ervália (MG)	24	48	11q	SOUZA <i>et al.</i> (2023)
	<i>Boana faber</i>	Itanhaém, São Paulo, Brasil	24	48	11q	SCHMID <i>et al.</i> (2016)
	<i>Boana faber</i>	Biritiba Mirim, Mogi das Cruzes, São Paulo, Brasil	24	48	11q	CARVALHO <i>et al.</i> (2009)
	<i>Boana faber</i>	Pedra Azul, Espírito Santo, Brasil	24	n.e.	11q	NUNES <i>et al.</i> (2008)
	<i>Boana lundii</i>	Pirenópolis, Goiás, Brasil	24	46	5p e 8p	OLIVEIRA <i>et al.</i> (2012)
	<i>Boana pardalis</i>	Mata da Biologia/UFV Viçosa (MG)	24	48	11q	SOUZA <i>et al.</i> (2023)
	<i>Boana pardalis</i>	Cariacica, Espírito Santo, Brasil	24	n.e.	11p	NUNES <i>et al.</i> (2008)

Tabela 3. Planilha com os dados extraídos da análise dos estudos selecionados a partir da busca em bases de dados sobre citogenética de anfíbios anuros do gênero *Rhinella*: grupos de espécies, espécies, localidade, número diploide (2n), número fundamental (FN), localização das NORs (par cromossômico) e referências bibliográficas. Abreviações: “p” – braço cromossômico curto; “q” – braço cromossômico longo; “n.e” – não especificado.

Grupo de espécies	Espécie	Localidade	2n	NF	NOR	Referências
<i>Rhinella granulosa</i>	<i>Rhinella granulosa</i>	Floresta Amazônica no norte do Brasil	22	44	n.e.	SILVA <i>et al.</i> (2024)
	<i>Rhinella granulosa</i>	Conceição da Barra, Espírito do Santo, Brasil	22	44	5q	BALDISSERA <i>et al.</i> (1999)
	<i>Rhinella pygmaea</i>	São João da Barra, Rio de Janeiro, Brasil	22	44	5q	BALDISSERA <i>et al.</i> (1999)
	<i>Rhinella fernandezae</i>	Alejandro Roca, Juárez Celman Depa, Argentina	22	44	n.e.	BARAQUET <i>et al.</i> (2011)
	<i>Rhinella mirandaribeiroi</i>	Flores de Goiás- GO, Brasil	22	44	n.e.	Presente estudo
<i>Rhinella margaritifera</i>	<i>Rhinella margaritifera</i>	Floresta Amazônica no norte do Brasil	22	44	n.e.	SILVA <i>et al.</i> (2024)
	<i>Rhinella margaritifera</i>	Tucuruí, Pará, Brasil	22	44	10q	BALDISSERA <i>et al.</i> (1999)
	<i>Rhinella hoogmoedi</i>	Bertioga, São Paulo, Brasil	22	44	10q	BRUSCHI <i>et al.</i> (2019)
	<i>Rhinella proboscidae</i>	Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus, Brasil	22	44	7p	BRUSCHI <i>et al.</i> (2019)
	<i>Rhinella sp. 1</i>	Bacabeira, Maranhão, Brasil	22	44	10q	BRUSCHI <i>et al.</i> (2019)
	<i>Rhinella sp. 2</i>	Parque Viruá, Roraima, Brasil	22	44	10q	BRUSCHI <i>et al.</i> (2019)
	<i>Rhinella cf. margaritifera</i>	Laranjal do Jari, Amapá, São Paulo	22	44	7p	BRUSCHI <i>et al.</i> (2019)
<i>Rhinella marina</i>	<i>Rhinella achavali</i>	Quebrada de los Cuervos, Departamento de Treinta y Tres, Uruguai	22	44	7p	KOLENC <i>et al.</i> (2013)
	<i>Rhinella arenarum</i>	Palmares do Sul, Brasil	22	44	7p	BALDISSERA <i>et al.</i> (1999)
	<i>Rhinella diptycha</i>	n.e	22	44	7p	KASAHARA <i>et al.</i> (1996)
	<i>Rhinella diptycha</i>	Lagoa Santa, Minas Gerais, Ibiraba, Bahia, Brasil	22	44	7p	AMARO-GHILARDI <i>et al.</i> (2008)
	<i>Rhinella diptycha</i>	Lucio V. Mansilla, Tulumba Depa, Argentina	22	44	7p	BARAQUET <i>et al.</i> (2011)
	<i>Rhinella diptycha</i>	Estância Funari, Botucatu, São Paulo, Brasil	22	44	7p	AZEVEDO <i>et al.</i> (2003)

Grupo de espécies	Espécie	Localidade	2n	NF	NOR	Referências
	<i>Rhinella diptycha</i>	Rio Verde, Goiás, Brasil	22	44	n.e.	Presente estudo
	<i>Rhinella henseli</i>	FLONA,sPasso Fundo, RS, Sertão, Rio Grande do Sul, Brasil	22	44	7p	BRUSCHI <i>et al.</i> (2019)
	<i>Rhinella icterica</i>	FLONA,sPasso Fundo, RS, Sertão, Rio Grande do Sul, Brasil	22	44	7p	BRUSCHI <i>et al.</i> (2019)
	<i>Rhinella icterica</i>	n.e	22	44	7p	KASAHARA <i>et al.</i> (1996)
	<i>Rhinella icterica</i>	Ribeirão branco, São Paulo, Brasil	22	44	7p	BALDISSERA <i>et al.</i> (1999)
	<i>Rhinella icterica</i>	Carapicuíba, São Paulo, Brasil	22	44	7p	AMARO-GHILARDI <i>et al.</i> (2008)
	<i>Rhinella icterica</i>	Estância Funari, Botucatu, São Paulo, Brasil	22	44	7p	AZEVEDO <i>et al.</i> (2003)
	<i>Rhinella marina</i>	Ilhéus, Bahia, Brasil	22	44	7p	BALDISSERA <i>et al.</i> (1999)
	<i>Rhinella marina</i>	Floresta Amazônica no norte do Brasil	22	44	7p	SILVA <i>et al.</i> (2024)
	<i>Rhinella rubescens</i>	Santa Bárbara, Minas Gerais, Brasil	22	44	7p	AMARO-GHILARDI <i>et al.</i> (2008)
	<i>Rhinella rubescens</i>	Brasília, DF, Brasil	22	44	7p	BALDISSERA <i>et al.</i> (1999)
<i>Rhinella crucifer</i>	<i>Rhinella arenarum</i>	Palmares do Sul, Arroio do Sal, Rio Grande do Sul, Brasil	22	44	7p	BALDISSERA <i>et al.</i> (1999)
	<i>Rhinella arenarum</i>	Alejandro Roca, Juárez Celman Depar, Argentina	22	44	7p	BARAQUET <i>et al.</i> (2011)
	<i>Rhinella crucifer</i>	n.e	22	44	7p	KASAHARA <i>et al.</i> (1996)
	<i>Rhinella crucifer</i>	Alfredo Chaves, Espírito Santo, Brasil	22	44	7p	SILVA (2010)
	<i>Rhinella ornata</i>	Alfredo Chaves, Espírito Santo, Brasil	22	44	7p	SILVA (2010)
	<i>Rhinella pombali</i>	Minas Gerais, Brasil	22	44	7p	SILVA (2010)
<i>Rhinella spinulosa</i>	<i>Rhinella achalensis</i>	La Posta, Pampa de Achala, San Alberto Departme, Argentina	22	44	10p	BARAQUET <i>et al.</i> (2011)

3.2 Cariótipos obtidos

3.2.1 *Boana albopunctata* (Spix, 1824)

A análise cromossômica em *B. albopunctata* evidenciou dois citótipos distintos, com a presença de um cromossomo B ($2n= 2x= 22$ e $22 + 1B$) e $NF= 44$ (Fig. 4 e Fig. 5), sem cromossomos sexuais distinguíveis. Os pares de cromossomos mitóticos 1, 2, 7, 9 e 10 foram caracterizados como metacêntricos, enquanto os pares 3, 5, 8 e 11 foram classificados como submetacêntricos e os pares 4 e 6 como subtelocêntricos (Tabela 2). O cariótipo de *B. albopunctata* portadora do cromossomo B, apresentou o par cromossômico 2 como submetacêntrico, e o pequeno cromossomo extra como metacêntrico (Tabela 3).

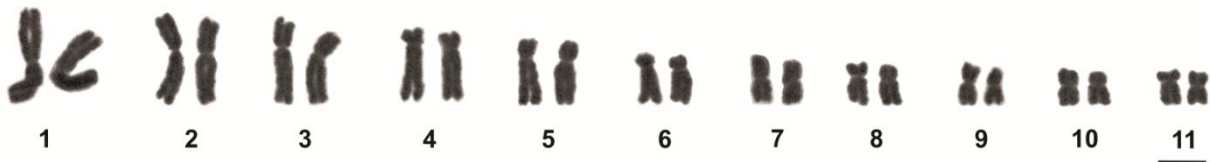


Figura 4. Cariótipo de *Boana albopunctata* com $2n= 2x= 22$ e $NF=44$, por coloração convencional de Giemsa. Barra = 5 μm .

Tabela 4. Dados morfométricos dos cromossomos mitóticos de *Boana albopunctata* de acordo com Green e Sessions (1991). **CR** - Razão centromérica; **CI** - Índice centromérico; **m** - Metacêntrico (CR = 1–1,67; CI = 0,5–0,375); **sm** - Submetacêntrico (CR = 1,68–3; CI = 0,374–0,25); **st**- Subtelocêntrico (CR= 3,01–7; CI= 0,249–0,125).

Par cromossômico	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
CR	1.10	1.46	2.15	3.59	2.38	3.16	1.12	1.9	1.2	1.46	1.86
CI	0.476	0.406	0.319	0.218	0.296	0.241	0.472	0.347	0.456	0.408	0.350
Morfologia	m	m	sm	st	sm	st	m	sm	m	m	sm



Figura 5. Cariótipo de *Boana albopunctata* com $2n= 2x= 22 + 1 B$, por coloração convencional de Giemsa. Barra = 5 μm .

Tabela 5. Dados morfométricos dos cromossomos mitóticos de *Boana albopunctata* “B” de acordo com Green e Sessions (1991). **CR** - Razão centromérica; **CI** - Índice centromérico; **m** - Metacêntrico (CR = 1–1,67; CI = 0,5–0,375); **sm** - Submetacêntrico (CR = 1,68–3; CI = 0,374–0,25); **st** - Subtelocêntrico (CR= 3,01–7; CI= 0,249–0,125).

Par cromossômico	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	B
CR	1.14	2.01	2.2	3.28	2.10	3.92	1.23	2.05	1.41	1.4	1.94	1.14
CI	0.469	0.336	0.317	0.234	0.324	0.204	0.448	0.332	0.416	0.421	0.340	0.467
Morfologia	m	sm	sm	st	sm	st	m	sm	m	m	sm	m

3.2.2 *Boana crepitans* (Wied-Neuwied, 1824)

Boana crepitans apresentou o número diploide de $2n= 2x= 24$ cromossomos e NF= 48, sem cromossomos sexuais distinguíveis (Figura 6). Os pares cromossômicos 1, 2, 9, 10-12 foram classificados como metacêntricos, já os pares 3, 5, 7 e 8 como submetacêntricos, e o pares 4 e 6 como subtelocêntricos (Tabela 4).



Figura 6. Cariótipo de *Boana crepitans* com $2n= 2x= 22$ e NF= 44, por coloração convencional de Giemsa. Barra = 5 µm.

Tabela 6. Dados morfométricos dos cromossomos mitóticos de *Boana crepitans* de acordo com Green e Sessions (1991). **CR** - Razão centromérica; **CI** - Índice centromérico; **m** - Metacêntrico (CR = 1–1,67; CI = 0,5–0,375); **sm** - Submetacêntrico (CR = 1,68–3; CI = 0,374–0,25); **st** - Subtelocêntrico (CR= 3,01–7; CI= 0,249–0,125).

Par cromossômico	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CR	1.20	1.48	1.92	3.36	2.29	3.65	1.88	1.71	1.21	1.18	1.10	1.26
CI	0.454	0.403	0.343	0.230	0.304	0.216	0.348	0.368	0.453	0.460	0.477	0.442
Morfologia	m	m	sm	st	sm	st	sm	sm	m	m	m	m

3.2.3 *Boana multifasciata* (Günther, 1859)

Boana multifasciata compartilhou o número cromossômico de $2n= 2x= 22$ e o número fundamental $NF= 44$, sem cromossomos sexuais distinguíveis (Figura 7). Todos os conjuntos cromossômicos são biarmados, sendo 1, 2, 8, 9 e 11 caracterizados como metacêntricos, enquanto os pares 3, 5, 7 e 10 caracterizados como submetacêntricos e os pares 4 e 6 como subtelocêntricos (Tabela 5).



Figura 7. Cariótipo de *Boana multifasciata* com $2n= 2x= 22$ e $NF= 44$, por coloração convencional de Giemsa. Barra = 5 μm .

Tabela 7. Dados morfométricos dos cromossomos mitóticos de *Boana multifasciata* de acordo com Green e Sessions (1991). **CR** - Razão centromérica; **CI** - Índice centromérico; **m** - Metacêntrico (CR = 1–1,67; CI = 0,5–0,375); **sm** - Submetacêntrico (CR = 1,68–3; CI = 0,374–0,25); **st**- Subtelocêntrico (CR= 3,01–7; CI= 0,249–0,125).

Par cromossômico	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
CR	1.19	1.19	2.24	3.60	2.24	3.67	2.14	1.24	1.19	1.92	1.26
CI	0.457	0.460	0.309	0.217	0.309	0.215	0.319	0.446	0.458	0.344	0.444
Morfologia	m	m	sm	st	sm	st	sm	m	m	sm	m

3.2.4 *Boana paranaiba* (Carvalho, Giaretta, and Facure, 2010)

O número diploide de $2n= 2x= 22$ cromossomos e $FN= 44$ foi encontrado nos dez espécimes de *B. paranaiba* analisados (Figura 8). Nenhum dos espécimes foi observado cromossomos supranumerários, tal como cromossomos sexuais. Os conjuntos cromossômicos mitóticos 1, 2, 7, 9 e 11 foram caracterizados como metacêntricos, os pares 3, 5, 8 e 10 submetacêntricos, enquanto os pares 4 e 6 subtelocêntricos (Tabela 6).

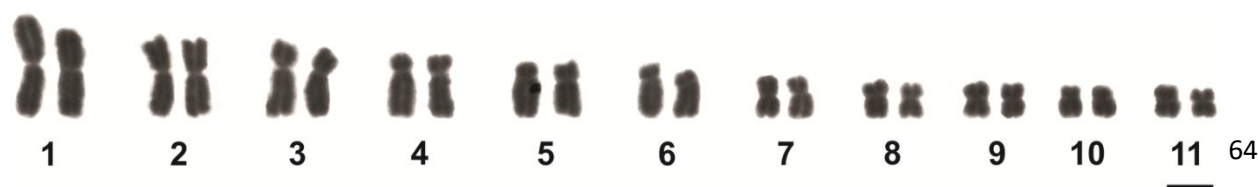


Figura 8. Cariótipo de *Boana paranaíba* com $2n=2x=22$ e $NF=44$, por coloração convencional de Giemsa. Barra = 5 μm .

Tabela 8. Dados morfométricos dos cromossomos mitóticos de *Boana paranaíba* de acordo com Green e Sessions (1991). **CR** - Razão centromérica; **CI** - Índice centromérico; **m** - Metacêntrico (CR = 1–1,67; CI = 0,5–0,375); **sm** - Submetacêntrico (CR = 1,68–3; CI = 0,374–0,25); **st**- Subtelocêntrico (CR= 3,01–7; CI= 0,249–0,125).

Par cromossômico	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
CR	1.18	1.31	1.92	3.14	2.64	3.56	1.4	1.81	1.31	1.98	1.26
CI	0.459	0.433	0.343	0.242	0.276	0.220	0.419	0.356	0.436	0.338	0.443
Morfologia	m	m	sm	st	sm	st	m	sm	m	sm	m

3.2.5 *Boana raniceps* (Cope, 1862)

Boana raniceps possui o número diploide de $2n=2x=24$ e $NF=48$, sem a presença de cromossomos sexuais distinguíveis (Figura 9). A constituição cariotípica presente tem como metacêntricos os pares 1, 2, 9, 10 e 11, submetacêntricos 4-8 e 12, e o par 3 como o único subtelocêntrico (Tabela 7).



Figura 9. Cariótipo de *Boana raniceps* com $2n=2x=24$ e $NF=44$, por coloração convencional de Giemsa. Barra = 5 μm .

Tabela 9. Dados morfométricos dos cromossomos mitóticos de *Boana raniceps* de acordo com Green e Sessions (1991). **CR** - Razão centromérica; **CI** - Índice centromérico; **m** - Metacêntrico (CR = 1–1,67; CI = 0,5–0,375); **sm** - Submetacêntrico (CR = 1,68–3; CI = 0,374–0,25); **st**- Subtelocêntrico (CR= 3,01–7; CI= 0,249–0,125).

Par cromossômico	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CR	1.02	1.53	3.71	2.69	2.65	2.34	1.97	2.26	1.37	1.31	1.09	1.95
CI	0.496	0.395	0.212	0.271	0.274	0.300	0.337	0.307	0.422	0.432	0.479	0.339
Morfologia	m	m	st	sm	sm	sm	sm	sm	m	m	m	sm

3.2.6 *Rhinella diptycha* (Cope, 1862)

A análise cromossômica de *R. diptycha* revelou o número de $2n = 2x = 22$ e $NF = 44$, sem distinção de cromossomos sexuais (Figura 10). Os pares 3 e 4 são submetacêntricos, enquanto os pares restantes são metacêntricos (1, 2 e 5- 11) (Tabela 8).



Figura 10. Cariótipo de *Rhinella diptycha* com $2n = 2x = 22$ e $NF = 44$, por coloração convencional de Giemsa. Barra = 5 μm .

Tabela 10. Dados morfométricos dos cromossomos mitóticos de *Rhinella diptycha* de acordo com Green e Sessions (1991). **CR** - Razão centromérica; **CI** - Índice centromérico; **m** - Metacêntrico ($CR = 1-1,67$; $CI = 0,5-0,375$); **sm** - Submetacêntrico ($CR = 1,68-3$; $CI = 0,374-0,25$); **st** - Subtelocêntrico ($CR = 3,01-7$; $CI = 0,249-0,125$).

Par cromossômico	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
CR	1.36	1.14	1.80	2.06	1.16	1.27	1.03	1.11	1.21	1.25	1.23
CI	0.424	0.468	0.359	0.328	0.464	0.441	0.492	0.475	0.456	0.449	0.450
Morfologia	m	m	sm	sm	m	m	m	m	m	m	m

3.2.7 *Rhinella mirandaribeiroi* (Gallardo, 1965)

O número diploide de $2n = 2x = 22$ cromossomos e um número fundamental igual a 44 foi observado nos dois espécimes de *R. mirandaribeiroi* analisados (Figura 11). Em nenhum dos espécimes foram localizados cromossomos supranumerários, incluindo cromossomos sexuais. Os conjuntos cromossômicos mitóticos foram classificados da seguinte forma: os pares 1-3, 5, 6, 9- 11 como metacêntricos e os pares restantes 4, 7 e 8 como submetacêntricos (Tabela 9).

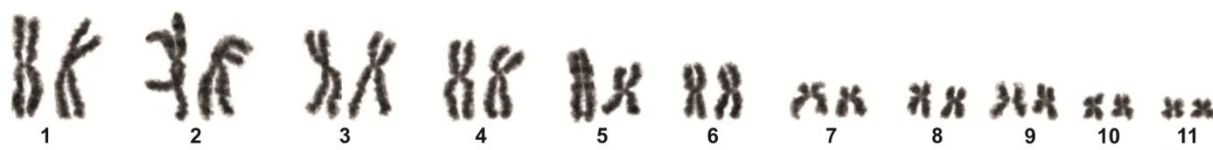


Figura 11. Cariótipo de *Rhinella mirandaribeiroi* com $2n= 2x= 22$ e $NF= 44$, por coloração convencional de Giemsa. Barra = 5 μm .

Tabela 11. Dados morfométricos dos cromossomos mitóticos de *Rhinella mirandaribeiroi* de acordo com Green e Sessions (1991). **CR** - Razão centromérica; **CI** - Índice centromérico; **m** - Metacêntrico ($CR = 1-1,67$; $CI = 0,5-0,375$); **sm** - Submetacêntrico ($CR = 1,68-3$; $CI = 0,374-0,25$); **st** - Subtelocêntrico ($CR= 3,01-7$; $CI= 0,249-0,125$).

Par cromossômico	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
CR	1.39	1.52	1.34	1.98	1.36	1.03	2.05	1.87	1.20	1.31	1.42
CI	0.419	0.398	0.428	0.335	0.424	0.493	0.328	0.349	0.455	0.434	0.417
Morfologia	m	m	m	sm	m	m	sm	sm	m	m	m

4 DISCUSSÃO

4.1 Redução do número cromossômico em *Boana albopunctata* (Spix, 1824)

O gênero *Boana* é caracterizado por apresentar um cariótipo bastante conservado de $2n= 2x= 24$, sendo considerado um caráter de estado pleiomórfico para o gênero e uma sinapomorfia para a subfamília Hylineae (Faivovich *et al.*, 2005; Ferro *et al.*, 2018). Contudo, estudos realizados em *B. albopunctata* e outras espécies do gênero, vêm revelando redução no número cromossômico de $2n= 2x= 24$ para $2n= 2x= 22$, conforme encontrado neste estudo, que pode ser decorrente de um ancestral comum (Ferro *et al.*, 2018).

A reorganização cromossômica dessa redução ainda persiste desconhecida. No entanto, diversas hipóteses têm sido propostas para explicar esse fenômeno. Por exemplo, Bogart (1973) propôs que a redução no número diploide de $2n= 24$ para $2n= 22$ em *B. albopunctata* foi decorrente pela translocação do material genético do menor cromossomo no cariótipo ancestral $2n= 24$ para um ou mais cromossomos. Gruber *et al.* (2007) propuseram um mecanismo alternativo, sugerindo que essa redução provavelmente resultou de um rearranjo estrutural envolvendo cromossomos de pequeno tamanho, ou seja,

uma possível fusão entre o par cromossômico 11, portador de NOR para algumas espécies do grupo (e.g., *B. raniceps* e *B. crepitans*) e o par 12, alterando a posição dessas regiões organizadoras nucleolares para o par 8, o que é considerado conservado para espécies com cariótipo de $2n = 22$. No entanto, os autores não descartam a possibilidade de que o rearranjo tenha ocorrido com qualquer um dos outros cromossomos de tamanho pequeno, devido à relativa uniformidade em os padrões de bandas.

Não obstante, uma possível explicação adicional, conforme proposto por Venancio *et al.* (2022), é que os pares cromossômicos 11 e 12 em cariótipos com $2n = 24$ do grupo de espécies *B. albopunctata* são frequentemente classificados como cromossomos m ou sm, sugerindo a ocorrência de um mecanismo mais complexo para a redução do número de cromossomos. Além disso, o autor enfatiza que os pontos de quebra e os mecanismos envolvidos ainda não estão completamente compreendidos. A translocação de um par pequeno para mais de um cromossomo não identificado, levando à redução do número diploide para $2n = 2x = 22$, não pode ser descartada. Essas reduções possivelmente desempenharam papel importante na evolução cromossômica do gênero *Boana*. Contudo, mais estudos genéticos devem ser realizados a fim de direcionar uma resposta congruente para essa redução cariotípica no gênero.

4.2 Cromossomo B em *Boana albopunctata*

Os cromossomos B (Bs) são elementos supranuméricos que coexistem com o conjunto cromossômico padrão (cromossomos A) de vários eucariotos (Green, 1990; Camasho, 2005; Ferro *et al.*, 2012, 2023). Exceto pela dispensabilidade para o crescimento e desenvolvimento normais, muitas características dos cromossomos B, como variabilidade numérica entre e dentro de indivíduos, tamanho geralmente menor em comparação aos cromossomos do complemento A natureza heterocromática, segregação anormal durante divisões celulares e padrões de herança não mendeliana, não são universais (Gruber *et al.*, 2014). Isso sugere que os cromossomos supranumerários representam sistemas complexos e distintos, cuja origem nas diferentes espécies ainda é tema de extensas investigações e debates.

As características mais marcantes na diferenciação desses cromossomos extras em anuros são: presença restrita a alguns indivíduos, morfologia distinta em relação aos cromossomos A regulares, ou seja, apresenta tamanho menor, sendo próximo morfológicamente do par 8, natureza heterocromática e ausência de pareamento

cromossômico com qualquer outro cromossomo (Gruber *et al.*, 2007).

Diversas hipóteses têm sido sugeridas para elucidar a origem dos cromossomos B em anuros. Para Bogart (1973) e Gruber *et al.* (2007, 2014), a translocação de material genético do menor cromossomo do cariótipo ancestral ($2n = 24$) de *B. albopunctata* para um ou mais cromossomos pode ter ocorrido. Nessa hipótese, o homólogo do menor cromossomo teria sofrido heterocromatinização, resultando em um cromossomo B funcional. Eventualmente, esse cromossomo B teria sido perdido, contribuindo para a estabilização do cariótipo em $2n = 22$. Por outro lado, Venancio *et al.* (2022) sugerem que o cromossomo B pode ter originado de um cromossomo do conjunto A enriquecido com microssatélites, como o par 8, portador de NOR para a espécie. À luz desses e outros estudos abrangendo a presença de cromossomos B (Bs), D'ambrosio *et al.* (2017), desenvolveram um banco de dados online com informações sobre a presença desses elementos e outras informações citogenéticas adicionais para plantas, animais e fungos, nomeado como B-chrom (www.bchrom.csic.es), auxiliando na mineração de dados ou estudos comparativos.

Em anuros, os cromossomos Bs foram descritos em 24 (0,31%) espécies, incluindo *B. albopunctata* (Ferro *et al.*, 2023). Os primeiros estudos envolvendo cromossomo B de *B. albopunctata* foram realizados por Cardoso (1986), em uma população do Morro do Ferro em Poços de Caldas- MG. Com o avanço citogenético, novos estudos foram conduzidos para compreender a dinâmica evolutiva e possível origem desses cromossomos. No Brasil, foram descritos cromossomos Bs nessa espécie nas regiões de Rio Claro- SP (Gruber *et al.*, 2007) e União da Vitória- PR (Venancio *et al.*, 2022), estendendo-se até a Argentina (Ferro *et al.*, 2012, 2023), e pela primeira vez no bioma Cerrado brasileiro (Este estudo).

O cromossomo B foi identificado em dois dos dez espécimes de *B. albopunctata* analisados neste estudo, representando 20% do total amostrado. Essa descoberta marca a primeira descrição cariotípica desse elemento supranumerário na região do Cerrado brasileiro, especificamente em Rio Verde-Goiás, Brasil. Estudos com experimentos de pintura cromossômica revelaram semelhanças de sequência entre os cromossomos B de populações separadas por mais de 1.000 km de distância, sugerindo uma origem evolutiva comum para esses elementos supranuméricos (Ferro *et al.*, 2023). Sob essa perspectiva, a análise dos espécimes de *B. albopunctata* com esse elemento extra, neste trabalho, localizada no Cerrado brasileiro, ganha relevância ao ser comparada às populações de outras localidades do Brasil. As distâncias entre o local de amostragem deste estudo e as demais regiões em que cromossomos B foram identificados: Rio Claro- SP (700 km), Poços de Caldas- MG (750

km), e União da Vitória- PR (1.100 km), reforçam a hipótese de uma origem comum. Essas localidades representam um intervalo geográfico significativo, que pode indicar ampla dispersão dos cromossomos B ao longo de eventos evolutivos, além de possíveis mecanismos conservados que sustentam a manutenção desses elementos supranumerários em populações distintas de *B. albopunctata*. Essa correlação geográfica e evolutiva aponta para a necessidade de investigações adicionais que combinem estudos citomoleculares e análises populacionais para esclarecer as relações entre as populações e a dinâmica evolutiva dos cromossomos Bs.

Somado a isso, a baixa prevalência observada neste estudo pode refletir um estágio inicial de invasão cromossômica, começando a se estabelecer, como relatado em outras espécies (Camasho *et al.*, 2005), destacando a importância de investigações contínuas para compreender a origem desses elementos, bem como detectar possível avanço na invasão do cromossomo B no Cerrado brasileiro e em outras regiões.

4.3 *Boana crepitans* (Wied-Neuwied, 1824)

B. crepitans é uma espécie endêmica brasileira, com ocorrência nos estados de Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Alagoas, Sergipe, Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Goiás e Tocantins (Frost, 2025; IUCN, 2025). Essa espécie integra o grupo de *B. faber* (Faivovich *et al.*, 2005), diferentemente das outras espécies pertencentes ao gênero *Boana* descritas no presente trabalho, que fazem parte do grupo de *B. albopunctata*.

O número cromossômico de $2n = 2x = 24$ e $NF = 48$ encontrado neste estudo estão de acordo com aqueles descritos anteriormente na literatura (Rabello *et al.*, 1970; Gruber *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2014), fortalecendo o pressuposto de conservação cariotípica dessa espécie. Os espécimes analisados nesses estudos foram amostrados nos municípios de Piranhas- AL e Wenceslau Guimarães- BA, ambos localizados no nordeste brasileiro. As localidades de Ag-NOR nos cromossomos de ambas as populações foram distintos. Gruber *et al.* (2007) descreveu o par 11 como portador dessas regiões. Por outro lado, Carvalho *et al.* (2014) identificaram o par 7, além disso, os padrões de Banda C identificado no par 3 para o autor pode ser uma característica específica espécie, uma vez que é observado somente nessa população.

Os achados neste estudo são, portanto, a primeira descrição cariotípica da espécie para o Cerrado brasileiro, contribuindo para a confirmação do número cromossômico e conhecimento da diversidade genética populacional com base na distribuição geográfica.

Estudos citogenéticos em espécies provenientes de localidades distintas ainda não exploradas, são essenciais para compreender a dinâmica da evolução cromossômica, mediante características ambientais únicas (Carvalho *et al.*, 2014) especialmente no que se refere à identificação de cromossomos B e outras inferências genéticas relevantes, caso ocorram.

Sob essa perspectiva, é essencial realizar mais estudos citogenéticos, como análises de Ag-NOR e Bandejamento C, em localidades ainda não exploradas na ampla distribuição da espécie. Tais estudos são fundamentais para confirmar os dados obtidos por outros autores, identificar possíveis padrões de variação cromossômica e outras características genéticas relevantes que possam fornecer *insights* adicionais sobre a dinâmica evolutiva e adaptativa da espécie em diferentes localidades.

4.4 *Boana multifasciata* (Günther, 1859)

B. multifasciata é distribuída no norte do Pará e na área de fronteira entre os estados do Maranhão e Tocantins no Brasil. Há alguma incerteza na distribuição, mas pode ser circunscrita à parte norte do Cerrado e partes adjacentes da Amazônia (Fouquet *et al.* 2021; Frost, 2025; IUCN, 2025).

Foram analisados dois espécimes neste estudo. O número cromossômico encontrado ($2n= 2x= 22$) para a espécie, está em conformidade com o descrito por Ferro *et al.* (2018). Adicionalmente, a análise morfológica e classificação dos cromossomos revelou resultados que corroboram com os achados descritos pelo autor para a mesma espécie. Os pares cromossômicos foram classificados como metacêntricos (1, 2, 8, 9 e 11), submetacêntricos (3, 5, 7 e 10) e subtelocêntricos (4 e 6), confirmando a estabilidade do padrão morfológico e número cromossômico dessa espécie no grupo *B. albopunctata*. Oliveira *et al.* (2012) e Mattos *et al.* (2014) também analisaram o cariótipo de *B. multifasciata*, amostrados nos estados brasileiros de Serranópolis- Goiás e Iranduba- Amazonas, respectivamente, identificando um número cromossômico de $2n= 2x= 24$, que diverge dos resultados obtidos neste estudo.

Esta espécie foi associada ao grupo de *B. albopunctata* (Mittan *et al.*, 2022) que também apresenta redução cariotípica de $2n= 2x= 22$ e padrão de bandas C e localização de NORs equivalentes (Gruber *et al.*, 2007; Ferro *et al.*, 2012; Venancio *et al.*, 2022). Dada essas considerações, torna-se provável que *B. multifasciata* também possua $2n= 2x= 22$ cromossomos (Ferro *et al.*, 2018). Além disso, os espécimes analisados neste trabalho foram

coletados nas proximidades da localidade-tipo da espécie: Belém- Pará, Brasil (Frost, 2025). Por conseguinte, é presumível que essas divergências estejam associadas às diversidades populacionais crípticas.

A comparação entre os dados deste estudo e os descritos na literatura evidencia que a estabilidade estrutural do cariótipo pode estar diretamente relacionada à conservação funcional e evolutiva no grupo *B. albopunctata*. Contudo, análises mais abrangentes (e.g., Bandas C, Ag- NOR) e citomoleculares (e.g., hibridização fluorescente *in situ*- FISH e DAPI) podem auxiliar na identificação de possíveis rearranjos cromossômicos não detectados com técnicas citogenéticas convencionais, auxiliando na compreensão da evolução cromossômica do gênero.

4.5 *Boana paranaíba* (Carvalho, Giaretta, and Facure, 2010)

A constituição cariotípica aqui descrita pela primeira vez para *B. paranaíba* é de $2n=2x=22$ e $NF=44$, a mesma encontrada em outras espécies do grupo de *B. albopunctata*. *B. albopunctata* tem sido amplamente descrita com $2n=22$ e presença de elementos supranumerários (cromossomos B), como demonstrado em diversos estudos (Gruber *et al.*, 2007; Ferro *et al.*, 2012; Venâncio *et al.*, 2022; Ferro *et al.*, 2023). Esses achados são consistentes com os resultados apresentados neste estudo. Adicionalmente, Ferro *et al.* (2018) relataram cariótipos de várias espécies do grupo, incluindo *Boana cf. alfaroi* (Caminer and Ron, 2014), *B. leucocheila* (Caramaschi and Niemeyer, 2003) e *B. multifasciata*, todas apresentando $2n=22$ cromossomos. O mesmo estudo indicou um número diploide de $2n=24$ para as espécies: *B. almendarizae* (Caminer and Ron, 2014), *B. calcarata* (Troschel, 1848), *B. cf. lanciformis* (Cope, 1871), *B. heilprini* (Noble, 1923) e *B. raniceps* (Cope, 1862). *B. fasciata* (Günther, 1858) também foi descrita com $2n=24$ por Bogart e Bogart (1971). Curiosamente, *B. lanciformis* apresentou o número cromossômico de $2n=22$ (Mattos *et al.*, 2014), mostrando discrepância em relação aos dados de Ferro *et al.* (2018), sugerindo possíveis diferenças populacionais.

B. paranaíba foi originalmente descrita para a localidade-tipo no município de Araguari, no estado de Minas Gerais, Brasil (Frost, 2025). Atualmente, apresenta ocorrência nos biomas Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, sendo seu habitat original a savana do Cerrado (IUCN, 2025). No entanto, essas áreas têm sofrido impactos significativos devido à expansão da pecuária e ao crescimento de áreas urbanas (Carvalho *et al.*, 2010; Ramalho *et*

al., 2019; Vaz-Silva *et al.*, 2020; IUCN, 2025). Essas ações antrópicas, combinadas com a fragmentação de habitat, podem representar uma ameaça direta à conservação da espécie, potencialmente influenciando a diversidade genética e dinâmica populacional. Portanto, esforços de conservação e estudos adicionais sobre a genética (e.g., Bandeamento C e Ag-NOR) e a ecologia da espécie são essenciais para garantir a preservação em um cenário de mudanças ambientais crescentes, abrangendo também espécies ainda não cariotipadas.

Somado a isso, ainda há uma lacuna de dados citogenéticos para a maioria das espécies pertencentes ao mesmo grupo, cujos cariótipos ainda não foram descritos, como: *B. courtoisae* (Fouquet, Marinho, Réjaud, Carvalho, Caminer, Jansen, Rainha, Rodrigues, Werneck, Lima, Hrbek, Giaretta, Venegas, Chávez, and Ron, 2021), *B. caiapo* (Pinheiro, Cintra, Valdujo, Silva, Martins, Silva, and Garcia, 2018), *B. dentei* (Bokermann, 1967), *B. eucharis* (Fouquet, Marinho, Réjaud, Carvalho, Caminer, Jansen, Rainha, Rodrigues, Werneck, Lima, Hrbek, Giaretta, Venegas, Chávez, and Ron, 2021), *B. maculateralis* (Caminer and Ron, 2014), *B. steinbachi* (Boulenger, 1905) e *B. tetete* (Caminer and Ron, 2014). Estudos futuros direcionados a essas espécies poderão elucidar padrões cariotípicos adicionais no grupo e contribuir para a compreensão da evolução cromossômica em Boana.

4.6 *Boana raniceps* (Cope, 1862)

O número diploide de $2n = 2x = 24$ e $NF = 48$ encontrado no presente trabalho para *B. raniceps* reforçam aqueles obtidos em outros estudos (Rabello *et al.*, 1970; Gruber *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2010; Mattos *et al.*, 2014). Esses dados confirmam o número cromossômico conservado para a espécie, embora as ordenações cromossômicas em cada cariograma ou as nomenclaturas da morfologia adotadas pelos distintos autores nem sempre tenham sido coincidentes. Os dados de regiões Ag-NOR foram encontrados no par cromossômico 11 pelos autores.

Adicionalmente, a heterocromatina constitutiva (Bandas C) também foi encontrada presente no mesmo par cromossômico, ainda que caracterizada como quase ausente (Gruber *et al.*, 2007, 2014; Ferro *et al.*, 2018). Esses dados revelam o alto grau de conservadorismo e, possivelmente, especificidade única da espécie. Esse conservadorismo pode ser uma estratégia adaptativa para a manutenção da ampla distribuição geográfica (i.e., Colômbia Amazônica, Venezuela- Amazonas, Guiana Francesa, Brasil, IUCN, 2025).

Embora todas as populações de *B. raniceps* cariotipadas até o momento apresentem

$2n = 2x = 24$ cromossomos, estudos anteriores, como o de Gruber *et al.* (2007), sugerem que processos de redução cariotípica, como a transição de $2n = 2x = 24$ para $2n = 2x = 22$ observada em *B. albopunctata*, podem estar ocorrendo em outros grupos do gênero. Dessa forma, é plausível propor que *B. raniceps*, *pertencente ao mesmo grupo*, esteja passando por um processo semelhante de redução cromossômica. Contudo, estudos adicionais envolvendo outras populações são necessários para identificar variações cromossômicas e testar essa hipótese. A identificação de tais variações podem fornecer evidências sobre possíveis caminhos de evolução cariotípica no gênero *Boana*, contribuindo para a diversificação adaptativa das espécies.

4.7 *Rhinella diptycha* (Cope, 1862)

Devido à sistemática ainda pouco esclarecida e à insuficiência de dados morfológicos, ecológicos e moleculares, o gênero *Rhinella* tem sido alvo de inúmeras revisões taxonômicas, tanto em níveis interespecíficos quanto intraespecíficos. Essas revisões têm gerado debates sobre o verdadeiro status taxonômico de diversas espécies, muitas das quais foram incluídas em complexos de espécies, por causa da série de linhagens crípticas, evidenciando os desafios associados à taxonomia do grupo (Santos *et al.*, 2015; Frost, 2025). *R. diptycha*, por exemplo, é uma das espécies que, ao longo das décadas, passou por diferentes reclassificações taxonômicas (Lavilla e Brusquetti *et al.*, 2018; Frost, 2025; IUCN, 2025) e está inclusa atualmente no grupo de *R. marina* (Pereyra *et al.*, 2021).

Os dados citogenéticos disponíveis para a espécie ainda estão associados a classificações antigas, como *Chaunus schneideri*, *C. jimi*, *Bufo paracnemis*, *R. jimi* e *R. schneideri* (Beçak *et al.*, 1968; Kasahara *et al.*, 1996; Azevedo *et al.*, 2003; Amaro-Ghilardi *et al.*, 2008; Baraquet *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2020). Esses autores encontraram um número cromossômico de $2n = 2x = 22$ e $NF = 44$ para a espécie, em conformidade com os achados no presente estudo. Adicionalmente, o padrão morfológico uniforme dos cromossomos classificados na maioria em metacêntricos e/ou submetacêntricos, como observado também no presente trabalho, é uma característica que vem sendo abordada como específica para o gênero (Baraquet *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2024). Essa similaridade cromossômica resultaria em um mecanismo de isolamento relaxado para a especiação, contribuindo para a alta frequência observada de eventos de hibridização entre espécies do gênero (Azevedo *et al.*, 2003; Bruschi *et al.*, 2019; Pereyra *et al.*, 2015, 2021; Valinnoto *et al.*, 2017; Silva *et al.*,

2024). Essa semelhança acaba resultando em implicações evolutivas, pois as características cromossômicas podem desempenhar papel crucial como barreiras reprodutivas, tanto pré-zigóticas quanto pós-zigóticas entre espécies distintas (Mezzasalma *et al.*, 2017; Bruschi *et al.*, 2019).

Ademais, o padrão uniforme de Bandas C nas regiões pericentromérica de todos os cromossomos e localização de Ag- NOR no par cromossômico 7, encontrados na maioria dos estudos citogenéticos para o gênero, reforçam o elevado grau de conservadorismo em *R. diptycha* e em outras espécies do gênero (Kasahara *et al.*, 1996; Azevedo *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2020). Possivelmente, essa uniformidade na morfologia cromossômica, localização das regiões organizadoras de nucléolos e regiões com heterocromatina constitutiva, decorrentes da provável endogamia entre espécies do gênero, pode refletir a estabilidade evolutiva do grupo, sugerindo que eventos de reorganização cromossômica têm sido raros ao longo da história evolutiva (Guimarães *et al.*, 2019; Rivera *et al.*, 2022)

4.8 *Rhinella mirandaribeiroi* (Gallardo, 1965)

R. mirandaribeiroi possui ampla distribuição no Cerrado brasileiro, incluindo seus enclaves nos estados do Amazonas e Rondônia, além de registros de ocorrência na Bolívia (Narvaes e Rodrigues, 2009; Neves *et al.*, 2019; Vaz-Silva *et al.*, 2020; Pereyra *et al.*, 2021). Esta espécie é integrante do grupo *R. granulosa* (Pereyra *et al.*, 2021; Frost, 2025).

Neste estudo, descreve-se pela primeira vez o cariótipo de *R. mirandaribeiroi*, que apresenta número cromossômico de $2n=2x=22$ e número fundamental (NF) de 44, mantendo o padrão cariotípico observado em outras espécies do mesmo grupo. Além disso, a morfologia cromossômica, composta por cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, reforça a especificidade como característica do gênero (Baraquet *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2020). Entre as 14 espécies pertencentes ao grupo de *R. granulosa*: *R. azarai* (Gallardo, 1965), *R. beebei* (Gallardo, 1965), *R. bergi* (Céspedes, 2000), *R. bernardoi* (Sanabria, Quiroga, Arias, and Cortez, 2010), *R. centralis* (Narvaes and Rodrigues, 2009), *R. dorbignyi* (Duméril and Bibron, 1841), *R. fernandezae* (Duméril and Bibron, 1841), *R. granulosa* (Spix, 1824), *R. humboldti* (Gallardo, 1965), *R. major* (Müller and Hellmich, 1936), *R. merianae* (Gallardo, 1965), *R. mirandaribeiroi* (Gallardo, 1965) e *R. pygmaea* (Myers and Carvalho, 1952), apenas *R. granulosa*, *R. fernandezae*, *R. pygmaea* e *R. mirandaribeiroi* (Presente estudo) apresentam descrição cariotípica.

Dada a ampla diversidade e distribuição de espécies que compõem o gênero *Rhinella*,

lacunas de conhecimentos citogenéticos devem ser solucionadas, antes que espécies não descritas citogeneticamente sejam extintas. As semelhanças morfológicas do gênero com a maioria das espécies crípticas podem passar despercebidas pelos pesquisadores, esforços direcionados a estudos em várias localidades de ocorrência do gênero é um passo a ser seguido, a fim de lançar luz desses conhecimentos. Além disso, o bioma brasileiro Cerrado principal local de ocorrência da espécie tem sido constantemente ameaçado por distúrbios antropogênicos (Medeiros *et al.*, 2022), podendo resultar na extinção dessas espécies, antes que sejam estudadas. Consequentemente, a ausência de dados citogenéticos para várias espécies do grupo ressalta a necessidade de esforços adicionais para preencher essas lacunas. Estudos futuros podem revelar variações cromossômicas ainda não descritas e contribuir para a compreensão da evolução cromossômica, especiação e conservação dessas espécies.

5 CONCLUSÕES

Este estudo contribui para a amplificação do conhecimento citogenético dos gêneros *Boana* e *Rhinella* ao descrever os cariótipos de sete espécies, incluindo *Boana paranaiba* e *Rhinella mirandaribeiroi*, cujos dados cromossômicos foram apresentados pela primeira vez. Ambas as espécies mostraram um número diploide de $2n= 2x= 22$ e $NF = 44$, com predominância de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, reforçando o padrão cariotípico conservador observado nesses gêneros. As demais espécies que fazem parte do gênero *Boana* e *Rhinella* também apresentaram o mesmo número cromossômico, com exceção de *B. crepitans* e *B. raniceps* com $2n= 2x= 24$ e $NF= 48$.

Um achado relevante foi à identificação de cromossomos B em *Boana albopunctata*, representando a primeira evidência de elementos supranumerários na espécie no bioma Cerrado. Essa descoberta amplia a distribuição geográfica conhecida dos cromossomos B na espécie, antes registrados apenas em populações do Sudeste e Sul do Brasil, e fornece novos *insights* sobre a evolução e manutenção desses elementos em populações distintas, bem como a possível relação filogenética dessas populações

Os resultados reforçam o papel fundamental das abordagens citogenéticas para compreender a evolução cromossômica em *Boana* e *Rhinella*. Contudo, persistem lacunas significativas na citogenética desses gêneros, com muitas espécies sem descrição cariotípica. A continuidade dos estudos, incluindo técnicas de bandeamentos (i.e., Bandas C e Ag-NOR) e citomoleculares como FISH, será fundamental para explorar possíveis rearranjos

cromossômicos e a relação com a especiação e adaptação ao ambiente. Assim, os dados apresentados não apenas contribuem para o avanço do conhecimento citogenético, mas também oferecem subsídios para estratégias de conservação, especialmente em regiões ameaçadas, como o Cerrado brasileiro, onde essas espécies estão vulneráveis a impactos ambientais crescentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARO-GHILARDI, R. C. et al. Chromosomal studies in four species of genus *Chaunus* (Bufonidae, Anura): localization of telomeric and ribosomal sequences after fluorescence in situ hybridization (FISH). *Genetica*, v. 134, p. 159-168, 2008.

ANUNCIAÇÃO, P. R. et al. Amphibian conservation status in Brazil: Spatial patterns, threats, and challenges. *Journal for Nature Conservation*, p. 126611, 2024.

AZEVEDO, M. F. C. et al. Comparative cytogenetic studies of *Bufo ictericus*, *B. paracnemis* (Amphibia, Anura) and an intermediate form in sympatry. *Genetics and Molecular Biology*, v. 26, p. 289-294, 2003.

BAKER, R. J. et al. Preparations of mammalian karyotypes under field conditions. *Occasional Papers* 228:1-8. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.156987>, 2003.

BALDISSERA, F. A.; BATISTIC, R. F.; HADDAD, C. F. B. Cytotaxonomic considerations with the description of two new NOR locations for South American toads, genus *Bufo* (Anura: Bufonidae). *Amphibia-Reptilia* 20:413-420, 1999.

BARAQUET, M. et al. Redescription of the karyotype of five species of the family Bufonidae (Amphibia: Anura) from central area of Argentina. *Biologia*, v. 66, p. 543-547, 2011.

BEÇAK, M. L. Chromosomal analysis of eighteen species of Anura. *Caryologia*, v.21, n. 3, p. 191-208, jan, 1968.

BOGART, J. P.; BOGART, J. E. Genetic compatibility experiments between some South American anuran amphibians. *Herpetologica*, p. 229-235, 1971.

BOGART, J. P. Evolution of anuran karyotypes. In: Vial JL (ed) *Evolutionary Biology of Anurans*. Mizzou Press, Columbia, pp 337-349, 1973.

BRUSCHI, D. P. et al. Comparative cytogenetics of nine populations of the *Rhinella* genus (Anura, Bufonidae) with a highlight on their conservative karyotype. *Genetics and molecular biology*, v. 42, n. 2, p. 445-451, 2019.

CARDOSO, A. J. Utilização de recursos para reprodução em comunidade de anuros no sudeste do Brasil. Unpublished PhD thesis, Campinas State University, 1986.

- CARDOZO, Dario E. et al. Karyotypic data on 28 species of *Scinax* (Amphibia: Anura: Hylidae): diversity and informative variation. *Copeia*, v. 2011, n. 2, p. 251-263, 2011.
- CARVALHO, K. A.; GARCIA, P. C. A.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Cytogenetic comparison of tree frogs of the genus *Aplastodiscus* and the *Hypsiboas faber* group (Anura, Hylidae). *Genet Mol Res*, v. 8, n. 4, p. 1498-508, 2009.
- CARVALHO, T. R.; GIARETTA, A. A.; FACURE, K.G. A new species of *Hypsiboas* Wagler (Anura: Hylidae) closely related to *H. multifasciatus* Günther from southeastern Brazil. *Zootaxa* 2521: 37–52, 2010.
- CASSINI, C. S. et al. Um passo além de uma ampla análise filogenética molecular: Delimitação de espécies de *Adenomera marmorata* Steindachner, 1867 (Anura: Leptodactylida, 2020.
- CATROLI, G. F.; KASAHARA, S. Cytogenetic data on species of the family Hylidae (Amphibia, Anura): results and perspectives. Publication UEPG: Biological and Health Science Ponta Grossa. 15:67–86, 2009.
- CHAPARRO, J. C. et al. A new species of arboreal *Rhinella* (Anura: Bufonidae) from cloud forest of southeastern Peru. *Herpetologica* 63:203-212, 2007.
- D'AMBROSIO, U. et al. B-chrom: a database on B-chromosomes of plants, animals and fungi. *New Phytologist*, v. 216, n. 3, p. 635-642, 2017.
- DOMINATO, R. C. et al. First karyotype description of the species of *Adenomera* Steindachner, 1867 (Anura, Leptodactylidae) in the “thomei” clade. *Comparative Cytogenetics*, v. 16, n. 3, p. 151, 2022.
- FAIVOVICH, J. et al. Phylogenetic relationships of the *Boana pulchella* group (Anura: Hylidae). *Mol Phylogenetics Evol* 155:106981, 2021.
- FAIVOVICH, J. et al. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylineae: Phylogenetic analysis and taxonomic revision. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. v. 294, p. 1-240, 2005.
- FERRO, J. M. et al. B chromosomes in the tree frog *Hypsiboas albopunctatus* (Anura: Hylidae). *Herpetologica*, v. 68, n. 4, p. 482-490, 2012.
- FERRO, J. M. et al. Chromosome evolution in *Cophomantini* (Amphibia, Anura, Hylineae). *PLoS One*, v. 13, n. 2, p. e0192861, 2018.
- FERRO, J. M. et al. Cytogenetics of four foam-nesting frog species of the *Physalaemus gracilis* group (Anura, Leptodactylidae). *An Acad Bras Cienc*. Apr 11;94(1):e20200092. doi: 10.1590/0001-3765202220200092. PMID: 35442263, 2022.
- FERRO, J. M. et al. A single origin for the widely distributed B chromosomes of the gladiator frog *Boana albopunctata*. *Biological Journal of the Linnean Society* 139.1: 30-38, 2023.

FUNK, W. C.; CAMINER, M.; RON, S. R. High levels of cryptic species diversity uncovered in Amazonian frogs. *Proc R Soc B Biol Sci* 279:1806-1814, 2012.

GAZONI, T. Marcadores Citológicos no Cariótipo de Espécies de *Leptodactylus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) Analisado com Técnicas de Citogenética Clássica e Molecular. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista – UNESP, Rio Claro, 2011.

GOLD, J. R. et al. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *Journal of Fish Biology*, v. 37, n. 4, p. 563-575, 1990.

GONÇALVES, M. W. et al. Avaliação de danos genômicos em anfíbios anuros do cerrado goiano. *Revista Estudos-Vida e Saúde (Revista de Ciências Ambientais e Saúde)*, v. 41, p. 89-104, 2014.

GUIMARÃES, S. P. Complexos *rhinella marina* e *rhinella granulosa* (amphibia, anura, bufonidae): uma investigação molecular. 2019.

GREEN, D. M.; SESSION, S. K. *Amphibian Cytogenetics and Evolution*. Academic Press Inc., San Diego, 456 p, 1991.

GRUBER, S. L. et al. Chromosome banding in three species of *Hypsiboas* (Hylidae, Hylinae), with special reference to a new case of B-chromosome in anuran frogs and to the reduction of the diploid number of $2n=24$ to $2n=22$ in the genus. *Genetica*, v. 130, p. 281-291, 2007.

GRUBER, S. L.; HADDAD, C. F. B.; KASAHARA, S. Karyotype analysis of seven species of the tribe Lophiohylini (Hylinae, Hylidae, Anura), with conventional and molecular cytogenetic techniques. *Comparative cytogenetics*, v. 6, n. 4, p. 409, 2012.

GRUBER, S. L. et al. Possible interspecific origin of the B chromosome of *Hypsiboas albopunctatus* (Spix, 1824)(Anura, Hylidae), revealed by microdissection, chromosome painting, and reverse hybridisation. *Comparative Cytogenetics*, v. 8, n. 3, p. 185, 2014.

HEYER, W. R. et al. *Measuring and monitoring biological diversity. Standard methods for Amphibians*. Smithsonian Institution Press, Washington, 384 p, 1994.

IUCN SSC Amphibian Specialist Group & Instituto Boitatá de Etnobiologia e Conservação da Fauna. The IUCN Red List of Threatened Species 2023: e.T88417507A107299132. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2023-1.RLTS.T88417507A107299132.en>. 2023b. Accessed on 08 January 2025.

IUCN SSC Amphibian Specialist Group & Instituto Boitatá de Etnobiologia e Conservação da Fauna. 2023. *Boana crepitans*. The IUCN Red List of Threatened Species 2023:e.T113795579A54346249. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2023-1.RLTS.T113795579A54346249.en>. Accessed on 16 January 2025.

IUCN SSC Amphibian Specialist Group & Instituto Boitatá de Etnobiologia e Conservação da Fauna. 2023. *Boana multifasciata*. The IUCN Red List of Threatened Species 2023:e.T83541576A61400540.

<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20231.RLTS.T83541576A61400540.en>. Accessed on 16 January 2025.

IUCN SSC Amphibian Specialist Group & Instituto Boitatá de Etnobiologia e Conservação da Fauna. 2023. *Boana paranaíba*. The IUCN Red List of Threatened Species 2023:e.T83539002A86256019.
<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20231.RLTS.T83539002A86256019.en>. Accessed on 18 January 2025.

IUCN SSC Amphibian Specialist Group. 2023. *Boana raniceps*. The IUCN Red List of Threatened Species 2023: e.T88331830A61401422.
<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2023-1.RLTS.T88331830A61401422.en>. Accessed on 20 January 2025.

IUCN SSC Amphibian Specialist Group. 2023. *Rhinella diptycha*. The IUCN Red List of Threatened Species 2023: e.T200091873A61394670.
<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2023-1.RLTS.T200091873A61394670.en>. Accessed on 21 January 2025.

IUCN SSC Amphibian Specialist Group. 2023. *Boana albopunctata*. The IUCN Red List of Threatened Species 2023: e.T55378A61397601. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2023-1.RLTS.T55378A61397601.en>. Accessed on 16 January 2025.

KASAHARA, S. et al. Chromosome banding in three species of Brazilian toads (Amphibia-Bufonidae), 1996.

KASAHARA, S. et al. Comparative cytogenetic analysis on four tree frog species (Anura, Hylidae, Hylinae) from Brazil. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 103, n. 1-2, p. 155-162, 2003.

KASAHARA, S. Introdução à pesquisa em citogenética de vertebrados. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 2009.

KOLENC, F. et al. The tadpole and karyotype of *Rhinella achavali* (Anura: Bufonidae). *J Herpetol* 47:599-606, 2013.

LAVILLA, E. O.; BRUSQUETTI, F. On the identity of *bufo diptychus cope*, 1862 (Anura: Bufonidae). 2018.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. 1964.

LIMA, A. P. et al. Guia de sapos da reserva Adolpho Ducke. Amazônia Central. Ed. Attema. Manaus, AM, 2006.

LIMA, L. R. et al. Uncovering Neotropical treefrog diversity: integrative taxonomy reveal paraphyly in *Boana atlantica* (Amphibia, Anura, Hylidae). *Amphibia-Reptilia*, v. 40, n. 4, p. 511-521, 2019.

- LOURENÇO, L. B. et al. Molecular phylogeny and karyotype differentiation in *Paratelmatobius* and *Scythrophrys* (Anura, Leptodactylidae). *Genetica*, v. 132, p. 255-266, 2008.
- LUEDTKE, J. A. et al. Ongoing declines for the world's amphibians in the face of emerging threats. *Nature*, v. 622, n. 7982, p. 308-314, 2023.
- MATTOS, T. L. et al. Karyotypic diversity in seven Amazonian anurans in the genus *Hypsiboas* (family Hylidae). *BMC genetics*, v. 15, p. 1-13, 2014.
- MEZZASALMA, M. et al. When can chromosomes drive speciation? The peculiar case of the Malagasy tomato frogs (genus *Dyscophus*). *Zoologischer Anzeiger*, v. 268, p. 41–46, 2017.
- MITTAN, C. S. et al. Temporal and spatial diversification along the Amazonia-Cerrado transition in Neotropical treefrogs of the *Boana albopunctata* species group. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 175, p. 107579, 2022.
- MORAVEC, J. et al. A new species of the *Rhinella margaritifera* species group (Anura, Bufonidae) from the montane forest of the Selva Central, Peru. *ZooKeys* 371:35–56, 2014.
- NARVAES, P.; RODRIGUES, M. T. Taxonomic revision of *Rhinella granulosa* species group (Amphibia, Anura, Bufonidae), with a description of a new species. *Arquivos de Zoologia*, v. 40, n. 1, p. 1-73, 2009.
- NEVES, M. et al. Herpetofauna in a highly endangered area: the Triângulo Mineiro region, in Minas Gerais State, Brazil. *Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal.*, v. 32, 2019.
- NUNES, R. R. A.; FAGUNDES, V. Patterns of ribosomal DNA distribution in hylid frogs from the *Hypsiboas faber* and *H. semilineatus* species groups. *Genetics and Molecular Biology*, v. 31, n. 4, p. 982-987, 2008.
- OLIVEIRA, H. H. P. et al. Citogenética Comparativa das Famílias Leptodactylidae e Hylidae do Cerrado Goiano. *Revista EVS-Revista de Ciências Ambientais e Saúde*, v. 37, n. 5, p. 725-735, 2010.
- OLIVEIRA, H. H. P. et al. Citogenética comparativa das famílias Leptodactylidae e Hylidae do cerrado goiano. *Estudos*. 339(2):123–31, 2012.
- PAIVA, C. R. et al. Karyotypes and Ag-NORs in *Phyllomedusa camba* De La Riva, and *P. rhodei* Mertens, 1926 (Anura, Hylidae, Phyllomedusinae): cytotaxonomic considerations. *Italian Journal of Zoology*, v. 77, n. 1, p. 116-121, 2010.
- PEREYRA, M. O. et al. Egg clutch structure of *Rhinella rumbolli* (Anura: Bufonidae), a toad from the Yungas of Argentina, with a review of the reproductive diversity in *Rhinella*. *Salamandra*, v. 51, n. 2, p. 161–170, 2015.
- PEREYRA, M. O. et al. Evolution in the genus *Rhinella*: a total evidence phylogenetic analysis of Neotropical true toads (Anura: Bufonidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, v. 447, n. 1, p. 1-156, 2021.

PERKINS, R. D. et al. A database of amphibian karyotypes. *Chromosome Research*, v. 27, p. 313-319, 2019.

PYRON, R. A. Biogeographic analysis reveals ancient continental vicariance and recent oceanic dispersal in amphibians. *Syst Biol* 63:779-797, 2014.

PYRON, R. A.; WIENS, J. J. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Mol Phylogenet Evol* 61:543-583, 2011.

RABELLO, M. N. Chromosomal studies in Brazilian anurans. *Caryologia*, v. 23, n. 1, p. 45-59, 1970.

RAMALHO, W. P. et al. Structure and regional representativeness of the herpetofauna from Parque Estadual da Serra de Caldas Novas, Cerrado, Central Brazil. *Neotropical Biodiversity*, v. 5, n. 1, p. 10-21, 2019.

RIVERA, D. et al. Phylogenomics, introgression, and demographic history of South American true toads (*Rhinella*). *Molecular Ecology*, v. 31, n. 3, p. 978-992, 2022.

SANTOS, S. P.; IBÁÑEZ, R.; RON, S. R. Systematics of the *Rhinella margaritifera* complex (Anura, Bufonidae) from western Ecuador and Panama with insights in the biogeography of *Rhinella alata*. *ZooKeys*, n. 501, p. 109, 2015.

SBH. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Brazilian amphibians – List of species. Lista de anfíbios. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/checklist/anfibios.htm>>. Acesso em: 01 dez. 2024.

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

SEGALLA, M. et al. Brazilian amphibians –List of species. Disponível em <http://www.sbherpetologia.org.br>, 2016.

SILVA, D. J. S. Análise citogenética e morfométrica em populações de *Rhinella pombali* (Baldiessa Jr., Caramaschi e Haddad, 2004) e *Rhinella crucifer* (Wied- Neuwied, 1821) (Anura, Bufonidae). M. Sc. Thesis, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

SILVA, M. J. et al. Cytogenetic analysis of *Rhinella jimi* (Stevaux, 2002)(Anura, Bufonidae) from northeastern Brazil. *Cuadernos de Herpetología*, v. 34, 2020.

SILVA, D. S. et al. Comparative molecular and conventional cytogenetic analyses of three species of *Rhinella* (Anura; Bufonidae). *Plos one*, v. 19, n. 8, p. e0308785, 2024.

SOUZA, K. L. et al. Repetitive DNA mapping in five genera of tree frogs (Amphibia: Anura) from the Atlantic Forest: new highlights on genomic organization in Hylidae. *Cytogenetic and Genome Research* 163.5-6: 317-326, 2023.

SUÁREZ, P. et al. Chromosome evolution in Dendropsophini (Amphibia, Anura, Hylinae). *Cytogenetic and Genome Research*, v. 141, n. 4, p. 295-308, 2013.

TARGUETA, C. P. et al. Karyotypic differentiation via 2n reduction and a finding of a case of triploidy in anurans of the genus *Engystomops* (Anura, Leiuperidae). *Genetica* 139:1339-1347, 2012.

TEIXEIRA, L. S. R. et al. Comparative cytogenetics of tree frogs of the *Dendropsophus marmoratus* (Laurenti, 1768) group: conserved karyotypes and interstitial telomeric sequences. *Comparative Cytogenetics*, v. 10, n. 4, p. 753, 2016.

URDAMPILLETA, J. D. et al. Karyotype evolution and phylogenetic analyses in the genus *Cardiospermum* L.(P aullinieae, S apindaceae). *Plant Biology*, v. 15, n. 5, p. 868-881, 2013.

VALLINOTO, M. et al. Deep divergence and hybridization among sympatric Neotropical toads. *Zoological Journal of the Linnean Society*, v. 180, n. 3, p. 647–660, 2017.

VAZ-SILVA, W. et al. Guia de identificação das espécies de anfíbios (Anura e Gymnophiona) do estado de Goiás e do Distrito Federal, Brasil Central. Sociedade Brasileira de Zoologia, 2020.

VENANCIO, S. et al. Comparative cytogenetics among *Boana* species (Anura, Hylidae): focus on evolutionary variability of repetitive DNA. *Genetics and molecular biology*, v. 45, n. 4, p. e20220203, 2022.