

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

**Citogenética de espécies de anfíbios (Anura) das Bacias Hidrográficas Taquari-Antas e Apauê Inhandava, RS e atividade antimicrobiana da secreção da pele de *Rhinella henseli* (Anura, Bufonidae)**

Natália Cristine Ficanha

Passo Fundo

2018

Natália Cristine Ficanha

Citogenética de espécies de anfíbios (Anura) das Bacias Hidrográficas Taquari-Antas e Apauê Inhandava, RS e atividade antimicrobiana da secreção da pele de *Rhinella henseli* (Anura, Bufonidae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Passo Fundo, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientadora:

Profa. Dra. Carmen Sílvia Busin

Coorientadora:

Profa. Dra. Andréa Michel Sobottka

Passo Fundo

2018

CIP – Catalogação na Publicação

---

F444c Ficanha, Natália Cristine

Citogenética de espécies de anfíbios (Anura) das Bacias Hidrográficas Taquari-Antas e Apauê Inhandava, RS e atividade antimicrobiana da secreção da pele de *Rhinella henseli* (Anura, Bufonidae) / Natália Cristine Ficanha. – 2018.

101 f. : il. color.; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Sílvia Busin.

Coorientadora: Profa. Dra. Andréa Michel Sobottka.

Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Universidade de Passo Fundo, 2018.

1. Anfíbios. 2. Análises cromossômicas. 3. Identificação de espécies. I. Busin, Carmen Sílvia, orientadora. II. Sobottka, Andréa Michel, coorientadora. III. Título.

CDU: 597.6/.9

---

Catalogação: Bibliotecária Marciéli de Oliveira - CRB 10/2113

# ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO



## ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação:

**“Análise citogenética de espécies de anfíbios (Anura) das bacias hidrográficas Taquari Antas e Apauê Inhandava, RS e análise da atividade antimicrobiana da secreção da pele de *Rhinella henseli* (Anura, Bufonidae)”**

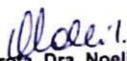
Elaborada por

**NATÁLIA CRISTINE FICANHA**

Como requisito parcial para a obtenção do grau de  
“Mestre em Ciências Ambientais”

Aprovado em: 13/09/2018  
Pela Banca Examinadora

  
**Profa. Dra. Carmen Silvia Busin**  
Presidente da Comissão Examinadora – UPF/PPGCiAmb

  
**Profa. Dra. Noeli Zanella**  
Universidade de Passo Fundo – UPF/PPGCiAmb

  
**Profa. Dra. Elaine Maria Lucas Gonsales**  
UFSC

## **DEDICATÓRIA**

À minha família

## **AGRADECIMENTOS**

A todos aqueles que, de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, o meu imenso muito obrigada! Em especial, gostaria de agradecer:

- À minha orientadora e amiga, professora Dra. Carmen Sílvia Busin, pela oportunidade que me ofereceu de encarar essa etapa trabalhando nesta área, para mim tão desafiadora, e ao mesmo tempo encantadora. Obrigada pelo exemplo de grande profissional que és, sempre trabalhando com seriedade, e muita competência. Serei sempre grata pela confiança depositada, pelas tantas conversas, orientações, cafés, e principalmente pela paciência que teve comigo no decorrer desses dois anos.

- Às professoras Dras. Andréa Michel Sobottka e Fabiana Tonial, por embarcarem conosco no desafio de trabalhar com anfíbios, bem como por todos os momentos de aprendizado.

- Às amigas e colegas de laboratório Audren Piassetta, Jessica de Camargo Favaretto, Julia Vanini, Sara Schmitz Nhoato, Mariana Doering e Ana Vitória Lucion Didoné, por toda a ajuda prestada, e por toda a dedicação que sempre mostraram. Sou muito grata de ter dividido com vocês essa vivência. Obrigada pelas risadas, pelas conversas sérias e produtivas, pelos desabafos e pelo apoio de sempre.

- À toda a equipe do Laboratório de Herpetologia, em especial a professora Dra. Noeli Zanella, aos estagiários, ao colega Rodrigo Barbosa Fontana e a colega e grande amiga Juciela Cicheleiro, que auxiliaram com as coletas e identificação dos animais aqui analisados. Também ao nosso “motorista particular” Élinton Rezende, o qual não mediu esforços para nos auxiliar em qualquer situação.

- Agradeço também a todo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, pelos ensinamentos prestados.

- Aos funcionários da secretaria do Instituto de Ciências Biológicas, especialmente à secretária Dionice Ozelame, por toda ajuda prestada, sempre com muita dedicação, competência e eficiência, além de todo o carinho que sempre teve por nós. Também à funcionária Sirlei pelo empréstimo frequente de materiais.

- Aos colegas de turma, pela amizade, em especial à minha grande amiga Vanessa por todo o apoio nas horas felizes, e também nas mais difíceis e angustiantes. Com certeza uma amizade que levarei para a vida toda. Também agradeço em especial aos amigos Luís Eduardo, Thuani, Felipe, e a grande amiga Juciela.

- À minha irmã Nicoli, por toda ajuda prestada nos finais de semana em que passávamos medindo cromossomos, e também por toda a amizade e carinho.

- Ao meu namorado Fernando, que mais do que namorado, foi meu melhor amigo, ajudante, psicólogo, motorista, cozinheiro, entre tantas outras funções. Só tenho a agradecer por todo o amor, carinho e compreensão que teve comigo.

- À minha família, principalmente aos meus pais Carlos e Silvane, que muitas vezes em meio a tantas dificuldades, se mantiveram firmes, para que eu também pudesse me manter. Sou eternamente grata pelo apoio e incentivo.

- Agradeço também a CAPES, pelo apoio financeiro prestado para a realização desse trabalho.

## EPÍGRAFE

“Um coelho branco é tirado de dentro de uma cartola. E porque se trata de um coelho muito grande, este truque leva bilhões de anos para acontecer. Todas as crianças nascem bem na ponta dos finos pêlos do coelho.

Por isso elas se encantam com esse truque de magia! Mas à medida que envelhecem, elas vão afundando lentamente para a base dos pelos do coelho. E ficam por lá. Tão confortáveis que jamais ousarão subir de volta para a ponta dos pêlos. Somente os filósofos ousam retomar essa jornada perigosa rumo aos limites da linguagem e da existência. Alguns deles escorregam e despencam no caminho, mas outros se agarram com força aos pêlos do coelho e lá do alto gritam para serem ouvidos pelos que ficaram ali embaixo, acomodados na pelagem macia do coelho, refestelando-se com boa comida e bebida.

— Senhoras e senhores — gritam eles —, estamos flutuando pelo espaço!

Mas ninguém ali presta atenção no que gritam os filósofos.

— Puxa, mas que gente mais barulhenta! — dizem.

E continuam a conversar: será que você poderia me passar a manteiga? Qual a cotação das ações hoje? Qual o preço do tomate? Você ouviu dizer que a Lady Di está grávida de novo?”

Jostein Gaarder - O Mundo de Sofia .

“Os seres humanos podem ansiar pela certeza absoluta, podem aspirar e alcançá-la; podem fingir que a atingiram. Mas a história da ciência – de longe o mais bem-sucedido conhecimento acessível aos humanos – ensina que o máximo que podemos esperar é um aperfeiçoamento sucessivo de nosso entendimento, um aprendizado por meio dos nossos erros, uma abordagem assintótica do Universo, mas com a condição de que a certeza absoluta sempre nos escapará.”

Carl Sagan – O mundo assombrado pelos demônios.

## RESUMO

A grande uniformidade morfológica dos anuros os torna o grupo mais facilmente diagnosticável entre os vertebrados e, em função dessa pouca diversificação de formas, os estudos baseados apenas em morfologia são, muitas vezes, de difícil interpretação taxonômica. Atualmente outras abordagens estão sendo utilizadas na identificação destes animais, como por exemplo, a vocalização, o sequenciamento de genes e o estudo dos cromossomos que, somados aos estudos de morfologia, facilitam a correta identificação das espécies. Nas Bacias Hidrográficas Taquari-Antas e Apauê Inhandava, RS, os trabalhos sobre a anurofauna local são ainda incipientes e quando eles acontecem, são decorrentes, na sua maioria, de análises de morfologia externa. Outro aspecto relevante no grupo dos anuros se relaciona à atividade antimicrobiana das secreções produzidas em sua pele. Esta tem sido uma área de grande interesse farmacológico, pois pode representar uma nova perspectiva terapêutica. Tratando-se de uma proposta que abrange duas diferentes abordagens, objetivamos: (1) caracterizar citogeneticamente as espécies ocorrentes nas duas bacias, comparando os resultados entre si e com os de outros locais de ocorrência, verificando a correta identificação das espécies e (2), avaliar a atividade antimicrobiana das secreções da pele de *Rhinella henseli*, testando sua ação sobre as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e o fungo *Candida albicans*. Neste estudo, foram caracterizadas citogeneticamente, por meio da coloração convencional (Giemsa) e diferencial dos cromossomos (Bandamento C e AgNOR) as espécies: *Aplastodiscus perviridis*, *Leptodactylus latrans*, *Leptodactylus mystacinus*, *Physalaemus cuvieri*, *Physalaemus aff. gracilis*, *Boana faber*, *Leptodactylus plaumanni*, *Odontophrynus americanus*, *Melanophryniscus devincenzii*, *Rhinella henseli* e *Rhinella icterica*. Para a análise da atividade antimicrobiana, a obtenção da secreção de *R. henseli* foi por meio de injeção subcutânea de epinefrina, testada pela técnica de bioautografia. Nossos resultados verificaram que as espécies que foram comparadas citogeneticamente entre si e com as de outros locais de ocorrência, por meio de estudos já realizados por outros autores, não apresentaram diferenças relevantes nas características cromossômicas espécie-específicas das populações, não sendo verificada nenhuma evidência de alteração citogenética, concluindo assim, que as bacias hidrográficas não representaram, até o momento, barreiras geográficas capazes de isolar as populações. Através do estudo antimicrobiano, verificamos que em *R. henseli* a secreção extraída da sua pele apresenta atividade antimicrobiana contra a levedura *C. albicans*, sendo este o primeiro estudo da ação antimicrobiana neste bufonídeo.

Palavras-chave: 1. Anurofauna. 2. Análises cromossômicas. 3. Identificação de espécies. 4. Ação antimicrobiana. 5. Ação antifúngica.

## ABSTRACT

The great morphological uniformity of the anurans makes them the most easily diagnosable among it may represent a new therapeutic perspective. The objective of this proposal is to: (1) characterize the cygenogenetic species in the two basins, comparing the results with each other and with those of other sites of occurrence, verifying the correct identification of the species and (2), to evaluate the antimicrobial activity of *Rhinella henseli* skin secretions, testing its action on the bacteria *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and the fungus *Candida albicans*. In this study, the species: *Aplastodiscus perviridis*, *Leptodactylus latrans*, *Leptodactylus mystacinus*, *Physalaemus cuvieri*, *Physalaemus* aff. *gracilis*, *Boana faber*, *Leptodactylus plaumanni*, *Odontophrynus americanus*, *Melanophryniscus devincenzii*, *Rhinella henseli* and *Rhinella icterica* were cytogenetically characterized by conventional staining (Giemsa) and differential chromosomes (Bandamento C and AgNOR). For the analysis of the antimicrobial activity, the secretion of *R. henseli* was obtained by subcutaneous injection of epinephrine, tested by the technique of bioautography. Our results verified that the species that were cytogenetically compared to each other and to those of other sites of occurrence, through studies already performed by other authors, did not present significant differences in the species-specific chromosome characteristics of the populations, and no evidence of cytogenetic alteration, thus concluding that the river basins did not represent, so far, geographical barriers capable of isolating populations. Through the antimicrobial study, we observed that in *R. henseli* the secretion extracted from its skin shows antimicrobial activity against yeast *C. albicans*, being this the first study of the antimicrobial action in this bufo.

Key words: 1. Anura wildlife. 2. Chromosomal analysis. 3. Identification of species. 4. Antimicrobial action. 5. Antifungal action.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

Figura 1 - Mapa da distribuição das Bacias Hidrográficas do Rio Grande do Sul..... 26

### CAPÍTULO I

Figura 1 - Karyotypes of five species of the *Rhinella margaritifera* and *Rhinella marina* groups from Brazil based on Giemsa staining..... 66

Figura 2 - Karyotypes of five species of the *Rhinella margaritifera* and *Rhinella marina* groups from Brazil stained by Ag-NOR method..... 67

## **LISTA DE TABELAS**

### **CAPÍTULO I**

Tabela 1 - Number of *Rhinella* specimens analyzed and their localities in Brazil..... 64

Tabela 2 - Detailed cytogenetic data available for species of the *Rhinella* genus..... 65

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- 2n:** número diploide de cromossomos
- AgNOR:** Técnica de impregnação pela prata das regiões organizadoras de nucléolo
- CS:** Constrição Secundária
- DNA:** Ácido desoxirribonecleico
- FLONA:** Floresta Nacional
- HC:** heterocromatina centromérica
- HI:** heterocromatina intersticial
- HP:** heterocromatina pericentromérica
- HT:** heterocromatina telomérica
- int:** região intersticial do cromossomo
- M:** cromossomos metacêntricos
- NORs:** Regiões Organizadoras de Nucléolo
- p:** braço curto do cromossomo
- PC:** Posição do Centrômero
- per:** região pericentromérica do cromossomo
- q:** braço longo do cromossomo
- rRNA:** Ácido ribonucleico ribossomal.
- SISBIO:** Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade.
- SM:** cromossomo submetacêntrico
- ST:** cromossomo subtelocêntrico
- st:** região subterminal do cromossomo
- ter:** região terminal do cromossomo
- U010:** Bacia Hidrográfica Rios Apuaê – Inhandava.
- UFPR:** Universidade Federal do Paraná.
- UFRGS:** Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Unicamp:** Universidade Estadual de Campinas.
- ZUEC:** Museu de Zoologia Prof. Dr. Adão José Cardoso.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>18</b>
2.1	<i>A ordem Anura</i>	18
2.2	<i>Análises citogenéticas em anfíbios anuros</i>	19
2.3	<i>Bacias Hidrográficas Taquari Antas e Apauê Inhandava</i>	23
2.4	<i>Os Anfíbios e as Barreiras Geográficas</i>	26
2.5	<i>Investigação de atividade antimicrobiana em anuros</i>	30
<b>3</b>	<b>PRODUÇÃO CIENTÍFICA I</b>	<b>45</b>
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>68</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Classe Amphibia compreende animais que vivem uma parte de seu ciclo na água doce e a outra parte na terra. É dividida em três ordens: Anura (rãs, pererecas e sapos), Caudata (salamandras e tritões) e Gymnophiona, (cecílias ou apodes) (Pough, Janis & Heiser 2008).

O grupo dos anuros (grego *an*=sem, *uro*=cauda), ocorre em todos os continentes, exceto nas regiões gelificadas dos Polos Norte e Sul e nas ilhas oceânicas (Frost 2018). A grande uniformidade morfológica dos anuros os torna o grupo mais facilmente diagnosticável entre os vertebrados. Ao mesmo tempo, e em função dessa pouca variação morfológica intraespecífica, os estudos baseados em morfologia são, muitas vezes, de difícil interpretação no que se refere aos aspectos de taxonomia e filogenia de determinados grupos, visto que, nesses estudos, a existência de sobreposição de caracteres morfológicos apontados como diagnósticos entre táxons aparentados, muitas vezes torna difícil a realização de uma eficiente diferenciação, gerando erros de identificação com tendência a unir várias espécies em uma só (Busin et al. 2001, Lourenço et al. 2015). Outras abordagens utilizadas para identificação também são utilizadas, como por exemplo, a vocalização, o sequenciamento de genes, o estudo dos cromossomos que, somados aos estudos de morfologia externa e interna, e aos demais estudos, auxiliam a correta identificação das espécies. Nesse contexto, o estudo citogenético pode ser utilizado como ferramenta capaz de auxiliar os estudos taxonômicos, filogenéticos e da evolução da anurofauna.

Outro aspecto relevante no grupo dos anuros se relaciona à atividade antimicrobiana que as secreções produzidas na pele desses animais podem apresentar. Devido ao sério problema enfrentado atualmente com microrganismos que apresentam resistência aos medicamentos disponíveis no mercado, a atividade antimicrobiana dessas secreções tem sido um tema de grande interesse farmacológico e que pode representar uma nova perspectiva terapêutica, uma vez que os anuros representam um

verdadeiro laboratório bioquímico, com o arsenal de toxinas que fabricam (Schwartz et al. 2007). Portanto, a investigação dessas substâncias é significativa e deve ser intensificada, pois além dos efeitos antimicrobianos, elas têm apresentado diversos outros efeitos, como anestésicos e alucinógenos, conforme relatado na revisão de literatura desta dissertação.

Nas Bacias Hidrográficas, Taquari Antas e Apauê Inhandava, região norte do estado do Rio Grande do Sul, os trabalhos sobre o conhecimento da anurofauna são ainda incipientes e quando acontecem, são decorrentes, na sua maioria, de análises da morfologia externa e da vocalização. Com o objetivo de verificar se as características cromossômicas espécie-específicas dos anuros das populações das duas bacias hidrográficas são as mesmas e se as bacias podem estar representado barreiras geográficas, analisamos citogeneticamente sete espécies de anuros provenientes da Floresta Nacional de Passo Fundo (FLONA), município de Mato Castelhano, RS (28°18'59.10"S, 52°11'26.42'O), Bacia Hidrográfica Taquari-Antas: *Physalaemus cuvieri*, *Physalaemus* aff. *gracilis*, *Aplastodiscus perviridis*, *Boana faber*, *Rhinella henseli*, *R. icterica* e *Leptodactylus latrans*, e nove espécies provenientes do parque Municipal de Sertão, Sertão, RS (28°02'33.46"S, 52°12'58.56"O), Bacia Hidrográfica Apauê Inhandava: *L. latrans*, *L. mystacinus*, *L. plaumanni*, *P. cuvieri*, *Physalaemus* aff. *gracilis*, *R. henseli*, *R. icterica*, *M. devincenzii* e *O. americanus*. Da espécie *R. henseli*, investigamos a atividade antimicrobiana da secreção da pele, testando sua ação contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e contra o fungo *Candida albicans*.

No capítulo I, apresentamos o Artigo: “Citogenética de nove espécies de anfíbios anuros ocorrentes em duas Bacias Hidrográficas do norte do Rio Grande Do Sul”, que traz as características citogenéticas comparativas das espécies, comparando os dados citogenéticos obtidos para as populações das duas bacias e com dados das espécies ocorrentes em outras localidades e analisadas por outros autores.

No capítulo II, o Artigo “Comparative cytogenetics of nine populations of the *Rhinella* genus (Anura, Bufonidae) with highlight on their conservative karyotype” discute dados da localização das Regiões Organizadoras de Nucléolo

---

(NORs) de populações de anuros do gênero *Rhinella*, e nele contrubuímos com as análises de *R. henseli* (primeiro relato citogenético) e *R. icterica*, populações de Sertão e de Mato Castelhana. Este artigo já foi aceito pela Revista “Genetics and Molecular Biology” e foi escrito em parceria com o grupo de Pesquisa em Citogenética e Mutagênese da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e com o Laboratório de Estudos Cromossômicos da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

No capítulo III, apresentamos o Artigo “Inibição de *Candida albicans* pela secreção da pele de *Rhinella henseli* (Anura, Bufonidae)“, onde testamos a atividade antimicrobiana da secreção da pele desse anuro.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *A ordem Anura*

Caudata, Anura e Gymnophiona são as três ordens da Classe Amphibia (Frost, 2018). A evolução das três ordens está relacionada com a forma de locomoção do grupo, sendo os anuros a ordem que obteve mais progresso na conquista de terra firme, devido a sua anatomia basicamente composta por corpo curto, cabeça grande e longos membros pélvicos que lhes permitem saltar, andar e escalar (Pough et al. 2008). Contudo, o grupo dos anfíbios nunca conquistou por si só a terrestrialidade, por ainda ser dependente do ambiente aquático (Rossa-Feres et al. 2017).

A América do Sul é o continente que abriga a maior diversidade de anfíbios do mundo, e o Brasil é o país que possui a mais diversa herpetofauna do planeta, com uma alta taxa de endemismo (Eterovick et al. 2005). Segundo Segalla et al. (2016), atualmente, nosso país abriga 1080 espécies de anfíbios, destes, 1039 são de anuros. Em nível mundial, já são registradas 7.922 espécies de anfíbios, sendo 6.991 anuros (Frost 2018). Os representantes dessa ordem podem ser encontrados por todo o planeta, com exceção das ilhas oceânicas mais remotas e regiões frias como os Polos Norte e Sul (Frost 2018).

Para o Rio Grande do Sul, são conhecidas 92 espécies de anfíbios anuros (Herpetologia UFRGS 2010). Lema & Martins (2011) realizaram um levantamento da anfíbiofauna do estado, relatando, porém, dificuldades na condução do trabalho uma vez que esta esfera do conhecimento é pouco estudada para o Rio Grande do Sul e constataram que muitas espécies apresentam taxonomia duvidosa, outras tantas ainda não descritas e algumas com variações de morfologia a serem consideradas e que podem resultar na descoberta de novas espécies. Relatam também, que muitos locais são pouco ou ainda não amostrados. Importante ressaltar também que a existência de grande variabilidade e sobreposição de caracteres morfológicos apontados como diagnósticos entre espécies aparentadas, muitas vezes torna difícil a realização de uma eficiente

---

diferenciação entre táxons, sendo comum a ocorrência de erros de identificação (Fonte, 2010). Assim sendo, o número de anuros ocorrentes no Estado não é exato, pois a cada estudo, a descoberta de novas espécies vem aumentando (Kwet & Di-Bernardo 1999, Kwet 2008, Iop, Santos & Cechin 2016, Bolzan, Saccol & Santos, 2016).

Devido aos poucos estudos, muitas espécies de anfíbios ocorrentes no Bioma Mata Atlântica, o qual integra as áreas de estudo deste trabalho, foram consideradas deficientes em dados na última avaliação da lista brasileira das espécies de anfíbios ameaçadas de extinção, e algumas delas já podem ter sido extintas, ou já podem estar ameaçadas há muito tempo (Rossa-Feres et al. 2017).

## 2.2 *Análises citogenéticas em anfíbios anuros*

Os estudos das características cromossômicas são muito utilizados como ferramenta para o estudo taxonômico dos anuros, e fornecem caracteres que facilitam a correta classificação taxonômica e filogenética. Muitas vezes, o estudo dos cromossomos permite descobrir a formação de novas espécies de anuros que habitam ambientes irregulares, montanhosos e com recursos hídricos que podem estar atuando para a formação de barreiras geográficas isolando, assim, populações específicas, Martino et al. 2002, Medeiros et al. 2003).

Durante algumas décadas, a análise citogenética nos anuros esteve baseada principalmente em comparações do número e da morfologia cromossômica, além da localização das constrições secundárias em cariótipos submetidos somente a coloração convencional (Kasahara, 2009). Tais estudos foram capazes de revelar grupos com grande homogeneidade nessas características, a exemplo dos bufonídeos (Bogart 1973) e hilídeos (Anderson 1991) e, por outro lado, grupos bastante variáveis como os leptodactilídeos (Denaro 1972). Kasahara (2009) relata que a morfologia cromossômica definida por meio de dados morfométricos iniciou com os trabalhos de Levan, Fredga & Sandberg em 1964, e que hoje, a mais comum nomenclatura cromossômica utilizada é a estabelecida por Green & Sessions (1991).

Apenas com a análise de cariótipos corados convencionalmente não é possível obter dados detalhados suficientes para cada cromossomo do conjunto, uma vez que a informação disponível é limitada apenas ao tamanho cromossômico e a posição do centrômero, permitindo apenas a caracterização do número e morfologia cromossômica (Targueta et al. 2018). Apesar desses estudos baseados apenas em coloração convencional terem fornecido dados importantes para o esclarecimento dos mecanismos de evolução cariotípica e das relações filogenéticas em grupos de anuros (Bogart 1973, Morescalchi 1973), a citogenética comparativa avançou muito com o desenvolvimento e o emprego das técnicas de bandamento dos cromossomos, principalmente com a determinação do padrão de heterocromatina do genoma, e da localização das NORs (Kasahara, 2009).

Em 1928, Heitz foi o primeiro a adotar o termo heterocromatina, a fim de diferenciar determinadas estruturas, percebendo que a região era altamente condensada. A heterocromatina pode ser definida basicamente como uma classe específica de cromatina altamente repetitiva (Kasahara 2009). A coloração das regiões heterocromáticas dos cromossomos, conseguida por meio da técnica de bandamento C, ocorre em virtude da amplificação de sequências repetitivas de DNA, produto principal da heterocromatina (Sumner 1994). Sumner (1972) descreveu uma técnica de bandamento C simples e rápida, a qual é ainda utilizada, pois consiste em um tratamento com ácido (ácido clorídrico), um tratamento alcalino (hidróxido de bário saturado), seguido de um tratamento com solução salina (cloreto e citrato de sódio). O ácido clorídrico permite a despurinização da molécula de DNA, que quando em tratamento com o hidróxido de bário resulta em quebras nos sítios apurínicos, o que facilita a extração do DNA (Kasahara 2009). Schmid et al. (1990), relatam que a extração de DNA ocorre mais facilmente nas regiões de banda C negativas, portanto, estas sofrem uma fraca coloração, ao contrário das regiões de banda C positivas, que ficam fortemente coradas.

Embora várias espécies de anuros compartilhem similaridade no número e morfologia cromossômica, é possível haver grandes diferenças na quantidade e na localização da heterocromatina nos cromossomos, diferenciando espécies (Silva et al.

2000, Busin et al. 2001, Busin et al. 2008, Arruda & Morielle-Versute 2008, Oliveira et al. 2013), visto que a localização, densidade, quantidade e número de bandas nos cromossomos pode ser altamente variável, mudando rapidamente conforme a evolução das espécies, resultado de possíveis rearranjos cromossômicos. A determinação do padrão heterocromático nos genomas é empregada com sucesso nos anuros e tem permitido a caracterização e diferenciação de espécies (Busin, Viniprova & Recco-Pimentel 2001, Veiga-Menoncello, Lima & Recco-Pimentel 2003, Medeiros, Rossa-Feres & Recco-Pimentel 2003, Busin, et al. 2006, Busin et al. 2008, entre outros), demonstração de polimorfismos (Lourenço, Garcia & Recco-Pimentel 2003), além do esclarecimento de possíveis rearranjos cromossômicos envolvidos na evolução de alguns grupos (Busin et al. 2001).

Segundo Galls & Pardue (1969) e Sumner (1990), as NORs podem ser caracterizadas como regiões cromossômicas ricas em sequências de guanina e citosina, as quais são compostas por várias cópias de genes ribossomais, codificadores de determinados RNAs ribossomais (RNAr) como 18S, 5,8S e 28S, organizados *in tandem* e separados por sequências espaçadoras. No cariótipo, as NORs podem aparecer coincidindo com as constrições secundárias (Henderson et al. 1972), ou podem conter heterocromatina no mesmo sítio (King 1980, Schmid 1982). A técnica de Howell & Black (1980) tem sido a mais aceita e utilizada para a detecção e localização das NORs ativas nos cromossomos. Ela é baseada na afinidade do nitrato de prata com as proteínas acídicas, impregnando com prata os locais de RNAr dos cromossomos (Kasahara 2009).

Em alguns estudos sobre o número e a localização das NORs, podemos notar um conservadorismo, visto que muitas vezes o par portador está relacionado às regiões ricas em heterocromatina (Quinderé et al. 2009, Iizuka, Matsuda, Yamada, Nakazato & Sessions 2013, Ferro et al., 2018). Porém, o emprego da técnica AgNOR em anfíbios têm possibilitado a discussão de possíveis relações evolutivas entre espécies (Ruiz, Soma & Beçak 1981), a caracterização de grupos (Anderson 1991) e a identificação de possíveis homeologias entre os cariótipos de diferentes espécies (Rosa, Aguiar, Giaretta & Recco-Pimentel 2003, Busin et al. 2006). Embora, na maioria das vezes os estudos cariotípicos de anuros, tanto de famílias conservadas, como das mais derivadas,

---

apresentem apenas um par cromossômico portador das NORs, há casos em que ela está localizada em mais de um par cromossômico, apresentando NORs adicionais nos cariótipos (Busin et al. 2006, Quinderé et al. 2009, Cardozo et al. 2011, Peixoto, Oliveira, Feio & Dergam 2016).

Segundo Kasahara (2009), existem muitos estudos que comprovam que os resultados das análises citogenéticas são fundamentais para confirmar que indivíduos pertencentes taxonomicamente a uma mesma espécie, fossem considerados exemplares de espécies diferentes, ou vice-versa, isso devido às constituições cariotípicas apresentadas. Exemplos de estudos onde a citogenética foi decisiva para a determinação de processo de especiação foi o de Busin et al. (2001), separando por meio da citogenética as espécies de *Pseudis minuta* e de *P. cardosoi*, até então consideradas, por meio da análise de características morfológicas, uma única espécie. Por meio da determinação do padrão heterocromático e da localização das NORs nos cariótipos, os autores conseguiram também, comprovar como ocorreu o processo de especiação nesse grupo. Martino & Sinsch (2002), analisando indivíduos de *Odontophrynus americanus* e *O. cordobae*, comprovaram que as duas espécies só podem ser separadas por meio da citogenética, pois morfológicamente são extremamente semelhantes. Outro estudo citogenético relevante foi o de Nogueira et al. (2015), cuja hipótese foi de constatar por meio da caracterização detalhada dos cromossomos que, indivíduos de *Scinax auratus* e *S. eurydice* poderiam estar muito associados a espécie *S. alter*, devido a fortes semelhanças em características morfológicas, porém, acabaram descobrindo que *S. auratus* compartilhava alguns traços cromossômicos com a maioria das espécies de *S. ruber*, e não com a *S. alter* conforme o esperado. Podemos mencionar, ainda, o trabalho de Medeiros et al. (2003), onde a citogenética de *Dendropsophus nana* e *D. sanborni*, separa as duas espécies que possuem características morfológicas muito parecidas e por viverem frequentemente em simpatia, são confundidas entre si. Além de separar as espécies, nesse trabalho, os autores discutiram também que a morfologia cromossômica dos cariótipos das duas espécies divergiu com as divulgadas para populações de outras regiões geográficas e sugeriram tratarem-se ambas, de espécies novas. Targueta et al. (2018) também relatam que, em alguns casos, a variação cariotípica de algumas

---

espécies supera a diversificação morfológica, reforçando o uso da citogenética como ferramenta para a taxonomia.

Por outro lado, algumas vezes, somente o estudo citogenético não consegue diferenciar espécies, como por exemplo, no estudo de Carvalho et al. (2009), onde *Aplastodiscus cochranæ* e *A. perviridis* apresentaram número e morfologia cromossômicas, localização da NOR e padrão heterocromático idênticos, tornando difícil uma diferenciação baseada apenas em caracteres citogenéticos, ressaltando assim a importância de análises adicionais como de morfologia externa e interna, filogenéticas, de vocalização, sequenciamento de genes, entre outras.

Dessa forma, o estudo citogenético das espécies que habitam as Bacias Hidrográficas Taquari Antas e Apauê Inhandava é empregado neste estudo como ferramenta capaz de auxiliar os estudos taxonômicos, filogenéticos e da evolução da anurofauna local, fornecendo dados que, somados aos de outras naturezas, como de morfologia e vocalização, contribuirão para a exata identificação dessa anurofauna, dado que o frágil conhecimento da diversidade de espécies é um dos maiores desafios para a conservação da biodiversidade (Funk, Caminer & Ron, 2012).

### 2.3 Bacias Hidrográficas Taquari Antas e Apauê Inhandava

O conceito de Bacia Hidrográfica pode ser compreendido por meio da concepção de rede hidrográfica e de relevo, visto que é uma área delimitada por um ponto de elevação que separa o escoamento das águas, mais conhecido como divisor de águas e é determinado pela topografia (Schiavetti & Camargo, 2002). Uma parcela da água da chuva que cai sobre o território das Bacias Hidrográficas infiltra para o subsolo e outra parte escoia pela superfície, escorrendo para o leito dos rios, ocorrendo então a entrada de água no ciclo hidrológico de cada bacia hidrográfica (Agência Nacional de Águas [ANA], 2017). As Bacias hidrográficas Taquari-Antas (G040) e Apauê-Inhandava (U010) possuem entre si uma distância de aproximadamente 30,3 km em

---

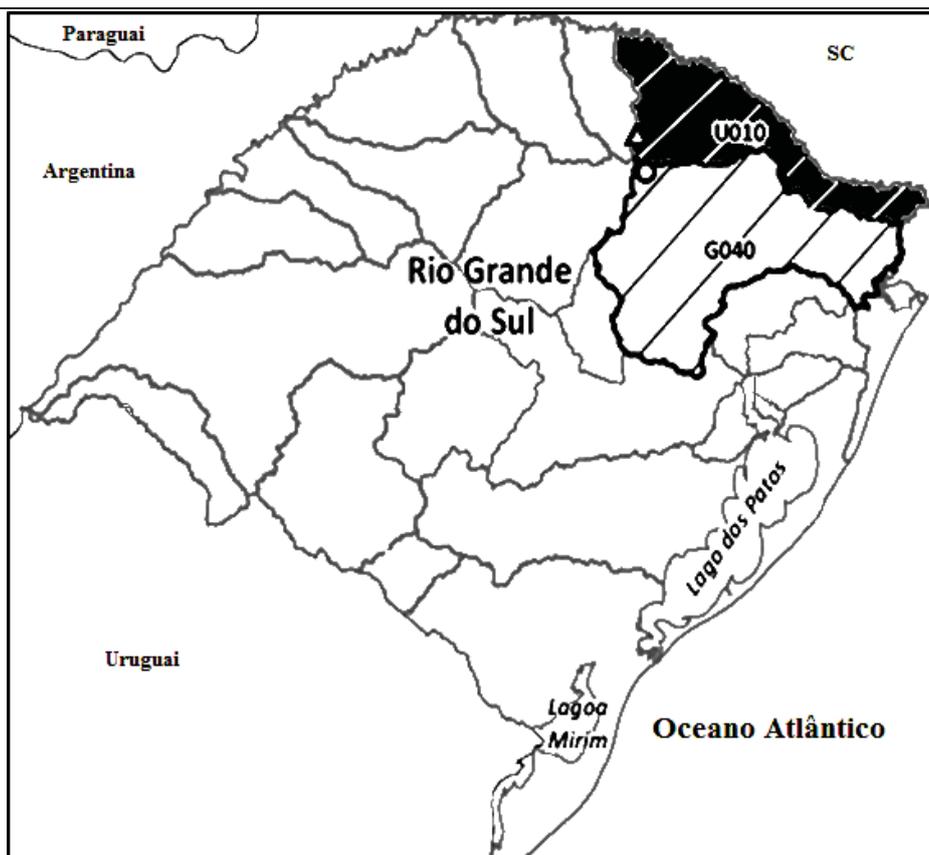
linha reta. A região dessas bacias é rica em divisores de águas, pois estão inseridos quase no limite de outras bacias como a do Rio Passo Fundo e a do Alto do Jacuí, além de pertencerem a Regiões Hidrográficas diferentes. Dessa forma, as águas que caem em cada uma das quatro bacias, escoam para lados distintos até desembocar no oceano.

A Bacia Hidrográfica Taquari-Antas, pertence à Região Hidrográfica do Guaíba, está localizada no nordeste do Estado do Rio Grande do Sul. Banha 118 municípios que somam uma população de aproximadamente 1.281.866 milhão de habitantes e esta inserida numa das regiões de maior importância econômica do estado. Abrange parte dos campos de cima da serra e região do Vale do Taquari, com predomínio da agropecuária, e a região colonial da Serra Gaúcha, caracterizada por intensa atividade industrial. A Bacia tem clima temperado com isoterma anual superior a 18°C. Regiões ao norte da Bacia possuem altitudes entre 400 e 600 m, enquanto que a região central possui altitudes inferiores a 400 m (Departamento de Recursos Hídricos da Secretaria de Estado do Meio Ambiente [DRH/SEMA], 2012). Devido à sua magnitude, esta bacia possui características físicas e antrópicas diferenciadas: áreas de alto índice de industrialização, áreas com predomínio de produção primária, zonas intensamente urbanizadas e riscos de ocorrência de enchentes, entre outras (Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler, RS [FEPAM], 2016). A captação de água destina-se a irrigação, ao abastecimento público, a agroindústria e a dessedentação de animais. Os principais cursos de água são o Rio das Antas, Rio Tainhas, Rio Lageado Grande, Rio Humatã, Rio Carreiro, Rio Guaporé, Rio Forqueta, Rio Forquetinha e o Rio Taquari (DRH & SEMA, 2012).

Já, a Bacia Hidrográfica Apuaê Inhandava, pertence à Região Hidrográfica do Uruguai. Situa-se a norte-nordeste do Estado do Rio Grande do Sul, compreendendo 52 municípios, e destes, 38 têm sede na área e cinco possuem menos de 5% dos seus territórios inseridos na bacia. Abrange a província geomorfológica Planalto Meridional e uma população estimada em 372.671 habitantes. Os principais corpos de água são os rios Apuaê, Inhandava, Cerquinha, Pelotas, Arroio Poatã e o Rio Uruguai. O principal uso de água na bacia se destina ao abastecimento público. A bacia é caracterizada por clima subtropical, onde a temperatura do mês mais quente é superior a 22°C e clima

---

temperado, com temperatura do mês mais quente inferior a 22°C. A altitude da bacia tem uma variação entre 500 e 1.350m (DRH & SEMA, 2016). Já, a região de coleta dos animais da nossa pesquisa apresenta altitude aproximada de 650 metros (Tedesco & Zanella, 2014).



**Figura 1.** Mapa da distribuição das Bacias Hidrográficas do Rio Grande do Sul. Em destaque as Bacias Hidrográficas Apuaê-Inhandava (U010) e Taquari-Antas (G040).

○ = Floresta Nacional de Passo Fundo. ▲ = Parque Natural Municipal de Sertão. G040 = Rio Taquari-Antas. U010 = Rios Apuaê – Inhandava.

#### 2.4 Os Anfíbios e as Barreiras Geográficas

Como várias espécies de anfíbios que ocorrem no Brasil são endêmicas, tendem a constituir populações pequenas e assim, mais suscetíveis a processos que ameaçam a sua existência. No trabalho de Pires, Fernandez & Barros (2006), é possível perceber que alguns processos naturais e antrópicos podem vir a separar populações pequenas e que o grau de isolamento destas, pode ser considerável quando não possuem uma estrutura metapopulacional, ou seja, um conjunto de populações locais onde a dispersão

---

de indivíduos de uma população para outra ainda seja possível. A separação dessas populações pode levar a processos de extinção ou especiação. No processo de extinção, quatro fatores podem contribuir independentemente para extinguir populações grandes ou pequenas: (1) aleatoriedade demográfica, (2) ambiental, (3) genética e (4), as catástrofes naturais. Já, o processo de isolamento, pode ocorrer por diversos fatores como fragmentação de habitats, formação de montanhas, rios, ilhas, entre outros. Hannah, (2011) discute que as mudanças climáticas, por exemplo, também podem influenciar populações a uma dispersão, e desse modo, não são somente as barreiras geográficas físicas que atuam no processo de especiação. Ribeiro, Metzger, Martensen, Ponzoni & Hirota (2009), mostram, em seu estudo, que o Bioma Mata Atlântica está gravemente fragmentado o que resta dele encontra-se distribuído em pequenas manchas, sendo 80% delas formadas por menos de 50 hectares de sua composição original, com quase metade possuindo atualmente, área menor que 100 hectares, cenário bem característico da região Norte do estado do Rio Grande do Sul. Em decorrência de fatos como este, é que a principal ameaça aos anfíbios no Brasil e no mundo vem sendo a fragmentação, a degradação e a destruição das áreas de ocorrência destes animais (Silvano & Segalla 2005, Becker, Fonseca, Haddad, Batista & Prado 2007).

A distribuição das espécies no globo terrestre é definida por diversos processos ecológicos, como por exemplo, movimentos tectônicos, mudanças bruscas nas condições climáticas e barreiras (Ficetola, Mazel & Thuiller 2017). Conforme revisão de Pires et al. (2006), ao longo do tempo os habitats foram transformados em pequenos pedaços remanescentes, isolados uns dos outros e mergulhados em paisagens de mosaico alteradas pelo homem. Os autores discutem que essa fragmentação pode ser dividida conceitualmente em: (1) Redução total da área, onde ocorre uma diminuição da biodiversidade em curto prazo, afetando populações pequenas ou raras pela perda de habitat e (2), pela fragmentação ou divisão do habitat, reduzindo a biodiversidade em longo prazo, formando ilhas de isolamento geográfico, diminuição ou eliminação de espécies consideradas colonizadoras, uma vez que os padrões da Teoria da Biogeografia de Ilhas podem ser aplicados também a ilhas de habitat. O norte do Rio Grande do Sul apresenta uma paisagem caracterizada pelo uso intensivo dos recursos naturais, uma vez

---

que as florestas e campos foram substituídos pelas lavouras, chegando próximo do esgotamento, apresentando atualmente fragmentos pequenos. Dessa forma, alguns processos naturais, juntamente com ações antrópicas dessa natureza, podem vir a separar populações pequenas e o grau de isolamento deve ser considerado.

A definição mais compreensível para especiação, apesar de ser muito mais complexa, é a que explica o termo como a divisão de uma população por barreiras geográficas, limitando a dispersão espacial dos indivíduos e resultando no impedimento do livre fluxo gênico entre eles (Queiroz 1998). Para Andrade (2010), esse processo é considerado impressionante e intrigante para a evolução, pois entender quais são seus mecanismos ainda é um grande desafio para os pesquisadores, por se tratar de um processo complexo e acometido por fatores genéticos, ecológicos, ambientais e comportamentais, os quais podem interagir entre si de maneira incomum. Santos Filho, Silva & Cabral (2017) ainda ressaltam que a temática da especiação requer atenção especial ao ser discutida, principalmente por envolver outras áreas do conhecimento como as da geografia, geologia e climatologia.

Vanzolini (1992) discute que a especiação pode ser vista de diferentes maneiras, como por exemplo, considerando as mudanças morfológicas de uma determinada espécie ao decorrer do tempo geológico e compreendendo quais processos naturais podem estar interferindo nessa transformação, que ocasiona a distinção de uma espécie em duas ou mais. Conforme Colley & Fischer (2013), tais mecanismos estão fortemente relacionados às diversas teorias sobre as origens da biodiversidade e, sem dúvidas, as barreiras geográficas são os fatores primordiais para que o fluxo gênico entre espécies seja impedido (Santos-Filho et al. 2017).

No caso dos anfíbios, rios e ilhas podem atuar como barreira geográfica sobre um grande número de espécies. Além das barreiras já conhecidas, outras também estão sendo estudadas, como é o caso das estradas, que podem atuar como barreira ambiental, impedindo a movimentação animal de um lado para outro, podendo resultar no isolamento de espécies, especialmente para pequenos anuros (Jaeger et al. 2005). Exemplo disso é o estudo de dois anos que Cairo & Zalba (2007) realizaram na Argentina, onde os autores comprovaram que uma espécie endêmica de

---

*Melanophryniscus* estava sendo afetada pela rodovia, pois, dos 76 indivíduos recapturados nas margens de uma estrada, apenas dois deles haviam conseguido atravessá-la durante o tempo do estudo. Além disso, Silva & Benmaman (2008), que, trabalhando com espécies de anuros restritos a regiões de riachos formadores de diferentes bacias, mostram que estes anuros parecem não alcançar rios maiores, mesmo tendo conexão com os mesmos. Conforme os autores, os rios maiores estariam atuando como uma barreira geográfica sobre as populações. Também Castellano, Rosso, Doglio & Giacoma (1999), constataram que uma população de *Bufo viridis* (anteriormente *Bufo viridis*), de uma ilha da Itália, possuía indivíduos 30% maiores e duas vezes mais pesados dos que aqueles que habitavam o continente, vindo a constituir uma espécie distinta. Além de Wu, Li & Murray (2006), que fizeram um trabalho similar e constataram que populações de *Fejervarya limnocharis* (antiga *Rana limnochari*) insulares possuíam tamanho corporal significativamente maior quando comparadas àquelas encontradas no continente, visto que estas possuíam maior disponibilidade de recursos e barreira geográfica entre as populações.

Santos-Filho et al. (2017) também ressaltam que o isolamento por barreira geográfica não age por si só no mecanismo de especiação. Segundo os autores, populações separadas precisam evoluir de forma independente, através da seleção de um *pool* gênico diferente e, que se ambas estiverem expostas a condições ambientais parecidas e que fatores evolutivos não venham a interferir no *pool* gênico, é bem provável que a especiação não ocorra. Vale considerar aqui, que alterações cromossômicas, como rearranjos, ocorrentes nos cariótipos de algumas espécies, podem representar o principal mecanismo para o curso da especiação, pois contribuem para o isolamento reprodutivo entre as espécies (Wolfe 2003), em decorrência de que estas alterações podem diminuir a fertilidade dos híbridos heterozigotos (Rieseberg 2001).

---

### 2.5 *Investigação de atividade antimicrobiana em anuros*

A pele dos anfíbios é adaptada para lhes prestar proteção, respiração cutânea, osmorregulação, termorregulação e a secreção de substâncias que agem contra microrganismos e predadores (Conlon, Kolodziejek & Nowotny 2004, Jared et al. 2009). Áreas como a neurociência, embriologia, ecologia, genética e evolução, têm mostrado grande interesse em estudos com a secreção da pele dos animais desse grupo. Este interesse se deve, principalmente, em virtude das características peculiares que apresentam e também pela capacidade de regeneração dos tecidos, crescimento e diferenciação de suas células epiteliais, entre outras (Lillywhite 2006, Yoshida et al. 2013). Glândulas mucosas e granulosas estão presentes na pele dos anfíbios. As granulosas são encontradas em tamanho maior e em menor número na região dorsal da pele e são responsáveis pela produção e armazenamento das secreções (Conlon et al. 2004, Pinto et al. 2009). Quando essas glândulas se dispõem agrupadas, são denominadas paratóides e, apesar de os anfíbios possuírem glândulas por todo o corpo, estas são as mais visíveis (Jared et al. 2009).

Pesquisas sobre a composição química dessas secreções, já mostraram resultados satisfatórios sobre a atividade farmacológica de muitas das substâncias ali encontradas (Schwartz et al. 2007). Geralmente a secreção apresenta aminas biogênicas, esteróides, peptídeos e alcalóides em sua composição. Estas substâncias podem possuir efeitos cardiotoxicos, neurotóxicos (Toledo & Jared 1995), alucinógenos (Pinto et al. 2009), anestésicos e, principalmente, antimicrobianos (Braga, Silva, Evangelista-Barreto & Protázio 2015, Yang, Shen, Liu & Kong 2016, Barnhart et al. 2017, Pereira et al. 2018, entre outros). Se os anfíbios não possuísem essas glândulas de secreção, ficariam facilmente expostos a patógenos que os atacariam através da pele, além de que, segundo Siano et al. (2014), a presença delas também pode fornecer informações taxonômicas e filogenéticas esclarecedoras para a história evolutiva dos animais.

Estudos recentes mostram que as secreções possuem moléculas antimicrobianas abundantes, principalmente peptídeos (Gibble, Rollins-Smith & Baera 2008, Lamadrid-

---

Feris, Coy-Barrera, Franco, Valencia & Arboleda 2015, Ladram & Nicolas 2016, Conlon et al. 2017), que atuam na imunidade inata do animal, podendo ser encontrados também em bactérias, fungos, plantas, animais invertebrados e em outros vertebrados (Mookherjee & Hancock 2007; Siano et al. 2014). Quando oriundos da secreção de anuros, podem apresentar características inibitórias ao crescimento de bactérias Gram positivas e principalmente de Gram negativas (Magalhães et al. 2008).

As secreções tegumentares dos anfíbios ainda podem apresentar diversos outros efeitos, como por exemplo, o estudo de Raghavan, Babu, Rajou & Sai (2010) onde, além de serem antivirais, alguns peptídeos presentes na secreção de anfíbios como a *Rana tigerina* (atual *Hoplobatrachus tigerinus*), podem apresentar ação anti-inflamatória e até mesmo antitumoral. Também trabalho recente de Monteiro et al. (2018), apontou uma inibição completa da infecção do vírus da dengue quando em contato com um peptídeo sintético derivado da secreção de *Boana semilineata* (antiga *Hypsiboas semilineatus*).

Estudos apontam que fatores como tamanho corporal, sexo e idade, podem ter influência na quantidade de secreção que fica depositada no tegumento dos sapos venenosos (Jeckel, Saporito & Grant 2015). Esses sapos são geralmente coloridos e possuem alcalóides na composição da sua secreção que são obtidos através da dieta (Saporito, Spande, Garraffo & Donnelly 2009, Hantak et al. 2013, Mina, Ponti, Woodcraft, Johnson & Saporito 2015, Hovey, Seiter, Johnson & Saporito 2018). Os antibióticos convencionais tem reduzido sua ação sobre algumas bactérias e o desenvolvimento de novos antibióticos a partir dos peptídeos encontrados nas secreções dos anfíbios anuros pode conter o problema dos microrganismos resistentes (Zaslhoff et al. 2002).

*Candida albicans* é um fungo oportunista, que em condições normais, está presente como um organismo comensal, sem causar malefício ao ser humano (De-Rossi et al. 2011). Porém, em pessoas com imunodeficiência, a *Candida* pode causar diversas infecções, muitas vezes crônicas, além de que a candidíase pode também se manifestar nos rins, fígado, baço e cérebro (Colombo & Guimarães 2003). Este fungo, assim como

---

outros microrganismos, vem adquirindo cada vez mais resistência (Vieira & Santos 2017), o que evidencia ainda mais que o estudo da atividade antimicrobiana da secreção de anfíbios poderá trazer informações farmacológicas importantes na terapêutica atual.

---

**REFERÊNCIAS**

- AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (BRASIL). CONJUNTURA DOS RECURSOS HÍDRICOS NO BRASIL 2017: relatório pleno / Agência Nacional de Águas. Brasília: ANA, 2017. 169p. <https://pt.scribd.com/document/369468392/Conjuntura-Completo-caf2236b>
- AMARO R.C, RODRIGUES M.T, YONENAGA-YASSUDA Y., CARNAVAL A.C. 2012. Demographic processes in the montane Atlantic reinflorest: Molecular and cytogenetics evidence from the endemic frog *Proceratophrys boiei*. Mol Phyl Evol. 62: 880-888.
- ANDERSON, K. 1991. Chromosome evolution in Holoartic treefrogs. In: D.M. Green and S.K. Session, eds. Amphibian cytogenetics and evolution. Academic Press, San Diego, California, USA. pp. 229-328.
- ANDRADE, E. M. B. 2010. Especiação sem barreiras e padrões de diversidade. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- BARNHART, K., FORMAN, M.E., UMILE, T.P., KUENEMAN, J., MCKENZIE, V., SALINAS, I., WOODHAMS, D.C. 2017. Identification of bufadienolides from the boreal toad, *Anaxyrus boreas*, active against a fungal pathogen. Microbial Ecology. 74(4), 990–1000.
- BECKER, C.G., FONSECA, C.R., HADDAD, C.F.B., BATISTA, R.F. & PRADO, P.I. 2007. Habitat split and the global decline of amphibians. Science, 318(5857), 1775–1777.
- BOGART, J.P. 1973. Evolution of anuran karyotypes. p. 337–349 in J. L. (ed.), Evolutionary Biology of the Anurans. Columbia, University of Missouri Press.
- BOLZAN, A.M.R., SACCOL, S.A. & DOS SANTOS, T.G. 2016. Composition and diversity of anurans in the largest conservation unit in Pampa biome, Brazil. Biota Neotropica, 16(2), 1–14.

BRAGA, J.R.M., SILVA, M.A., EVANGELISTA-BARRETO, N.S. & PROTÁZIO, A.S. 2015. Atividade do veneno de *Rhinella jimi* (Stevaux, 2002) (Anura: Bufonidae) sobre cepas microbianas. Rev. Biol. Ciênc. Terra. 15(2): 27-33.

BUSIN, C.S., ANDRADE, G.V., BERTOLDO, J., DEL GRANDE, M.L., UETANABARO, M. & RECCO-PIMENTEL, S.M. 2008. Cytogenetic analysis of four species of *Pseudis* (Anura, Hylidae), with the description of ZZ/ZW sex chromosomes in *P. tocantins*. Genetica, 133(2), 119–127.

BUSIN, C.S., LIMA, A.P., DE ALMEIDA PRADO, C.P., STRÜSSMANN, C., JÚNIOR, S.S. & RECCO-PIMENTEL, S.M. 2006. Chromosomal differentiation of populations of *Lysapsus limellus limellus*, *L. l. bolivianus*, and of *Lysapsus caraya* (Hylinae, Hylidae). Micron, 37(4), 355–362.

BUSIN, C.S., VINCIPROVA, G. & RECCO-PIMENTEL, S.M. 2001. Chromosomal rearrangements as the source of variation in the number of chromosomes in *Pseudis* (Amphibia, Anura). Genetica. 110(2), 131–141.

CAIRO, S.L. & ZALBA, S.M. 2007. Effects of a paved road on mortality and mobility of red bellied toads (*Melanophryniscus* sp.) in Argentinean grasslands. Amphibia-Reptilia, 28(3), 377–385.

CARDOZO, D.E., LEME, D.M., BORTOLETO, J.F., CATROLI, G.F., BALDO, D., FAIVOVICH, J., KOLENC, F., SILVA A.P.Z., BORTEIRO, C., HADDAD, C.F.B., KASAHARA, S. 2011. Karyotypic data on 28 species of *Scinax* (Amphibia: Anura: Hylidae) diversity and informative variation. Copeia 2011:251–263

CARVALHO, K.A., GARCIA, P.C.A. & RECCO-PIMENTEL, S.M. 2009. Cytogenetic comparison of tree frogs of the genus *Aplastodiscus* and the *Hypsiboas faber* group (Anura, Hylidae). Genet. Mol. Res. 8 (4): 1498-1508.

CASTELLANO, S., ROSSO, A., DOGLIO, S. & GIACOMA, C. 1999. Body size and calling variation in the green toad (*Bufo viridis*). Journal of Zoology, 248(1), 83–90.

- COLLEY, E. & FISCHER, M.L. 2013. Especiação e seus mecanismos: histórico conceitual e avanços recentes. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, 20(4), 1671–1694.
- COLOMBO, A.L., GUIMARÃES, T. 2003. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 36(5), 599-607.
- CONLON, J.M., KOLODZIEJEK, J. & NOWOTNY, N. 2004. Antimicrobial peptides from ranid frogs: Taxonomic and phylogenetic markers and a potential source of new therapeutic agents. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. 1696(1), 1–14.
- DE ROSSI, T., LOZOVY, M.A.B., SILVA, V. DA, FERNANDES, E.V., GERALDINO, T.H., COSTA, I. C., FELIPE, I. 2011. Interações entre *Candida albicans* e hospedeiro. *Semina: Ciências Biológicas e Da Saúde*. 32(1), 15–28.
- DENARO, L. 1972. Karyotypes of Leptodactylidae anurans. *J. Herpetol*. 6:71-74.
- DRH, & SEMA-RS. (2008). *Relatório anual sobre a situação dos recursos hídricos no estado do Rio Grande do Sul – edição 2007/2008*. Retrieved January 10, 2017, from [http://www.sema.rs.gov.br/conteudo.asp?cod\\_menu=294&cod\\_conteudo=6281](http://www.sema.rs.gov.br/conteudo.asp?cod_menu=294&cod_conteudo=6281).
- DRH, & SEMA-RS. (2012). *Elaboração dos serviços de consultoria referente a fase A e B do Plano de Bacia do rio Taquari-Antas fase B – cenários futuros para a gestão dos recursos hídricos na bacia hidrográfica Taquari-Antas e enquadramento das águas superficiais*.
- DRH, & SEMA-RS. (2016). *Plano da Bacia Hidrográfica dos rios Apuaê-Inhandava Fases A, B e C. Relatório Técnico Rt 3. Diagnóstico da bacia*.
- ETEROVICK P.C., CARNAVAL A.C.O.Q., BORGES-NOJOSA, D.M., SILVANO, D.L., SEGALLA, M.V. & SAZIMA, I. 2005. Amphibian Declines in Brazil: An Overview. *Biotropica*. 37(2), 166-179.

---

FERRO, J. M., CARDOZO, D. E., SUÁREZ, P., BOERIS, J. M., BLASCO-ZÚÑIGA, A., BARBERO, G., GOMES, A., GAZONI, T., COSTA, W., NAGAMACHI, Y.C., RIVERA, M., PARISE-MALTEMPI, P.P., WILEY, J.E., PIECZARKA, J.C., HADDAD, C.F.B., FAIVOVICH, J. & BALDO, D. 2018. Chromosome evolution in Cophomantini (Amphibia, Anura, Hylinae). PLoS ONE, 13(2), 1–29.

FICETOLA, G.F., MAZEL, F., & THUILLER, W. 2017. Global determinants of zoogeographical boundaries. Nature Ecology and Evolution. 1(4), 1–7.

FONTE, L.F.M. da. 2010. Variação morfológica e na estrutura do canto em *Scinax granulatus* (Peters, 1871) (Anura Hylidae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

FROST, D.R. Amphibian species of the world: an online reference. Version 6.0 (Date of access: 04/out/2018). Available from: URL: <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>.

FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PROTEÇÃO AMBIENTAL HENRIQUE LUIZ ROESSLER – RS. 2016. Qualidade ambiental - região hidrográfica do Guaíba. Qualidade das águas da bacia hidrográfica do Rio das Antas e Rio Taquari. Retrieved January 17, 2017, from [http://www.fepam.rs.gov.br/qualidade/qualidade\\_taquari\\_antas/taquariantas.asp](http://www.fepam.rs.gov.br/qualidade/qualidade_taquari_antas/taquariantas.asp).

FUNK, W.C., CAMINER, M. & RON, S.R. 2012. High levels of cryptic species diversity uncovered in Amazonian frogs. Proc. R. Soc. B. 279, 1806–1814.

FUTUYMA, D. 2009. Biologia Evolutiva, 3 ed. Funpec, Ribeirão Preto.

GALLS, J.G. & PARDUE, M.L. 1969. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparation. Proc Natl Acad Sci USA. 64 pp 600-604.

GIBBLE, R.E., ROLLINS-SMITH, L. & BAER, K.N. 2008. Development of an assay for testing the antimicrobial activity of skin peptides against the amphibian chytrid fungus (*Batrachochytrium dendrobatidis*) using *Xenopus laevis*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 71(2), 506–513.

---

GREEN, D.M. & SESSIONS, S.K. 1991. Nomenclature for chromosomes. In: Amphibian cytogenetics and evolution. San Diego: Academic Press 431–432pp.

HANNAH, L.J. 2011. Climate Change Biology. Elsevier, San Diego.

HANTAK, M.M., GRANT, T., REINSCH, S., MCGINNITY, D., LORING, M., TOYOOKA, N. & SAPORITO, R.A. 2013. Dietary alkaloid sequestration in a poison frog: an experimental test of alkaloid uptake in *Melanophryniscus stelzneri* (Bufonidae). Journal of Chemical Ecology. 39(11–12), 1400–1406.

HEITZ E. 1928. Das heterochromatin der moose. I Jahrb Wiss Botanik. 69 762-818.

HENDERSON, A. S., WARBURTON, D. & ATWOOD, K. C. 1972. Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement. Proc Natl Acad Sci USA. 69:3394-3398.

HOVEY, K.J., SEITER, E.M., JOHNSON, E.E. & SAPORITO, R.A. 2018. Sequestered alkaloid defenses in the dendrobatid poison frog *Oophaga pumilio* provide variable protection from microbial pathogens. Journal of Chemical Ecology, 44(3), 312–325.

HOWELL, W.M. & BLACK, D.A. 1980. Controlled silver staining of nucleolar organizer regions with a protective colloidal developer: a –1 step method. Experientia 36:1014–1015.

IIZUKA, K., MATSUDA, Y., YAMADA, T., NAKAZATO, T. & SESSIONS, S.K. 2013. Chromosomal localization of the 18s and 28s Ribosomal RNA genes using fish and AgNO<sub>3</sub> banding in *Hynobius quepaertensis*, *H. tsuensis* and *Onychodactylus koreanus* (Urodela: Hynobiidae). Current Herpetology. 32(2), 89–101.

IOP, S., SANTOS, T.G. DOS. & CECHIN, S.Z. 2016. Anfíbios anuros dos Campos Sulinos: espécies com ocorrência nas áreas campestres do Pampa e da Mata Atlântica. Porto Alegre: Rede Campos Sulinos UFRGS.

JAEGER, J.A.G., BOWMAN, J., BRENNAN, J., FAHRIG, L., BERT, D., BOUCHARD, J., VON TOSCHANOWITZ, K.T. 2005. Predicting when animal

---

populations are at risk from roads: An interactive model of road avoidance behavior. *Ecological Modelling*. 185(2–4), 329–348.

JARED, C., ANTONIAZZI, M.M., JORDÃO, A.E.C., SILVA, J.R.M.C., GREVEN, H. & RODRIGUES, M.T. 2009. Parotoid macroglands in toad (*Rhinella jimi*): Their structure and functioning in passive defence. *Toxicon*, 54(3), 197–207.

JECKEL, A.M., SAPORITO, R.A. & GRANT, T. 2015. The relationship between poison frog chemical defenses and age, body size, and sex. *Frontiers in Zoology*. 12(1).

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

KING, M. 1980. C-banding studies on australian hylid frogs: secondary constriction structure and the concept of euchromatin transformation. *Chromosoma*. 80:191-217.

KWET, A. 2008. New species of *Hypsiboas* (Anura: Hylidae) in the pulchellus group from southern Brazil. *Salamandra*, 44(1), 1–14.

KWET, A., DI-BERNARDO, M. 1999. Anfíbios, amphibien, amphibians. Porto Alegre: EDIPUCRS.

LABORATÓRIO DE HERPETOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. 2010. Lista de Espécies de Anfíbios do Rio Grande Do Sul. Retrieved January 07, 2018, from <http://www.ufrgs.br/herpetologia>.

LADRAM, A., & NICOLAS, P. 2016. Antimicrobial peptides from frog skin: biodiversity and therapeutic promises. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 21, 1341–71.

LAMADRID-FERIS, F., COY-BARRERA, E.D., FRANCO, O.L., VALENCIA, J.A. & ARBOLEDA, V.J. W. 2015. Identification of compounds from white frog (Anura: Hylidae) cutaneous secretions with potential to be used in biotechnological processes. *Pharmacologyonline*, 2, 118–123.

LEMA, T.de & MARTINS, L.A. 2011. Anfíbios do Rio Grande Do Sul catálogo, diagnoses, distribuição, iconografia. Porto Alegre: EDIPUCRS.

- LEVAN, A., FREDGA, K. & SANDBERG, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*. 52, 201-220.
- LILLYWHITE, H.B. 2006. Water relations of tetrapod integument. *Journal of Experimental Biology*, 209, 202–226.
- LOURENÇO, L.B., TARGUETA, C.P., BALDO, D., NASCIMENTO, J., GARCIA, P.C.A., ANDRADE, G.V., HADDAD, C.F.B. & RECCO-PIMENTEL, S.M. 2015. Phylogeny of frogs from the genus *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae) inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 92: 204-216.
- LOURENÇO, L.B., GARCIA, P.C. & RECCO-PIMENTEL, S.M. 2003. Intrageneric karyotypic divergence in *Scythrophrys* (Anura, Leptodactylidae) and new insights on the relationship with the leptodactylid *Paratelmatobius*. *Ital. J. Zool.*, 70 (2): 183-190.
- MAGALHÃES, B.S., MELO, J.A., LEITE, J.R., SILVA, L.P., PRATES, M.V., VINECKY, F., BARBOSA, E.A., VERLY, R.M., MEHTA A., NICOLI, J.R., BEMQUERER, M.P., ANDRADE, A.C., BLOCH, C. JR. 2008. Post-secretory events alter the peptide content of the skin secretion of *Hypsiboas raniceps*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.n377(4), p. 1057-61.
- MARTINO, A.L. & SINSCH, U. 2002. Speciation by polyploidy in *Odontophrynus americanus*. *Journal of Zoology*, The Zoological Society of London, Cambridge University Press, 257:(June), 67–81.
- MEDEIROS, L.R., ROSSA-FERES, D.C., & RECCO-PIMENTEL, S.M. 2003. Chromosomal differentiation of *Hyla nana* and *Hyla sanborni* (Anura, Hylidae) with a description of NOR polymorphism in *H. nana*. *Journal of Heredity*, 94(2), 149–154.
- MINA, A.E., PONTI, A.K., WOODCRAFT, N.L., JOHNSON, E.E., & SAPORITO, R.A. 2015. Variation in alkaloid-based microbial defenses of the dendrobatid poison frog *Oophaga pumilio*. *Chemoecology*. 25(4), 169–178.
- MONTEIRO, J.M.C., OLIVEIRA, M.D., DIAS, R.S., NACIF-MARÇAL, L., FEIO, R.N., FERREIRA, S.O., PAULA, S.O. 2018. The antimicrobial peptide HS-1 inhibits dengue virus infection. *Virology*. 514(July 2017), 79–87.

- MOOKHERJEE, N. & HANCOCK, R.E.W. 2007. Cationic host defence peptides: Innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(7–8), 922–933.
- MORESCALCHI, A. 1973. Amphibia. *In*: Chiarelli, A. B. and Capana E. (Eds.), *Cytotaxonomy and vertebrate evolution*. Academic Press, New York, pp.233-348.
- NOGUEIRA L., PAIM, F., DINIZ D., SOLÉ, M., AFFONSO P., SIQUEIRA, S. & SAMPAIO, I. 2015. Cytogenetic analysis of *Scinax auratus* and *Scinax eurydice* (Anura, Hylidae) with emphasis on cytotaxonomy. *Comp Cytogenet.* 2015; 9(2): 227–236.
- OLIVEIRA, B. DE., MORAES, M.S.S., DERTÔNIO, D., FARIA, R.G., & PANTALEÃO, S.M. 2013. Cytogenetic study of *Leptodactylus fuscus* and *L. latrans* (Anura: Leptodactylidae) from the semiarid Brazilian Caatinga scrublands. *Phyllomedusa*. 12(2), 125–133.
- PEIXOTO, M.A.A., OLIVEIRA, M.P.C., FEIO, R.N. & DERGAM, J.A. 2016. Karyological study of *Ololygon tripui*, (Anura, Hylidae) with comments on chromosomal traits among populations. *Comparative Cytogenetics*, 10(4), 505–516.
- PEREIRA, K.E., CROTHER, B.I., SEVER, D.M., FONTENOT, C.L., POJMAN, J.A., WILBURN, D.B., & WOODLEY, S.K. 2018. Skin glands of an aquatic salamander vary in size and distribution and release antimicrobial secretions effective against chytrid fungal pathogens. *The Journal of Experimental Biology*, (June).
- PINTO, E.G., FELIPE, A.C., NADALETTO, D., RALL, V.L.M. & MARTINEZ, R.M. 2009. Investigação da atividade antimicrobiana do veneno de *Rhinella icterica* (Amphibia, Anura). *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 68(3): 471-475.
- PIRES, A.S., FERNANDEZ, F.A.S., & BARROS, C.S. 2006. Vivendo em um mundo em pedaços: efeitos da fragmentação florestal sobre comunidades e populações animais. *In*: Rocha, C.F.C., Bergallo, H., Van Sluys, M. & Alves, M.A.S. (Eds). *Biologia da Conservação: essências*. São Carlos: Rima Editora.

---

POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. A Vida dos Vertebrados. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

QUEIROZ, K.DE. 1998. The General Lineage Concept of Species , Species Criteria , and the Process of Speciation and Terminological Recommendations. *Endless Forms: Species and Speciation*, 57–75.

QUINDERÉ, Y.R.S.D., LOURENÇO, L.B., ANDRADE, G.V., TOMATIS, C., BALDO, D. & RECCO-PIMENTEL, S.M. 2009. Polytypic and polymorphic cytogenetic variations in the widespread anuran *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leiuperidae) with emphasis on nucleolar organizing regions. *Biol Res.* 42(1), 79–92.

RAGHAVAN, K., BABU, M., RAJARAM, R. & SAI, K.P. 2010. Efficacy of frog skin lipids in wound healing. *Lipids in Health and Disease.* 74(9), 1-7.

RIBEIRO, M.C., METZGER, J.P., MARTENSEN, A.C., PONZONI, F.J., & HIROTA, M.M. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation.* 142(6), 1141–1153.

RIESEBERG, Loren H. Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends in Ecology and Evolution*, London, v.16, n.7, p.351-357. 2001.

ROSA, C., AGUIAR, O.JR., GIARETTA, A.A. & RECCO-PIMENTEL, S.M. 2003. Karyotypic variation in the genus *Megalosia* (Anura, Leptodactylidae) with the first description of a B chromosome in leptodactylid frogs. *Copeia*, 2003(1):166-174.

ROSSA-FERES et al. 2017. Revisões em zoologia: Mata Atlântica. Lista de espécies, histórico dos estudos, biologia e conservação. Emygdio Leite de Araujo Monteiro-Filho, Carlos Eduardo Conte (orgs.). 1. ed. Curitiba: Ed. UFPR.

RUIZ, I.R.G., SOMA, M. & BEÇAK, W. 1981. Nucleolar organizer region and constitutive heterocromatin in polyploid species of the genus *Odontophrynus* (Amphibia, Anura). *Cytogen. Cell Genet.* 29:84-98.

---

SANTOS-FILHO, S.F., SILVA, J.F.DE.A., CABRAL, L.J.L.S. 2017. Áreas preferenciais para alopatria com base no relevo do Piauí (Brasil): um estudo inferencial. *Revista Brasileira de Geografia Física* 10(3): 799-811.

SAPORITO, R.A., SPANDE, T.F., GARRAFFO, H.M. & DONNELLY, M.A. 2009. Arthropod alkaloids in poison frogs: A review of the “dietary hypothesis.” *Heterocycles*. 79(C), 277–297.

SCHIAVETTI, A.F.M., CAMARGO, A. 2002. Conceitos de Bacias Hidrográficas: Teorias e Aplicações. Bahia: Editus. pp. 27. Consultado em 18 de Janeiro de 2018. <https://pt.scribd.com/document/369461421/Conceitos-de-Bacias-Hidrograficas>

SCHMID, M. 1982. Chromosome banding in Amphibia VII Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. *Chromosoma*. 87: 327-44.

SCHMID, M., STEINLEIN, C. & FRIELD, R.DE., ALMEIDA, C. G., HSSF, T., HILLIS, D.M. & CUELLMAN, W.E. 1990. Chromosome banding in Amphibia XV Two types of Y chromosome and heterochromatin hypervariability in *Gastrotheca pseustes* (Anura Hylidae). *Chromosoma* 99:413-23.

SCHWARTZ, C.A., CASTRO, M.S., PIRES JÚNIOR, O.R., MACIEL, N.M., SCHWARTZ, E.N.F. & SEBBEN, A. 2007. Princípios bioativos da pele de anfíbios: panorama atual e perspectivas. *Herpetologia no Brasil II* 2: 146-168.

SEGALLA, M.V., CARAMASCHI, U., CRUZ, C.A.G., GRANT, T., HADDAD, C.F.B., GARCIA, P.C. D.A., BERNECK, B.V.M. & LANGONE, J.A. 2016. SBH Brazilian Amphibians: List of Species, 5, 34–46.

SIANO, A., GATTI, P.I., IMAZ, M.S., ZERBINI, E., SIMONETTA, A.C., LAJMANOVICH, R. & TONARELLI, G.G. 2014. A comparative study of the biological activity of skin and granular gland secretions of *Leptodactylus latrans* and *Hypsiboas pulchellus* from Argentina. *Rec. Nat. Prod.* 8(2): 128–135.

SILVA, A.P.Z., HADDAD, C.F.B. & KASAHARA, S. 2000. Chromosomal studies on five species of the genus *Leptodactylus* Fitzinger, 1826 (Amphibia, Anura) using differential staining. *Cytobios* 103: 25–38.

- 
- SILVA, H.R. DA. & BENMAMAN, P. 2008. Uma nova espécie de *Hylodes Fitzinger* da Serra da Mantiqueira, Minas Gerais, Brasil (Anura: Hylodidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 25(1), 89–99.
- SILVANO, D.L., & SEGALLA, M.V. 2005. Conservation of Brazilian amphibians. *Conserv Biol*. 19(3), 653–658.
- SUMNER, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 83:438–442.
- SUMNER, A.T. 1990. C-banding and related methods. In: *Chromosome banding*. Unwin Hyman. Ed. London. 39-90.
- SUMNER, A.T. 1994. Functional aspects of the longitudinal differentiation of chromosomes. *Eur J Histochem*. 38:91-109.
- SCHWARTZ, C. A., CASTRO, M. DE S., PIRES JR., O, R., MACIEL, N. M., SCHWARTZ, E. N. F. & SEBEN, A. 2007. Princípios bioativos da pele de anfíbios: panorama atual e perspectivas. *Herpetologia do Brasil II*. In: Nascimento, L. B.; Oliveira, M. E. Sociedade Brasileira de herpetologia, Belo Horizonte: PUC Minas, v. 2, p. 146-168.
- TARGUETA, C.P., VITTORAZZI, S.E., GATTO, K.P., BRUSCHI, D.P. & VEIGA-MENONCELLO, A.C.P. 2018. Anuran cytogenetics: an overview.
- TEDESCO, C.D., ZANELLA, N. Parque natural municipal de Sertão. Passo Fundo: Ed. Universidade de Passo Fundo, 2014.
- TOLEDO, R.C. & JARED, C. 1995. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. *Comp. Biochem. Phys. A* 111(1): 1–29.
- VANZOLINI, P.E. 1992. Paleoclimas e especiação em animais da América do Sul tropical. *Estudos Avançados*, 6, 41-65.
- VEIGA-MENONCELLO, A.C., LIMA, A.P. & RECCO-PIMENTEL, S.M. 2003. Cytogenetics of two central Amazonian species of *Colostethus* (Anura, Dendrobatidae) with nidicolous tadpoles. *Caryologia*, 56:253-260.

---

VIEIRA, A.J.H. & SANTOS, J.I. 2017. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. Rev. Bras. Anal. Clin. 49(2178–5317): 2235–239.

WOLFE, K. 2003. Speciation reversal. Nature, 422(6927), 25–26.

WU, Z., LI, Y., & MURRAY, B.R. 2006. Insular shifts in body size of rice frogs in the Zhoushan Archipelago, China. Journal of Animal Ecology, 75(5), 1071–1080.

YANG, H.L., SHEN, Z.Q., LIU, X. & KONG, Y. 2016. Two novel antimicrobial peptides from skin venoms of spadefoot toad *Megophrys minor*. Chin. J. Nat. Medicines 14(4): 294–298.

YOSHIDA, K. YOKOUCHI, M., NAGAO, K., ISHII, K., AMAGAI, M. & KUBO, A. 2013. A. Functional tight junction barrier localizes in the second layer of the stratum granulosum of human epidermis. Journal of Dermatological Sciences.71:89–99.

ZASLOFF, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature, 415: 389- 395

### **3 PRODUÇÃO CIENTÍFICA I**

**Comparative cytogenetic of nine populations of the *Rhinella* group (*Anura*, *Bufo*nidae) with highlight on their conservative karyotype**

Journal:	<i>Genetics and Molecular Biology</i>
Manuscript ID:	GMB-2018-0139.R1
Manuscript Type:	Short Communication
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Bruschi, Daniel; Universidade Federal do Parana Setor de Ciencias Biologicas, Genetics Sousa, Debora; Universidade Federal do Parana (UFPR), Departamento de Genetica Soares, Amanda; Universidade Federal do Parana, Genetics Carvalho, Kátia; Universidade Estadual de Campinas, Genética e Evolução, Microbiologia e Imunologia Busin, Carmen; Universidade de Passo Fundo, Ciências Biológicas Ficanha, Natalia; Universidade de Passo Fundo, Ciências Biológicas Lima, Albertina; Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia, Ecologia Andrade, Gilda; Universidade Federal do Maranhao, Biologia Recco-Pimentel, Shirlei; Universidade Estadual de Campinas Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional
Keyword:	Bufo noid toads, nuclear organizing region, chromosomal evolution

SCHOLARONE<sup>®</sup>  
Manuscripts

<https://mc04.manuscriptcentral.com/gmb-scielo>

1  
2  
3  
4  
5 **Comparative cytogenetics of nine populations of the *Rhinella* genus**  
6 **(Anura, Bufonidae) with highlight on their conservative karyotype**  
7  
8  
9

10 Daniel Pacheco Bruschi<sup>1, 2</sup>; Débora Yasmim Sousa<sup>1</sup>; Amanda Soares<sup>1</sup>; Klélia Aparecida  
11 de Carvalho<sup>2, 3</sup>; Carmen Sílvia Busin<sup>4</sup>; Natália Cristine Ficanha<sup>5</sup>; Albertina Pimentel  
12 Lima<sup>5</sup>; Gilda Vasconcellos Andrade<sup>6</sup> and Shirlei Maria Recco-Pimentel<sup>2</sup>  
13  
14

15 <sup>1</sup>Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR),  
16 81531-980 Curitiba, Paraná, Brazil.  
17

18 <sup>2</sup> Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de  
19 Campinas (UNICAMP), 13083-863 Campinas, São Paulo, Brazil.  
20

21 <sup>3</sup> Departamento de Genética e Evolução, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, Universidade  
22 Estadual de Campinas (UNICAMP), 13083-863 Campinas, São Paulo, Brazil.  
23

24 <sup>4</sup> Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais (PPGCI/Amb),  
25 Universidade de Passo Fundo (UPF), 99052-900 Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil.  
26

27 <sup>5</sup> Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), 69060-001 Manaus, Amazonas, Brazil.  
28

29 <sup>6</sup> Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do  
30 Maranhão-UFMA, 65080-040 São Luis, Maranhão, Brazil  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37

38 **Running title:** Cytogenetics of *Rhinella* genus  
39

40 **Key-words:** Bufonid toads, nucleolar organizing region, chromosomal evolution.  
41  
42  
43

44 **Correspondence author:** Daniel Pacheco Bruschi, Laboratório de Citogenética Animal  
45 e Mutagênese Ambiental, Universidade Federal do Paraná (UFPR), 81531-980 Curitiba,  
46 Paraná, Brazil. E-mail: [danielpachecobruschi@gmail.com](mailto:danielpachecobruschi@gmail.com)  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Abstract

*Rhinella* genus is one of the most diverse bufonid toads, currently composed by 92 valid species and naturally distributed throughout different Neotropical ecoregions. Here, we analyses nine Brazilian populations of toads representing species of the *Rhinella margaritifera* and *Rhinella marina* groups. These new data include the first description of the karyotypes of the *R. hoogmoedi* and *R. proboscidae*, as well as other, taxonomically unresolved forms. Chromosomal analysis of the populations revealed pronounced chromosomal uniformity ( $2n=22$ ), including the diploid number and chromosomal morphology. Three different NOR-bearing chromosomes were identified: in the subterminal region of pair 10q in *R. hoogmoedi*, *Rhinella* sp. 1 and *Rhinella* sp. 2, in subterminal region of 7p in *R. proboscidae* and *Rhinella* cf. *margaritifera* while in *R. howelli* and *R. icterica* was detected in interstitial region of 7p. Karyotypic uniformity of the genus permits the inference of interspecific chromosome homeologies and evolutionary changes in the NOR-bearing chromosome may represent an informative character in species group level. The review of the cytogenetic data of the *Rhinella* species, together with the new karyotypes reported here, will contribute to the understanding of the chromosomal evolution these toads that, despite the ample distribution of many forms, karyotypes are highly conserved.

Cytogenetic data provide a powerful tool for the evaluation of the taxonomic (Cuevas, 2008; Fávero *et al.*, 2011; Funk *et al.*, 2012) and evolutionary relationships (Veiga-Menoncello *et al.*, 2014) among anuran species. The understanding of chromosomal characters help to identify synapomorphies (Cunningham and Cherry, 2004; Targueta *et al.*, 2012; Suárez *et al.*, 2013; Ferro *et al.*, 2018) and homoplasies

1  
2  
3 (Cardozo *et al.*, 2011), and when combined with molecular phylogenetic inferences, can  
4 contribute to the understanding of the role of chromosomal rearrangements in the  
5 diversification of a lineage (Veiga-Menoncello *et al.*, 2014). Evolutionary analysis of  
6 amuran cytogenetics has provided important additional insights for phylogenetic  
7 inferences (Loureço *et al.*, 2015; Targueta *et al.*, 2018). Recent shifts in analytical  
8 approaches have allowed more systematic evaluation, which have traced the  
9 evolutionary changes in the chromosomal complement (for e.g., see Loureço *et al.*,  
10 2008), both within and among amuran groups. However, the lack of cytogenetic data for  
11 many groups remains a limiting factor, especially if taking in account the considerable  
12 taxonomic richness of the order Amura, which has at least 6950 species (Frost 2018).  
13 One interesting example is the genus *Rhinella*, a cosmopolitan group currently  
14 composed of 92 valid species (Frost, 2018), although there is considerable evidence of  
15 the existence of a number of cryptic species and undescribed taxa (Fouquet *et al.*, 2007).  
16 Most of the species of this genus are arranged in species groups (*R. crucifer*, *R. festae*,  
17 *R. granulosa*, *R. margaritifera*, *R. marina*, *R. spinulosa* and *R. veraguensis*), but some  
18 taxa have not been assigned to any existing group (e.g. Chaparro *et al.*, 2007; Moravec  
19 *et al.*, 2014).

20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
Cytogenetic analyses of the genus *Rhinella* revealed a pronounced  
chromosomal uniformity, including the diploid number and chromosomal morphology,  
and some species, such as *Rhinella icterica*, *Rhinella jimi*, and *Rhinella schneidleri*,  
cannot even be distinguished by their C-banding or the distribution of their NOR  
(Kasahara *et al.*, 1996; Amaro-Ghilardi *et al.*, 2008). However, alternative NOR-  
bearing chromosomes have been identified in other species of the genus (Silva *et al.*,  
2010; Baraquet *et al.*, 2011). The present study is based on a compilation of the  
available chromosomal data for *Rhinella*, combined with karyotypes obtained from nine

1  
2  
3 Brazilian populations of toads representing species of the *Rhinella margaritifera* and  
4 *Rhinella marina* groups. These new data include the first description of the karyotypes  
5 of two species of the *R. margaritifera* group (*Rhinella hoogmoedi* and *Rhinella*  
6 *proboscidae*), as well as other, taxonomically unresolved forms.  
7  
8  
9

10  
11 The specimens and their respective collecting localities are listed in Table 1.  
12  
13 The collection of specimens was authorized by SISBIO/Chico Mendes Institute for the  
14 Conservation of Biodiversity, through license number 20266-1. Voucher specimens  
15 were deposited in the Zoology Museum (ZUEC) "Prof. Dr. Adão José Cardoso" at  
16 Campinas State University (UNICAMP) in São Paulo, Brazil. The chromosomal  
17 samples were prepared from suspensions of intestinal epithelial cells, following King  
18 and Rofe (1976) and Schmid (1978). The chromosomes were stained with 10% Giemsa  
19 or submitted to the Ag-NOR technique (Howell and Black, 1980). In addition to these  
20 primary data, the Web of Science (Institute of Scientific Information, Thomson  
21 Scientific) bibliographic database was searched for all the published cytogenetic data  
22 available on the genus *Rhinella*.  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34

35 Chromosomal analysis of the nine *Rhinella* populations revealed conservative  
36 karyotype features, beginning with the diploid number ( $2n = 22$ ), which was consistent  
37 across all species (see Table 2; Fig 1). All karyotypes consist of six metacentric (pairs  
38 1–3, 5, 8 and 9; Fig. 1) and five submetacentric pairs (pairs 4, 6, 7, 10 and 11; Fig.1).  
39 While relatively few *Rhinella* species have been analyzed cytogenetically (Table 2), the  
40 available data are remarkable for their uniformity, with only metacentric and  
41 submetacentric pairs being found in any species. While small differences in the number  
42 of metacentric and submetacentric pairs are found in some studies (Amaro-Ghilardi *et*  
43 *al.*, 2008; Baraquet *et al.*, 2011), it seems likely that this has been due to the application  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 of different criteria for the classification of the chromosomes, rather than any real  
4 variation among species in their karyotypes.  
5

6  
7 Three different NOR-bearing chromosomes were identified in the present study.  
8  
9 In *R. hoogmoedi* (Bertioga, SP), *Rhinella* sp. 1 (Bacabeira, MA) and *Rhinella* sp. 2  
10 (Parque Viruá, RR), the silver impregnation method detected a NOR site in the  
11 subterminal region of the long arm of pair 10, while in *R. proboscidea* (Reserva Ducke,  
12 AM) and *Rhinella* cf. *margaritifera* (Laranjal do Jari, AP) the NOR was located in the  
13 subterminal region of the short arm of the homologs of pair 7 (Fig. 2). In two species of  
14 the *R. marina* group, *Rhinella henzeli* and *Rhinella icterica*, from both Passo Fundo and  
15 Sertão (RS), NOR-bearing chromosomes were detected in the interstitial region of the  
16 short arm of the homologs of pair 7, in both sampled populations (Fig. 2).  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26

27 A similar degree of uniformity has been observed in inter-population cytogenetic  
28 studies of other *Rhinella* species. For example, considerable karyological uniformity  
29 has been found in the *R. icterica* populations from three sites in the Brazilian state of  
30 São Paulo (Kasahara *et al.*, 1996; Baldissera *et al.*, 1999; Azevedo *et al.*, 2003) and in  
31 the two populations from Rio Grande do Sul (present study). The *cururu* toad, *R.*  
32 *icterica*, occurs in southern Brazil, ranging from Rio Grande do Sul north to Bahia,  
33 Minas Gerais and Goiás, eastern Paraguay, and westward to Misiones, in Argentina,  
34 and is considered to be a cosmopolitan species, occurring in different habitats and  
35 altitudes within the Atlantic Forest biome. The cytogenetic data available on the  
36 populations of *R. schneideri*, another species distributed widely in South America,  
37 indicate a similar pattern of uniformity (Kasahara *et al.*, 1996; Azevedo *et al.*, 2003;  
38 Amaro-Ghilardi *et al.*, 2008; Baraquet *et al.*, 2011).  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51

52 The overview of the data available for the different *Rhinella* species (Table 2)  
53 indicates that the position of the NOR site is relatively stable within phenotypic groups  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 to genus. The *Rhinella* species groups are determined based on phenotypic criteria  
4 (Frost 2018), and while the monophyly of the *Rhinella granulosa* group, has been  
5 supported by molecular phylogenetic analyses (Pereyra *et al.*, 2016), this has not been  
6 confirmed in the others. Karyotype data are available for four of these species groups  
7 (Table 2). In all the species of the *Rhinella crucifera* group, the NOR is found in the  
8 subtelocentric region of pair 7p, whereas in the *R. marina* group, it is found in an  
9 interstitial region of the 7p, and in the *R. granulosa* group, it is located in the terminal  
10 region of the homologs of pair 5q. In the *R. margaritifera* group, by contrast, the NOR  
11 site is found in the subterminal region of the homologs of pair 10q or the interstitial  
12 region of pair 7p (Table 2).  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23

24 As the karyotypic uniformity of the genus permits the inference of interspecific  
25 chromosome homeologies, it seems reasonable to conclude that the evolutionary  
26 changes in the NOR-bearing chromosome may represent a putative synapomorphy in  
27 each species group. However, the confirmation of this hypothesis would require the  
28 analysis of a much larger dataset, to permit the more reliable evaluation of potential  
29 synapomorphies. If confirmed, the variation in the characteristics of the NOR-bearing  
30 chromosomes would provide valuable insights for the understanding of the phylogenetic  
31 relationships among the *Rhinella* species groups. In the *R. granulosa* group, for  
32 example, Pereyra *et al.* (2016) identified NORs in the homologs of pair 5 as an  
33 additional synapomorphy in this group. A similar scenario can be inferred for both the  
34 *R. crucifera* and *R. marina* groups, but not the *R. margaritifera* group, given the variation  
35 already observed in the NOR-bearing chromosomes of the different species of this  
36 group.  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51

52 The *R. margaritifera* group is currently composed of 19 species (Vaz-Silva *et*  
53 *al.*, 2015), with the NOR being found in the homologs of pair 10 (long arm) in *R.*  
54  
55  
56

1  
2  
3 *hoogmoedi* (present study), and in *Rhinella* sp. 1 from Maranhão and *Rhinella* sp. 2  
4 from Roraima. Baldissera *et al.* (1999) described the karyotype in specimens of the *R.*  
5 *margaritifera* group from Tucuruí, in the Brazilian state of Pará. In the present study,  
6  
7 three populations (*Rhinella* sp. 1, *Rhinella* sp. 2 and *Rhinella* cf. *margaritifera*) were  
8  
9 assigned to the *R. margaritifera* group based on morphological and biogeographical  
10  
11 criteria, although it was not possible to resolve the taxonomic status of these  
12  
13 populations based on their karyotypes. Despite their morphological similarities, the  
14  
15 *Rhinella* cf. *margaritifera* specimens from Laranjal do Jari can be distinguished from all  
16  
17 the other populations assigned to the *R. margaritifera* group based on the NOR-bearing  
18  
19 chromosome and for phenotypic features (Lima - personal observation), which may  
20  
21 indicate the presence of a novel taxonomic entity, which requires further investigation.  
22  
23  
24  
25

26  
27 The taxonomic status of the species of the *R. margaritifera* group remains  
28  
29 uncertain, and phylogenetic inferences indicate the existence of a number of cryptic  
30  
31 lineages, and a possible species complex within this group (Fouquet *et al.*, 2007). This  
32  
33 reinforces the need for a thorough taxonomic review of the arrangement of the *R.*  
34  
35 *margaritifera* group in the Amazon region. Molecular approaches has been effective for  
36  
37 the recognition and description of many new *Rhinella* species (Fouquet *et al.*, 2007b;  
38  
39 Moravec *et al.*, 2014), and it would almost certainly provide important insights into the  
40  
41 delimitation of the species within the *R. margaritifera* group.  
42  
43

44 The species of the *Rhinella margaritifera* group are distributed in northern South  
45  
46 America and Central America forest domain, besides of the for *R. hoogmoedi*  
47  
48 (Caramaschi and Nuemeyer 2003), which inhabits the Atlantic Forest biome, and *R.*  
49  
50 *scinella*, *R. ocellata*, *R. sebbeni* and *R. paraguayensis*, which occur in the Brazilian  
51  
52 Cerrado savanna (Ávila *et al.*, 2010; Vaz-Santos *et al.*, 2015). The forest-dwelling  
53  
54 species tend to present high levels of individual variation in morphological features,  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 however, which limits the usefulness of these attributes for the discrimination of  
4 species. Santos *et al.* (2015) identified populations from western Ecuador and Panama,  
5 frequently assigned to *R. margaritifera* species, as *R. aiata*, which has helped to resolve  
6 the confusing zoogeography of the *R. margaritifera* complex. However, the status of the  
7 populations of the *R. margaritifera* group from the east of the Andes remains  
8 unresolved, and the phylogenetic inferences of Fouquet *et al.* (2007) indicated the  
9 potential existence of at least five distinct taxa identified as *R. margaritifera* in Brazil  
10 and French Guiana.  
11  
12

13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20 The *R. proboscidae* karyotype is described here for the first time, and it presents  
21 NOR on the homologs of pair 7, a condition different from that of the other species of  
22 the *R. margaritifera* group. While the taxonomy and arrangement of the species in this  
23 group are complex (Fouquet *et al.*, 2007), it's have been diagnosed by the presence of  
24 an expansion of the posterior ramus of the pterygoid (Pranuk, 2006), a putative  
25 morphological synapomorphy that supports the *R. margaritifera* group. However, this  
26 putative phenotypic synapomorphy has not been formally tested. *Rhinella proboscidae*  
27 occurs along the Amazon River between Peru and Manaus, in Brazil, the locality  
28 sampled in the present study. The morphological characters of these populations support  
29 their inclusion in the *R. margaritifera* group. In contrast with the other species groups,  
30 however, in which the NOR-bearing chromosome represents a putative synapomorphy,  
31 two distinct scenarios are equally possible for the *R. margaritifera* group: (1) the NOR  
32 on pair 10 is a chromosomal synapomorphy in this group and the NOR on pair 7 of *R.*  
33 *proboscidae* represent a character reversion; or (2) the retention of an ancestral  
34 polymorphism. Unfortunately, the lack of a complete phylogenetic reconstruction that  
35 includes representatives of all the *Rhinella* groups hampers more conclusive inferences  
36 on the chromosomal evolution of this genus. In the specific case of the *R. margaritifera*  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 group, a more systematic analysis of monophyly based on the investigation of specific  
4 molecular markers would likely provide decisive insights into the evolution of this  
5  
6  
7 group.

8  
9 The conservative arrangement of the NOR-bearing chromosomes in the different  
10  
11 *Rhinella* groups highlights the potential contribution of cytogenetic data for the  
12 identification of diagnostic synapomorphies in species groups or clades. A similar  
13 approach has been applied successfully in other amphibian groups (for a review, see  
14 Targueta *et al.*, 2018; Grant *et al.*, 2017). For example, comparative cytogenetics and  
15 the allocation of chromosomal characters (morphology and NOR sites) in a  
16 phylogenetic tree inferred from molecular markers allowed Cardozo *et al.* (2011) to  
17 identify three potential synapomorphies in the genus *Oligodon* (*Scinax cathartinus* clade  
18 – Duellman *et al.*, 2016). Lourenço *et al.* (2015) also identified the interstitial C-band in  
19 chromosome pair 5 as a synapomorphy of the *Physalaemus cuvieri* species group.  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30

31 One other relevant feature of *Rhinella* genus is the high frequency of  
32 hybridization and introgression events (Azevedo *et al.*, 2003; Narves and Rodrigues  
33 2009; Sequeira *et al.*, 2011; Guerra *et al.*, 2011; Pereyra *et al.*, 2015) in areas of  
34 sympatry, mainly in *Rhinella marina* group. As chromosomal features may represent  
35 important pre- or post-zygotic barriers to reproduction, groups with a uniform  
36 karyotype, such as those found in *Rhinella*, may reflect the relaxation of any isolation  
37 mechanism, which would further contribute in the high frequency of hybridization  
38 events observed in this genus. For example, Azevedo *et al.* (2003) identified an  
39 intermediate form between *Rhinella ictyrica* and *Rhinella schneideri* in a sympatric  
40 zone, based on the banding patterns of seroproteins analyzed by electrophoresis, even  
41 though the intermediate form presented no modification of the karyotype in comparison  
42 with the parental species.  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Overall, it is hoped that this review of the cytogenetic data available for the *Rhinella* species, together with the new karyotypes reported here, will contribute to the understanding of the mechanisms of evolutionary changes that led to the diversification of these toads. Despite the ample distribution of many forms, karyotypes are highly conserved in most cases.

### Acknowledgments

We thank the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2016/07717-6) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROAP) to provided scholarships to DYS and AAS.

### References

- Amaro-Ghilardi RC, Silva MJ, Rodrigues MT and Yonenaga-Yassuda Y (2007) Chromosomal studies in four species of genus *Chaunax* (Bufonidae, Anura): localization of telomeric and ribosomal sequences after fluorescence in situ hybridization (FISH). *Genetica* 134:159-168.
- Ávila RW, Pansonato A and Strüssmann C (2010) A new species of the *Rhinella margaritifera* group (Anura: Bufonidae) from Brazilian Pantanal. *Zootaxa* 2339:57–68.
- Azevedo MFC, Foresti, F, Ramos PRR and Jim J (2003) Comparative cytogenetic studies of *Bufo ictericus*, *B. paracnemis* (Amphibia, Anura) and an intermediate form in sympatry. *Genetics and Molecular Biology* 26(3):289-294.
- Baldiçera FA, Batistic RF and Haddad CFB (1999) Cytotaxonomic considerations with the description of two new NOR locations for South American toads, genus *Bufo*

- (Amura: Bufonidae). *Amphibia-Reptilia* 20:413-420.
- Baraquet M, Valetti JA, Salas N and Martino A (2011) Redescription of the karyotypes of five species of the family Bufonidae (Amphibia: Anura) from central area of Argentina. *Biologia* 66: 543-547.
- Caramaschi U and Niemeyer H (2003) Nova espécie do complexo de *Bufo margaritifera* (Laurenti, 1768) do Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil (Amphibia, Anura, Bufonidae). *Boletim do Museu Nacional, Nova Série, Zoologia* 501:1-16.
- Cardozo DE, Leme DM, Bortoleto JF, Catroli GF, Baldo D, Faivovich J, Kolenc F, Silva APZ, Borteiro C, Haddad CFB and Kasahara S (2011) Karyotypic data on 28 species of *Scinax* (Amphibia: Anura: Hylidae): diversity and informative variation. *Copeia* 2:251-263.
- Chaparro JC, Pramuk JB and Ghiesenkamp AG (2007) A new species of arboreal *Rhinella* (Amura: Bufonidae) from cloud forest of southeastern Peru. *Herpetologica* 63:203-212.
- Cuevas CC (2008) A new species of the genus *Alyodes* (Amura: Neobatrachia) from the Nothofagus forest, Coastal Range, Southern Chile, identified by its karyotype. *Zootaxa* 1771: 43-53.
- Cunningham MJ and Cherry MI (2004) Molecular systematics of African 20-chromosome toads (Amura: Bufonidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 32:671-685.
- Fávero ER, Veiga-Menoncello ACP, Rossa-Feres DC, Strüssmann C, Giaretta AA, Andrade GV, Colombo P and Racco-Pimentel SM (2011) Intra-generic karyotypic variation in *Pseudopaludicola* (Amura: Leiuperidae) and its taxonomic relatedness. *Zool. Stud.* 50: 826-836.
- Ferro JM, Cardozo DE, Suárez P, Boeris JM, Blasco-Zúñiga A, Barbero G, Gomes A, Gazoni T, Costa W, Nagamachi CY, Rivera M, Parise-Maltempi PP, Wiley J,

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60
- Pieczarka JC, Haddad CFB, Faivovich J, Baldo D (2018) Chromosome evolution in Cophomantini (Amphibia, Anura, Hylinae). *PLoS One* 13:e0192861.
- Fouquet A, Gilles A, Vences M, Marty C, Blanc M and Gemmell NJ (2007) Underestimation of species richness in Neotropical frogs revealed by rDNA analyses. *PLoS ONE* 2:e1109.]
- Fouquet A, Vences M, Salducci MD, Meyer A, Marty C, Blanc M and Gilles A (2007b) Revealing cryptic diversity using molecular phylogenetics and phylogeography in frogs of the *Scinax ruber* and *Rhinella margaritifera* species groups. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43:567-682.
- Frost DR. (2018) Amphibian Species of the World: an Online Reference. <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>. (may 7, 2018) American Museum of Natural History, New York, USA.
- Funk WC, Caminer M and Ron SR. (2012) High levels of cryptic species diversity uncovered in Amazonian frogs. *Proc. R. Soc. B.* 279:1806-1814.
- Grant T, Rada, M, Anganoy-Criollo M, Batista A, Dias PH, Jeckel AM, Machado DJ, Rueda-Almonacid JV (2017) Phylogenetic Systematics of Dart-Poison Frogs and Their Relatives Revisited (Anura: Dendrobatoidea). *South American Journal of Herpetology* 12:1-90.
- Green DM and Sessions SK (1991) (eds): *Amphibian Cytogenetics and Evolution*. Academic Press, San Diego, 456 pp.
- Guerro C, Baldo D, Rosset S, Borteiro C and Kolenc F (2011) Advertisement and release calls in Neotropical toads of the *Rhinella granulosa* group and evidence of natural hybridization between *R. bergi* and *R. major* (Anura: Bufonidae). *Zootaxa* 3092:26–42.
- Howell WM and Black DA (1980) Controlled silver staining of nucleolar organizer

- regions with a protective colloidal developer: a – 1 step method. *Experientia* 36:1014–1015.
- Kasahara S, Silva APZ and Haddad CFB (1996) Chromosome banding in three species of Brazilian toads (Amphibia-Bufonidae). *Brazilian Journal of Genetic* 19:237-242.
- King M and Rofe R (1976) Karyotypic variation in the Australian gecko *Phyllodactylus marmoratus* (Gray) (Gekkonidae, Reptilia). *Chromosoma* 54: 75 – 87.
- Kolenc F, Borteiro C, Cotichelli L, Baldo D, Debat CM and Candiotti FV (2013) The tadpole and karyotype of *Rhinella achensali* (Amura: Bufonidae). *Journal of Herpetology* 47(4):599-606.
- Lourenço LB, Targueta CP, Baldo D, Nascimento J, Garcia PCA, Andrade GV, Haddad CFB and Recco-Pimentel SM (2015) Phylogeny of frogs from the genus *Physalaemus* (Amura, Leptodactylidae) inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 92: 204-216.
- Lourenço LB, Bacci Jr M, Martins VG, Recco-Pimentel SM and Haddad CFB (2008) Molecular phylogeny and karyotype differentiation in *Parateimnotobates* and *Scythrophrys* (Amura, Leptodactylidae). *Genetica* 132:255-266.
- Moravec J, Lehr E, Cusi JC, Córdova JH and Gvoždík V (2014) A new species of the *Rhinella margaritifera* species group (Amura, Bufonidae) from the montane forest of the Selva Central, Peru. *ZooKeys* 371: 35–56.
- Narvaes P and Rodrigues MT (2009) Taxonomic revision of *Rhinella granulosa* species group (Amphibia, Anura, Bufonidae), with a description of a new species. *Arq. Zool.* 40:1–73.7
- Pereyra MO, Baldo D, Blotto BL, Iglesias PP, Thomé MTC, Haddad CFB, Barrio-Amorós C, Ibáñez R, Fairvovich J (2015) Phylogenetic relationships of toads of the

1  
2  
3 *Rhinella granulosa* group (Anura: Bufonidae): a molecular perspective with  
4 comments on hybridization and introgression. *Cladistics* 32:36-53.

5  
6  
7 Pramuk JB (2006) Phylogeny of South American Bufo (Anura: Bufonidae) inferred  
8 from combined evidence. *Zool. J. Linn. Soc.* 146, 407–452.

9  
10  
11 Santos SP, Ibáñez R, and Ron SR (2015) Systematics of the *Rhinella margaritifera*  
12 complex (Anura, Bufonidae) from western Ecuador and Panama with insights in  
13 the biogeography of *Rhinella alata*. *Zookeys* 501:109–145.

14  
15  
16 Schmid M (1978) Chromosome banding in Amphibia. II. Constitutive heterochromatin  
17 and nucleolus organizer regions in Ranidae, Microhylidae and Rhacophoridae.  
18 *Chromosoma* 68:131-148.

19  
20  
21 Sequeira F, Sodré D, Ferrand N, Bernardi IAR, Sampaio I, Schneider H and Vallinoto  
22 M (2011) Hybridization and massive mtDNA unidirectional introgression between  
23 the closely related Neotropical toads *Rhinella marina* and *R. schneideri* inferred  
24 from mtDNA and nuclear markers. *BMC Evol. Biol.* 11:264.

25  
26  
27 Silva DJS (2010) Análise citogenética e morfométrica em populações de *Rhinella*  
28 *pombali* (Baldissera Jr., Caramaschi e Haddad, 2004) e *Rhinella crucifera* (Wied-  
29 Neuwied, 1821) (Anura, Bufonidae). Masters Dissertation. Universidade Federal  
30 de Viçosa. Minas Gerais.

31  
32  
33 Suárez P, Cardozo D, Baldo D, Pereyra MO, Faivovich J, Orrico VGD, Catroli GF,  
34 Gabriele M, Bernarde PS, Nagamachi C, *et al* (2013) Chromosome evolution in  
35 *Dendropsophini* (Amphibia, Anura, Hylinae). *Cytogenetics Genome Research*  
36 141:295-308.

37  
38  
39 Targueta CP, Vittorazzi SE, Gatto KP, Bruschi DP, Veiga-Manoncello ACP, Recco-  
40 Pimentel SMR and Lourenço LB (2018) Anuran Cytogenetics: An Overview. In:  
41 Norris N and Miller C (eds) *An Essential Guide to Cytogenetics*. 1st edition. Nova

1  
2  
3 Science Publishers, Hauppauge-NY, pp 1-64.

4  
5 Targueta CP, Rivera M and Lourenço LB (2012) Karyotypic differentiation via 2n  
6  
7 reduction and a finding of a case of triploidy in anurans of the genus *Engystomops*  
8  
9 (*Amura*, Leiuperidae). *Genetica* 139:1339-1347.

10  
11 Veiga-Menoncello ACP, Lourenço LB, Strussmann C, Rossa-Feres DC, Andrade GV,  
12  
13 Giaretta A and Recco-Pimentel SM (2014) A phylogenetic analysis of  
14  
15 *Pseudopaludicola* (*Amura*) providing evidence of progressive chromosome  
16  
17 reduction. *Zool. Scripta*, 43:261-272.

18  
19  
20 Vaz-Silva W, Maciel NM, Bastos RP and Pombal JrJP (2015) Revealing Two New  
21  
22 Species of the *Rhinella margaritifera* Species Group (*Amura*, Bufonidae): An  
23  
24 Enigmatic Taxonomic Group of Neotropical Toads. *Herpetologica*, 71(3):212-222.  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Review Only

**Legends**

**Figure 1:** Karyotypes of five species of the *Rhinella margaritifera* (A-E) and *Rhinella marina* (F-G) groups from Brazil, based on Giemsa staining: (A) *R. hoogmoedi*; (B) *R. proboscidae*; (C) *Rhinella* sp. 1; (D) *Rhinella* sp. 2 and (E) *Rhinella* cf. *margaritifera*; (F) *R. ictorica* from Sertão, RS; (G) *R. henseli*, from Sertão, RS.

**Figure 2:** Karyotypes of five species of the *Rhinella margaritifera* (A-E) and *Rhinella marina* (F-G) groups from Brazil stained by Ag-NOR method: (A) *R. hoogmoedi*; (B) *R. proboscidae*; (C) *Rhinella* sp. 1; (D) *Rhinella* sp. 2 and (E) *Rhinella* cf.

1  
2  
3 *margaritifera*; (F) *R. ictarica*, from Sertão, RS; (G) *R. howelli*, from Sertão, RS. The  
4  
5 boxes indicate the NOR-bearing chromosomes.  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Review Only

**Table 1:** Number of *Rhinella* specimens analyzed and their localities in Brazil.

Species	Number of specimens analyzed	Collection locality	Geographical coordinates
<i>R. hoogmoedi</i>	2 ♂ + 3 ♀	Bertioga, SP	23°48'23.15"S; 46°03'32.23"O
<i>R. proboscidea</i>	2 ♂ + 1 ♀	Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus, AM	2°57'48.04"S; 59°55'22.20"O
<i>Rhinella</i> sp. 1	2 ♂ + 1 ♀	Bacabeira, MA	2°56'28.32"S; 44°21'41.35"O
<i>Rhinella</i> sp. 2	5 ♂	Parque Virua, RR	1°17'26.82"N; 61°09'09.20"O
<i>Rhinella</i> cf. <i>margaritifera</i>	5 ♂ + 1 ♀	Laranjal do Jari, AP	1°05'39.49"N; 53°13'04.98"O
<i>R. henseli</i>	2 ♂ + 5 ♀	FLONA, Passo Fundo, RS	28°18'59.10"S; 52°11'26.42"O
<i>R. henseli</i>	3 ♂ + 3 ♀	Sertão, RS	28°02'33.46"S; 52°12'58.56"O
<i>R. icterica</i>	3 ♂ + 2 ♀	FLONA, Passo Fundo, RS	28°18'59.10"S; 52°11'26.42"O
<i>R. icterica</i>	8 ♂	Sertão, RS	28°02'33.46"S; 52°12'58.56"O

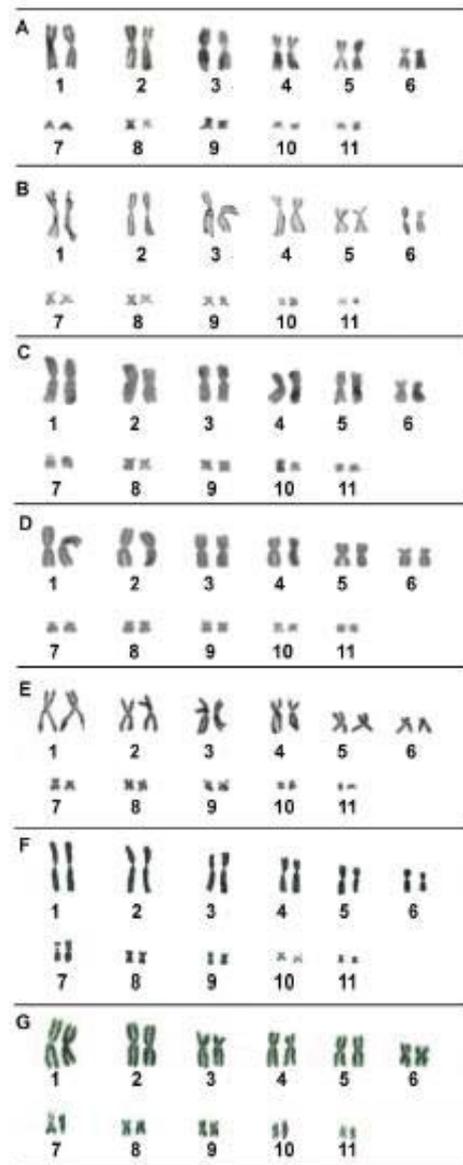
<https://mc04.manuscriptcentral.com/gmb-scielo>

**Table 2:** Detailed cytogenetic data available for species of the *Rhinella* genus.

Species	2n	FN	NOR-bearing chromosome	Reference
<i>R. margaritifera</i> group				
<i>R. hoogmoedi</i>	22	44	St 10(p)	Present study
<i>R. margaritifera</i>	22	44	St 10(q)	Baldissera <i>et al.</i> , (1999)
<i>Rhinella</i> sp. 1	22	44	St 10(q)	Present study
<i>Rhinella</i> sp. 2	22	44	St 10(q)	Present study
<i>Rhinella cf. margaritifera</i>	22	44	St 7(p)	Present study
<i>R. proboscidea</i>	22	44	St 7(p)	Present study
<i>R. crucifer</i> group				
<i>R. crucifer</i>	22	44	St 7(p)	Kawahara <i>et al.</i> , (1996) Silva (2010)
<i>R. ornata</i>	22	44	St 7(p)	Silva (2010)
<i>R. pombali</i>	22	44	St 7(p)	Silva (2010)
<i>R. marina</i> group				
<i>R. arenarum</i>	22	44	Int 7 (p)	Baldissera <i>et al.</i> , (1999) Baraquet <i>et al.</i> , (2011)
<i>R. icterica</i>	22	44	Int 7 (p)	Kawahara <i>et al.</i> , (1996) Baldissera <i>et al.</i> , (1999) Azevedo <i>et al.</i> , (2003) Present study
<i>R. marina</i>	22	44	Int 7 (p)	Baldissera <i>et al.</i> , (1999)
<i>R. schneideri</i>	22	44	Int 7 (p)	Kawahara <i>et al.</i> , (1996) Azevedo <i>et al.</i> , (2003) Amaro-Ghilardi <i>et al.</i> , (2008) Baraquet <i>et al.</i> , (2011)
<i>R. rubescens</i>	22	44	Int 7 (p)	Amaro-Ghilardi <i>et al.</i> , (2008)
<i>R. jimi</i>	22	44	Int 7 (p)	Amaro-Ghilardi <i>et al.</i> , (2008)
<i>R. achavalii</i>	22	44	Int 7 (p)	Kolenc <i>et al.</i> , (2013)
<i>R. henzei</i>	22	44	Int 7 (p)	Present study
<i>R. granulosa</i> group				
<i>R. granulosa</i>	22	44	Ter 5(q)	Baldissera <i>et al.</i> , (1999)
<i>R. pygmaea</i>	22	44	Ter 5(q)	Baldissera <i>et al.</i> , (1999)
<i>R. fernandezae</i>	22	44	n.e.	Baraquet <i>et al.</i> , (2011)
<i>R. spinulosa</i> group	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
<i>R. variegata</i> group	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
<i>R. festae</i> group	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
<i>R. achalensis</i> (not assigned to any group)	22	44	Int10(p)*	Baraquet <i>et al.</i> , (2011)

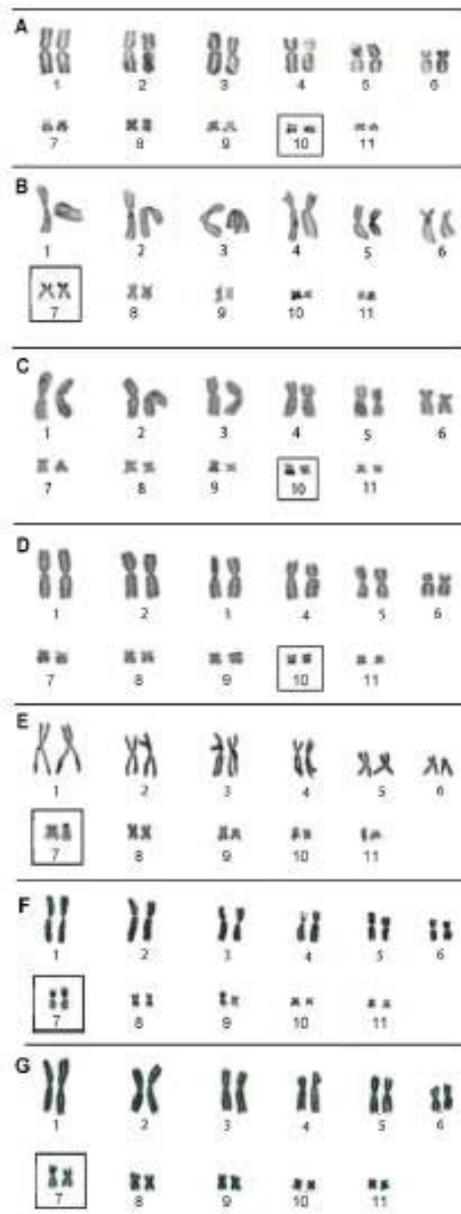
q = long arm; p = short arm; St = subtelocentric; int = interstitial position; per = pericentromeric position; ter = terminal position in the chromosome; n.e. = not examined; \*only secondary constriction information.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



Karyotypes of five species of the *Rhinella margaritifera* (A-E) and *Rhinella marina* (F-G) groups from Brazil, based on Giemsa stainings: (A) *Rhinella hooemoedi*; (B) *Rhinella proboscidae*; (C) *Rhinella* sp. 1; (D) *Rhinella* sp. 2 and (E) *Rhinella* cf. *margaritifera*; (F) *R. ictarica* from Sertão, RS; (G) *R. henseli* from Sertão, RS

122x297mm (300 x 300 DPI)



Karyotypes of five species of the *Rhinella margaritifera* (A-E) and *Rhinella marina* (F-G) groups from Brazil stained using the Ag-NOR method: (A) *Rhinella hoosmoedi*; (B) *Rhinella proboscidea*; (C) *Rhinella* sp. 1; (D) *Rhinella* sp. 2 and (E) *Rhinella* cf. *margaritifera*; (E) *R. ictarica* from Sertão, RS; (F) *R. henseli* from Sertão, RS. The boxes indicate the NOR-bearing chromosomes.

117x297mm (300 x 300 DPI)

<https://mc04.manuscriptcentral.com/gmb-scielo>

## **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Por meio das análises citogenéticas comparativas das populações de anuros da FLONA, Mato Castelhana, RS e do Parque Natural Municipal de Sertão, Sertão, RS, não encontramos evidências de processo de evolução cariotípica, possivelmente em decorrência da proximidade entre as áreas de coleta, sugerindo que as populações não estejam isoladas geograficamente, permitindo um bom fluxo gênico entre elas. Quando comparados a outros estudos, nossos resultados não apresentaram diferenças relevantes nas características cromossômicas espécie-específicas, exceto nas espécies *P. cuvieri* e *O. americanus*. Vale ressaltar, que a maioria das espécies analisadas são generalistas, e, portanto, se adaptam bem em meio as alterações estruturais decorrentes da fragmentação, que caracteriza seus habitats, e que os dados citogenéticos se apresentaram bem conservados, o que comprova que se tratam de espécies ancestrais

A revisão dos dados citogenéticos das espécies do gênero *Rhinella*, evidencia que embora o gênero possua uma ampla distribuição, os cariótipos se apresentaram altamente conservados. O status taxonômico das espécies pertencentes ao grupo *Rhinella margaritifera* ainda permanece incerto, o que torna possível a existência de um complexo de espécies dentro do grupo. Também o gênero *Rhinella* possui alta frequência de eventos de hibridação e introgressão em áreas de simpatia, portanto, grupos com um cariótipo uniforme podem refletir a inexistência de mecanismos de isolamento, contribuindo com hibridação. Nosso estudo pode contribuir na compreensão dos mecanismos de mudança evolutiva que levaram à diversificação desses sapos.

Na avaliação de atividade antimicrobiana, constatamos que a secreção extraída das glândulas da pele de *R. henseli* apresenta atividade antimicrobiana contra o fungo *Candida albicans*, levedura que causa diversos processos infecciosos oportunistas. A diversidade bioquímica em secreções de pele de anfíbios tem potencial para aplicações farmacêuticas, entretanto, sugerimos a continuidade das análises antimicrobianas, na espécie, testando outros microorganismos e caracterizando os diferentes componentes químicos presentes na secreção.

Resumo comparativo das características citogenéticas das espécies de anuros do norte do estado do Rio Grande do Sul

Espécies	CARIÓTIPO			NOR		Padrão de heterocromatina			
	2n	Morfologia	C. S.	Local.	H.N.				
<i>A. perviridis</i>	24	M, SM	-	 11	-	HC			
<i>B. faber</i>	24	M, SM, ST	 11	 11	-	HC			
<i>L. latrans</i>	22	M, SM, ST	-	 8	-	 4p	 7p	 8p	 10p
<i>L. mystacinus</i>	22	M, SM	 4	 4	-	 1q			
<i>L. plaumanni</i>	22	M, SM	 8	 8	-	HC			
<i>P. cuvieri</i>	22	M, SM	 8	 8	 8	 8p			
<i>Physalaemus aff. gracilis</i>	22	M, SM	 10	 10	 10	HC			
<i>R. henseli</i>	22	M, SM	 7	 7	 7	HC			
<i>R. icterica</i>	22	M, SM	 7	 7	-	HC			
<i>M. devincenzii</i>	22	M, SM	-	 5	-	 1p	 3p		
<i>O. americanus*</i>	44	M, SM	 4	 4	-	HC			



**PPGCiAmb**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais  
**Instituto de Ciências Biológicas - ICB**