Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

# Consideración sistemática del género Ceratophrys con especial referencia al par diploide-octoploide C. Cranwelli y C. Ornata

Mercadal, Isabel Teresa

1981

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Mercadal, Isabel Teresa. (1981). Consideración sistemática del género Ceratophrys con especial referencia al par diploide-octoploide C. Cranwelli y C. Ornata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1696_Mercadal.pdf

Cita tipo Chicago:
Mercadal, Isabel Teresa. "Consideración sistemática del género Ceratophrys con especial referencia al par diploide-octoploide C. Cranwelli y C. Ornata". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1981.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1696_Mercadal.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

# "Consideración sistemática del género *Ceratophrys* con especial referencia al par diploide-octoploide *C. cranwelli* y *C. ornata*."

TRABAJO DE TESIS PARA OPTAR
AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS
de

Isabel Teresa Mercadal

Director de Tesis
Prof. Dr. H. Hemmer
(Instituto de Zoología, Universidad de Maguncia, República Federal de Alemania)

1696
Ej: 2

A mis padres

INDICE

I - Introducción.

II - Materiales y métodos.

1-Proteínas miógenas

2-Proteínas séricas

3-Haptoglobinas

4-LDH

5-MDH, XDH, G-6PDH

6-MDH (coloración)

7-XDH (coloración)

8-G-6PDH (coloración)

9-Parvalbúminas

10-Contenido nuclear de DNA

11-Citometría

12-Conteo de eritrocitos

13-Determinación del contenido de hemoglobina

14-Medición de eritrocitos en ejemplares preservados

15-Determinación del consumo de oxígeno

16-Cultivo de leucocitos

17-Técnica de bandeo C en médula ósea

18-Medición de los ejemplares

19-Caracteres morfognósticos

III - Resultados.

1-Proteínas miógenas

2-Parvalbúminas

3-Proteínas séricas

4-Haptoglobinas

5-LDH

6-MDH

7-XDH

8-G-6PDH

9-Determinación del contenido nuclear de DNA

10-Citometría

11-Citometría en animales preservados

12-Contenido de hemoglobina

13-Consumo de oxígeno

14-Bandeo C

15-Especies consideradas en el presente trabajo

16-Distribución geográfica

17-Condiciones ecológicas de C.ornata y C.cranwelli

18-Condiciones ecológicas de las zonas de distribución de Ceratophrys

19-Condiciones ecológicas de las demás poblaciones poliploides bisexuales

20-Estudio de algunos caracteres métricos

21-Caracteres morfognósticos

IV - Discusión

V - Agradecimientos

VI - Bibliografía.

## INTRODUCCION

En los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios bajo distintos aspectos para tratar de esclarecer el fenómeno de la poliploidía en anfibios. Expondremos suscintamente, restringiéndonos a las poblaciones bisexuales de anfibios anuros, cuáles han sido las especies involucradas y cómo han sido enfocados dichos estudios.

Los primeros trabajos a este respecto fueron realizados por Beçak y sus colaboradores en el género Odontophrynus, quienes demuestran por primera vez en el año 1966 la ocurrencia de poliploidía en vertebrados. Encontraron que Odontophrynus americanus poseía un complemento cromosómico 2n=4X=44. Estos estudios citológicos fueron ampliados desde el punto de vista electroforético (proteínas séricas, isoenzimas) citoquímico (contenido nuclear de DNA, de RNA ribosomal y de hemoglobina), etoecológicos (Barrio, 1964) y ensayos de hibridización (Beçak, Beçak, 1967; Beçak, 1969; Schwantes, Schwantes y Beçak, 1969; Beçak y Pueyo, 1970; Schwantes, Schwantes y Beçak, 1971; Beçak y Goissis, 1971; Schmidtke, Beçak y Engel, 1976; Schwantes, Schwantes y Beçak, 1977) para tratar de esclarecer los procesos regulatorios que se producen en el organismo poliploide. Ceratophrys dorsata (=varia) ha sido incluida en algunos de los estudios bioquímicos de Odontophrynus americanus y O. cultripes u O. americanus, O. cultripes y O. occidentalis, pero tan sólo para ser tomado como referencia para confirmar relaciones esperadas por su nivel de ploidía y no como objeto principal de las investigaciones (Beçak, 1969; - Schwantes, Schwantes y Beçak, 1969 y 1971; Beçak, Beçak, Lavalle y Schreiber, 1967).

Otro género sudamericano que presenta especies poliploides y que ha sido estudiado citológica y etoecológicamente es Pleurodema, con las especies kriegi y bibroni, ambas tetraploides (Barrio y Rinaldi de Chieri, 1970 a; Barrio, 1977).

En Phyllomedusa burmeisteri se descubrieron poblaciones tetraploides en Brasil (Botucatu) (Batistic et al., 1975) y en Argentina (Misiones) fueron estudiadas audioespectrográficamente (Barrio, 1976).

En América del Norte es conocido únicamente el par diploide-tetraploide Hyla chrysoscelis-H. versicolor que han sido investigadas exhaustivamente desde el punto de vista bioacústico, cariotípico, citológico, citoquímico e inmunológico como así también se han llevado a cabo ensayos de hibridización (Wasserman, 1970; Bogart y Wasserman, 1975, Maxson et al., 1977; Ralin, 1978; Cash y Bogart, 1978; Ralin y Selander, 1979; Bogart, 1980; etc.).

En Africa se descubrieron casos de poliploidía en Dicroglossus occipitalis (4n) (Monrovia, Grassfield, Liberia), Tomopterna (=Pyxicephalus) delalandii (4n) (Jamestown, Queenstown, Cathcart y Grahamstown en Sud Africa) y Bufo sp. D. (4n) (Asmara, Etiopía) creyendo pertenecer a la especie kerinyagae (Bogart y Tandy, 1976), Xenopus (laevis) bunyoniensis (4n) (Kigezi, Uganda) y Xenopus ruwenzoriensis (6n) (Semliki, Uganda) (Tymowska y Fischberg, 1973).

En Asia, Bufo viridis (4n) en Kirghizia (Mtes. Tien Shan, 1610-3500 m: Mazik et al., 1976; Frunze: Bachmann et al., 1978) y Bufo oblongus (= danatensis) (4n) en Turkmen y Dushanbe en Tadshikistan (Pisanets, 1978 y Hemmer, comunicación personal) siendo estu

diados además citoquímicamente.

El género Ceratophrys ha sido objeto durante las dos últimas décadas de diversos estudios que incluyen principalmente los citológicos, por ser éste el que presenta los únicos casos conocidos hasta el presente (Bogart, 1980) de octoploidía en vertebrados: C.varia (=dorsata) (Beçak et al., 1967) y C. ornata (Bogart, 1967). C. ornata posee su contraparte diploide, C. cranwelli (Barrio, 1980), pero aún no hay información referente a la existencia del par diploide para C. varia.

Saez y Brum (1959) fueron los primeros quienes analizaron los cromosomas de C. ornata, pero no lo interpretaron como resultado de la duplicación cromosómica; debido a la presencia de distinto número de cromosomas en las metafases lo trataron como un caso de mixoploidía. Bogart (1967) le atribuyó su verdadero significado. Posteriores estudios bajo este aspecto en C. ornata fueron llevados a cabo por Bianchi (1968) quien asevera ser aneuploides. Barrio y Rinaldi de Chieri (1970) reconocen en esta entidad dos formas diferentes en cuanto a su número cromosómico. Posteriormente es descripta la forma diploide como C. cranwelli (Barrio, 1980). Beçak et al. (1967 a y b) y Beçak (1969) realizan estudios similares en C. varia. Otra especie investigada citológica y citoquímicamente es C. calcarata, que posee un complemento cromosómico de 2n=26.

Nos hemos propuesto ampliar los conocimientos de este discutido e interesante género de anuros circunscribiéndonos primeramente al par diploide-octoploide C. cranwelli-C. ornata ya que constituyen material ideal para la elucidación de la problemática conside

rada (poliploidía), máxime teniendo en cuenta que sus respectivas áreas distributivas presentan zonas de contacto que posibilitarían su hibridación. Hemos encarado los estudios en forma comparativa bajo el punto de vista fisiológico, molecular (electroforesis de proteínas miógenas, séricas e isoenzimas, contenido nuclear de DNA, y hemoglobina), citológico y ecológico. Queremos recordar que el género Ceratophrys ha sido tratado últimamente sólo superficialmente dándolo como ejemplo de su elevado nivel de ploidía (Bogart y Wasserman, 1972; Bogart, 1980). Barrio (1980) al describir C. cranwelli aporta datos etoecológicos y citométricos al conocimiento de esta especie y de C. ornata. El último trabajo que lo trata taxionómicamente como grupo es el de Lynch (1971) y es brevemente considerado filogenéticamente por Heyer (1975) y Laurent (1979).

La falta de unanimidad de criterios para establecer la composición y los caracteres que definen a la familia Ceratophryidae ha dado lugar a numerosas discusiones. En los últimos años la validez de la familia Ceratophryidae ha cobrado mayor aceptación segregándolo de la familia Leptodactylidae. Pruebas a nivel etológico (Barrio, 1963), miológico y osteológico (Reig y Cei, 1963; Reig y Limeses, 1963) cariosistemático (Barrio y Rinaldi de Chieri, 1970 b) e inmunológico (Cei, 1965) sustentan este criterio. Los géneros incluídos en ella son Ceratophrys Wied, 1824, Lepidobatrachus Budgett, 1899 y Chacophrys Reig y Limeses, 1963.

Esta problemática taxionómica incumbe al propio género Ceratophrys sea por la inclusión de especies pertenecientes al género Stombus por algunos autores, por la exclusión de otras (como veremos

más adelante), o llegado el caso, por la mis -identificación de algunos de sus miembros debido a la carencia de una precisa descripción y delimitación de sus caracteres. Reig y Limeses (1963) aclaran, al dar la diagnosis del género Chacophrys, que debería ser ésta más breve, como lo requiere toda diagnosis, pero no les fue posible ya que "se requiere afinar criterios de ponderación de los caracteres para poder escoger aquellos que sean realmente los relevantes y los que mejor indican el camino evolutivo de los distintos taxa; sólo entonces se podrán proporcionar nuevas diagnosis genéricas de todos los "ceratofrínidos" que satisfagan los requerimientos de brevedad, exclusión y precisión, de una buena diagnosis". Sólo la búsqueda de equivalencias sinapormorfas nos permitiría encontrar tal camino evolutivo. (En dicha búsqueda se basa el verdadero método de sistemática filogenética). Sabemos que las especies o grupos de especies que poseen caracteres apomorfos en común constituyen conjuntamente un grupo monofilético y que la consideración de caracteres plesiomorfos no permite tal agrupación (Hennig, 1968). Si ordenamos los caracteres según sean plesiomorfos o apomorfos obtendremos así la estructura de las relaciones filogenéticas de parentesco.

Como consecuencia (y/o causa) de este inconveniente, la información existente respecto a su distribución geográfica del género Ceratophrys no sólo era escasa sino confusa y, en ciertas oportunidades, errónea. Por tal motivo hemos desarrollado una técnica que nos permitió, además de la reconsideración de los caracteres morfognósticos y morfométricos, no sólo poner un poco más en claro esta problemática, sino también esbozar una posible hipótesis de las aún

poco claras vinculaciones filogenéticas del género.

## MATERIALES Y METODOS

Los animales utilizados para el estudio de proteínas miógenas y séricas, haptoglobinas y LDH fueron recolectados en distintas localidades: Ceratophrys ornata=Chascomús, Benavídez, Ing. Maschwitz, Lincoln, La Matanza, Alberdi (Pcia. de Buenos Aires); C. cranwelli= Rufino y Gob. Crespo (Pcia. de Santa Fe), Rosales, Corral de Bustos, Bell Ville y James Craik (Pcia. de Córdoba) y Sol de Mayo, Pinto y Sumampa (Pcia. de Santiago del Estero).

Fueron mantenidos en una cámara a 15°C hasta su utilización. Eran alimentados cada 2 semanas con trozos de hígado (principalmente) o ratones recién nacidos.

Para el estudio de proteínas séricas MDH, XDH, G-6PDH, contenido nuclear de DNA, hemoglobina y consumo de $O_2$ sólo fueron utilizados animales provenientes de Benavídez (C. ornata) y de Sumampa (C. cranwelli).

Fueron utilizados 327 C. ornata y 84 C. cranwelli para el estudio de proteínas miógenas; 58 ornata y 54 cranwelli en el estudio de proteínas séricas; 51 ornata y 38 cranwelli para haptoglobinas; 50 ornata y 27 cranwelli totales para la determinación de LDH en distintos órganos (más detallado, ver tabla 9); 42 ornata y 36 cranwelli para LDH en suero; 17 y 10 respectivamente para el estudio de MDH en distintos órganos; 10 y 6 para XDH y 10 y 7 para G6PDH.

Para el estudio del contenido nuclear de DNA se emplearon -

2 C.ornata y 13 C. cranwelli; 22 ornata y 25 cranwelli con fines citométricos; 4 ornata y 6 cranwelli para el conteo de eritrocitos y determinación del contenido de hemoglobina; 4 ornata y 4 cranwelli para la determinación del consumo de oxígeno y por último 2 individuos de cada especie para la técnica de bandeo C. El número de ejemplares utilizados para el cálculo de los distintos índices está indicado en la tabla 18. Los mismos fueron provistos por los siguientes museos: Naturhistorisches Museum Wien, Senckenberg Museum Frankfurt, Zoologische Staatssamlung München y Museum Ludwigsburg - Stuttgart.

Proteínas miógenas

Para el estudio de las proteínas miógenas se utilizaron únicamente homogenatos de músculo gastrocnemio lavados dos veces con buffer Tris-Cítrico y Bórico-NaOH en una relación 2:1, fueron cortados y se homogeneizaron con un volumen del buffer igual al peso del músculo. Luego fue centrifugado 30' a 3500 rpm. El sobrenadante fue guardado a -20°C y analizado al día siguiente.

Después de 2 a 3 meses se descartaban las muestras debido a que se observaron variaciones en las corridas con respecto al patrón original.

Se utilizó el método de electroforesis en disco. (Castagnino, 1970). Los geles fueron preparados con Acrilamida (Eastman) Bisacrilamida (Eastman), TEMED (Eastman), Persulfato de amonio (Anedra). La concentración total del gel era del 7%, siendo un 97,5% de éste

Acrilamida y un 2,5% Bisacrilamida. El buffer del gel fue Tris - (0,052 M)-Cítrico (0,0076 M) pH 8,5 y ácido bórico (0,2M)-NaOH (0,03M) pH 8 en una proporción 2:1. El buffer de corrida, Bórico-NaOH. Previo a la siembra se equilibraba 30' haciendo pasar 5mA por tubo (manteniendo constante el voltaje). Se sembraba aproximadamente 0,1 ml del sobrenadante mezclándolo previamente con sacarosa. La duración de la corrida electroforética fue de 2 horas en todos los casos. A su finalización se colorearon las proteínas con Amido Schwarz (1% en ácido acético al 7%) y se decoloró con ácido acético al 7%. Los geles se conservaron en la misma solución.

Se efectuaban en distintos días corridas repitiendo la muestra para comprobar la reproducibilidad del método.

Proteínas séricas

La sangre era extraída de la vena angularis o por punción - cardíaca. Para el primer caso fueron utilizados capilares heparinizados y centrifugados en los mismos (Hemmer et al., 1978).

Para las corridas de suero fueron empleados dos medios soporte: acatato de celulosa y gel de poliacrilamida. En la electroforesis en Cellogel el buffer utilizado fue Veronal (1,84g/l)-Veronal-Na (10,50g/l) y Tris (7,20g/l) pH 9,49. 8 tiras fueron corridas a la vez aplicando 150V durante 2 horas. Se sembraban aproximadamente 3 µl de suero. Se coloreaban con Amido Schwarz, se decoloraban y se transparentaban por el método corriente.

Para poder comparar las bandas de proteínas se sembraban pa-

ralelamente 2 muestras de suero en la misma tira. Las mediciones de la intensidad de las fracciones que corrían como albúmina eran llevadas a cabo por medio de un densitómetro (Elphor).

La electroforesis en gel de poliacrilamida se realizó en placa horizontal utilizando una concentración de gel del 7% en poliacrilamida (95% Acrilamida, 5% Bisacrilamida). El buffer de corrida fue Tris (10,775g/l), EDTA (0,925g/l) y ácido bórico (5,5g/l) pH 8,4. El buffer del gel era una dilución al 1/4,5 del de corrida. Se utilizaron mechas de papel de filtro dobladas varias veces. La muestra se aplicó en trozos de papel de filtro rectangulares y se sembraban 8 $\mu$l de suero. La corrida era concluída luego de 2 hs. aplicando - 20V/cm. Se coloreó con Amido Schwarz al 1% en ácido acético 7%.

Haptoglobinas

Para las corridas de haptoglobinas se utilizó el método de electroforesis en disco. Los geles fueron preparados con un 97,5% de Acrilamida y un 2,5% de Bis acrilamida teniendo una concentración total de poliacrilamida del 7%. El buffer de corrida y el del gel fue Veronal-Veronal-Na $\mu$=0,05 pH=8,6. Se aplicaron 5mA/tubo y la corrida duró 2 hs. La muestra de suero se preparaba mezclando 10 lambdas de suero, 50 lambdas de $H_2O$ destilada y 4 lambdas de hemoglobina. Luego de terminada la corrida se colocaban los geles en la siguiente solución colorante para peroxidasas: benzidina 200mg., ácido acético glacial 5 ml, $H_2O$ destilada 100 ml y, antes de sumergir los geles, se agregaba 0,1 ml $H_2O_2$ 30% (Peacock et al., 1963). Se

dejaba incubar 30 minutos en oscuridad. Los geles se guardaban en ácido acético 7%.

No sólo se realizaron corridas de suero con su correspondiente hemoglobina, sino que a falta de ésta (por hemólisis durante el lavado de los glóbulos rojos) se la reemplazó por otra perteneciente a un individuo de la misma región.

LDH

Para el estudio de la lactato deshidrogenasa se utilizaron corazón, hígado, riñón, testículo, cuerpo graso y bazo. Después de lavar los órganos 3 veces con buffer (Bor-NaOH: Tris-Cítrico=2:1) para sacar los restos de sangre, se homogeneizaban en igual volumen del buffer mencionado. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 minutos a 4°C y se guardó el sobrenadante hasta su uso a -70°C.

La electroforesis fue realizada usando gel de poliacrilamida en disco. El buffer de corrida Bor-NaOH pH 8,0. Se sembraron 50 lambdas del sobrenadante obtenido y se aplicaban 5 mA/tubo. Al finalizar se coloreaban para LDH. El colorante se preparó según la técnica de Fernández (1967) utilizando Buffer Trietanolamida-clorhidrato-NaOH pH 7,8; 0,3 mg PMS, ác. láctico 2 M 2 ml; 9,0 mg NBT, buffer 4 ml; 10,0 mg NAD y $H_2O$ dest. 10 ml.

Se dejaba incubar a 37°C; el tiempo dependía del órgano en estudio.

La electroforesis para LDH en suero se realizó en gel de poliacrilamida en placa horizontal. El buffer del gel era Tris-Cítrico

(0,026 M Tris y 0,0038 M. ác. cítrico) y el buffer de corrida Bor-NaOH pH 8,0. Se aplicó 20 v/cm durante 5 horas, manteniendo la temperatura a 4°C.

MDH, XDH y G-6PDH

Los fenotipos de estas enzimas fueron examinados en riñón (MDH, XDH), hígado (G-6PDH),cuerpo graso (MDH) y músculo (MDH) que fueron mantenidos a -20°C hasta su utilización. Para el análisis de estas enzimas sólo se trabajó con animales procedentes de Benavídez (Buenos Aires) y Sumampa (Santiago del Estero).

La homogeneización se llevó a cabo con igual volumen de una solución de sacarosa (0,3 M sacarosa, 10 mM Trietanolamina-HC1, 2 mM EDTA) pH 7,2. y centrifugados a 4°C, 10.000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante fue guardado a -20°C hasta su posterior uso.

La electroforesis en disco se realizó en gel de poliacrilamida de 2 distintas porosidades: 0,9 ml gel de separación al 5% y gel de concentración 2,5% (70 µl). Las soluciones utilizadas para cada gel figuran en la tabla 1. Los tubos (4 mm de diámetro interno, 8 cm de longitud) eran previamente introducidos en una solución al 0,1% de SDS.

El buffer de corrida utilizado fue Tris-Glicina pH 8,3 (6g Tris, 28,8 g Glicina, llevados a 1 l con $H_2O$ destilada. La solución era diluída en una proporción 1:10 con $H_2O$ destilada).

Gel de separación (5%)

| Solución A | Solución B |
|---|---|
| 10,0 g Acrilamida | 9,0 g Tris |
| 0,3 g Bisacrilamida | 0,05 ml TEMED |
| $H_2O$ dest. a 100 ml | $H_2O$ dest. y HCl hasta 100 ml y pH 8,9 |

Mezclar 1A:1B y Persulfato de amonio (10%) (150 µl/20 ml)

Gel de concentración (2,5%)

| Solución A | Solución B |
|---|---|
| 5 g Acrilamida | 1,5 g Tris |
| 1,25 g Bisacrilamida | 0,12 ml TEMED |
| $H_2O$ dest. a 100 ml | $H_2O$ dest. hasta 100 ml y pH 6,9 |

Mezclar 1A:1B y Persulfato de amonio (10%) (100 µl/20 ml)

TABLA 1 - Soluciones para la preparación de geles de poliacrilamida para la electroforesis en disco de MDH, XDH y G-6PDH.

MDH

Se sembraron 20 µl del sobrenadante que era diluído en una relación 1:10 con la solución de homogeneización. Al finalizar la corrida (1,5 mA/tubo durante 2 horas) se coloreaban con 0,3 mg PMS, 7,5 mg NTB, 10 mg NAD, 2 ml ácido málico 0,5 M (llevado a pH 6,0 con NaOH), 10 ml buffer Trietenolamina-HCl pH=7,8 y 4 ml $H_2O$ destilada, incubados en oscuridad a 37°C.

XDH

Se sembraron 50 µl del sobrenadante, sin diluir. La corrida era llevada a cabo como en el caso anterior.

La solución colorante utilizada estaba compuesta por 1 mg PMS, 2 mg NBT, 4 mg NAD, 1 ml hipoxantina 0,125 M y 10 ml buffer Tris-HCl 0,2 M pH 8,0.Era incubado en oscuridad a 37°C. (Modificación de la técnica de Selander et al., 1971).

G-6PDH

Se procedió como en XDH pero aplicando 1,25 mA/tubo durante 5 horas y la solución colorante consistía en 2 mg PMS, 2 mg NBT, 3 mg NADP, 0,5 ml glucosa 6- fosfato 0,125 M, 0,01 M $MgCl_2$ y 10 ml buffer Tris-HCl 0,2M pH 8,0 (modificación de la técnica de Stelle et al., 1968).

## Parvalbúminas

En cuanto al estudio de las parvalbúminas se siguió la técnica de Pechére et al. (1974) utilizando 46 g de músculo de *Ceratophrys ornata* y homogeneizado en un volumen de solución igual a dos veces el peso del músculo.

Dicha solución consistía en 0,3 M sacarosa, 0,01 M Trietanolamina, 0,003 M EDTA-2Na. Se dializó contra $H_2O$ destilada durante 24 horas con tres cambios; se centrifugó a 7000 rpm a 4°C durante 30 minutos. Luego se llevó a 70% de saturación con $(NH_4)_2SO_4$ a 4°C a pH neutro con la adición de NaOH 1M. Después de 2 horas se centrifugaba a 12000 rpm 30 minutos. El precipitado se dializaba 2 horas y se siembra en una columna con Sephadex G-75.

La lectura de la absorbancia se efectuó a 254 nm. Por último, las fracciones que contenían parvalbúminas fueron concentradas en tubos de diálisis y se sembró en el mismo gel de poliacrilamida utilizado para la separación de proteínas miógenas.

## Contenido nuclear de DNA

Las mediciones citofotométricas del contenido de DNA fueron determinadas en núcleos de eritrocitos. Se realizaron frotis de sangre, obtenida por punción de la *vena angularis*, fueron secados rápidamente e introducidos en una solución de formalín al 10%. Se prepararon frotis de *Bufo oblongus* (3n), como referencia para los posteriores cálculos del contenido de DNA, siendo tratados de la misma

manera y simultáneamente con los de Ceratophrys.

El tiempo mínimo de fijación fue de 24 horas, siendo mantenidos a 4°C. Antes de proceder a su coloración, los preparados debían estar perfectamente secos, colocándolos para tal fin en desecador. Se hidrolizaron en HCl 5 N a temperatura ambiente por períodos de 10 y 5 minutos, enjuagados con agua corriente, coloreados durante 2 horas en reactivo de Schiff y lavados en $SO_2$ (25 ml bisulfito de sodio 15%, 25 ml 1 N HCl y llevado a 500 ml con $H_2O$ destilada). Por último enjuagados en agua corriente, deshidratados y montados en forma permanente.

Las mediciones de los núcleos individuales fueron llevadas a cabo a 550 nm en un microdensitómetro integrador Barr and Stroud tipo GN-5.

De cada individuo se realizaron 2 preparados y de cada uno de ellos se midieron 10 núcleos. Los valores relativos fueron convertidos a unidades standard teniendo la equivalencia entre éstos y los de B. oblongus.

## Citometría

Se midieron para cada individuo de ambas especies 20 eritrocitos de 4 preparados distintos. Para ello la sangre fue extraída de la vena angularis y no fueron coloreados. Las lecturas se realizaron bajo un aumento de 240x para el eritrocito total y de 600x para los núcleos.

Para el cálculo tanto de la superficie como del volumen ce-

lular y nuclear se consideró que se asemejaban a un elipsoide. Fueron utilizadas las fórmulas $\pi.1.b$ y $4.\pi.1.b^2/3$ para la superficie y el volumen respectivamente, donde 1 corresponde al radio mayor y b al radio menor (celular o nuclear según el caso).

Conteo de eritrocitos

Fue utilizada una cámara de conteo Thoma. Se extrajo 10 µl de sangre de la vena angularis y se la mezcló con 20 µl de citrato de sodio. Para la dilución final fue utilizada la siguiente solución: 1 parte de citrato de sodio al 3,8% y 5 partes de solución Haymsche (Hallmann, 1952).

El cálculo de la concentración de eritrocitos se efectuó mediante la fórmula:

$$\frac{\text{N° eritrocitos}}{\text{Sup.contada x altura de la cámara x dilución}}$$

Determinación del contenido de hemoglobina

Se realizó mediante un test(ASID-Diagnostika) que consiste en la oxidación de la hemoglobina, por el hexacianoferrato de calcio, a hemiglobina, la cual forma un complejo estable (hemiglobincianid) mediante cianuro de calcio.

La extinción es leída a 546 nm. Dicho valor es multiplicado por 36,3, valor que es obtenido de la curva de calibración de una

solución standard de cianhemiglobin. La concentración está dada en g/100 ml de sangre.

Medición de eritrocitos en ejemplares preservados

Se extrajeron los eritrocitos de la vena abdominalis haciendo una pequeña incisión transversal (3-5 mm) en la piel y luego otro corte en dicha vena para extraer simplemente con una aguja los eritrocitos que se encontraban agregados.

Debido a que algunos ejemplares eran muy pequeños o la vena se veía traslúcida, se cortó un trozo de la misma. Tanto el cúmulo de eritrocitos como la vena previamente cortada longitudinalmente eran colocados en una solución al 0,1% de SDS (sodiododecilsulfato). En el lapso mínimo de 2 días se lograba la disgregación de los eritrocitos entre sí y su total turgencia. Una pequeña cantidad de la muestra era colocada sobre un portaobjetos y con una espátula en forma de cuchara se procedía a la mejor disgregación del cúmulo.

Las mediciones de los eritrocitos se efectuaron con un aumento de 240x y de su núcleo con 600x. Para el cálculo de la superficie y volumen tanto del núcleo como de la superficie plana del eritrocito se partió de la misma suposición que en el caso de los eritrocitos de material vivo, y por lo tanto fueron utilizadas las mismas fórmulas.

Determinación del consumo de oxígeno

En la figura 1 está representado esquemáticamente el equipo

utilizado para la determinación del consumo de oxígeno a diferentes temperaturas. El mismo consta de un recipiente donde es colocado el animal y una cápsula de Petri conteniendo KOH 2 N (el objeto del KOH es combinarse con el $CO_2$ producido por el animal, logrando así que la variación de la presión dentro del recipiente sea debida únicamente a los cambios originados por las variaciones de la tensión del $O_2$). Se conecta este recipiente con una bureta, la cual está en comunicación con un Erlenmeyer con $H_2O$, por una lado, y por otro, con una bureta de Warburg. Esta última registra los cambios debidos a la disminución de la tensión de $O_2$ provocado por el consumo del mismo por el animal. Dicha bureta contiene solución Brodie hasta un cierto nivel.

Se utiliza un segundo recipiente de igual capacidad que el anterior, la cual se comunica únicamente a otra bureta de Warburg. Este segundo recipiente es introducido en el mismo baño que el primero. La finalidad de este segundo recipiente es la de registrar los cambios de presión dentro del recipiente provocados por la variación de la temperatura.

Las lecturas son realizadas agregando $O_2$ (abriendo la llave a) hasta que el nivel de la columna de la bureta de Warburg, conectada al recipiente con el animal, alcance el mismo nivel que el de la bureta conectada al segundo recipiente. El volumen de $O_2$ consumido se lee en la bureta (a la cual se le ha agregado el $O_2$) y es expresado en ml.

Antes de realizar las mediciones se deja al animal 30 minutos en el recipiente (con las llaves abiertas) para que se aclima-

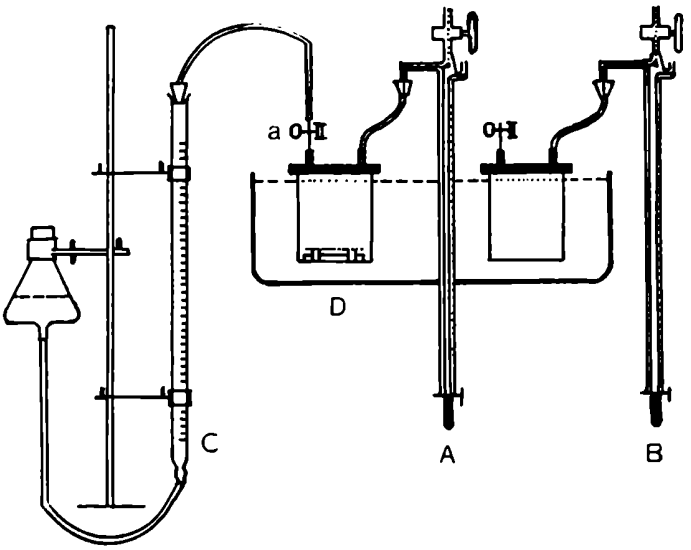



Fig. 1 - Esquema del equipo utilizado para la determinación del consumo de $O_2$ .AyB= buretas de Warburg, A: conectada al recipiente conteniendo al animal en estudio, B: conectada al recipiente de referencia,C= bureta destinada a las lecturas de $O_2$ consumido.D= baño termostatizado.

tice a la temperatura de la medición. Se cierran las llaves y se comienza a leer a partir de los 30 minutos siguientes.

Para cada animal se toman 2 valores de consumo de $O_2$ por hora, entre los 30' y 90' y entre los 45' y 105'. Se toma finalmente el promedio entre ambos valores.

El volumen de gas consumido es calculado en condiciones normales por la siguiente fórmula: (Florey, 1975)

$$V_o = V \frac{P}{760} \frac{273}{T}$$

donde P: presión en KPa
T: temperatura del baño en grados Kelvin
V: volumen de gas medido en la bureta.

El valor del consumo de $O_2$ por hora es calculado por kg de peso del animal. Las unidades están dadas en $mlO_2$/kg.h.

Las lecturas fueron efectuadas a las siguientes temperaturas (en °C)= 5,5-7,0-9,0-10,5-15,5-18,0-20,5-25,5 y 30,0.

Los animales se encontraban siempre en las mismas condiciones de alimentación y temperatura en el laboratorio. Fueron elegidos individuos cuyo peso (dentro de cada sexo) fuese similar.

## Cultivo de leucocitos

Una de las técnicas para el estudio de los cromosomas en el presente trabajo fue el cultivo de leucocitos, llevada a cabo de acuerdo a la desarrollada por Ebendal (1977) y Hungerford (1965) con algunas modificaciones.

Se empleó como medio de cultivo Eagle Basal Medium (SERVA) (10 ml), al cual se le agregó Eagle Basal aminoácidos (1,25 ml) y Eagle Basal vitaminas (1,25 ml), L-Glutamin 2 mM, $NaHCO_3$ 7,5% hasta llevar a pH 7. Se agregó $H_2O$ destilada para completar 100 ml. Se diluyó dicha solución hasta lograr una concentración en sales de 0,65%. Por último se agregó rojo de fenol 7 µg/ml, penicilina 100 U/ml, heparina 20000 U/l y suero de cordero recién nacido 15%.

La sangre fue extraída de la vena angularis (0,1 ml ó menos) y agregada a 5 ml del medio con 0,2 ml de fitohemaglutinina (Wellcome). Los medios de cultivo fueron incubados a 25°C durante 4-5 días, manteniendo el pH a 7 con el agregado de HCl 1 N ó NaOH 1N.

12 horas antes de terminar con la incubación se añadió colchicina (SERVA) en una concentración final de 0,2 µg/ml. Se centrifuga 5 minutos a 1000 rpm, se resuspende con solución hipotónica (KCl 0,045 M) y se deja 15 minutos, por último se fija con metanol-ácido acético 3:1 cambiándolo varias veces.

Las células fijadas son extendidas haciendo caer una gota del precipitado obtenido a una distancia de 30 cm de altura sobre un portaobjetos previamente enfriado. Se colorean con orceína acética natural al 1% en ácido acético al 60% ó con solución Giemsa en una dilución 1:9 con buffer fosfato pH 6,7.

## Técnica de bandeo C en médula ósea

Se estudiaron los cromosomas mitóticos de acuerdo a la técnica de Schmid (1978). Se inyectó colchicina 0,3% (1,5 ml a las hem-

bras y 1 ml a los machos) intraperitonealmente. A las 14 horas eran sacrificados colocándolos en un recipiente cerrado saturado con vapores de éter y se les extrajo la médula ósea inyectando KC1 0,075 M a los fémures, tibia y húmeros que previamente eran despojados del tejido muscular.

Se dejaba 1 hora en la solución hipotónica y se eliminaba el tejido graso que quedaba en suspensión. Se centrifugó 10 minutos a 1000 rpm y luego se fijó con metanol-ácido acético 3:1 (frío y recién preparado), dejándolo reposar de 7-8 horas a 4°C. Posteriormente se centrifugó y se añadió 1 ml de fijador recién preparado. Sobre portaobjetos perfectamente limpios y enfriados con hielo se dejaba caer 3-4 gotas de la suspensión. Una vez secos se procedió a su tinción de acuerdo a la técnica de Sumner (1972) y las modificaciones de Schmid (1978). Se trataban los preparados con 0,2 N HCl, durante 1 hora en solución saturada de Ba $(OH)_2$ a 30°C y nuevamente enjuagados. Se incuba en 2x SSC (0,3 M ClNa y 0,03 M citrato trisódico) a 60°C durante 1 hora. Eran brevemente enjuagados e introducidos en la solución colorante de Giemsa al 8% en buffer fosfato pH 6,8 durante 1 1/2 horas.

Las fotografías eran tomadas con film Agfapan 25 con un aumento de 1250x.

Para la nomenclatura cromosómica se siguió el criterio según la posición centromérica de Levan, Fredga y Sandberg (1964).

Medición de los ejemplares

Se calcularon los siguientes índices de los ejemplares pre-

servados y vivos: longitud de la cabeza/ancho de la cabeza; longitud total/ancho de la cabeza; long. cab./ancho cab./distancia nasoorbital; long. tibia más long. pie/long. total; Long. total/long. cab./ancho cab. La longitud total del animal fue medida desde el hocico hasta el extremo del urostilo.

## Caracteres morfognósticos

Por contar en su mayoría con animales preservados no ha sido estudiado comparativamente el colorido. Se ha tratado suscintamente el patrón de manchas de la cabeza, el desarrollo de le membrana interdigital, párpados y el escamosal.

El desarrollo del escudo dorsal ha sido considerado desde el punto de vista morfométrico como morfognóstico.

# RESULTADOS

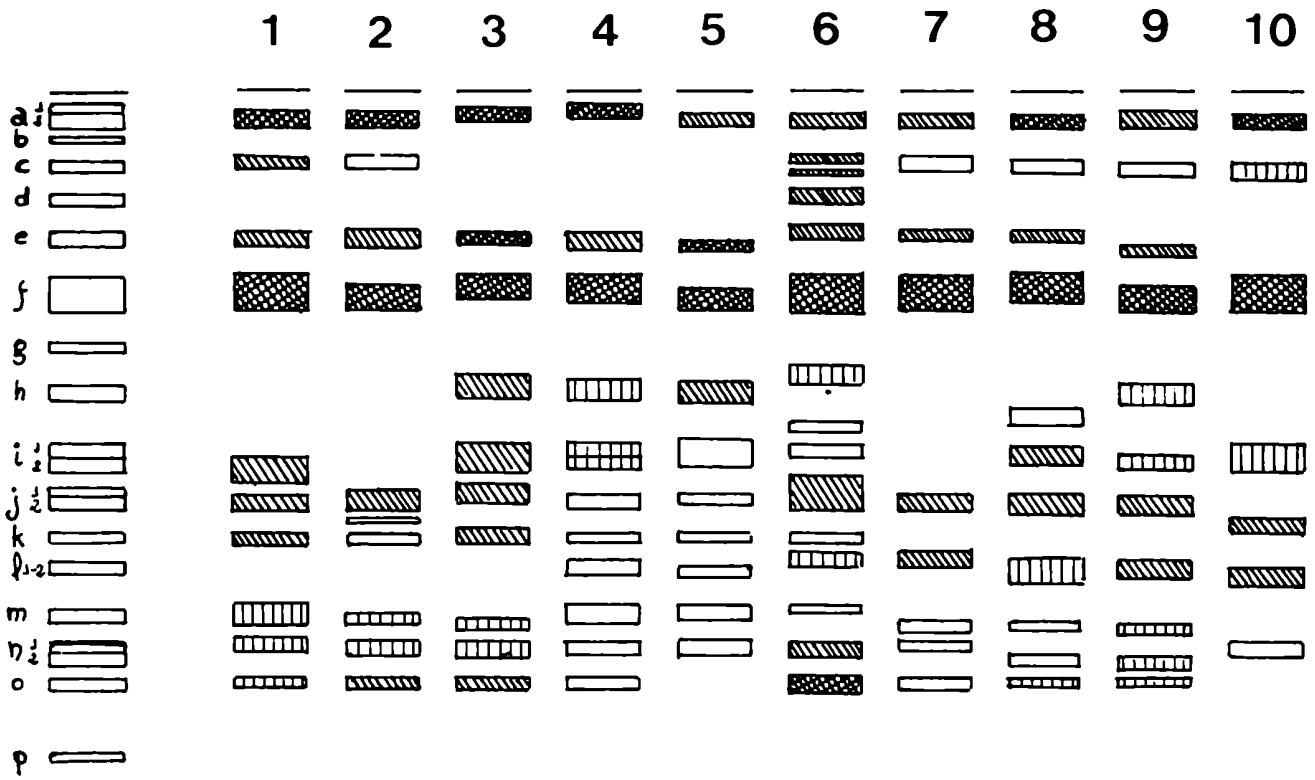
## Proteínas miógenas

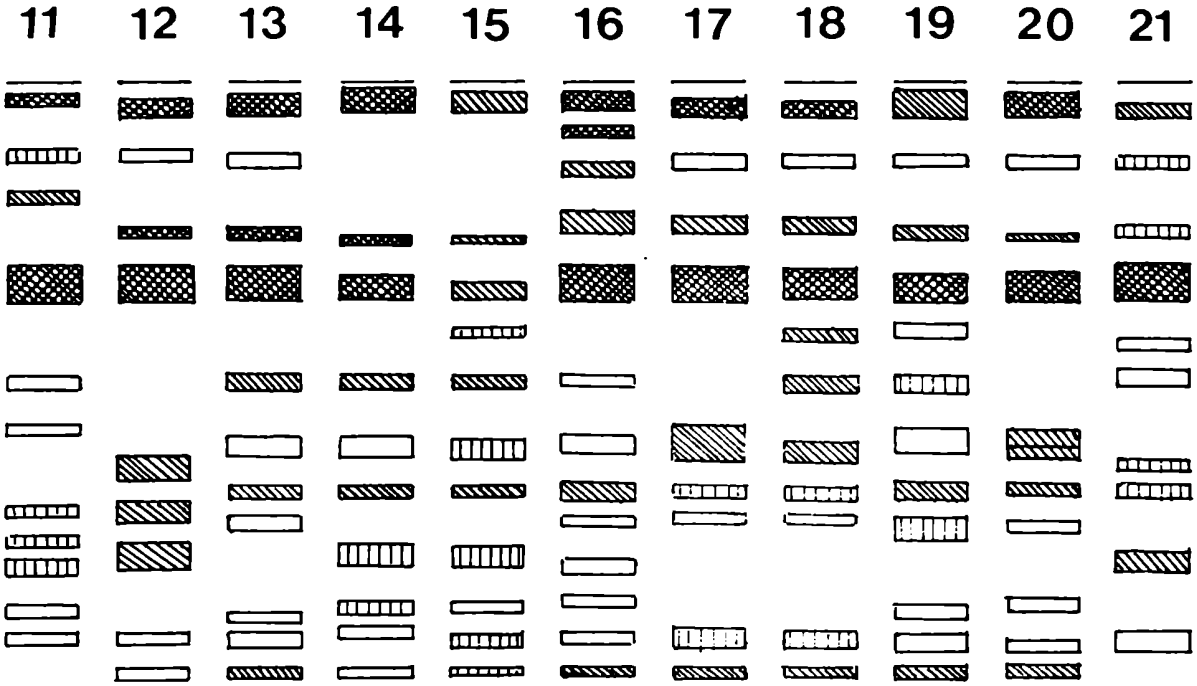
Fueron estudiados 411 individuos de los cuales 84 correspondían a la especie diploide y 327 a la octoploide. Se obtuvieron 39 patrones electroforéticos (Fig. 2 y 3).

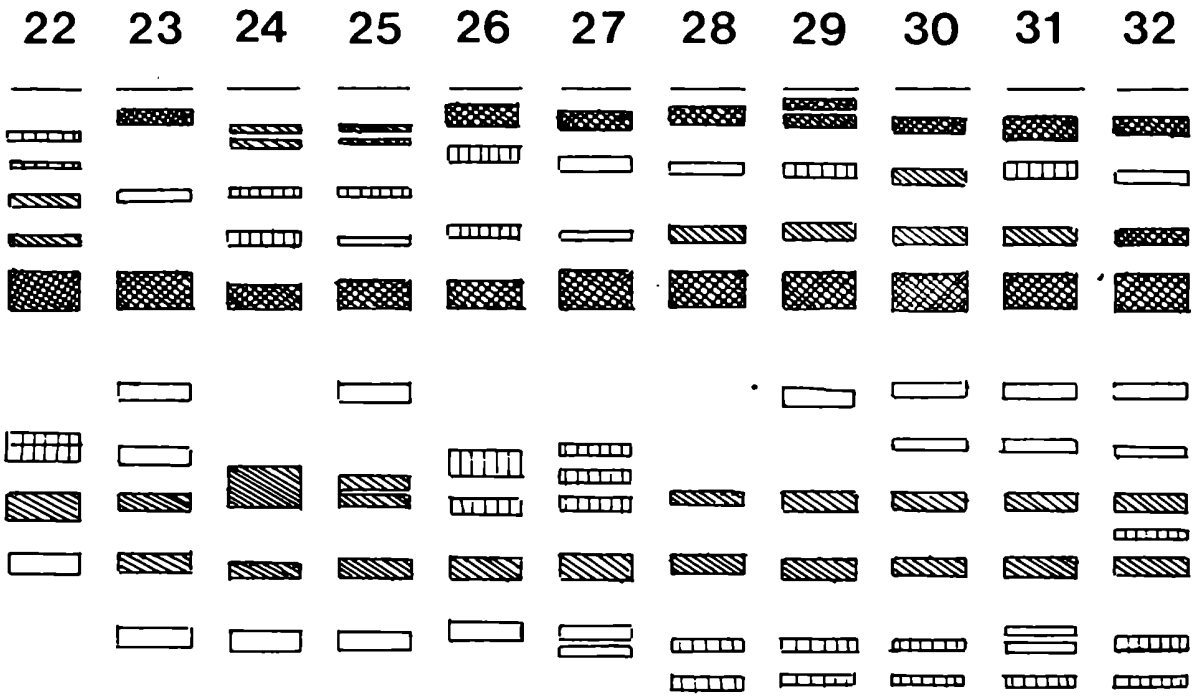
Dentro de estos patrones 18 son compartidos por la especie diploide y octoploide, 19 son exclusivos de la especie octoploide y sólo 1 de la diploide. (Tabla 2).

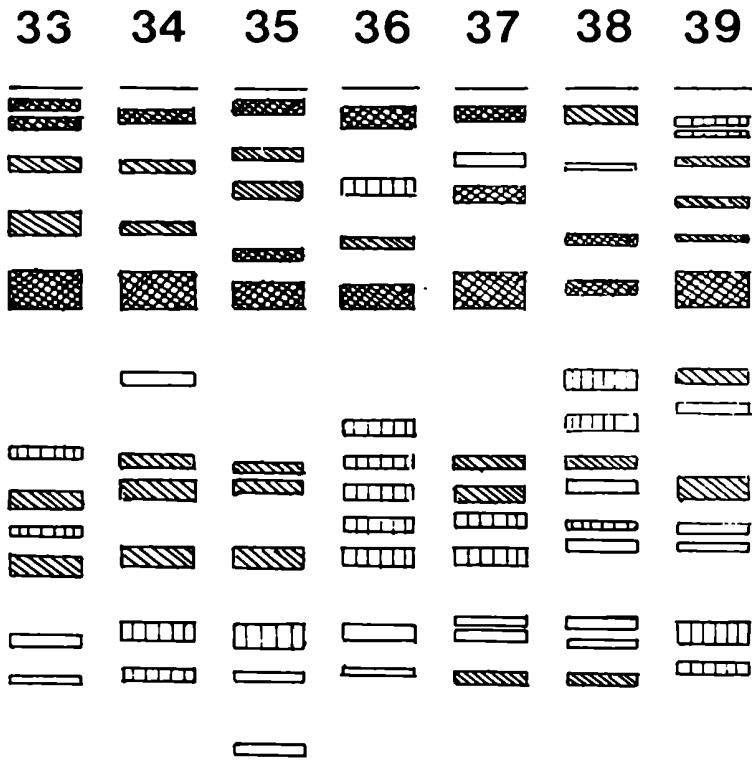
Las bandas proteicas (Fig. 2) están identificadas por letras

Fig. 2 - Esquema de los patrones electroforéticos de C. ornata y C. cranwelli. Los individuos estudiados proceden de las siguientes localidades: a) patrones 1,3,4,5,6,9,10,18,19, 20,22,23,31,32,37,38 y 39 de Benavídez e Ingeniero Maschwitz; b) patrón 2 de las localidades ya nombradas y Lincoln ; c) patrones 7,12,13,15,16,17,33 y 36 como en a) y Bell Ville; d) patrones 8,14 y 21 como en a) y Gobernador Crespo; e) patrón 11 como en a) y Sol de Mayo; f) patrón 13 como en a), Pinto y Bell Ville; g) patrón 24 como en f), Gob. Crespo, Sol de Mayo, James Craik y Sumampa; h) patrón 25 como d), Sol de Mayo. y Sumampa; i) patrón 26 como d), Bell Ville, Las Avispas, San Francisco y Santiago del Estero; j) patrón 27 como c), James Craik y Corral de Bustos; k) patrón 29 como c), James Craik, Gob. Crespo y Sol de Mayo; l) patrón 34 como en a), James Craik y Corral de Bustos; m) patrón 35 de Pinto, Sol de Mayo, Bell Ville y Gob. Crespo.


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
a
b
c
d
e
f
g
h
i
j
k
l
m
n
o
p


11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21


22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32




Bandas de mayor intensidad

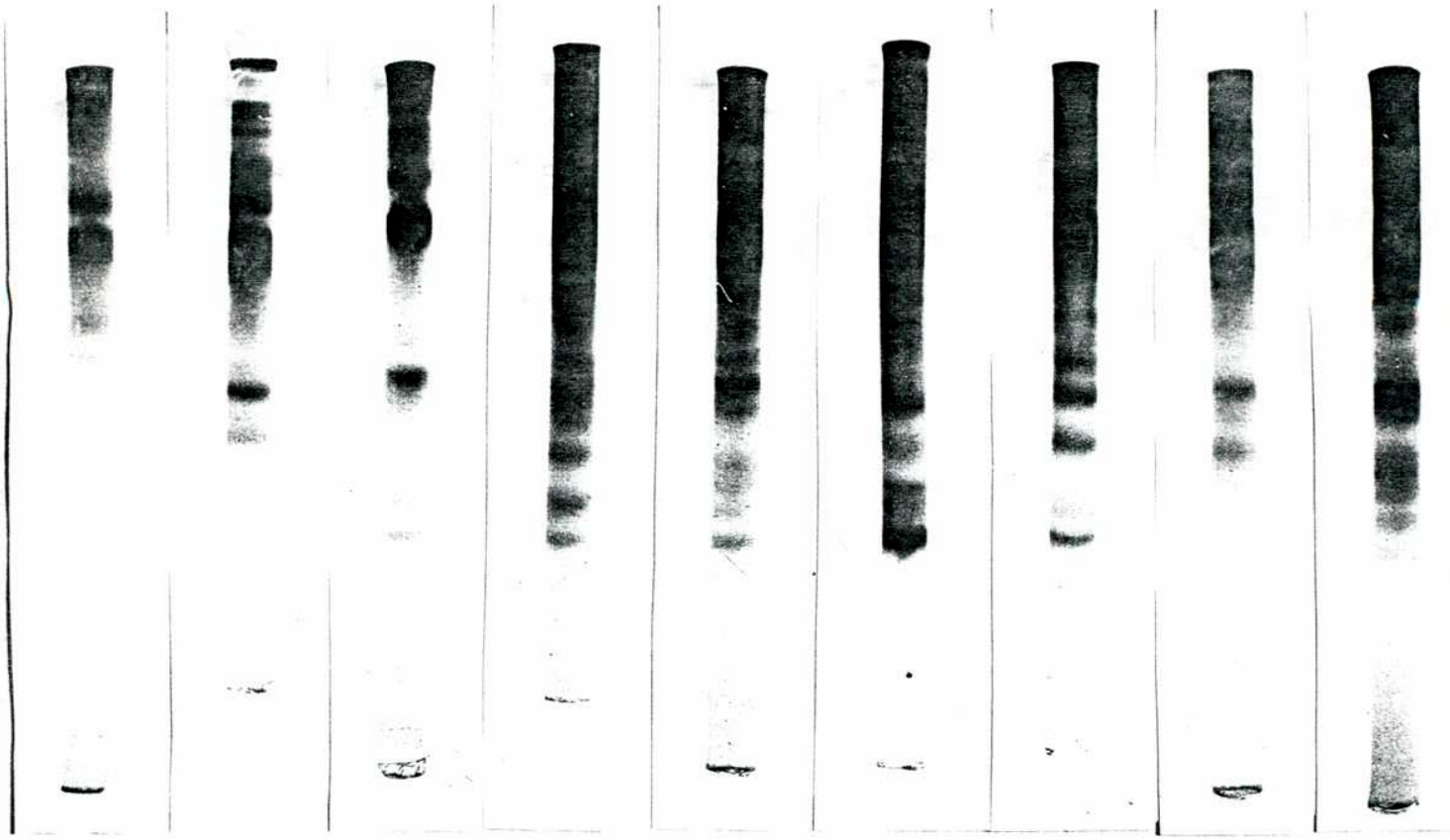


Fig. 3 - Algunos patrones electroforéticos de proteínas miógenas de Ceratophrys diploide y octoploide. De izquierda a derecha están ordenados los siguientes patrones: 4, 29, 16, 32, 16, 19, 31, 33, 30.

| Patrones electroforéticos | N° bandas | N° ejemplares | Frecuencia | % diploides |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 10 | 5 | 1,23 | -- |
| 2 | 10 | 6 | 1,48 | -- |
| 3 | 10 | 11 | 2,72 | -- |
| 4 | 12 | 2 | 0,49 | -- |
| 5 | 10 | 1 | 0,25 | -- |
| 6 | 15 | 9 | 2,22 | -- |
| 7 | 9 | 16 | 3,95 | 6,25 |
| 8 | 11 | 8 | 1,97 | 12,50 |
| 9 | 11 | 16 | 3,95 | -- |
| 10 | 7 | 3 | 0,74 | -- |
| 11 | 11 | 2 | 0,49 | 50,00 |
| 12 | 9 | 10 | 2,47 | 20,00 |
| 13 | 10 | 28 | 6,91 | 21,43 |
| 14 | 11 | 6 | 1,48 | 16,60 |
| 15 | 10 | 19 | 4,69 | 5,26 |
| 16 | 13 | 11 | 2,72 | 9,10 |
| 17 | 9 | 4 | 0,99 | 25,00 |
| 18 | 11 | 1 | 0,25 | -- |
| 19 | 12 | 5 | 1,30 | -- |
| 20 | 10 | 8 | 1,97 | -- |
| 21 | 10 | 8 | 1,97 | 12,50 |
| 22 | 9 | 2 | 0,49 | -- |
| 23 | 8 | 10 | 2,47 | -- |
| 24 | 8 | 30 | 7,41 | 76,60 |
| 25 | 10 | 12 | 2,96 | 50,36 |
| 26 | 8 | 24 | 5,92 | 70,83 |
| 27 | 10 | 9 | 2,22 | 55,50 |
| 28 | 8 | 28 | 6,91 | -- |
| 29 | 10 | 26 | 6,42 | 12,50 |
| 30 | 10 | 19 | 4,69 | -- |
| 31 | 11 | 18 | 4,44 | -- |
| 32 | 11 | 2 | 0,49 | -- |
| 33 | 11 | 6 | 1,48 | 16,66 |
| 34 | 10 | 20 | 4,94 | 5,26 |
| 35 | 11 | 13 | 3,21 | 100,00 |
| 36 | 11 | 4 | 0,99 | 25,00 |
| 37 | 11 | 7 | 1,73 | -- |
| 38 | 13 | 1 | 0,25 | -- |
| 39 | 13 | 1 | 0,25 | -- |

Tabla 2 - Análisis de los patrones electroforéticos de proteínas miógenas de - C. ornata y de C. cranwelli.

siguiendo el orden alfabético desde el extremo catódico. El número total de bandas asciende a 16. Si incluimos las que aparecen como desdobladas de una determinada banda hacen un total de 21. El máximo número de bandas lo encontramos en el patrón N° 6 con 15 bandas. El mismo está representado por individuos octoploides. Le siguen el N° 16, 38 y 39 con 13 bandas cada uno. Los 2 últimos patrones están representados por individuos octoploides y el N° 16 por 1 diploide y 10 octoploides.

La electroforesis en gel de pliacrilamida de proteínas musculares revela la existencia de dos bandas que aparecen en todos los electroforegramas analizados (ver tabla 3). Estas son la f y la j; la banda a, que corresponde a la de mayor movilidad, si bien aparece en todas las corridas, no puede homologarse en los distintos individuos en forma categórica debido probablemente a errores en la técnica por la interferencia de la precipitación de proteínas poco solubles en el lugar de siembra.

## Parvalbúminas

Las parvalbúminas son proteínas no enzimáticas, de pequeño tamaño, altamente solubles en agua y con gran movilidad electroforética, calcioproteínas propias de los vertebrados inferiores (Pechere et al., 1974).

Los registros fueron realizados a 254 nm, debido a que las parvalbúminas poseen un espectro de absorción inusual en U V, como consecuencia de una composición no balanceada en la cual el tripto

| Bandas | Frecuencias Totales | Grupos compartidos | Octoploide | Diploide |
|---|---|---|---|---|
| a | 92,3 | 87,5 | 95,5 | si |
| b | 13 | 18,8 | 9,1 | |
| c | 82 | 87,5 | 77,3 | si |
| d | 25,6 | 25 | 22,7 | si |
| e | 89,7 | 14 | 86,4 | si |
| f | 100 | 100 | 100 | si |
| g | 10,1 | 6,3 | 13,6 | |
| h | 56,4 | 50 | 68,2 | |
| i | 82 | 75 | 91 | si |
| j | 100 | 100 | 100 | si |
| k | 48,7 | 37,5 | 59 | |
| l | 74,4 | 87,5 | 63,6 | si |
| m | 36 | 18,8 | 50 | |
| n | 87,2 | 100 | 95,5 | si |
| o | 74,4 | 63 | 82 | si |
| p | 2,6 | | | si |

Tabla 3 - Frecuencias de las bandas presentes en los distintos patrones electroforéticos de proteínas miógenas.

fano está casi siempre ausente mientras que la fenilalanina está presente en alta cantidad (Pechere et al., 1974).

El segundo de los picos (obtenido por fraccionamiento cromatográfico en columnas de Sephadex) sería el que contendría las parvalbúminas (Fig. 4).

Se encontró, por comparación de las corridas electroforéticas realizadas al mismo tiempo del homogenato entero y de parvalbúminas purificadas por el método descripto, que éstas corresponderían a las bandas a, b, c, d, y e de los patrones de proteínas miógenas. (Fig. 2).

Proteínas séricas

Efectuando corridas simultáneas de suero de ambas especies y de suero humano normal, se pudo observar que predominaban en estos animales aquellas fracciones que tenían movilidad muy similar a las $\alpha$, $\beta$ globulinas, albúmina y prealbúmina humana, tanto en gel de poliacrilamida como en acetato de celulosa.

Existe gran polimorfismo en la fracción de las globulinas tanto en la especie octoploide como en la diploide. La variación intraespecífica es muy grande como para establecer alguna diferencia interespecífica. (Fig. 5).

Las fracciones de prealbúminas tienen un $R_f$ similar al de la albúmina de suero humano normal o de albúmina bovina. En los C.cranwelli estudiados no aparecían prealbúminas, en cambio en C.ornata se registraron o ninguna, 1 ó 2 fracciones que corrían con movili-

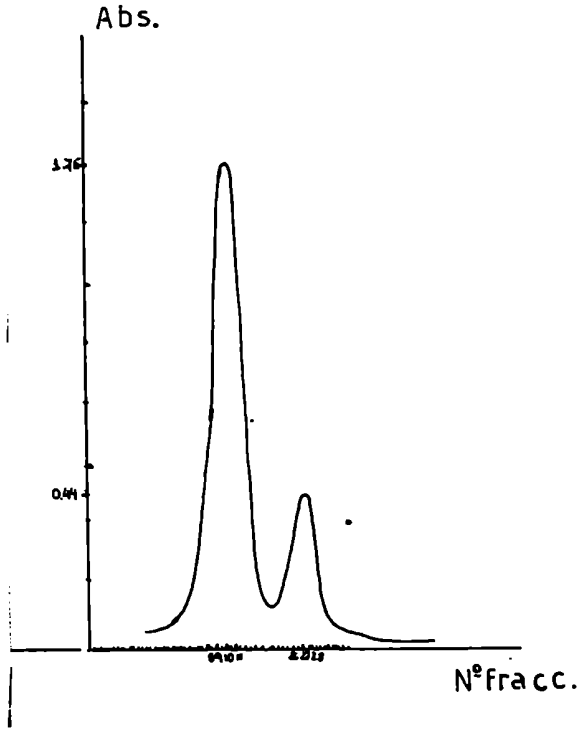



Fig. 4 - Cromatografía en Sephadex de miógeno de <u>Ceratophrys ornata</u> fraccionado con $(NH_4)_2SO_4$. Registro a 254 nm.

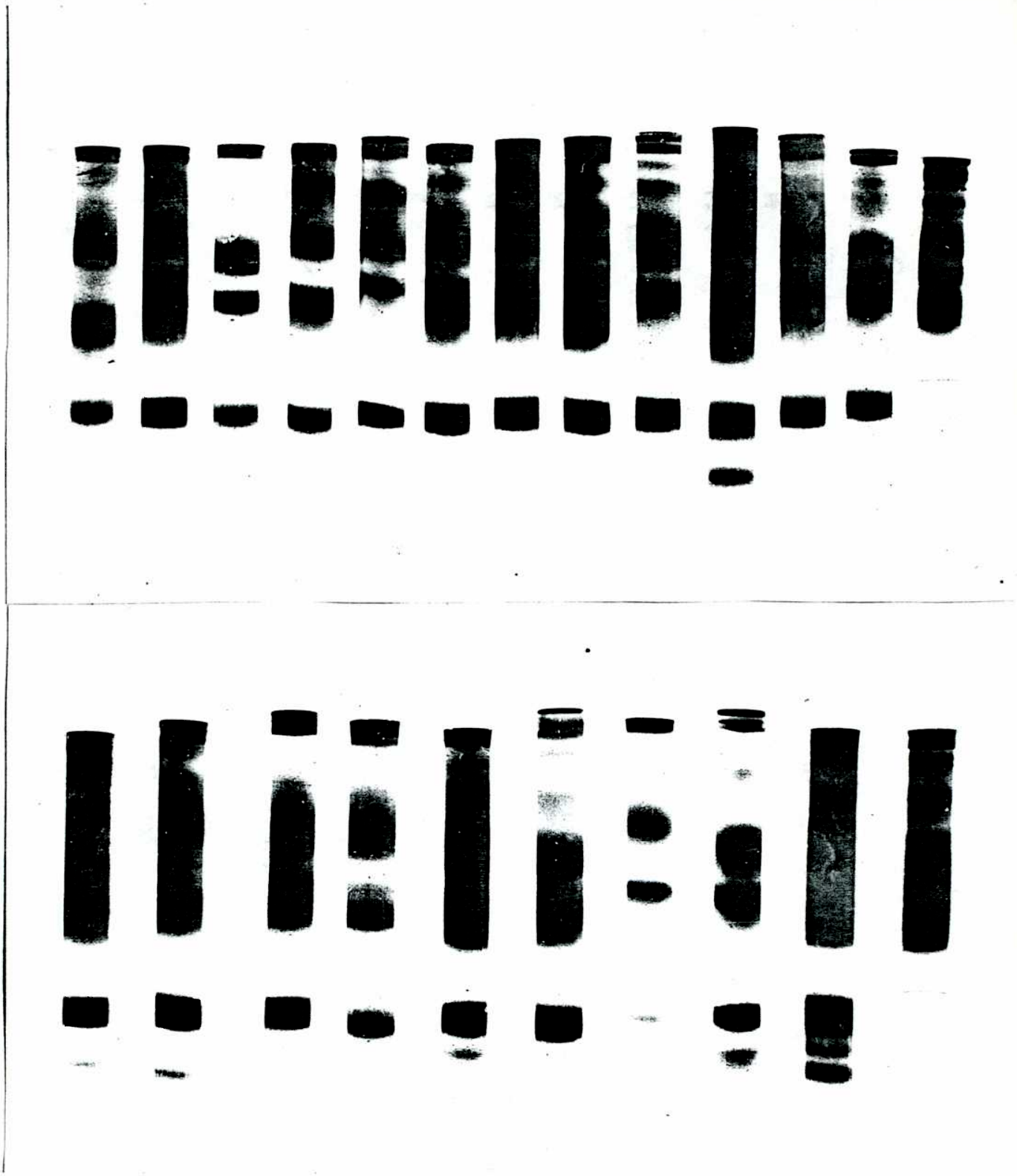


Fig. 5 - Separación de proteínas séricas en gel de poliacrilamida. Fotografía superior mostrando el polimorfismo en ejemplares de la especie diploide; fotografía inferior, en la especie octoploide.

dad de prealbúmina. Estas fracciones se encontraban en 3 posiciones diferentes. En C. cranwelli se presentaron 3 excepciones. Se trataba de individuos procedentes de Corral de Bustos, Rosales y de Rufino que presentaban una prealbúmina. Estas localidades tienen un gran interés pues allí se encuentran poblaciones cuyos individuos poseen álgunos caracteres exosomáticos de la especie octoploide (especialmente su coloración y distribución de manchas en el dorso). No fue realizado un estudio minucioso de las prealbúminas.

En la región de proteínas que corrían como albúminas se verificaron 3 fracciones (Tablas 4, 5, 6 y 7). Estas nunca aparecían juntas sino 1 ó 2 a la vez. En C. ornata, en la región de la banda 1 aparecían otra de distinta movilidad. Se pudo comprobar la existencia de 3 fracciones sólo por comparación de las 2 técnicas utilizadas, así como también la detección de la cuarta banda en la región de la fracción 1 en C. ornata. A la banda de albúmina de mayor frecuencia le fue asignada una movilidad igual a 100 para poder estudiar comparativamente las otras dos bandas en ambas especies. En C. cranwelli cuando presentaba dos bandas, éstas estaban en una relación 1:1. En cambio en C. ornata se presentaban relaciones 2:6,7:1, 3:5 y 4:1 (Fig. 6) verificándose un efecto por dosis génica; ésto nos conduciría a considerar la existencia de 1 locus génico (Albúmina) con 3 alelos (4 alelos en los individuos 2', 4', 17' y 13 ), el cual existe octuplicado.

En el presente trabajo fueron utilizadas también corridas electroforéticas de suero en acetato de celulosa que fueron realizadas en años anteriores, con el fin de poder aprovechar dicha in-

Ceratophrys cranwelli

| Animal N° | Fracciones 1 | 2 | 3 | Dosis | |
|---|---|---|---|---|---|
| II | X | X | | 1 | 1 |
| II | X | X | | 1 | 1 |
| V | | X | | | |
| VI | X | | X | 1 | 1 |
| VII | | X | X | 1 | 1 |
| VIII | X | X | | 1 | 1 |
| IX | X | | | | |
| X | X | X | | 1 | 1 |
| XI | | X | X | 1 | 1 |
| XII | X | | | | |
| XIII | X | | X | 1 | 1 |
| XIV | | X | | | |
| XV | | X | | | |
| XVI | | X | | | |
| XVII | | X | | | |
| XVIII | | X | | | |
| XIX | | X | | | |
| XX | X | X | | 1 | 1 |
| XXII | | | X | | |
| XXIII | X | X | | 1 | 1 |
| XXIV | | X | | | |
| XXV | X | | | | |
| XXVI | | X | X | 1 | 1 |
| XXVII | | | X | | |
| XXVIII | | X | X | 1 | 1 |
| XXIX | X | X | | 1 | 1 |
| XXX | | X | | | |

Tabla 4 - Fracciones proteicas con movilidad semejante a la albúmina halladas en C. cranwelli procedentes de Sumampa.

Ceratophrys cranwelli

| Animal N° | Fracciones 1 | 2 | 3 | Dosis | |
|---|---|---|---|---|---|
| C-1 | | | X | | |
| C-2 | | | X | | |
| C-3 | X | | | | |
| C-4 | | | X | | |
| C-5 | | X | X | 1 | 1 |
| C-51 | X | | | | |
| C-6 | | | X | | |
| C-7 | X | | | | |
| C-8 | | | X | | |
| C-9 | X | | | | |
| C-10 | | X | | | |
| C-11 | X | | | | |
| C-12 | | X | | | |
| C-13 | | X | | | |
| C-14 | | X | X | 1 | 1 |
| C-15 | | X | X | 1 | 1 |
| C-16 | X | | X | 1 | 1 |
| C-17 | | X | | | |
| C-18 | | X | | | |
| C-19 | X | | | | |
| C-20 | X | X | | 1 | 1 |
| C-21 | X | | X | 1 | 1 |
| C-22 | X | | | | |
| C-23 | | X | X | 1 | 1 |
| C-24 | X | X | | 1 | 1 |
| C-25 | | | X | | |
| C-26 | | X | | | |

Tabla 5 - Fracciones proteicas que corren como albúmina halladas en C. cranwelli. No se observa la presencia de la cuarta banda (entre la 1 y la 2). Procedencias: Villa del Rosario, Castelli, Frías, Guardia Escolta, El Ratón, La Lucila.

Ceratophrys ornata

| Animal N° | Fracciones 1 | 2 | 3 | Dosis |
|---|---|---|---|---|
| 1' | | X | | |
| 2' | Xo | | | |
| 3' | | X | X | 2 6 |
| 4' | Xo | X | | 1 1 |
| 6' | | X | | |
| 10' | | X | X | 3 : 5 |
| 11' | | X | X | 1 7 |
| 12' | | | X | |
| 13' | | X | | |
| 14' | | X | | |
| 15' | | X | X | 3 5 |
| 16' | | X | | |
| 17' | Xo | | | |
| 18' | | | X | |
| 19' | | X | X | 2 6 |
| 20' | | X | | |
| 21' | X | X | | 7 1 |
| 22' | | | X | |
| 24' | | X | | |
| 26' | | X | | |
| 27' | X | X | | 3 : 5 |
| 29' | | X | | |

Tabla 6 - Fracciones proteicas con movilidad semejante a la albúmina halladas en el suero de C. ornata procedentes de Benavídez. Los animales 2', 4' y 17' poseen una fracción que migra más rápidamente que la 1.

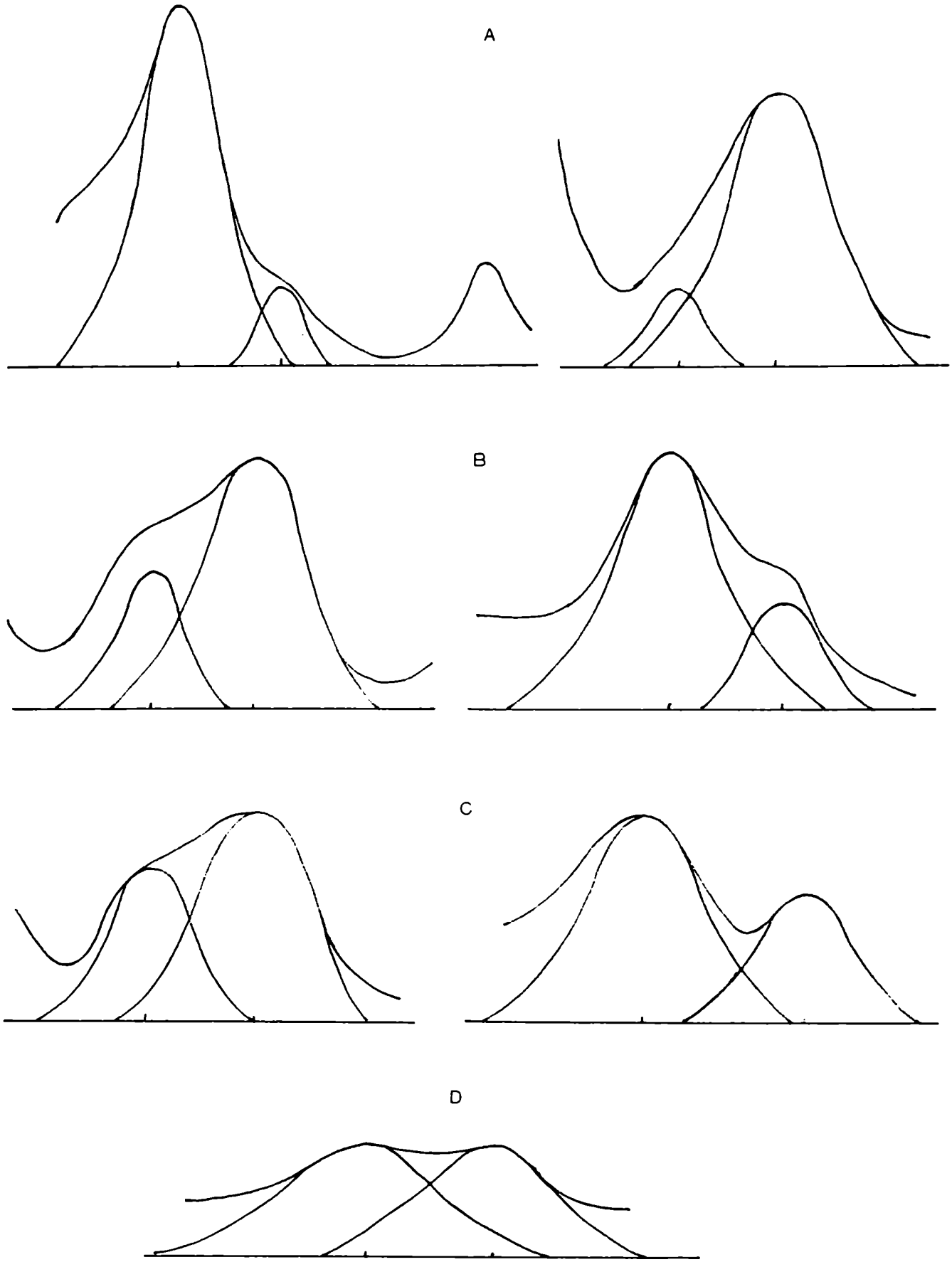
Tabla 7 - Fracciones proteicas que corren como albúmina halladas en C. ornata por el método de separación electroforética. El animal N° 13 posee una fracción que migra más rápidamente que la 1. La procedencia de los animales estudiados es la siguiente: Benavídez=3, 6, 11, 16, 17. Florencio Varela=1.4 , 14. Ingeniero Maschwitz=2. La Matanza=0.1, 0.2, 0.5, 0.6, 0.7, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.6, 1.7, 1.9, 4, 5, 7, 10, 15, 18. Oro Verde=0.3, 0.4, 0.8, 1.3, 1.5, 1.8. Otamendi=8, 9, 10. Uruguay=12.

Ceratophrys ornata

| Animal N° | Fracciones 1 | 2 | 3 | Dosis |
|---|---|---|---|---|
| 0.1 | | | X | |
| 0.2 | | | X | |
| 0.3 | | | X | |
| 0.4 | | X | | |
| 0.5 | | X | X | 2 : 6 |
| 0.6 | | | X | |
| 0.7 | | X | X | 1 7 |
| 0.8 | | X | X | 2 : 6 |
| 0.9 | | X | X | 6 2 |
| 1.0 | X | | | |
| 1.1 | | X | | |
| 1.2 | | X | X | 5 : 3 |
| 1.3 | | | X | |
| 1.4 | | X | X | 2 6 |
| 1.5 | X | | X | 1 1 |
| 1.6 | X | X | | 2 : 6 |
| 1.7 | X | X | | 1 7 |
| 1.8 | | | X | |
| 1.9 | | X | X | 3 : 5 |
| 2 | | X | | |
| 3 | | X | X | 1 7 |
| 4 | | X | | |
| 5 | | | X | |
| 6 | | X | | |
| 7 | | | X | |
| 8 | | X | | |
| 9 | | X | | |
| 10 | | X | X | 3 : 5 |
| 11 | | X | | |
| 12 | | X | | |
| 13 | Xo | X | | 1 7 |
| 14 | | X | X | 2 : 6 |
| 15 | | X | | |
| 16 | | X | | |
| 17 | X | | | |
| 18 | X | X | | 1 7 |

Fig. 6 - Gráficos obtenidos por medición densitométrica de corridas en acetato de celulosa que muestran las distintas proporciones en que se encuentran las fracciones de proteínas séricas que migran como albúmina. A: proporciones 7:1 y 1:7 (animales 21' y 0.7), B: proporciones 2:6 y 6:2 (animales 0.5 y 0.9), C: proporciones 3:5 y 5:3 (animales 10 y 1.2), D: proporción 1:1 (animal XI). A., B y C corresponden a C. ornata y D a C. cranwelli.

Dirección de corrida de izquierda a derecha.


A
B
C
D

formación. Se presentó el inconveniente que las muestras fueron - sembradas en tiras por separado y no de a dos, lo cual facilitaría su comparación. No obstante se pudo llegar a los mismos resultados (también con la comparación de la cuarta banda en la región de la banda 1) gracias a la presencia de la banda 2 de mayor frecuencia.

En la tabla 8 se presentan las frecuencias alélicas para las fracciones que corren como albúmina para C. ornata, considerando no sólo la presencia de bandas y sino también el efecto de dosis. Para el cálculo de las frecuencias se consideró la banda 1' como 1 , como si fuesen una. Se observa que en C. cranwelli la frecuencia de las bandas 1 y 3 son aproximadamente similares pero siempre menores que la de la banda 2.

En C. ornata las frecuencias de las bandas de mayor movilidad (2 y 3) son las más altas. Sólo la población de Oro Verde la frecuencia de la banda 3 es de mayor frecuencia que la 2. Es de hacer notar que Oro Verde es la población más austral estudiada en - el presente trabajo. Para llegar a una conclusión sería necesario el análisis de las proteínas séricas de las poblaciones que se encuentran en el límite sur de la distribución de C. ornata.

## Haptoglobinas

Estas son proteínas séricas con capacidad de unión a la hemoglobina y migran como las $\alpha_2$ globulinas (Ferris et al., 1966).Al formar el complejo Hb-Hp aparecen no sólo en esta región sino que se observan en la región de las $\beta$ globulinas, correspondiendo éstas

| Localidad | N° de animales estudiados | Frecuencia alélica 1 | 2 | 3 |
|---|---|---|---|---|
| Sumampa, Guardia Escolta y Frías | C.c. n=38 | 0,27 | 0,48 | 0,25 |
| Santa Fe | C.c. n=12 | 0,31 | 0,38 | 0,31 |
| Benavídez, Ing. Maschwitz y La Matanza | C.o. n=47 | 0,15 | 0,47 | 0,38 |
| Oro Verde | C.o. n=6 | 0,06 | 0,18 | 0,76 |

Tabla 8 - Frecuencia de las fracciones proteicas que migran como albúmina. En C. ornata ha sido considerado el efecto debido a la dosis en que se encuentra cada alelo. Las localidades están ubicadas de norte a sur.

a la Hb. libre. También hay bandas en la región de la albúmina ya que se une a la hematina ($Fe^{3+}$) originando metahemalbúmina. Estas dos últimas producen patrones concordantes con el tipo de las otras Hp. de la especie en consideración (Ferris et al., 1966) aunque la hemoglobina procediera de otros individuos de la misma especie sea cual fuera el origen de la hemoglobina utilizada.

Comparando corridas hechas con suero y su hemoglobina y con otra hemoglobina, se lograron resultados concordantes. (Fig. 7).

Existe correspondencia entre el número de albúminas y de prealbúminas con la aparición de bandas de haptoglobinas en esa región. Por excepción hubo dos casos (1 ejemplar de James Craik y otro de Benavídez) donde aparecían dos bandas de haptoglobinas en la región donde, por tinción con Amido Schwartz, aparecía una sola albúmina. Las bandas de haptoglobinas de mayor intensidad en Ceratophrys se ubican entre las zonas que migran como $\alpha_1$ $\alpha_2$ globulinas humanas.

De los 89 ejemplares estudiados (51 octoploides y 38 diploides) se registraron 29 patrones electroforéticos distintos; 16 exclusivos a la especie octoploide (número de bandas varían de 4 a 10, siendo el de 6 bandas el más frecuente; luego de los de 7 y 8 bandas) 6 exclusivos a la especie diploide (número de bandas 4 a 6; el de 6 es el más frecuente) y 7 patrones que son compartidos por ambas especies (número de bandas 5 a 6) (Fig. 8).

En la totalidad de la investigación de las haptoglobinas se comprobó mayor polimorfismo intrapoblacional en la especie octoploide tanto respecto a la cantidad de patrones como de bandas por pa-

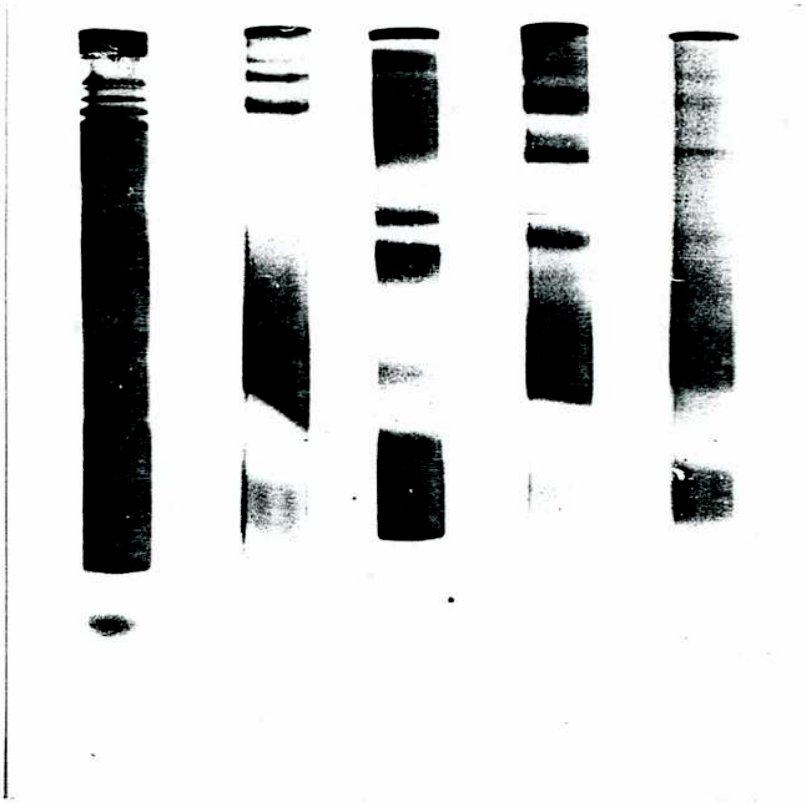
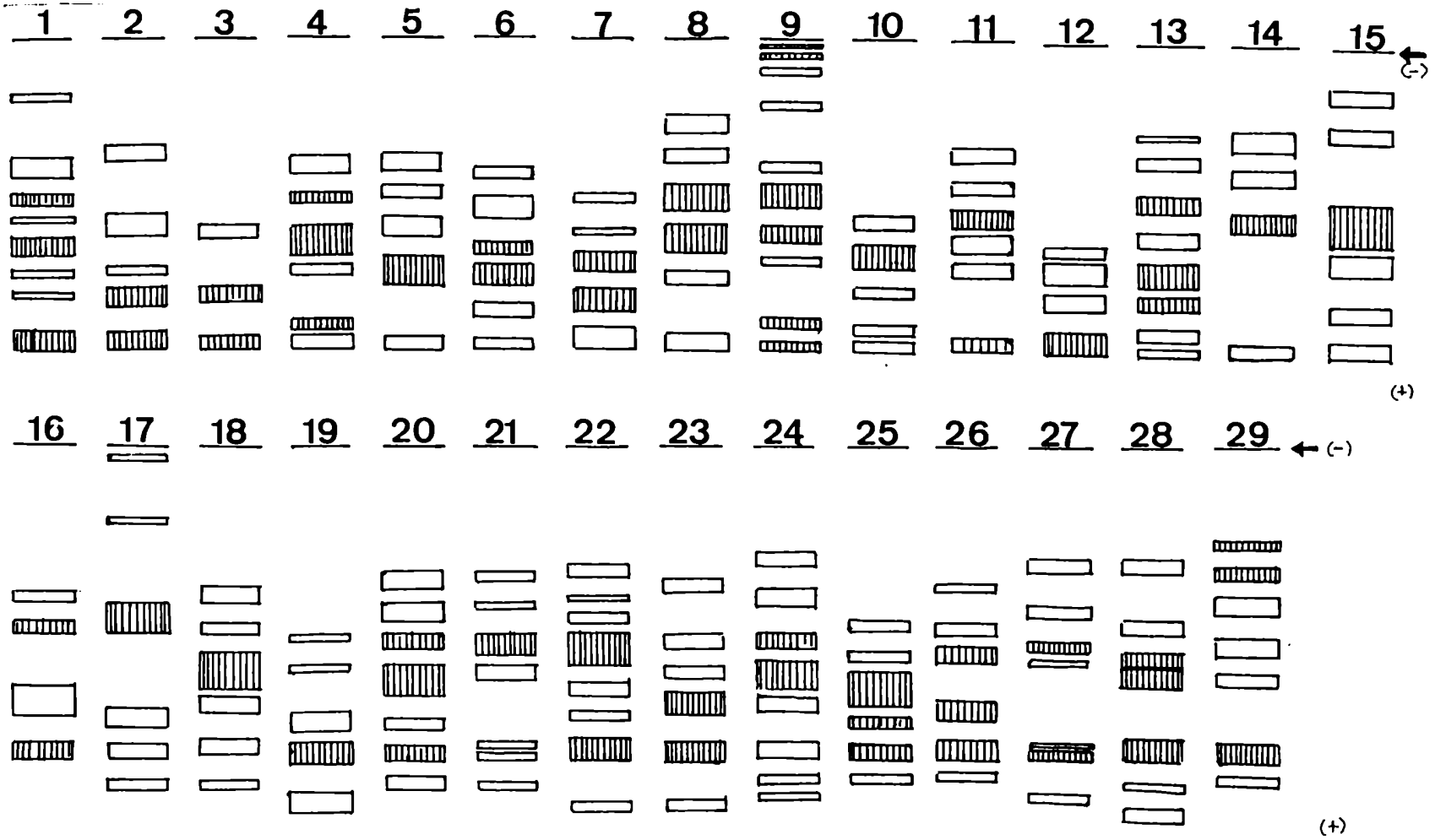


Fig. 7 - Separaciones electroforéticas que muestran (de izquierda a derecha) un suero humano, haptoglobinas humana, SHN (pool), haptoglobinas de SHN con hemoglobina humana, haptoglobina humana con hemoglobina de escuerzo.

Fig. 8 - Patrones electroforéticos de haptoglobinas de C. ornata y C. cranwelli. Extremo catódico. Patrones 1, 2, 4, 9, 12, 13, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 y 28 representados por C.ornata. Patrones 7, 10, 11, 14, 15, 16, 17, 27 y 29 representados por C. cranwelli. El resto de los patrones son compartidos.


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
(-)
(+)

trón. A este respecto debe tenerse en cuenta lo señalado por Riggs et al. (1964) en tortugas y anfibios: en los esquemas electroforéticos aparece un segundo componente de la hemoglobina, el cual se evidencia durante la hemólisis y no existe en el animal vivo. Se cree que se origina por polimerización, y su proporción aumenta con el tiempo de almacenaje.

LDH

Se analizaron los patrones electroforéticos de LDH en hígado, corazón, riñón, testículo, cuerpo graso y bazo (Fig. 9). El número de individuos y patrones enzimáticos figuran en la tabla 9.

En riñón se determinaron 8 zimogramas que diferían en la distribución de la intensidad de las bandas y del número de las mismas. Hubo mayor polimorfismo intrapoblacional en la especie octoploide, presentando ésta patrones con 4 y 5 bandas. En éste último caso la banda 1 en un patrón y la 5 en otro, estaban subdivididos. (Fig.9). (Las bandas son numeradas desde el punto de siembra).

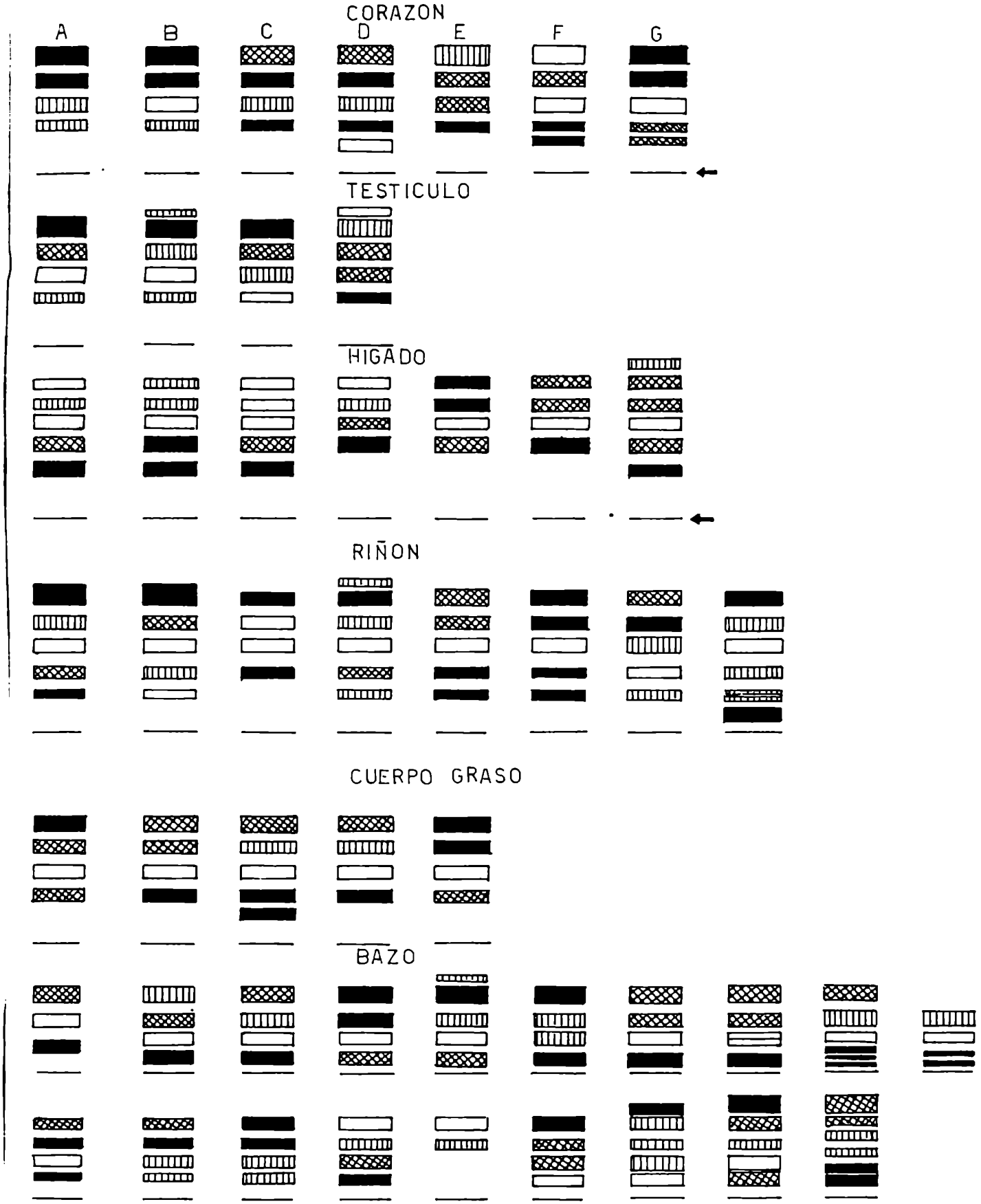
En testículo, los 4 zimogramas tenían esencialmente 4 bandas, estando la 1 subdividida en dos de ellos. Las bandas anódicas eran de mayor intensidad. No se pudo establecer diferencias significativas entre ambas especies.

En corazón, la banda 5 estaba subdividida en 2 de los 7 zimogramas. Esto se observó en la especie octoploide que era la que presentaba mayor polimorfismo. Se pudo observar un aumento en la frecuencia en que estaba representada la especie diploide desde el

| Organos | N° indiv. octop. | N°indiv. dip. | Total | Patrones enzimáticos | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | compart. | octop. | dip. | Total |
| Hígado | 50 | 15 | 65 | 4 | 3 | | 7 |
| Riñón | 29 | 28 | 57 | 3 | 4 | 1 | 8 |
| Corazón | 39 | 19 | 58 | 3 | 4 | | 7 |
| Testículo | 13 | 5 | 18 | 1 | 2 | 1 | 4 |
| Bazo | 29 | 27 | 56 | 5 | 9 | 5 | 19 |
| Cuerpo graso | 17 | 20 | 37 | 5 | | | 5 |

Tabla 9 - Individuos estudiados y patrones enzimáticos hallados de LDH en Ceratophrys octoploide y diploide.

Fig. 9 - Zimogramas de LDH en distintos tejidos de C. ornata y C. cranwelli. Extremo catódico. Corazón=D,F,G sólo octoploides, el resto compartidos. Testículo=B,C octoploides, D diploides y A compartido. Hígado=D,F,G octoploides, el resto compartidos. Riñón=C,D,F,G,H octoploides, A,B, E compartidos. Cuerpo graso=compartidos. Bazo=E,H,I,B',C'E',F'G',H' octoploides, A,F,A',D',I' diploides, el resto compartidos.


CORAZON
A
B
C
D
E
F
G
TESTICULO
HIGADO
RIÑON
CUERPO GRASO
BAZO

patrón A al C.

En hígado, como en Mamíferos, la banda de mayor intensidad era la catódica. También el mayor polimorfismo caracterizaba a la especie octoploide, encontrándose en ésta patrones con 4 y 6 bandas.

En cuerpo graso el grado de polimorfismo era semejante en ambas especies. En uno de los 5 patrones enzimáticos estaba subdividida la banda 5.

El órgano donde se encontró el mayor número de distintos tipos de zimogramas fue el bazo; 19 patrones consistentes de 3 a 6 bandas. Una probable respuesta a ésto podría encontrarse dentro de las funciones del bazo, especialmente en su participación en los procesos infecciosos e inmunitarios.

En suero de ambas especies la LDH tenía 5 bandas: la banda 1 migraba como la 2 de suero humano normal, la 2 entre la 2 y 3 de SHN y la 4 corría como la 4 de SHN.

Se pueden agrupar en 17 los patrones electroforéticos de LDH en suero de Ceratophrys, donde 3 son exclusivos de la especie octoploide, 9 compartidos y 5 que presenta sólo la especie diploide. (Fig. 10).

Las diferencias entre estos zimogramas radica en la intensidad de las distintas bandas y en la aparición de una subbanda en la banda 1 y en la 5. Decimos que algunos patrones son compartidos basándonos exclusivamente en la intensidad de la coloración presentada, aunque más estrictamente, si se toma en cuenta otro elemento de juicio, se ve que todas las bandas de la especie diploide migran más rápidamente que las correspondientes a las de la especie octo-

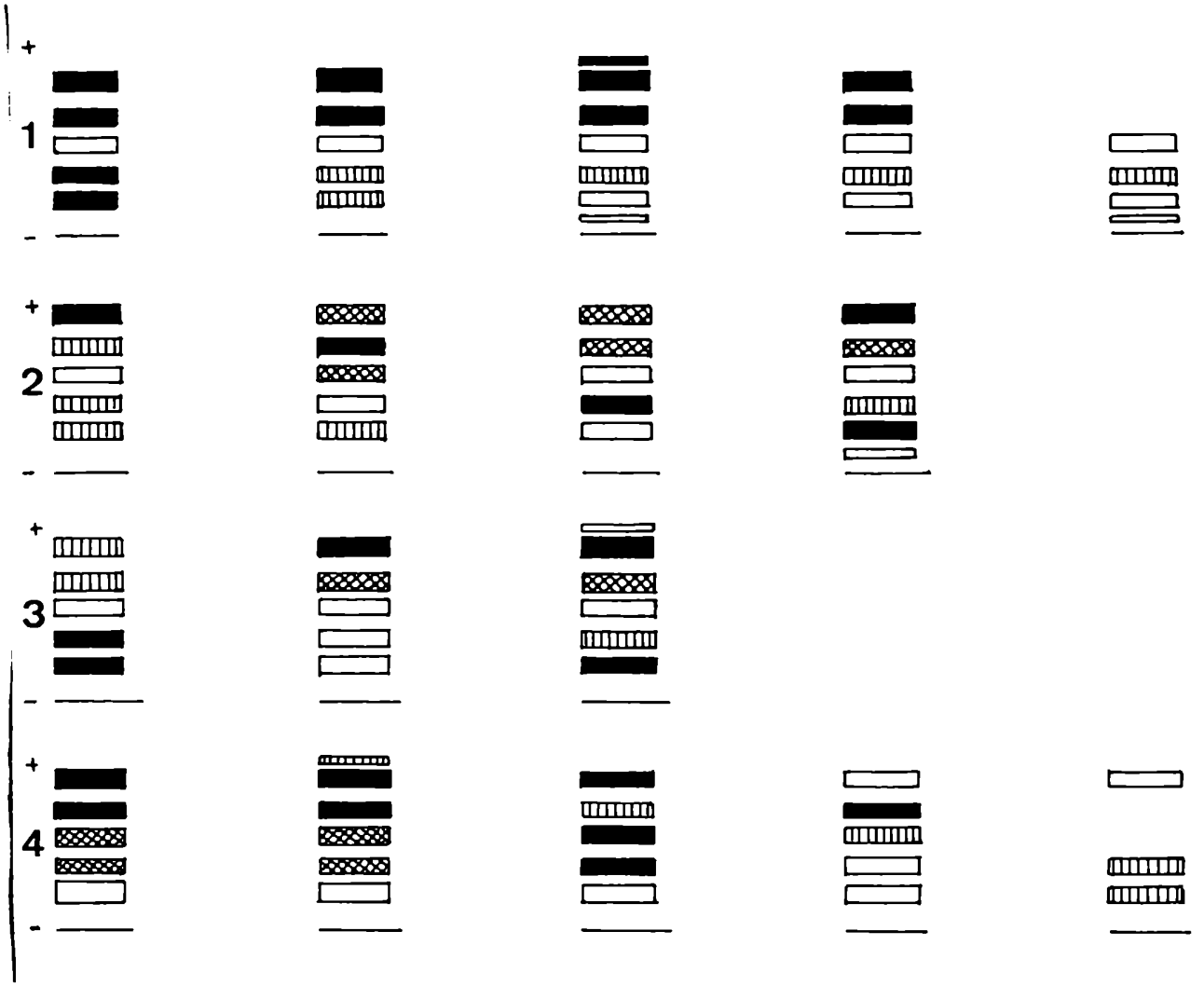



Fig. 10 - Zimogramas de LDH en suero de Ceratophrys diploides y octoploides.

Fila 1 y 2 representan patrones compartidos.

Fila 3, patrones de individuos octoploides y fila 4 de individuos diploides.

ploide.

Debemos exceptuar a los C. cranwelli procedentes de James Craik y de Rufino cuyas bandas migraban como la de los C. ornata bonaerenses.

Si aceptamos la existencia de las 4 subunidades de la LDH, podríamos aquí suponer la existencia de 4 subunidades distintas, - modificadas en algún aminoácido o que existiese otro alelo para dicho polímero.

Debe mencionarse que en ciertos estados patológicos se produce una infiltración en el suero de las enzimas del tejido dañado y produce una alteración del patrón enzimático del suero normal (Dixon & Webb, 1964).

Los patrones de LDH en Ceratophrys se ubican entre la LDH-2 y LDH-4 del suero humano normal. Se puede inferir que se trataría de LDH-2 debido a que en la gran mayoría de los casos consistían los patrones de 4 bandas, pudiendo ser heterocigota en la subunidad A ó B, suponiendo que las bandas catódicas son tetrámeros $A_4$ y las anódicas tetrámeros $B_4$. La presencia de 5 ó 6 bandas en algunos casos se debería a la alteración de algún polipéptido. La - fracción adicional podría considerarse como una subbanda, más que una banda, debido al espaciamiento en relación a las otras bandas entre sí.

MDH

Los patrones electroforéticos de la MDH-NAD dependiente en

riñón son compartidos por la especie diploide y por la octoploide. Los individuos heterocigotas presentan 3 bandas, sugiriendo que la molécula es un dímero (Fig. 11). La banda de mayor intensidad podía estar ubicada tanto en la región catódica como en la región intermedia entre la catódica y la anódica.

En C. ornata los patrones bibandeados de menor velocidad de migración se dividían en 3 tipos de acuerdo a la ubicación de la banda de mayor intensidad.

La MDH soluble NAD dependiente en cuerpo graso migra catódicamente y es monomórfica en los individuos analizados de ambas especies. La velocidad de migración es también similar.

El patrón de MDH soluble NAD dependiente en músculo, tanto en la especie octoploide como en la diploide, puede ser dividido en 2 fracciones. Por analogía con Xenopus (Wall y Blackler, 1974) la fracción de migración catódica representaría la MDH mitocondrial y la de migración anódica, la forma soluble. Se distinguen 1, 2 ó 3 fracciones en la región catódica (sólo la especie octoploide presentó en algunos casos 3 bandas simultáneamente). En la región anódica sólo 1 individuo diploide presentó 3 bandas, otros patrones presentaban 1 ó 2 bandas. La banda de mayor intensidad de coloración podía hallarse en cualquiera de las 3 posiciones (Fig. 11). En la región anódica la fracción de mayor frecuencia era la misma en ambas especies y se trataba de aquélla de menor velocidad de migración.

XDH

El patrón electroforético de XDH en riñón en C. cranwelli

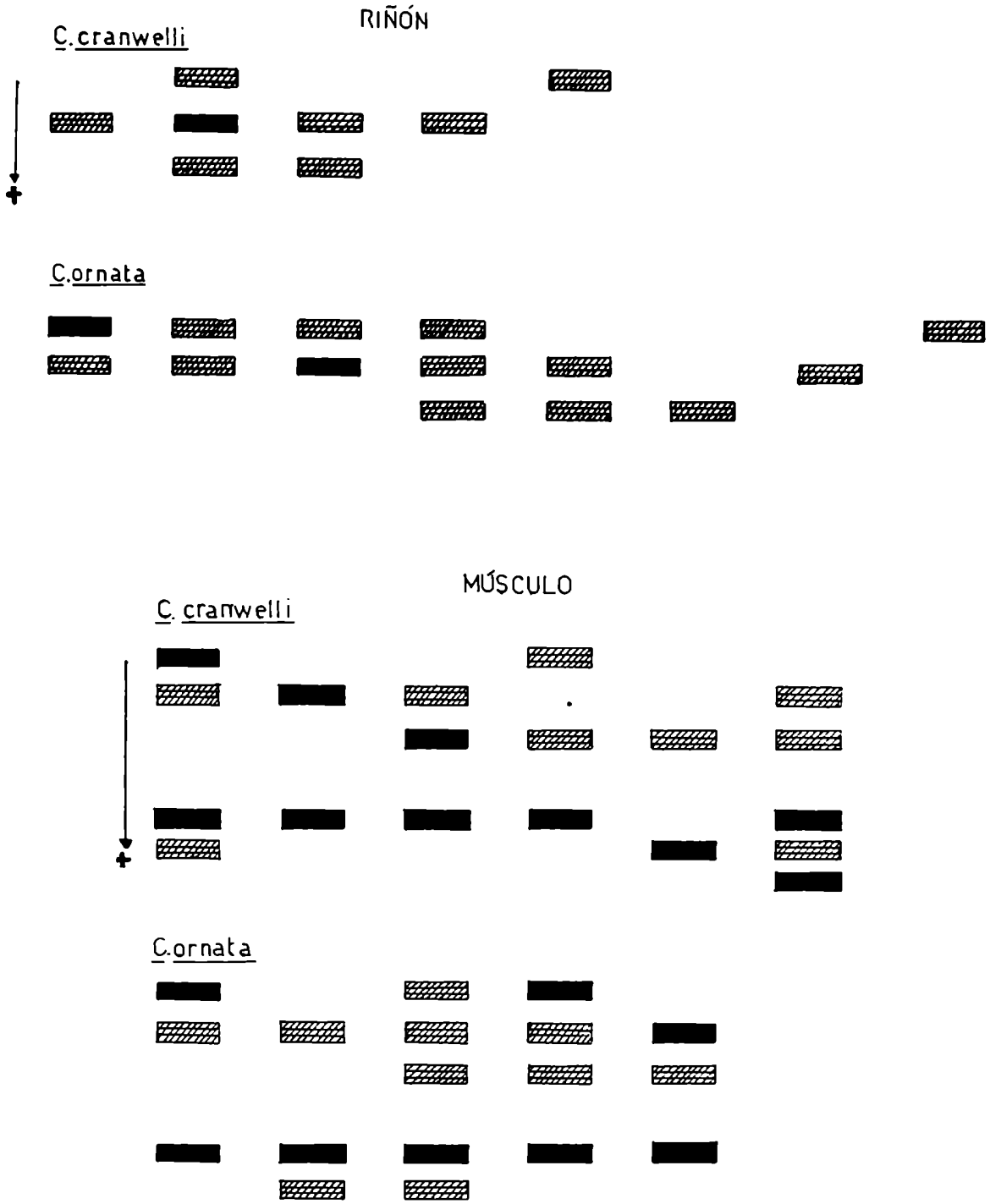



Fig. 11 - Patrones electroforéticos de la MDH en riñón y músculo de C. ornata y C. cranwelli.

▬ Banda de mayor actividad enzimática.

muestra la existencia de 4 bandas que no aparecían simultáneamente. Los patrones de C. ornata mostraban en cambio una mayor complejidad debido a la existencia en algunos casos de una banda muy próxima a la de mayor velocidad de migración (d). Esto podría sugerir que sería una subbanda, pero es descartada esta posibilidad por presentarse un caso en que sólo esta banda aparece sin la precedente. Algo semejante ocurre con la banda de migración intermedia (c) en un individuo (n=26) (Fig. 12).

G-6PDH

En la especie diploide encontramos 5 patrones electroforéticos cuyas bandas podían estar en 4 diferentes posiciones. Al presentarse 2 ó 3 bandas, la de mayor velocidad de migración era la de mayor actividad enzimática. (Fig. 13).

En la especie octoploide hallamos 7 patrones. A diferencia del caso anterior 3 fueron las posiciones de las bandas, pero hay que destacar que la banda intermedia presentaba otra muy próxima, lo cual no encontramos en C. cranwelli. En forma análoga a C.ornata, las bandas de mayor intensidad de coloración eran las anódicas.

Determinación del contenido nuclear de DNA

Los valores dados en la tabla 10 corresponden a la media, varianza mínima y desviación standard de los valores relativos de la forma diploide y octoploide para períodos de hidrólisis de 5 y

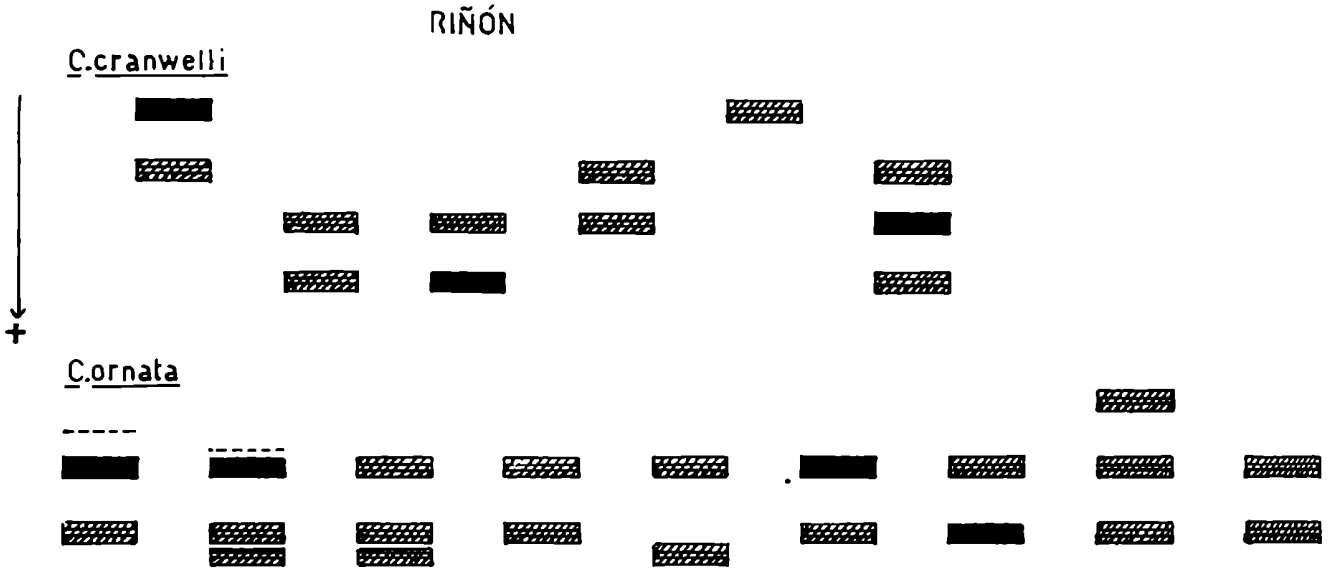



Fig. 12 - Patrones electroforéticos de XDH en riñón de C. ornata y de C. cranwelli.

▬ Banda de mayor actividad enzimática.

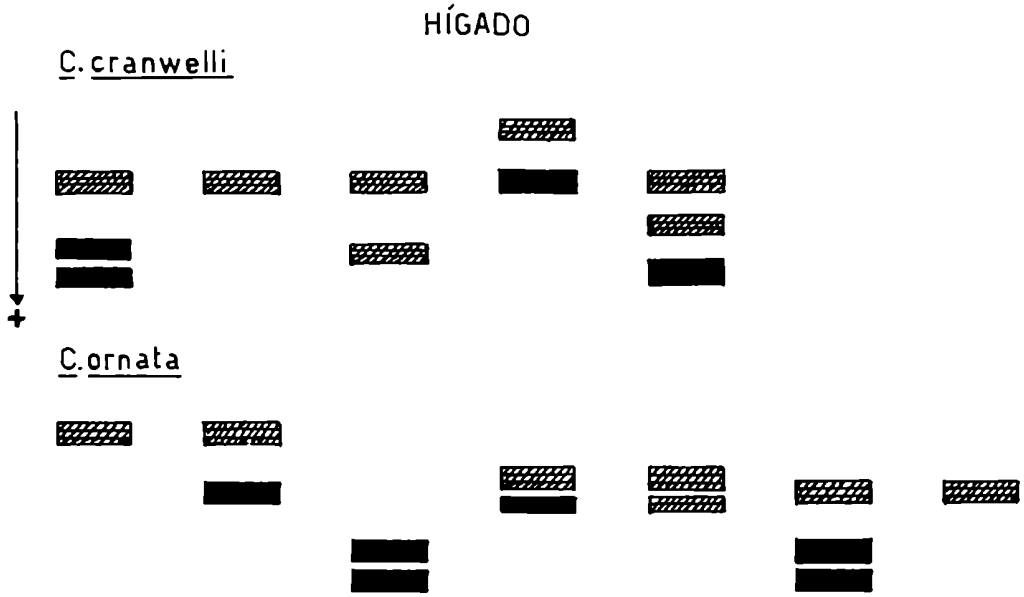



Fig. 13 - Patrones electroforéticos de G-6PDH en hígado de C. ornata y C. cranwelli.

▬ Banda de mayor actividad enzimática.

| Especie | Tiempo de hidrólisis | N° núcleos medidos | Cantidad relativa de DNA $\bar{X}$ | $S^2$ | S | Cantidad en pg. |
|---|---|---|---|---|---|---|
| C.ornata | 10' | 20 | 14980 + | 1222 + | 273 | 26,90 |
| | 5' | 19 | 10968 + | 1460 + | 335 | 24,20 |
| C.cranwelli | 10' | 190 | 4470 + | 2951 + | 215 | 8,02 |
| | 5' | 190 | 2903 + | 429 + | 31 | 6,40 |
| B.latastii | 10' | 10 | 9300 + | 842 + | 266 | 16,66 |
| (=oblongus) 3n | 5' | 10 | 7570 + | 562 + | 118 | |

Tabla 10 - Cantidad relativa y absoluta de DNA nuclear en la especie octoploide, diploide y de referencia tomada a distintos tiempos de hidrólisis. El contenido de la especie octoploide se obtuvo promediando las cantidades correspondientes a 10' y 5' y el cuádruplo de los valores a 10' y 5' de la especie diploide (27,2 pg.). El de la diploide como la cuarta parte de dicha cifra (6,8 pg.).

10 minutos. La conversión de los valores relativos a valores standard en pg de DNA, se efectuó tomando como referencia los valores conocidos de Bufo oblongus: triploide (7350 unidades equivalen a 16,66 pg).

El contenido de DNA del genoma octoploide fue calculado como promedio de los datos a 5 y 10 minutos de hidrólisis y como cuádruplo de los datos del diploide a 5 y 10 minutos. El valor del contenido de DNA calculado para la especie octoploide es 27,2 pg y para la diploide 6,8 pg.

## Citometría

Los valores de la superficie plana total de eritrocitos concuerdan con aquéllos obtenidos por Barrio (1980), es decir que en C. ornata la superficie celular es el doble que en C. cranwelli. También encontramos la relación 1:3 entre la superficie plana de los núcleos. Comprobamos que el volumen celular entre C. cranwelli y C. ornata guarda una relación 1:3 y el volumen nuclear 1:4 (Tabla 11 y 12). Este último resultado sería el esperado ya que el número cromosómico de C. ornata está incrementado en la misma proporción con respecto a C. cranwelli.

Disponiendo de los datos del volumen citoplasmático y nuclear hallamos que existe una relación núcleo-citoplasmática de 0,025 en C. cranwelli y de 0,040 en C. ornata, resultado de ésto una relación 1:1,6.

| N° del animal | Superficie celular | Volumen celular | Superficie nuclear | Volumen nuclear |
|---|---|---|---|---|
| I | 212,84 | 1939,91 | | |
| II | 183,77 | 1451,59 | | |
| III | 215,07 | 1845,14 | | |
| IV | 179,55 | 1423,96 | 26,41 | 44,53 |
| V | 175,80 | 1393,15 | 21,98 | 33,81 |
| VI | 186,61 | 1489,84 | 35,35 | 42,16 |
| VII | 192,21 | 1620,31 | | |
| VIII | 215,68 | 1945,23 | | |
| IX | 237,16 | 1735,49 | | |
| X | 198,42 | 1642,84 | | |
| XI | 200,03 | | | |
| XII | 180,01 | 1458,81 | 24,27 | 39,81 |
| XIII | 211,17 | 1836,43 | 29,48 | 51,68 |
| XIV | 194,97 | 1523,41 | | |
| XV | 195,74 | 1657,93 | | |
| XVI | 207,55 | 1667,70 | 23,27 | 36,62 |
| XVII | 209,01 | 1811,78 | 26,83 | 45,68 |
| XVIII | 197,50 | 1649,00 | 24,37 | 40,06 |
| XIX | 177,10 | 1419,50 | 25,68 | 42,42 |
| XX | 197,04 | 1649,00 | 24,17 | 40,11 |
| XXI | 213,76 | 1845,14 | | |
| XXII | 207,40 | 1810,08 | | |
| XXIII | 184,08 | 1541,48 | -- | -- |
| XXIV | 201,87 | 1691,08 | 25,69 | 42,81 |
| XXV | 188,99 | 1514,06 | 22,11 | 35,20 |
| | $\bar{X}$= 198,58 | $\bar{X}$=1653,25 | $\bar{X}$= 25,81 | $\bar{X}$= 41,24 |
| | S=± 5,40 | S=± 36,34 | S=± 3,31 | S=± 4,17 |

Tabla 11 - Superficie plana y volumen de los eritrocitos y de sus correspondientes núcleos en C. cranwelli. Los valores están dados en $\mu^2$ y $\mu^3$ respectivamente.

| N° del animal | Superficie celular | Volumen celular | Superficie nuclear | Volumen nuclear |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 387,41 | 4326,08 | 63,71 | 159,78 |
| 2 | 550,15 | 3985,23 | | |
| 3 | 373,99 | 3990,96 | | |
| 4 | 377,44 | 4005,20 | 68,49 | 175,00 |
| 6 | 391,02 | 4413,63 | | |
| 7 | 385,80 | 4008,60 | 65,23 | 149,60 |
| 10 | 401,83 | 4478,86 | | |
| 11 | 324,21 | 3277,81 | 52,20 | 112,38 |
| 12 | 338,02 | 3536,64 | | |
| 13 | 342,16 | 3522,40 | | -- |
| 14 | 414,72 | 4570,66 | 60,82 | 140,93 |
| 15 | 370,38 | 4095,73 | -- | -- |
| 16 | 370,92 | 3939,33 | 66,40 | 167,52 |
| 17 | 383,88 | 4279,54 | 75,01 | 207,95 |
| 18 | 351,90 | 3526,65 | | |
| 19 | 349,91 | 3857,73 | | |
| 20 | 360,95 | 3846,89 | -- | -- |
| 21 | 333,34 | 3305,01 | 57,22 | 128,46 |
| 22 | 337,25 | 3508,59 | 52,41 | 117,26 |
| 26 | | 5353,94 | 64,82 | 166,58 |
| 27 | | 4907,48 | 70,34 | 199,86 |
| 29 | -- | 3838,39 | 63,15 | 162,66 |
| | $\bar{X}$= 377,98 | $\bar{X}$= 4021,78 | $\bar{X}$= 63,32 | $\bar{X}$= 157,33 |
| | S=± 15,73 | S=± 108,79 | S=± 6,17 | S=± 25,35 |

Tabla 12 - Superficie plana y volumen de los eritrocitos y sus correspondientes núcleos en C. ornata. Los valores están dados en $\mu^2$ y $\mu^3$, respectivamente.

Citometría en animales preservados

Previo a la aplicación de la técnica destinada para la medición de eritrocitos en animales preservados, se procedió de igual modo pero con sangre fresca introducida en un tubo de diálisis y mantenida durante una semana en alcohol 70°.

Por mediciones previas de los eritrocitos de C. ornata y de C. cranwelli (frotis de sangre fresca) sabemos que sus superficies planas mantienen una relación de 2:1; esta misma relación la encontramos entre los eritrocitos procesados como arriba indicado (Tabla 13).

En la tabla 14 figura (en $\mu^2$) la superficie plana de los eritrocitos y de los núcleos de las especies investigadas. Dentro de la misma especie encontramos una gran dispersión de los valores. En C. ornata la superficie plana de los núcleos oscilaba entre 49,52 $\mu^2$ y 60,12 $\mu^2$ y en C. varia entre 55,49 $\mu^2$ y 66,53 $\mu^2$. En las mediciones de material vivo (procedentes todos de la misma localidad) verificamos también una gran dispersión de los valores de las superficies. En extendidos de sangre fresca de C. ornata los valores oscilaban entre 52,20 $\mu^2$ y 75,01 $\mu^2$. Los ejemplares procedentes de Joazeiro (nordeste de Brasil), identificados originalmente como C. dorsata(= varia), pero morfognóstica y morfométricamente semejantes a C. cranwelli, poseían un volumen nuclear que correspondía a un individuo octoploide (Tabla 14 y 15). En los mismos verificamos una oscilación del valor de la superficie plana nuclear entre 46,32 $\mu^2$ y 67,21 $\mu^2$.

Superficie celular

| | |
|---|---|
| C. *ornata* "A"<br>n=7 $\bar{X}$= 495,79<br>S=± 4,82 | C. ornata "B"<br>n=7 $\bar{X}$= 508,14<br>S=± 4,43 |
| C. cranwelli "A"<br>n=7 $\bar{X}$= 215,45<br>S=± 3,99 | C. cranwelli "B"<br>n=7 $\bar{X}$= 234,85<br>S=+ 4,60 |
| Relación C.c. "A": C.c. "A"<br>2,30 1 | Relación C.c. "B": C.c. "B"<br>2,16 1 |

Tabla 13 - Comparación de las superficies celulares de sangre fresca ("A") y fijada ("B") sometidas a la técnica descripta. n=número de células medidas. $\bar{X}$=media.S=desviación standard.

| Especie | Cat. N° | Superficie nuclear n | Superficie nuclear $\mu^2$ | Superficie celular n | Superficie celular $\mu^2$ | Observaciones |
|---|---|---|---|---|---|---|
| C.ornata Bs.As. | NMW 8312.1 | 5 | 56,78 | 5 | 377,06 | |
| C.ornata R.Janeiro | NMW 15817.2 | 5 | 54,69 | 6 | 348,99 | |
| C.ornata Bs.As. | ZSM 49/1922.1 | 6 | 59,26 | 6 | 307,26 | |
| C.ornata Bs.As. | ZSM 49/1922.2 | 6 | 60,12 | 6 | 274,89 | |
| C.ornata Bs.As. | ZSM 49/1922.3 | 6 | 49,52 | 6 | 285,09 | |
| C.ornata La Plata | ZFMK-H | 7 | 50,04 | 7 | 399,91 | |
| C.varia R.Janeiro | ZSM 79/1931 | 6 | 50,37 | 7. | 306,49 | |
| C.varia Santos | NMW 8311 | 6 | 52,45 | 6 | 331,65 | |
| C.varia Joinville | NMW 7110.3 | 6 | 48,70 | 6 | 301,89 | |
| C.varia Joinville | NMW 7110.1 | 6 | 61,07 | 6 | 380,74 | |
| C.varia Col.Hansa | SMF 3926/28 | 5 | 51,27 | 5 | 328,28 | |
| C.varia St.Cath. | SMF 29842/3 | 5 | 50,82 | 5 | 363,63 | |
| C.varia St.Cath. | SMF 54912 | 6 | 46,89 | 6 | 352,51 | |
| C)varia Col.Hansa | SMF 3929/30 | 6 | 48,34 | 6 | 331,65 | |
| C.varia Itatiaya | SMF 36216 | 6 | 46,97 | 6 | 262,08 | |
| C.varia Joinville | SMF 3931 | 6 | 65,53 | 6 | 383,12 | |
| C.varia Joinville | NMW 4584 | 7 | 52,12 | 7 | 328,89 | |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| C.varia Jaraguá | NMW 7111 | 7 | 45,49 | 7 | 277,37 | |
| C.varia Santos | NMW 7109 | 7 | 48,78 | 7 | 300,36 | |
| C.varia St.Cath. | NMW 7107 | 7 | 55,84 | 7 | 430,82 | |
| C.varia Santos | NMW 4590 | 7 | 45,61 | 7 | 272,97 | |
| C.varia Joazeiro | NMW 4589 | 8 | 47,00 | 8 | 297,75 | |
| C.varia Santos | NMW 6651 | 7 | 51,22 | 7 | 284,79 | |
| C.varia St.Cath. | SMNS 1691 | 6 | 59,26 | 6 | 418,71 | |
| C.varia R.Janeiro | SMNS 1735 | 6 | 51,38 | 5 | 292,76 | |
| C.varia Taraguado | SMNS 1736 ♀ | 6 | 54,60 | 6 | 380,96 | |
| C. varia Taraguado | SMNS 1736 ♂ | 6 | 37,17 | 6 | 395,00 | |
| C.cornuta Prov.Bahia | NMW 4600 | 7 | 64,91 | 7 | 389,79 | C.varia |
| C.cornuta Santos | NMW 10313 | 6 | 66,53 | 4 | 453,07 | C.varia |
| C.varia Salta(Arg.) | NMW 4586 | 5 | 16,89 | 5 | 149,26 | C.cranwelli |
| C.ornata Formosa(Arg.) | ZSM 286/1925 | 5 | 21,19 | 6 | 155,47 | C.cranwelli |
| C.sp. Bolivia | ZSM 312/1980.1 | 5 | 21,08 | 6 | 155,47 | C.cranwelli |
| C.sp. Bolivia | ZSM 312/1980.2 | 5 | 21,21 | 6 | 154,63 | C.cranwelli |
| C.sp. Bolivia | ZSM 312/1980.3 | 6 | 17,95 | 6 | 158,92 | C.cranwelli |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| C.stolzmanni Túmbez | NMW 4632 | 2 | 19,91 | 7 | 169,43 | |
| C.calcarata Colombia | SMF 54138 | 6 | 28,40 | 7 | 269,22 | |
| C.calcarata Colombia | SMF 3897 | 6 | 32,89 | 7 | 254,11 | |
| C.cornuta Surinam | ZSM 1057/0 | 9 | 21,65 | 10 | 236,93 | |
| C.cornuta Surinam | ZSM 1058/0 | 9 | 26,03 | 10 | 266,38 | |
| C.varia Joazeiro | NMW 4592 | 7 | 54,23 | 2 | 420,70 | C.sp. |
| C.varia Joazeiro | NMW 4582 | 8 | 56,83 | 5 | 438,11 | C.sp. |
| C.varia Joazeiro | NMW 4587 | 6 | 46,32 | 9 | 261,78 | C.sp. |
| C.varia Joazeiro | NMW 4588 | 8 | 58,11 | 4 | 396,46 | C.sp. |
| C.varia Joazeiro | NMW 4585:1 | 5 | 67,21 | 5 | 448,85 | C.sp. |
| C.varia Joazeiro | NMW 4585:2 | 7 | 49,14 | | | C.sp. |
| C.varia Joazeiro | NMW 4591 | 7 | 63,49 | | | C.sp. |

Tabla 14 - Superficies nuclear y celular de los eritrocitos de ejemplares conservados. En observaciones figura la correcta identificación del espécimen.
n=número de células medidas.

| Volumen nuclear del material preservado ( $\mu^3$ ) | | Relaciones nucleares | | |
|---|---|---|---|---|
| C.ornata | $\bar{X}$=226,24 | C.ornata | :C.cranwelli | = 3,81:1 |
| N=5 | s=± 5,93 | Material fresco | | |
| C.varia | $\bar{X}$=229,34 | C.ornata | :C.cranwelli | = 4,35:1 |
| N=19 | s=± 6,75 | Material fijado | | |
| C.cranwelli | $\bar{X}$= 52,03 | C.ornata | :C.stolzmenni | = 4,08:1 |
| N=5 | s=± 2,94 | C.varia | :C.ornata | = 1,01:1 |
| C.stolzmanni | $\bar{X}$= 55,46 | C.ornata | :C.calcarata | = 2,36:1 |
| N=1 | | | | |
| C.calcarata | $\bar{X}$= 95,74 | C.varia | :C.calcarata | = 2,40:1 |
| N=2 | s=± 2,94 | C.ornata | :C.Cornuta | = 3,27:1 |
| C.cornuta | $\bar{X}$= 69,21 | C.varia | :C.cornuta | = 3,31:1 |
| N=2 | s=± 3,80 | C.calcarata | :C.cornuta | = 1,38:1 |
| C.sp. | $\bar{X}$=196,82 | C.calcarata | :C.cranwelli | = 1,84:1 |
| N=7 | s=+32,65 | C.cornuta | :C.cranwelli | = 1,33:1 |
| | | C.ornata | :C.sp. | = 1,15:1 |
| | | C.sp. | :C.cranwelli | = 3,78:1 |
| | | C.sp. | :C.calcarata | = 2,06:1 |

Tabla 15 - Volúmenes nucleares y relaciones de los mismos entre las distintas especies del género. N=número de ejemplares investigados.

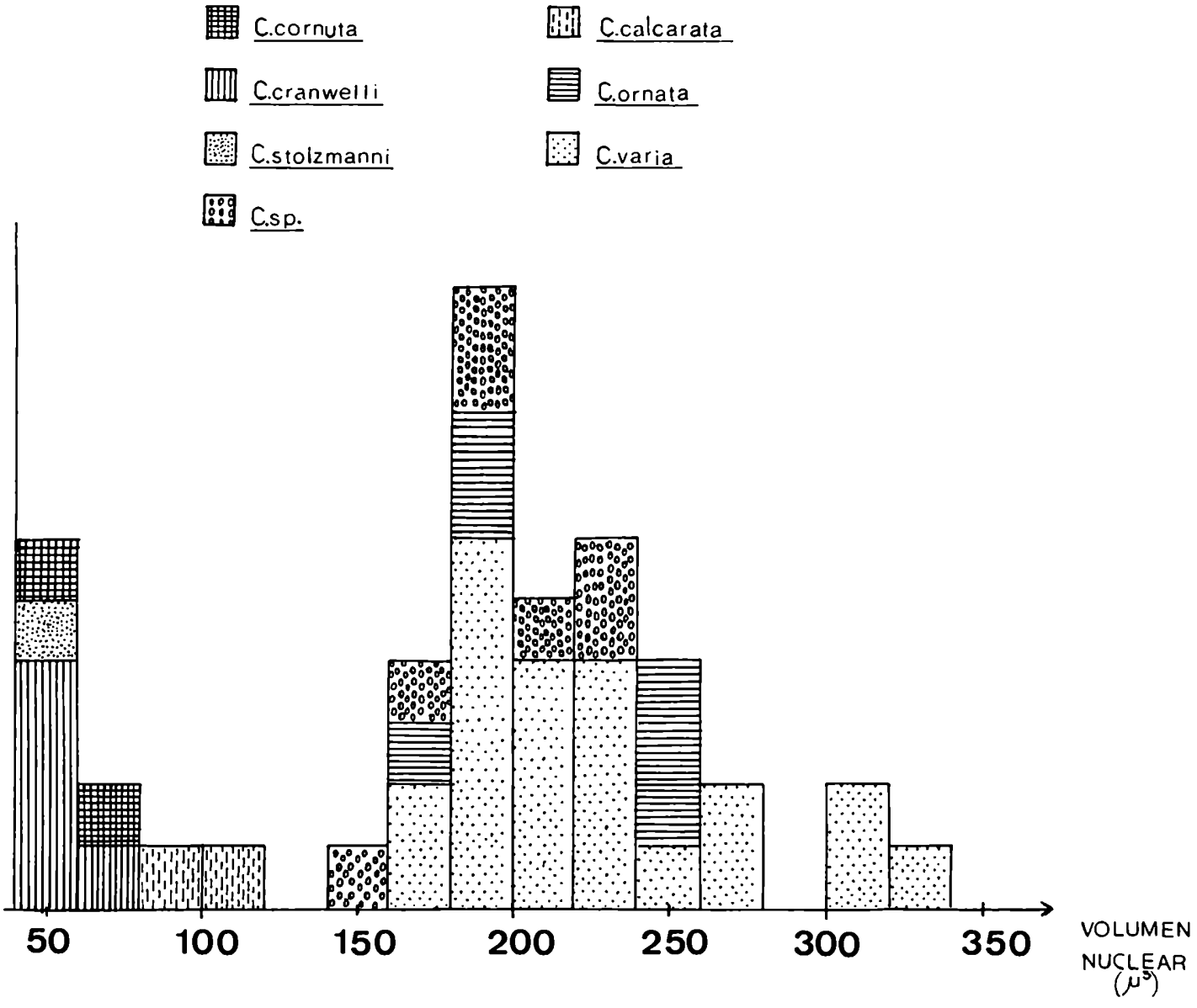



Fig. 14 - Distribución de frecuencias del volumen nuclear de los ejemplares conservados investigados.

Contenido de hemoglobina

Los resultados dados en la tabla 16 del contenido de hemoglobina en sangre, determinados en 4 individuos de la especie octoploide y a 7 de la diploide, poseen el mismo orden de magnitud - que los obtenidos por Beçak y Pueyo (1970) para *Odontophrynus americanus* (4X=44) y *O. cultripes* (2X=22).

La variabilidad en la concentración de hemoglobina entre los individuos de una misma especie es tan grande como en la otra y no existe diferencia significativa en el contenido de hemoglobina por volumen de sangre entre *C. ornata* y *C. cranwelli*.

Los datos de la tabla 16 representan el número de eritrocitos por $mm^3$ de sangre. La media obtenida para *C. cranwelli* asciende a 5,75 y para *C. ornata* a 2,05, lo cual da una relación 1:1,83, es decir aproximadamente el doble de eritrocitos por $mm^3$ en *C. cranwelli*.

Si calculamos el contenido de hemoglobina por eritrocito - (Tabla 16) observamos que ambas especies presentan un valor similar. Teniendo en cuenta que los eritrocitos en anfibios son nucleados - (salvo algunas excepciones (Noble, 1954))la forma que adquiere es semejante a un elipsoide. Podemos hacer una primera aproximación,- considerando que es un elipsoide y de este modo vemos que las superficies de los eritrocitos en *C. cranwelli* y *C. ornata* se encuentran en una relación 1:2 y el contenido de hemoglobina por unidad de superficie (ya que se encuentra distribuída en la "corteza" del eritrocito y no en el volumen) es semejante en ambas especies.

| Anim. N° | Extinción | g/100 ml. sangre | N° eritrocitos/mm$^3$ | mg. Hgb./eritr. | mg. Hgb./Sup. d. elips. |
|---|---|---|---|---|---|
| 17 | 0,347 | 12,60 | 1,85x $10^5$ | 0,68 | 2,12x $10^{-4}$ |
| 29 | 0,187 | 6,79 | 2,50 | 0,27 | 0,89 |
| 27 | 0,184 | 6,68 | 2,20 | 0,30 | 0,79 |
| 26 | 0,106 | 3,85 | 1,65 " | 0,23 | 0,65 " |
| | | $\bar{X}$= 7,48 | $\bar{X}$=2,05 " | $\bar{X}$=0,37 | $\bar{X}$=1,11 " |
| | | ±1,84 | ±0,61 | ±0,46 | ±1,65 |
| XVI | 0,263 | 9,55 | 3,55x $10^5$ | 0,27 | 1,73x $10^{-4}$ |
| XIV | 0,152 | 5,58 | 5,85 | 0,10 | 0,62 |
| XXIV | 0,304 | 11,03 | 4,30 | 0,26 | 1,58 |
| VI | 0,178 | 6,46 | 2,28 | 0,28 | 1,80 |
| V | 0,237 | 8,60 | 2,42 | 0,36 | 2,46 |
| XI | 0,140 | 5,08 | 4,10 " | 0,12 | 0,72 " |
| | | $\bar{X}$= 7,72 | $\bar{X}$=3,75 | $\bar{X}$= 0,23 | $\bar{X}$=1,48 |
| | | ±1,54 | ±1,15 | ±0,32 | ±1,67 |

Tabla 16 - Determinación del contenido de hemoglobina por unidad de superficie del eritrocito, considerado como cuerpo elipsoidal.

## Consumo de $O_2$

Las curvas de consumo de oxígeno a distintas temperaturas no presentan diferencias significativas entre ambas especies. Comprobamos un mínimo consumo entre los 17 y 20°C, temperaturas entre las cuales estaría la temperatura preferencial de ambas entidades - (Strübing, 1954). (Tabla 17, Fig. 15).

Es de hacer notar el gran aumento del consumo de $O_2$ a bajas temperaturas, presentando un máximo entre los 5 y 10,5° C. En la especie octoploide continúa siendo bastante alto aún a menores temperaturas. El segundo pico lo hallamos a 25,5° C.

Existe gran variación individual en cuanto al nivel de consumo a las distintas temperaturas. Por ejemplo a 25,5° C son obtenidos los siguientes valores para la especie octoploide (ml $O_2$/kg. h)=67,8; 59,2; 84,5 y 21,2. En la forma diploide=63,5; 50,1; 48,1 y 73,5. Al aumentar la temperatura comprobamos que el consumo disminuye bruscamente alcanzando un valor aproximado en los distintos individuos estudiados (Fig. 15), es decir que se minimizó esa gran diferencia individual que observábamos a otras temperaturas. Hubo una excepción que fue el animal N° 26 con un consumo extraordinariamente bajo a 30°C.

## Cariotipo

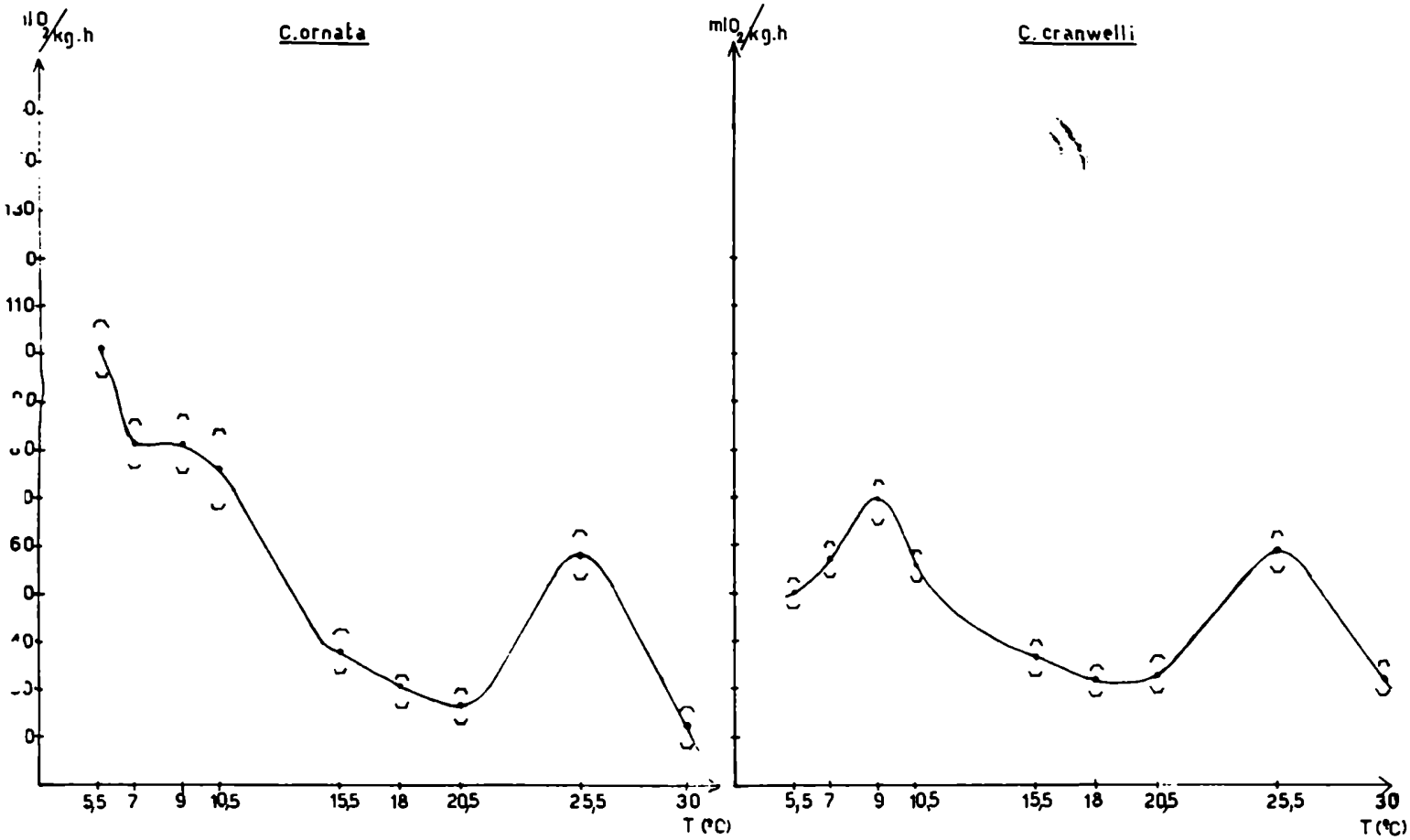
Entre las regiones heterocromáticas de pares de cromosomas homólogos no se observan mayores diferencias. Sin embargo hemos po

| An. N° \ T °C | 5,5 | 7,0 | 9,0 | 10,5 | 15,5 | 18,0 | 20,5 | 25,5 | 30,0 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ♀29 | 62,00 | 66,69 | 63,92 | 58,80 | 20,5 | 20,74 | 27,92 | 67,79 | 27,76 |
| ♀17 | 77,44 | 61,26 | 43,93 | 27,09 | 33,18 | 28,77 | 30,25 | 59,20 | 39,42 |
| ♂27 | 157,07 | 114,26 | 144,30 | 166,99 | 68,55 | 38,33 | 36,12 | 84,53 | 27,55 |
| ♀26 | 107,95 | 81,17 | 72,42 | 50,85 | 30,21 | 32,88 | 11,80 | 21,16 | 0,01 |
| ♀XI | 38,97 | 66,21 | 68,56 | 52,07 | 32,23 | 33,85 | 37,86 | 63,48 | 30,73 |
| ♂IX | 47,61 | 40,68 | 44,03 | 48,86 | 30,19 | 25,41 | 24,95 | 50,07 | 25,98 |
| ♂XIV | 58,39 | 55,35 | 73,77 | 58,42 | 48,83 | 40,27 | 46,33 | 73,48 | 45,15 |

Promedios para cada especie

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| C.o. | 101,11 | 80,85 | 81,14 | 75,93 | 37,98 | 30,18 | 26,52 | 58,17 | 23,68 |
| | ±6,47 | ±4,88 | ±6,62 | ±7,89 | ±4,60 | ±2,72 | ±3,23 | ±5,18 | ±4,09 |
| C.c. | 50,34 | 57,55 | 68,37 | 55,77 | 36,71 | 31,97 | 32,98 | 58,78 | 32,29 |
| | ±2,98 | ±3,54 | ±4,24 | ±2,57 | ±2,89 | ±2,56 | ±3,33 | ±3,46 | ±2,97 |

Tabla 17 - Consumo de oxígeno de C. ornata (números arábigos) y C. cranwelli (números romanos) a distintas temperaturas.




15 - Curvas de consumo de oxígeno de C. ornata y de C. cranwelli obtenidas del promedio de datos individuales a cada temperatura. Entre corchetes figura la desviación standard de los valores resultantes.

dido verificar que tanto en la especie diploide como en la octoploide el par 1 (ó grupo 1 en el caso de ésta última) es heteromorfo debido a la presencia de una banda contigua a la telomérica en uno de los brazos (Fig. 16) la cual difiere en la intensidad de la coloración. Esta particularidad fue encontrada en el par 3 de C. cranwelli no pudiendo ser comprobado en C. ornata (Fig. 17). En cambio en esta última especie hemos observado variabilidad en la distribución de la intensidad de las bandas C en los cromosomas de los grupos 2, 3, 4 y 5.

En la figura 18 están representados los cariogramas de ambas entidades. Las bandas de mayor intensidad de coloración están representadas por trazo oscuro contínuo. Comparando dichos cariogramas vemos que existiría mayor número de bandas de heterocromatina constitutiva en C. ornata.

Como rasgos particulares del bandeo C en la especie octoploide en relación a la diploide figuran: la presencia de 2 bandas pericentroméricas en el grupo 3, falta de bandas terminales intensamente coloreadas y presencia de una banda pericentromérica en el brazo largo del grupo 8, mayor intensidad de las bandas terminales del grupo 10.

Queremos destacar el hecho que los cromosomas de C. cranwelli y de C. ornata poseen un tamaño similar exceptuando los pertenecientes a los grupos 6, 7, 10, 11, 12 y 13 siendo los de C. ornata levemente más pequeños.

Especies consideradas en el presente estudio

Hemos considerado a C. calcarata, C. cornuta, C. cranwelli,

Fig. 16 - Cariotipo de C. cranwelli mostrando las zonas de heterocromatina constitutiva, bandas C. Aumento 1250x.

1 2 3 4 5

6 7 8 9 10

11 12 13

Fig. 17 - Cariotipo de C. ornata mostrando las zonas de heterocromatina constitutiva, bandas C. Aumento 1250x.

1

2

3

4

5

6

7

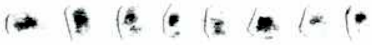
8

9

10

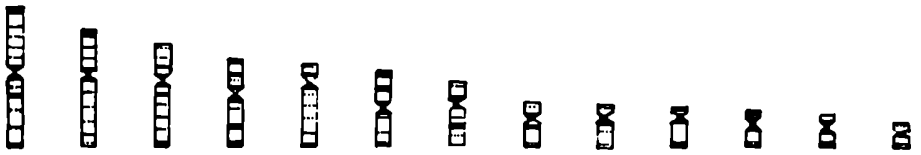
11

12



13

C. ornata



C. cranwelli

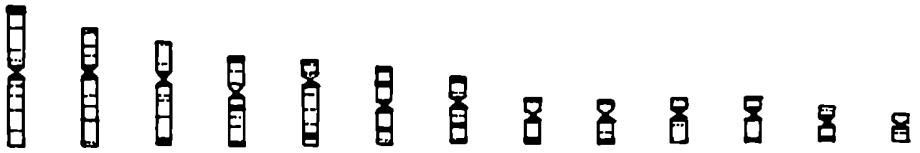


Fig. 18 - Representación diagramática del cariotipo de C. ornata y de C. cranwelli mostrando la posición de la heterocromatina constitutiva. Las bandas oscuras corresponden a las de mayor intensidad de coloración.

C. ornata, C. stolzmanni y C. varia como representantes del género Ceratophrys Wied, 1824 y no a las especies appendiculata, boiei, - cristiceps y fryi. Miranda Ribeiro (1920, 1923, 1926) ya reconocía a Stombus Gravenhorst, 1829 como género válido y le asignó las especies appendiculata, boiei, cristiceps, fryi y renalis. Cochran (1955) no admite como válido a Stombus y pasa esas especies a Ceratophrys. Reig y Limeses (1963) al proponer el nombre Chacophrys como género nuevo para la especie Ceratophrys pierotti, hacen una comparación con Ceratophrys y Stombus basándose en el estudio miológico y esqueletario. Ellos demuestran que las diferencias encontradas son significativas. Lynch (1971) incluye en el género las siguientes especies nominales: aurita (=dorsata=varia), calcarata, cornuta, ornata, pierotti, stolzmanni y testudo. Lynch sigue incluyendo a pierotti dentro de Ceratophrys y no reconoce al género Chacophrys porque considera las características esqueletarias de éste último idéntico a las de un estado postmetamórfico (estado 46) de Ceratophrys.

En la lista de batracios de Córdoba (Argentina) diTada et al. (1976) y en la obra de Cei (1980) sigue siendo reconocido pierotti como perteneciente al género Chacophrys.

Diversas razones nos han llevado a no considerar en el presente trabajo a C. testudo. De la descripción original (Andersson, 1945) encontramos como caracteres diferenciales respecto a las otras especies la ausencia de dientes vomerianos y la menor longitud del 1 dedo con respecto al 2. No hace mención a la existencia o no del escudo dorsal, no es muy clara la descripción de los pliegues y bandas dorsales y vemos además que el desarrollo de la membrana inter-

digital es semejante a la de C. cornuta. Peters (1955) menciona su ocurrencia en la región del Río Pastaza (Ecuador), Mertens et al., (1966) lo citan en su lista sistemática y Lynch (1971) lo incluye como una de las especies nominales del género. En ningún caso hacen comentarios sobre su posición taxionómica u otro aporte. Ante esta escasa información y por carecer de material para un mejor análisis y comparación con las demás especies no hemos tratado dicha especie.

Distribución geográfica (Fig. 19, 20 y 21)

Abreviaturas:

MNHK: Museum of Natural History, Kansas.

MNH,SI: Museum of Natural History, Smithsonian Institut

NMW: Naturhistorisches Museum Wien.

C. cranwelli: Argentina: Jujuy, Salta, Formosa, Chaco, Tucumán, Santiago del Estero, Catamarca, Córdoba, Santa Fe, San Luis y La Pampa (Barrio, 1980). En la provincia de La Pampa es citado para Gral. Pico (Gallardo, 1965).

Bolivia: Parapati (MNHK), Caiza (misión San Francisco, Alto Pilcomayo) (Peracca, 1897) Villa Montes (Müller y Hellmich, 1936).

Paraguay: Colonia Meno, Asunción (MNHK). Sur de Matto Grosso (Müller y Hellmich, 1936; Barrio, 1980).

C. calcarata: Colombia: Bolívar: Alto de Quimari; Santander, cerca

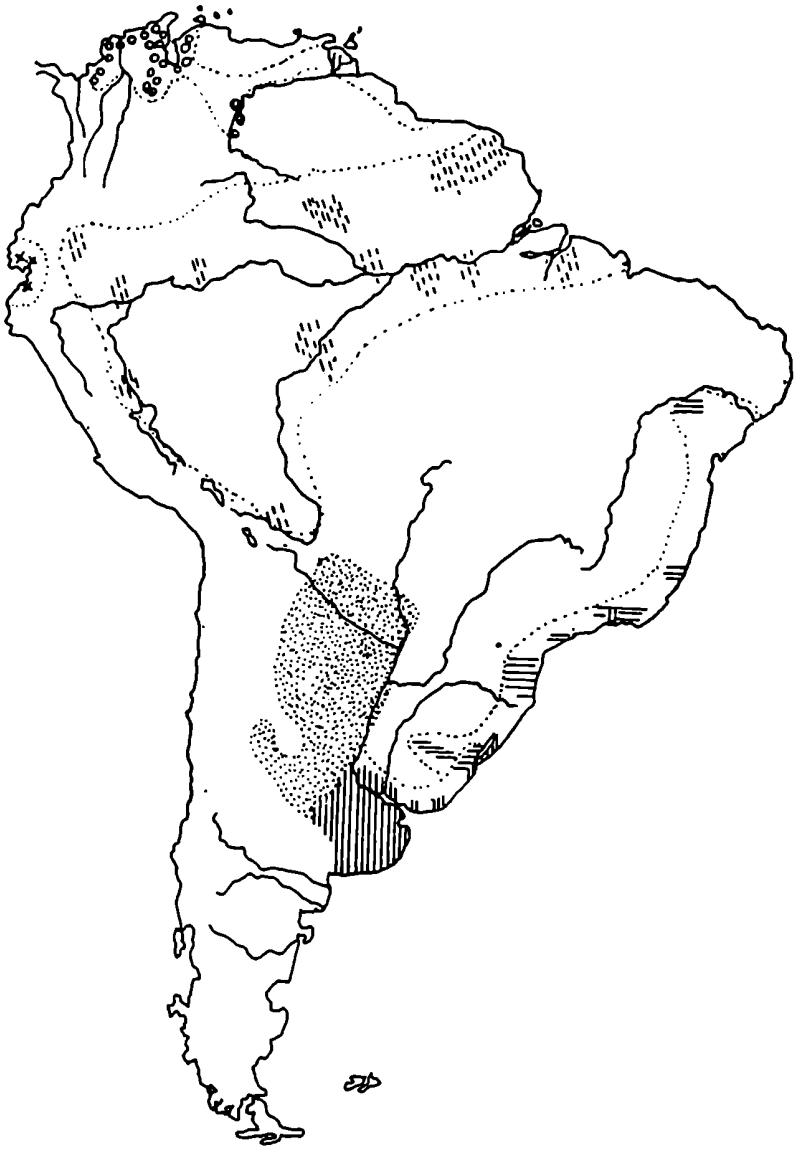


Fig. 19 - Distribución geográfica del género Ceratophrys

C. calcarata

C. cornuta

C. cranwelli

C. ornata

C. varia

C. stolzmanni

Fig. 20 - Ubicación de algunas localidades de hallazgo del género *Ceratophrys* en Sud América, exceptuando Argentina.

1-Barranquilla
2-Río Guaimaral
3-Curumani
4-Bucaramanga
5-Alto de Quimari
6-Puerto Ayacucho
7-San Francisco de Atabapo
8-Santa Cecilia
9-Sarayacu
10-Santa Clara
11-Leticia
12-Manaus
13-Río Llullapichis
14-Buena Vista
15-Foz do Jamari
15'-Igarapé Purunzinho
16-Santarem
17-Belem
18-Salinas
19-Túmbez
20-Joazeiro
21-Bahía
22-Río Atabapouana
23-Linhares
24-Río Doce
25-Teresópolis
26-Serra de Bocaina
27-Río de Janeiro
28-São Paulo
29-Santos
30-Joinville
31-Colonia Hansa
32-Santa Catharina
33-Río Grande
34-Parapati
35-Asunción
36-Colonia Meno
37-São Lourenço do Sul
38-Bagé
39-Santa Vitória do Palmar

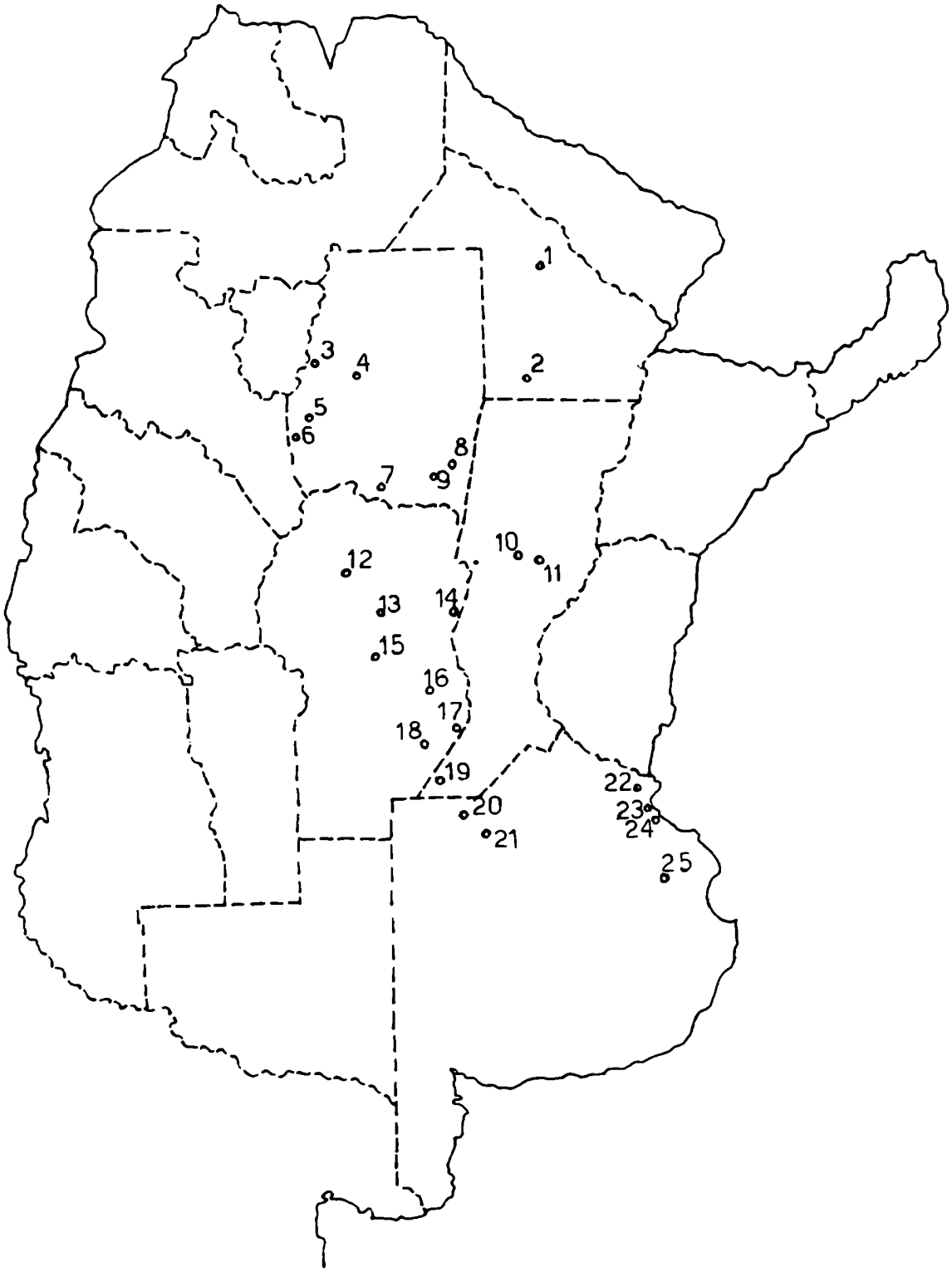
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
15'
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39

Fig. 21 - Mapa del norte y centro de Argentina mostrando las localidades de hallazgo de C. cranwelli y de C. ornata, algunas de ellas consideradas en el presente estudio.

1-Castelli
2-Cnel. du Graty
3-Gramilla
4-La Banda
5-Sol de Mayo
6-Frías
7-Sumampa
8-Guardia Escolta
9-Pinto
10-La Lucila
11-Gob. Crespo
12-Totoral
13-Villa del Rosario
14-San Francisco
15-James Craik
16-Bell Ville
17-Corral de Bustos
18-Monte Maiz
19-Rufino
20-Alberdi
21-Lincoln
22-Benavídez
23-La Matanza
24-Florencio Varela
25-Chascomús

C.cranwelli = 1 - 19

C.ornata =20 - 25


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

de Bucaramanga (NMW); Río Guaimaral, Curumani (Dto. Magadalena); Barranquilla; La Guajira (1/2 mi sur Pájaro (MNH,SI)).

Venezuela: sudeste y costa (Mertens et al., 1966) Guayana venezolana y tal vez Llanos, zona costera, región Falcón, cuenca baja del Maracaibo (Rivero, 1961).

Tal vez, sur de Guayanas y parte norte del Brasil (Mertens et al., 1966; Rivero, 1961).

| | | |
|---|---|---|
| C. cornuta: | Bolivia: | Buena Vista (Dto. Santa Cruz) (MNH,SI). |
| | Perú: | Orellana (2 km oeste de Puerto Sta. Clara (MNH,SI). Huanuco, Río Llullapichis (4-5 km corriente arriba de Río Pachitea, Finca Panguana) (Toft y Duellman, 1979). |
| | Colombia: | Amazonas, Leticia (MNH,SI). |
| | Ecuador: | región de drenaje del Río Pastaza: prov. Pastaza, Sarayacu, Río Bobonza, Cabeceras del Río Capahuari, Río Piudo (MNH,SI); Napo: Limón Cocha y Santa Cecilia (MNHK). |
| | Brasil: | Territorio de Rondonia; Foz do Jamari; Río Madeira (MNH,SI); Belem; Manaus; Tapajoz National Park (comunicación personal D.W. Hödl, Univ. Wien); Santarem (Boulenger, 1882); Igarapé Purunzinho (R. Madeira) (Heyer, 1977). |
| | Surinam: | (Boulenger, 1882; Geijkes, 1959). |

| | | |
|---|---|---|
| | Venezuela: | parte sur (Mertens et al., 1966). |
| C. dorsata: | Brasil: | Río de Janeiro: Guapi, Teresópolis (Cochran, 1955). Serra de Bocaina, São José do Barreiro (MNH,SI). Bahía: Joazeiro (NMW). Su presencia en Río de Janeiro (Distrito Federal) no ha sido registrada (Lutz, 1954). Santa Catharina:Río Humboldt (Cochran,1955). Hansa, Joinville (Miranda Ribeiro, 1920, 1926). Espíritu Santo: Río Doce (Miranda Ribeiro, 1920, 1926). Sooretama (Linhares) (MNHK). São Paulo: Río Grande, Piquete (Miranda Ribeiro, 1920, 1926), Santos (NMW). Río Grande do Sul. Bagé, São Lourenço do Sul (Braun et al., 1980). |
| C. ornata: | Argentina: | sur de Santa Fe, sur de Entre Ríos, Buenos Aires, este de La Pampa (Barrio, 1980). Es citado por Berg para Entre Ríos (Gallardo, 1964). En Buenos Aires alcanza por lo menos el partido de Coronel Suárez y probablemente llegue al este de La Pampa. |
| | Uruguay: | Departamento de Rocha, Departamento de San José (García, 1972). |
| | Brasil: | Brasil meridional, oriental desde Bahía. Therezopolis, Estado do Río hasta Río Grande do Sul (Miranda Ribeiro, 1926). Río Grande, Santa Vitória do Palmar (Braun et al., |

1980). Cochran (1955) hace una observación refiriéndose a los ejemplares citados para Río de Janeiro: éstos fueron recibidos en 1881 de "Río de Janeiro" sin dar a entender si es la ciudad o el estado.

C. stolzmanni: Perú: Túmbez (Peters, 1967).

Ecuador: Cuatro Hermanitos (4 km oeste nordoeste de Guayaquil, Salinas, Playas (Peters, 1967).

## Condiciones ecológicas de C. ornata y C. cranwelli

Basándonos en la distribución geográfica de estas entidades podemos caracterizar diferencialmente el ambiente en que se encuentran, mostrando además una zona de transición.

C. cranwelli se distribuye en el área perteneciente a la provincia chaqueña y del Espinal (Cabrera, 1953) que se caracteriza - por poseer clima continental con estación seca. La zona comprendida desde el norte de Chaco, centro y oeste de la Argentina hasta la Patagonia posee una baja humedad relativa que varía entre 55-60% (Prohaska, 1976). Se registran al oeste de Chaco y La Pampa valores de evaporación de 1500 mm anuales. La distribución estacional de las precipitaciones del Gran Chaco, si bien la cantidad anual desciende desde 1300 mm en el límite norte de Paraguay hasta menos de 500 mm en Santiago del Estero, permanece igual teniendo un máximo en los meses de verano. La temperatura media anual oscila entre 22°C a 18°C. El tipo de vegetación predominante es el bosque xerófilo caducifolio,

con un estrato herbáceo de gramíneas y numerosas cactáceas y bromeliáceas terrestres. Hay también palmares, sabanas y estepas arbustivas halófilas (Cabrera y Willink, 1973).

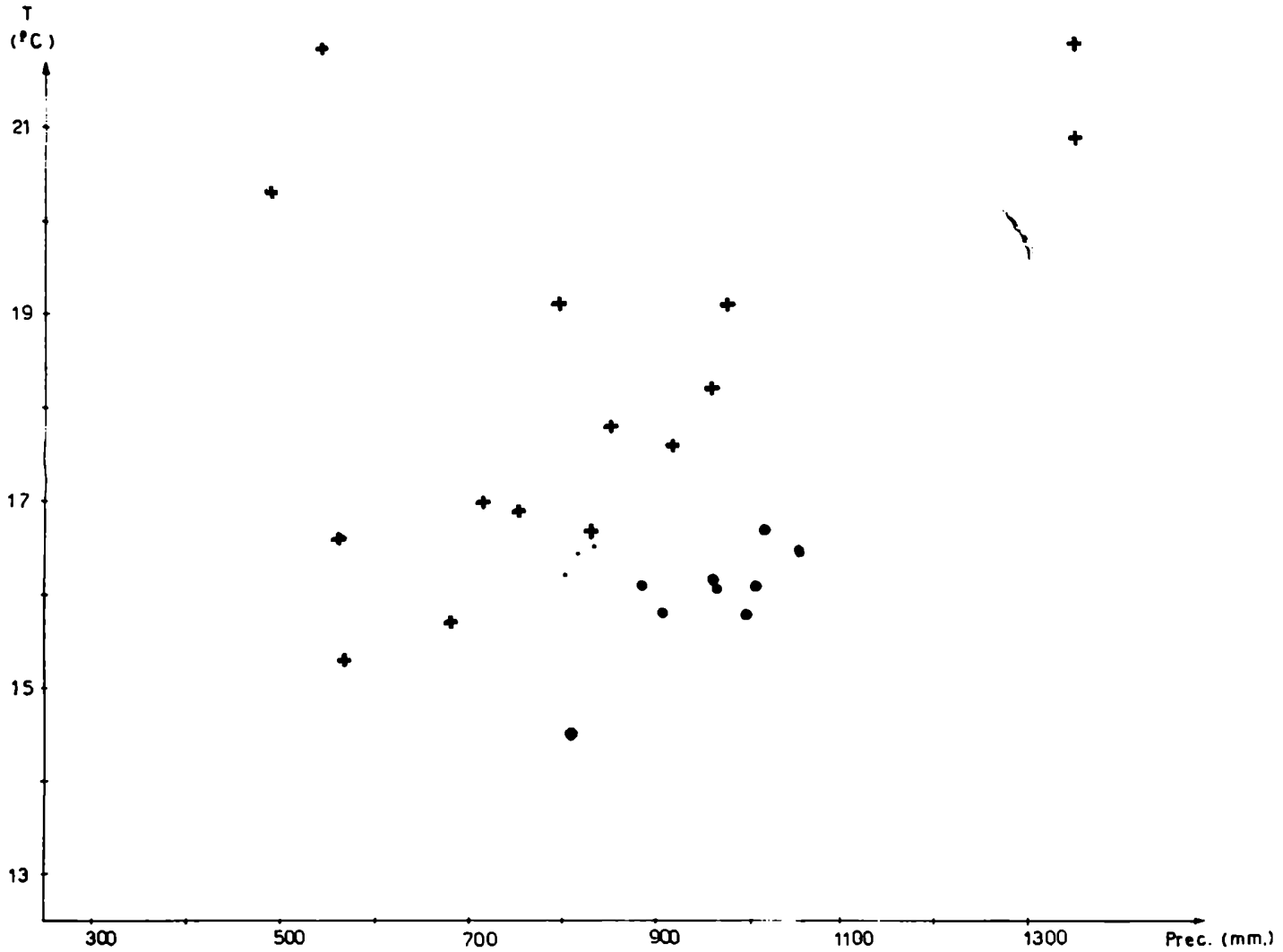
De acuerdo a Vellard (1948), C. cranwelli (que en dicho trabajo está citado como C. ornata), según su modo de vida y adaptación a un ambiente determinado, pertenece a la fauna de las lagunas temporarias (este de Salta, Formosa y Chaco). Dichas lagunas se secan una gran parte del año y sólo en épocas de grandes lluvias se rellenan, verificándose entonces la fecundación y postura.

Es de subrayar la afinidad existente entre los ambientes naturales de los llanos riojanos y los ambientes naturales áridos chaqueños. En la región árida y xerófila del oeste de San Luis (ciudad) se observan amplias zonas de suelo arcilloso, presentando a menudo charcos estacionales bastante grandes, como verdaderas lagunas temporarias en ocasión de veranos particularmente lluviosos. El carácter de la fauna de batracios de esta región es decididamente chaqueña. (Cei, 1954-1957 y 1955). En la región chaqueña, debido al clima árido, son abundantes las sales y minerales solubles. Son pobres en humus. Ciertas áreas son susceptibles a inundaciones durante la estación húmeda en verano debido a la existencia de suelos chestnut - con horizonte B arcilloso. Los suelos de la región peripampeana son mejor drenados que los del Chaco, mientras que los suelos ácidos o álcali son menos frecuentes, sin embargo contienen hacia el norte grandes extensiones de sal.

C. ornata se distribuye en la provincia pampeana (Cabrera y Willink, 1973) que se caracteriza por poseer un clima subtropical

sin estación seca (Lauer et al., 1952). La costa atlántica y área de influencia del Río de la Plata tienen una alta humedad relativa del 75-80% (Prohaska, 1976). La evaporación en los estados brasileños del sur y Uruguay se ajusta también a la bonaerense cayendo a valores de 1000 mm anuales. Como principal factor de la menor evaporación, debemos mencionar la notable disminución de la temperatura (Lauer et al., 1952). Las precipitaciones pierden al mismo tiempo su carácter periódico, distribuyéndose más uniformemente durante todo el año debido a la influencia marítima. Se registran valores entre 1000-800 mm anuales. La temperatura oscila entre los 14° y 18°C (Servicio Meteorológico Nacional).. La vegetación dominante es la estepa arbustiva o pseudo-estepa de gramíneas que forman matas de 60 cm a 1 m de altura, entre las cuales se encuentran también arbustos (Cabrera y Willink, 1973). Los suelos de la región pampeana están formados por sedimentos calcáreos y ricos en minerales fácilmente erosionables. Predominan los brunizems, que son muy ricos en humus, en carbonatos, y de reacción neutra. Posee un horizonte arcílico dominante en la región pampeana norte. Al este son pobres en drenaje como puede verse por la cadena de lagunas allí formadas; predomina el solonetz (Beek y Bramao, 1968) que se caracteriza por su contenido pobre en sales, son alcalinos y ricos en arcilla y materia orgánica (Ganssen, 1957).

Graficando los datos de temperatura media anual y precipitación media anual (Servicio Meteorológico Nacional, República Argentina y Walter et al., 1960) de las localidades donde se encuentran ambas especies (Fig. 22) podemos visualizar lo siguiente: Si bien




g. 22 - Relación entre temperatura media anual y precipitación media anual de algunas localidades de hallazgo de C.ornata (•) y de C. cranwelli (+). Los puntos corresponden a la zona de transición donde se encuentra C. cranwelli o ambas especies.

tanto la forma diploide como la octoploide pueden encontrarse en - zonas con la misma temperatura media anual, las precipitaciones son más escasas donde vive la diploide. E inversamente, la cantidad de lluvia caída durante el año puede ser igual para ambas entidades pero la temperatura es conspicuamente mayor para la diploide. En este mismo gráfico se pone en evidencia el carácter transitorio de las condiciones climáticas de la zona de contacto de ambas especies.Es allí donde la morfología de las poblaciones del sur de C. cranwelli presentan una convergencia hacia la forma bonaerense (Barrio, 1980).

Teniendo en cuenta el régimen de lluvias durante todo el año se registran las mayores precipitaciones para el mes de noviembre en ambas especies, comenzando ya en octubre. Si correlacionamos las precipitaciones con la distribución de los promedios mensuales de temperatura en una proporción recíproca fija (Walter y Lieth, 1960) a saber: una temperatura de 10°C corresponde a una precipitación de 20 mm se pueden determinar las épocas áridas cuando las precipitaciones quedan debajo de la curva de la temperatura (y húmeda cuando las precipitaciones exceden en mucho a la temperatura). (Fig. 23) Otra forma de distinguir una región de clima seco o húmedo es a través de los índices de aridez. Se considera un clima húmedo cuando la suma anual de precipitaciones es mayor que la evaporación anual; lo contrario para un clima árido. Dado que en la evaporación intervienen diversos factores (temperatura, radiación solar, viento, presión atmosférica, existencia de cuerpos de agua, cubertura vegetal, etc.) es muy difícil su medición. Utilizamos la fórmula de Martonne (Lauer et al., 1952) que él denomina "Indice d'aridité" ($i = \frac{N}{T+10}$

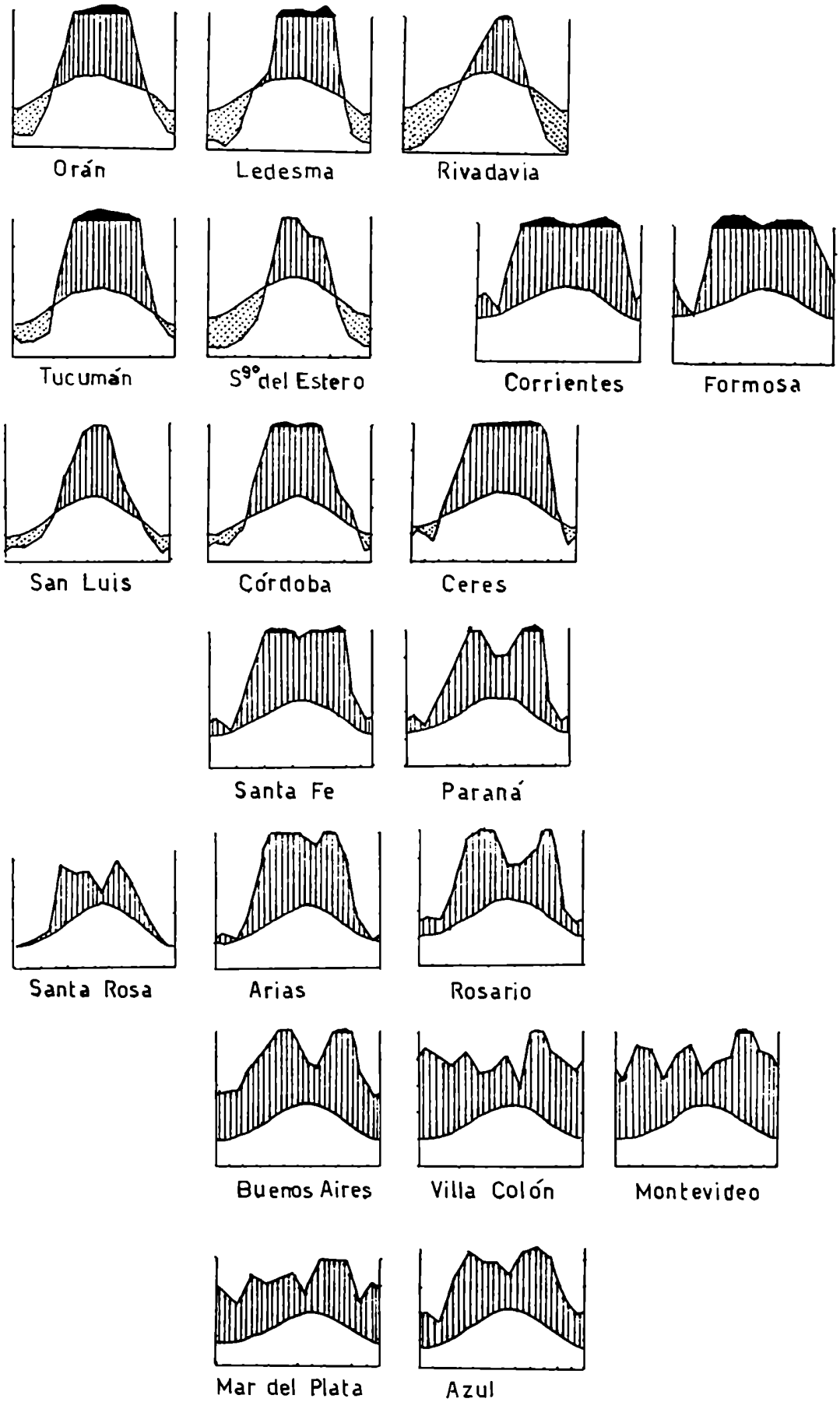
Fig. 23 - Representación diagramática del clima de algunas localidades de hallazgo de C. ornata y de C. cranwelli.

Una temperatura de 10°C corresponde a una precipitación de 20 mm.

Precipitaciones superan los 100 mm, reproducidas en la proporción 1:10.

Epoca estrictamente árida.

Gráficos sacados de Walter y Lieth (1960).


Orán
Ledesma
Rivadavia
Tucumán
S.º del Estero
Corrientes
Formosa
San Luis
Córdoba
Ceres
Santa Fe
Paraná
Santa Rosa
Arias
Rosario
Buenos Aires
Villa Colón
Montevideo
Mar del Plata
Azul

N= precipitación anual, T= Temperatura media anual. La cifra 10 reduce los inconvenientes que surgen al trabajar con temperaturas negativas). Indices inferiores a 20 caracterizan a una región seca. Aplicando éste índice a las distintas estaciones donde son hallados C. cranwelli y C. ornata (Tabla 18) no podemos establecer ninguna separación o distinción de los ambientes si consideramos valores - anuales (Tabla 18). Al calcular los índices para cada mes comprobamos que las estaciones donde se encuentra C. cranwelli presentan - (en mayor o menor grado) un aumento de la aridez en los meses de invierno que disminuye en general a partir de octubre (son considerados meses áridos cuando el índice es inferior a 1,66). En cambio en las estaciones donde hallamos C. ornata no se observa ese aumento de aridez y por lo tanto los valores se mantienen aproximadamente constantes durante todo el año. Resistencia y Formosa, a pesar de poseer altos valores de humedad mensual, sufren una abrupta caída durante 3 meses que, si bien no alcanzan en algunos de ellos el valor límite, son significativos si los referimos a los índices correspondientes a los demás meses.

## Condiciones ecológicas de las zonas de distribución de Ceratophrys

Para una mayor comprensión de las áreas que son descriptas - a continuación adoptamos la clasificación de Cabrera y Willink (1973) de las provincias biogeográficas de Sudamérica. Si bien diferentes autores adoptan una determinada nomenclatura para las distintas divisiones biogeográficas, todos coinciden en mayor o menor grado en -

| | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Córdoba | 3,59 | 3,02 | 3,05 | 1,56 | 1,12 | 0,64 | 0,25 | 0,41 | 0,84 | 2,61 | 4,25 | 3,91 | 27,99 |
| Tucumán | 5,30 | 4,72 | 6,44 | 2,29 | 1,77 | 1,12 | 1,11 | 0,63 | 0,92 | 2,48 | 3,85 | 2,75 | 32,10 |
| Catamarca | 1,88 | 2,25 | 1,46 | 0,48 | 0,32 | 0,38 | 0,24 | 0,35 | 0,21 | 1,00 | 1,47 | 1,60 | 12,95 |
| Sgo.Estero | 2,99 | 2,18 | 2,19 | 1,07 | 0,35 | 0,44 | 0,18 | 0,04 | 0,14 | 0,97 | 1,60 | 2,23 | 16,14 |
| Resist. | 5,86 | 4,10 | 4,07 | 5,22 | 3,39 | 1,95 | 1,59 | 1,35 | 1,92 | 5,84 | 3,77 | 4,30 | 43,66 |
| Roque S. Peña | 3,65 | 3,44 | 3,91 | 3,22 | 1,76 | 1,36 | 0,91 | 0,85 | 1,50 | 3,15 | 3,30 | 3,04 | 31,63 |
| Formosa | 3,09 | 3,99 | 2,93 | 4,20 | 4,00 | 3,01 | 1,91 | 2,21 | 3,36 | 6,28 | 4,03 | 3,95 | 43,38 |
| G. Crespo | 4,71 | 3,04 | 4,00 | 3,13 | 1,81 | 1,16 | 1,14 | 1,25 | 1,11 | 3,26 | 3,50 | 3,01 | 33,22 |
| L. Lomita | 3,05 | 2,63 | 3,32 | 3,42 | 1,43 | 1,22 | 1,15 | 0,32 | 1,15 | 3,45 | 2,40 | 3,40 | 38,44 |
| B. Ville | 4,06 | 3,35 | 3,44 | 1,93 | 1,39 | 1,32 | 1,12 | 0,85 | 0,93 | 3,21 | 3,85 | 3,27 | 31,16 |
| C. Bustos | 4,20 | 2,96 | 3,91 | 3,38 | 1,65 | 1,78 | 1,10 | 1,24 | 1,48 | 3,43 | 3,72 | 2,39 | 33,23 |
| Rosales | 3,27 | 2,78 | 3,76 | 2,43 | 1,12 | 1,94 | 0,75 | 0,83 | 1,43 | 3,74 | 3,39 | 3,01 | 30,61 |
| Rosario | 4,87 | 3,06 | 4,03 | 3,76 | 2,51 | 2,16 | 1,90 | 1,72 | 1,35 | 4,42 | 4,47 | 2,08 | 38,05 |
| Benavídez | 3,48 | 2,27 | 2,46 | 2,70 | 3,92 | 3,87 | 2,98 | 3,35 | 2,80 | 3,05 | 2,86 | 2,47 | 35,93 |
| Mercedes | 4,09 | 2,82 | 3,61 | 3,73 | 3,77 | 4,85 | 2,57 | 2,62 | 2,34 | 3,69 | 3,46 | 2,25 | 39,73 |
| 9 de Julio | 3,69 | 2,81 | 4,50 | 2,67 | 3,38 | 2,61 | 2,71 | 1,73 | 2,04 | 2,98 | 3,22 | 2,38 | 35,15 |
| F.Varela | 4,82 | 2,85 | 4,80 | 3,66 | 3,32 | 3,80 | 3,85 | 2,95 | 2,95 | 2,91 | 3,07 | 2,65 | 38,92 |
| Chascomús | 2,82 | 2,73 | 3,09 | 3,29 | 3,86 | 3,52 | 4,18 | 3,35 | 2,62 | 2,85 | 2,81 | 2,04 | 36,49 |

Tabla 18 - Indices de aridez mensuales y anual correspondientes a localidades de hallazgo de C. cranwelli y de C. ornata. Son considerados áridos aquellos meses cuyo índice es inferior a 1,66 y las localidades que poseen un índice anual inferior a 20. Primer grupo de localidades: C. cranwelli, tercer grupo: C. ornata y segundo grupo: localidades de la zona de transición.

cuanto a su número y extensión.

En el dominio Amazónico conciernen a nuestro estudio las provincias Amazónica, Pacífica y Atlántica. En el dominio Chaqueño las provincias de la Caatinga, Chaqueña, Espinal y Pampeana. En el dominio Andino-Patagónico la provincia del Desierto y, en el dominio del Caribe, la provincia de Guajira. Las provincias del Espinal y parte de la Chaqueña ya han sido descriptas al referirnos a la ecología de C. cranwelli y C. ornata en particular.

C. varia y C. ornata. La región costera del Brasil, desde aproximadamente Santa Catharina a Bahía pertenece a la provincia Atlántica, no excediendo los 50-100 km de ancho. Se caracteriza por el clima tropical marítimo, donde la humedad relativa se eleva a más de 85%. La provincia Riograndense está sujeta al régimen subtropical en donde existe una tendencia a un máximo de precipitaciones en verano y un mínimo en invierno, lo cual encontramos también en Río de Janeiro (Ratisbona, 1976) pero el máximo está más desplazado hacia el otoño (Lutz, 1972). La distribución de las precipitaciones es aquí más homogénea durante todo el año con un promedio anual de 2000 mm, alcanzando en algunas zonas los 4000 mm (Cabrera y Willink, 1973) (Fig. 24). Los promedios mensuales de temperatura se elevan a más de 23°C. Los inviernos son más fríos, con una temperatura entre los 10°y 15°C. Sobre las sierras es aún menor, con el más bajo promedio en Itatiaia (11°C). En la parte baja de la costa las temperaturas medias anuales oscilan entre los 20°-26°C (Lutz, 1972). Refiriéndonos a los suelos, la faja costera litoral, que drena directamente al mar, posee suelos podzólicos rojo amarillentos y fe-

Fig. 24 - Representación diagramática del clima de algunas localidades de hallazgo (o cercanas a las mismas) de Ceratophrys exceptuando Argentina y Uruguay.

Una temperatura de 10°C corresponde a una precipitación de 20 mm.

Precipitaciones superan los 100 mm, reproducidas en la proporción 1:10.

Epoca estrictamente árida.

Gráficos sacados de Walter y Lieth (1960).

Puerto Cabello
Maracaibo
Boa Vista
uayaquil
Iquitos
Manaos
Belem
Tumbez
Foz do Jamari
Joazeiro
Conception
Rio de Janeiro
Bahia
Santos
Joinville
Rio Grande

rrosos humíferos. Los "taboleiros" (sedimentos marinos) están acompañados por latosoles amarillentos, semejantes a la región amazónica. En la zona costera entre Uruguay y Brasil dominan los suelos - gley humíferos y planosoles. Son suelos de reacción ácida débil a fuerte y contienen un alto contenido de Fe (Ganssen, 1957).

C. cornuta. La región media del Amazonas (Belem) y la costa de la desembocadura del Amazonas están sujetas a un clima de tipo ecuatorial marítimo, dado que las lluvias son producidas por la penetración de masas de aire del mar hacia el continente. Las precipitaciones son mayores en otoño que en primavera, comenzando en diciembre en Belem. Hacia el este las estaciones seca y húmeda están mejor definidas.

En el Amazonas inferior la humedad relativa corresponde al ritmo de lluvias. En abril (mes más húmedo) la región media del - Amazonas alcanza una humedad relativa del 85% y en agosto (mes más seco) 75% (Ratisbona, 1976). Las precipitaciones oscilan entre los 2000 y 2600 mm anuales. En el Amazonas inferior y medio la temperatura media anual asciende a 26°C y varía poco durante el año. En la zona del Amazonas superior (clima ecuatorial continental) las precipitaciones están distribuídas uniformemente durante todo el año (Fig. 24). No hay una verdadera estación seca. El área comprendida por el río Llullaipichis (Perú) tiene un promedio anual de precipitaciones de 2200 mm. cuyo régimen muestra una estación más seca en los meses de junio, julio y agosto. Las lluvias incrementan en septiembre, alcanzando un máximo de intensidad en noviembre (Toft y Duellman, 1979). Tanto en el Amazonas superior como en Río Negro, -

la humedad relativa es superior a 85%. En toda la región entre los 10°lat. S y el sur de Colombia no se registran grandes variaciones de temperatura, poseyendo un promedio anual entre 23°y 30°C. La precipitación anual alcanza en algunos puntos 10000 mm. La vegetación dominante es la de la pluviselva, semejante a la de la provincia - Amazónica.

Al este de Ecuador y Perú y en la cuenca amazónica, el suelo más común es el latosol (caolinítico) amarillento (fuertemente ácido). Las zonas poco drenadas poseen suelos lateríticos con aguas - subterráneas y la vegetación predominante es la sabana, mientras que los mejor drenados están cubiertos por foresta tropical.

Santa Cruz de la Sierra (Bolivia) pertenece al denominado - Chaco Boliviano, donde la estación seca es más intensa cuanto más se dirige al límite argentino-paraguayo (Johnson, 1976). La estación lluviosa comienza a fines de octubre hasta marzo y sufre una brusca caída en los meses de invierno (Tabla 19). La temperatura media anual es aproximadamente 1000 mm. La vegetación refleja, a causa de este ciclo de lluvias, una interdigitación entre pantanal y cerrado - (Gans, 1960). Los suelos de esta región se caracterizan por su gran porosidad y permeabilidad. Son ricos en Fe y Al (Lateríticos), pobres en humus y de reacción ácida.

C. sp. (Joazeiro). En la provincia biogeográfica de la Caatinga (nordeste del Brasil) el número de meses húmedos disminuye - considerablemente, reduciendo en algunos lugares a 2 y 3 el número de meses húmedos. Posee clima semiárido. La faja comprendida desde la mitad de Río Grande do Norte a través de Parahyba y Pernambuco

| | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| C. calcarata | | | | | | | | | | | | | |
| Barranquilla | 0,03 | | 0,04 | 0,28 | 2,29 | 3,71 | 1,78 | 2,60 | 3,50 | 5,33 | 2,15 | 1,72 | 22,09 |
| Puerto Ayacucho | 0,36 | 0,43 | 1,67 | 4,09 | 9,21 | 12,34 | 12,39 | 8,18 | 4,82 | 4,54 | 2,95 | 1,06 | 60,46 |
| C. cornuta | | | | | | | | | | | | | |
| Manaus | 7,33 | 6,81 | 7,40 | 7,37 | 5,34 | 2,74 | 1,73 | 1,00 | 1,57 | 3,29 | 4,03 | 5,88 | 54,08 |
| Belem | 9,64 | 11,64 | 12,42 | 9,68 | 8,04 | 4,88 | 4,05 | 3,52 | 3,30 | 2,55 | 2,40 | 4,88 | 76,63 |
| Santa Cruz | 4,47 | 3,83 | 2,69 | 2,00 | 2,00 | 1,76 | 1,13 | 1,23 | 1,51 | 2,48 | 3,22 | 3,92 | 30,76 |
| C. stolzmanni | | | | | | | | | | | | | |
| Guayaquil | 5,86 | 5,18 | 6,24 | 3,59 | 1,06 | 0,43 | | | | 0,11 | 0,02 | 0,41 | 23,40 |
| C. varia | | | | | | | | | | | | | |
| Bahia | 2,04 | 3,19 | 4,57 | 7,78 | 8,51 | 6,64 | 6,17 | 3,39 | 2,89 | 2,93 | 3,32 | 3,49 | 54,96 |

Tabla 19 - Indices de aridez mensuales y anual correspondientes a localidades de hallazgos de C. calcarata, C. cornuta, C. stolzmanni y C. varia. Son considerados áridos aquellos meses cuyo índice es inferior a 1,66 y las localidades que poseen un índice anual inferior a 20.

en dirección sudoeste hacia el río São Francisco hasta el este de Bahía, es la que registra el menor número de meses húmedos (Lauer et al., 1952). En promedio, en la región de la Caatinga son encontrados los valores más altos de temperatura en verano, superando los 28°C, y con una precipitación que se encuentra entre los 400 y 750 mm anuales; además existe un alto grado de evaporación. Como particularidad de esta región se producen en ocasión años lluviosos en los cuales el agua corre y se pierde, y años de extrema sequía. Las sequías suelen prolongarse de mayo a septiembre, siendo de mayor extensión en los años muy secos. En las proximidades de Joazeiro los suelos incluyen vertisoles negros y marrones (ricos en $Ca^{++}$, flojos y grumosos) y rendsinas (calizos y ricos en humus) (Ganssen, 1957). También se encuentran los mediterráneos pardo rojizos de reacción poco ácida a neutra y latosoles (como en la región de la Guayanas que responden en general a la vegetación de la Caatinga). Se trata de suelos jóvenes.

C. stolzmanni. La línea costera del Perú y sur del Ecuador cubre una de las regiones más secas del mundo debido al efecto de la corriente fría de Humboldt. Se distingue un régimen de estaciones seca y húmeda. El promedio anual de precipitaciones es de 843 mm. Enero es el mes más húmedo (Tabla 19); a partir de marzo comienzan los meses secos hasta diciembre. Guayaquil (considerado el extremo occidental del área semiárida) tiene un máximo diario de temperatura sobre los 30°C de diciembre a mayo, coincidiendo con las lluvias. Diciembre es el mes de mayores temperaturas. Salinas es la localidad más seca y variable estacionalmente de toda el área, recibiendo

una precipitación media anual de sólo 56 mm. La vegetación se reduce a pocos arbustos. La costa pacífica es una planicie aluvial con dunas de arena. Además se encuentran suelos tipo mediterráneo (poco ácidos y ricos en Fe) y vertisoles (flojos y ricos en Ca). En la costa norte de Perú predominan los suelos desérticos.

C. calcarata. Entre el mar Caribe y el borde norte de la cordillera, incluyendo la Sierra Nevada de Santa Marta y de Perijá, (región del Passat (Lauer et al., 1952)), los meses de sequía se producen de enero a marzo. Existen 2 máximos de precipitaciones entre mayo y junio, y otro en el mes de octubre. Esta situación se presenta en toda la costa desde la desembocadura del Río Sinú hasta el límite con Venezuela. Al alejarse de la costa, las precipitaciones aumentan. La vegetación de la región costera es enteramente xerófila. La península de Goajira muestra de 2 a 3 meses húmedos. En los valles de los ríos Cauca, Magdalena, Sogamoso y Bogotá se registran de 4 a 7 meses húmedos. La temperatura media anual oscila entre 28° a 30°C (Snow, 1976). Los suelos del norte de Colombia (península de Goajira) y cuenca del Maracaibo son aluviales, con bajo contenido húmico.

La región venezolana, donde C. calcarata es mencionado (Rivero, 1961) se caracteriza por su condición semiárida. Puerto Ayacucho (límite entre Colombia y Venezuela) posee una temperatura anual de 27°C y una precipitación de 2455 mm anuales, de los cuales 551 mm caen en junio (máximo) y 3 mm en febrero. San Fernando de Atabapo marca el límite entre el comienzo de la selva y fin de la sabana, y la región semiárida.

Condiciones ecológicas de las demás poblaciones poliploides bisexuales.

Resulta de interés mencionar una particularidad de las condiciones climáticas de las zonas de distribución de las poblaciones tetraploides bisexuales cuyos individuos poseen hábitos terrestres; es por eso que excluiremos a los géneros Phylomedusa, Hyla, Xenopus y Dicroglossus.

Odontophrynus americanus (tetraploide), como ya hemos mencionado en la introducción se distribuye en Argentina, Brasil y Uruguay, en las zonas que coincidirían con la distribución de C. ornata y C. dorsata (ambas octoploides), excepto en Argentina donde ocupa además las provincias de Entre Ríos, sudeste de Corrientes y este de Santa Fe por una lado y por otro Jujuy y Salta (Beçak y Beçak, 1974; Barrio y Pistol de Rubel, 1972) (Fig. 25). En estas dos últimas provincias, si bien están citadas para C. cranwelli, los lugares de hallazgo no son los mismos, sino que corresponden a la provincia de las Yungas (Cabrera y Willink, 1973). Esta provincia biogeográfica, que limita al este con la provincia del Chaco, posee un clima más fresco que el de las colindantes, muy húmedo a causa no sólo de las abundantes precipitaciones, sino en especial de las neblinas. Tenemos referencias (Barrio, 1964) que O. americanus (4n) prefiere los ambientes con pastizales y bañados de las zonas húmedas, aunque incidentalmente se lo encuentre también en ciertos valles serranos.

El área distributiva de Pleurodema bibroni (4n) (Fig. 25) -

Pleurodema

Fig. 25 - Distribución geográfica de las poblaciones diploides y tetraploides de Odontophrynus y de Pleurodema.

diploide

tetraploide

abarca el sudeste de la República Oriental del Uruguay y parte del estado de Santa Catharina (Barrio, 1977). Vemos nuevamente que coincide con parte de las zonas de distribución de C. ornata y C. dorsata. Pleurodema kriegi (4n), sin embargo, ocupa un área muy restringida ya que queda circunscripta a la Pampa de Achala (Córdoba, Argentina) y a otras pequeñas altiplanicies del sistema de Sierra - Grande y nunca es encontrada debajo de los 2100-2400 m sobre el nivel del mar (Barrio, 1977). La temperatura media anual es de 9,5°C y la precipitación de 1000 mm anuales, lo cual daría un índice de aridez aproximado de 51. Existen grandes cambios estacionales y diarios de temperatura, y las mayores precipitaciones se producen a comienzos de noviembre, continuando hasta marzo.

Las poblaciones diploides de O. americanus habitan las provincias de Santiago del Estero, Catamarca y Córdoba en la Argentina (Barrio y Pistol de Rubel, 1972) y en São Manuel, Botucatu, Pardinho Itatinga, Avaré y Piraju en el estado de São Paulo (Brasil) (Beçak, Denaro, Beçak, 1970; Beçak y Beçak, 1974). En Argentina ocupa algunas de las áreas en las que también reside C. cranwelli. En el caso de las especies diploides de Pleurodema en Argentina (tucumana, guayapae y nebulosa) (Barrio, 1964) encontramos curiosamente el mismo hecho. Estas se distribuyen en las provincias de Tucumán, Santiago del Estero, Catamarca, Córdoba y La Pampa como C. cranwelli, y también en La Rioja, San Juan, Mendoza y San Luis. Si bien de estas - provincias sólo comparte algunas zonas con el escuerzo diploide, - presentan características edáficas, climáticas y florísticas similares a las de la provincia Chaqueña (Cei, 1955).

Se torna difícil la tarea de querer comparar las condiciones ecológicas de la región donde habitan las especies crípticas tetraploide y diploide de Bufo sp. en Africa, debido a la inseguridad de su ubicación taxionómica. Bogart y Tandy (1976) afirman que es similar a Bufo kerinyagae. En la descripción de la especie (Keith, 1968) no son citadas las localidades de hallazgo que figuran en el trabajo de Bogart y Tandy como pertenecientes al área distributiva de la misma. Sumado a ésto, la autora desconoce la única localidad de Etiopía donde es mencionada. Sólo podemos decir que en Asmara - (donde es citada la especie tetraploide) la temperatura media anual asciende a 16,5°C y la precipitación media anual es de 468 mm con un máximo entre junio y septiembre. Sin embargo podemos mencionar, de la zona donde se encontraría la especie diploide, que la temperatura media anual oscila entre 20° a 25°C y que los inviernos son más cálidos que en Asmara, encontrándose la precipitación media - anual entre los 250 y 500 mm (Griffith, 1972).

Tomopterna(=Pyxicephalus) delalandii es una especie cavadora que se distribuye en Sud Africa, Africa oriental llegando hasta las costas del Mar Rojo. La forma diploide es citada para Kuruman, - Sishen, Postmasburg, Stella y Pretoria en el centro de Sud Africa. Las precipitaciones registradas son menores que en la región de la costa oriental, (donde se encuentra la forma diploide) pudiendo llegar a tener entre 7 a 3 meses húmedos.

Balinski (1969) menciona como época normal de reproducción (cerca de Johannesburg) entre mediados de octubre y mediados de febrero, estando restringida a charcos u hoyas que se llenan en verano

por las lluvias y permanecen secas durante el invierno. La especie tetraploide es citada para Jamestown, Queenstown, Cathcart y Grahamstown (Bogart y Tandy, 1976), donde las precipitaciones oscilan entre 550 y 700 mm anuales (Schulze, 1972). Las precipitaciones están repartidas todo el año o a veces cuenta con 8 meses húmedos - (Walter y Lieth, 1960). La forma diploide de Bufo viridis se encuentra en las estepas de Kirgizistan (Bachmann et al., 1978), no sobrepasando los 650 msnm (Mazik et al., 1976 (1977)). La forma tetraploide, en cambio, se halla en la región montañosa (Mtes. Tien Shan), entre los 1600 a 3500 m snm, caracterizándose por su clima más húmedo. De acuerdo al atlas mundial de diagramas climáticos (Walter y Lieth, 1960) las precipitaciones medias anuales son superiores a 350 mm y la temperatura media anual inferiores a 11°C. La región de distribución de la forma diploide se caracteriza por poseer precipitaciones inferiores a 250 mm anuales y una temperatura superior a 12°C.

En cuanto a Bufo oblongus no se ha encontrado aún la forma diploide (H. Hemmer, comunicación personal), sólo se conocen las - formas tri y tetraploide que habita en zonas montañosas, Kabul (3n) y Duschanbe (4n) respectivamente (con 11,5°C y 309 mm anuales la primera y alrededor de 12,9°C y 315 mm anuales la segunda).

## Estudio de algunos caracteres métricos

El objeto de las mediciones del escudo dorsal en C. cranwelli y en C. ornata era comprobar si existía alguna diferencia en cuanto

a su tamaño dado que en las distintas claves del género (Miranda Ribeiro, 1920, 1923, 1926; Boulenger, 1882; Cochran, 1955) daban, como hecho curioso, que C. varia y C. ornata (ambas octoploides) poseían dicho escudo, en cambio C. calcarata que es diploide, carecía de él (Boulenger, 1890). Sin embargo no hemos encontrado diferencias en la dimensión del escudo dorsal de C. cranwelli ni de C. ornata. Hallamos en cambio un dimorfismo sexual en ambas entidades (Figs. 26, 27 y 28). En la figura 27 observamos que el desarrollo en ancho del escudo en C. cranwelli machos se mantendría independiente del crecimiento en largo del animal.

Basándonos en las claves y descripciones disponibles, el principal obstáculo que se nos presenta se refiere al escudo dorsal.Una primera ramificación separa a las especies en poseedoras y no poseedoras de tal escudo, sin embargo comprobamos que C. cornuta, que ha sido siempre caracterizada por la ausencia de escudo dorsal óseo, (excepto en el catálogo de Günther (1859) donde la menciona con escudo dorsal, pero se refiere a C. varia (Boulenger, 1882)), posee a cada lado de la columna vertebral 2 pequeñas placas óseas que no llegan a tocarse. Esto ha sido observado en los especímenes ZSM1057/0 y ZSM 1058/0 (Fig. 35). En C. ornata (ZSM 49/1922.1, .2 y .3) (Figs. 32 y 33) provenientes de La Plata (Rep. Argentina) que medían entre 4,00 y 6,57 cm, se verificó exactamente la misma particularidad.Un ejemplar de la misma especie (Museo de Bonn ZFMK-H 1980) de 4,73 cm carecía de escudo dorsal. El escudo de C. ornata provenientes de Benavídez (Rep. Argentina) y de C. cranwelli procedentes de Sumampa (Rep. Argentina) que poseían aproximadamente las mismas dimensiones,

Fig. 26 - Relación entre el largo del escudo dorsal óseo y la longitud del cuerpo en C. ornata y en C. cranwelli. r=coeficiente de correlación.

Fig. 27 - Relación entre el ancho del escudo dorsal óseo y la longitud del cuerpo en C. ornata y en C. cranwelli.

Fig. 28 - Relación entre el largo/ancho del escudo dorsal óseo y la longitud del cuerpo en C. ornata y en C. cranwelli.

+ C. ornata ♂ • C. cranwelli ♂

Δ C. ornata ♀ ∘ C. cranwelli ♀

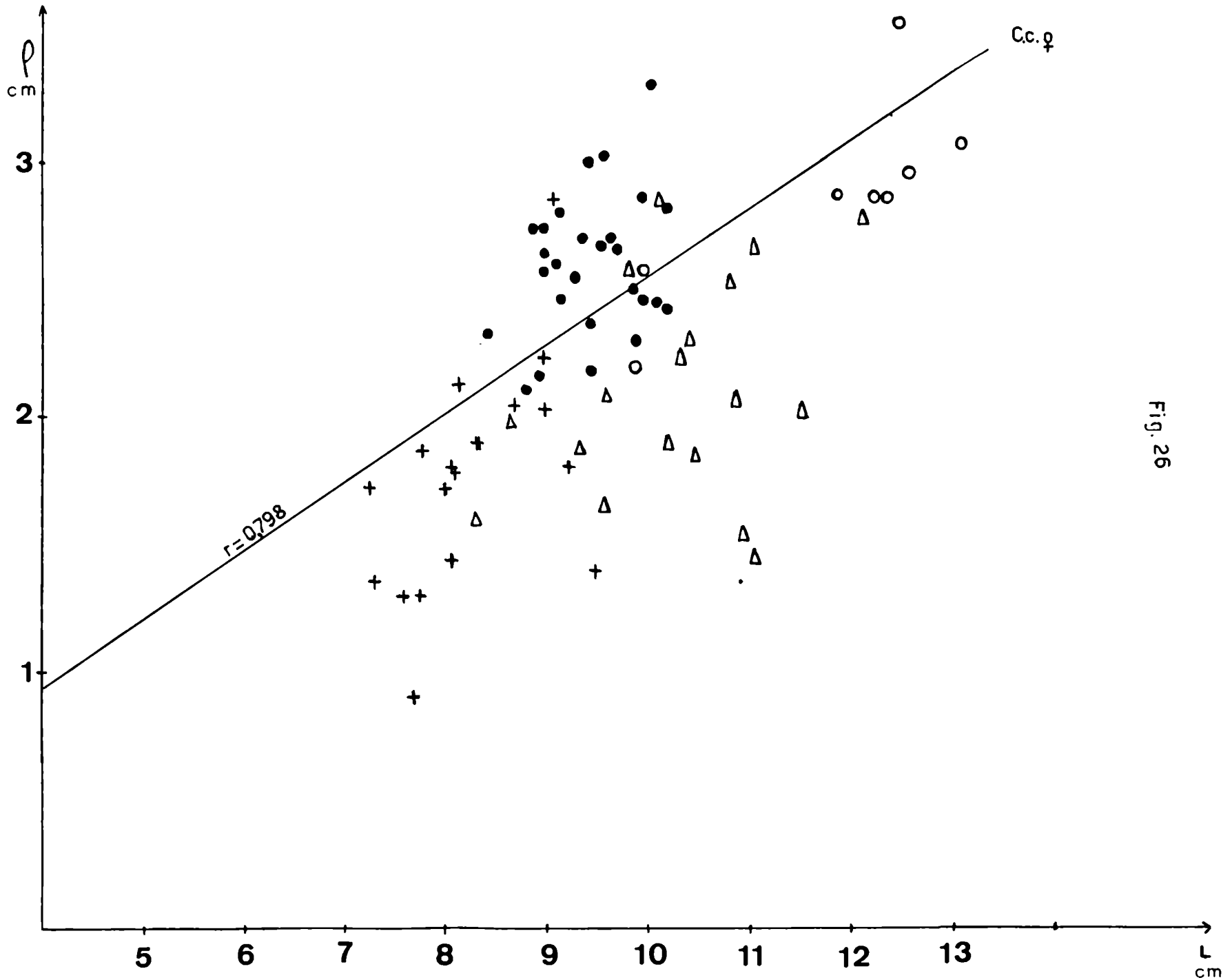



Fig. 26

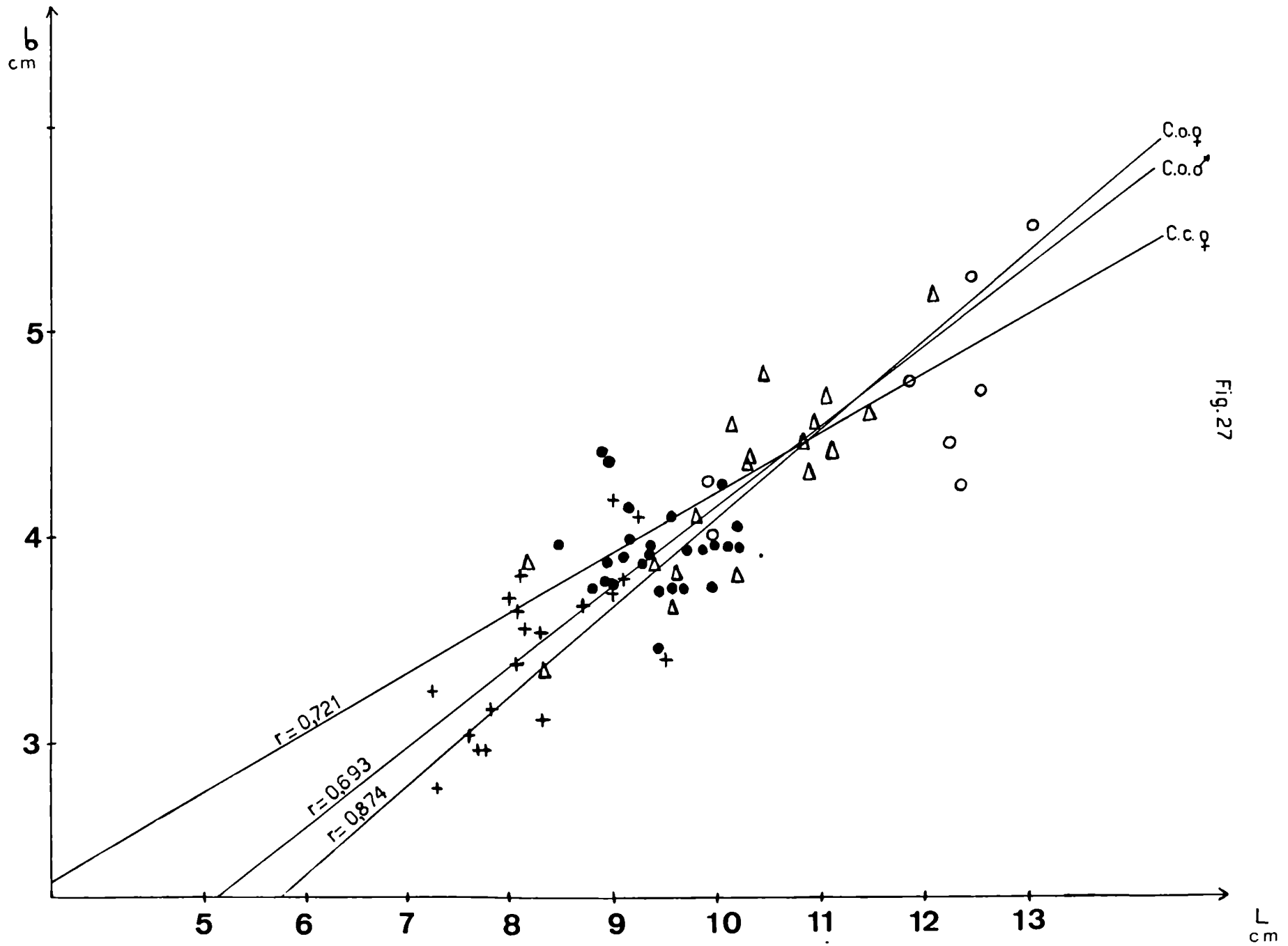



Fig. 27

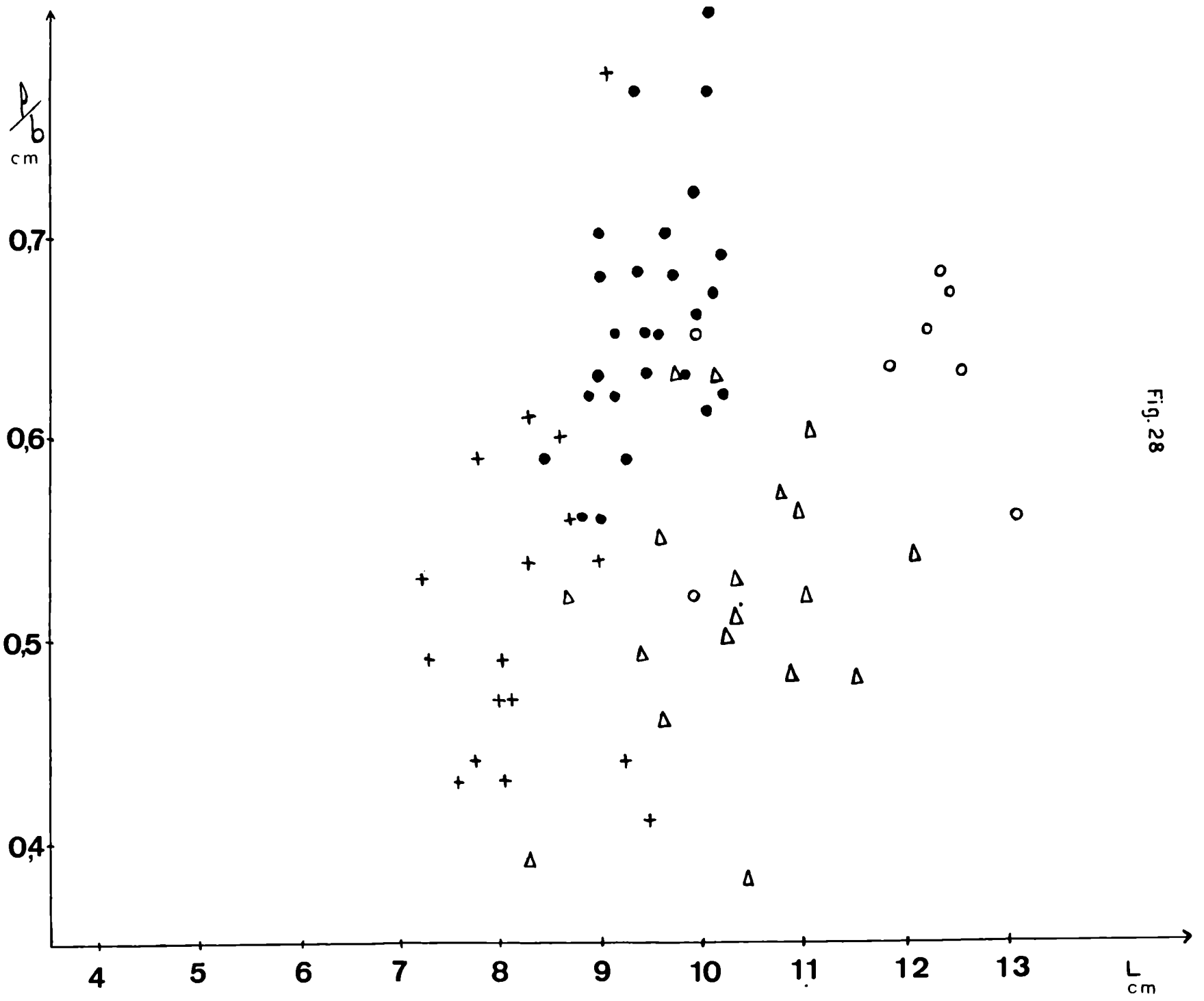



Fig. 28

estaba completamente desarrollado. Dos ejemplares de C. ornata procedentes de Río de Janeiro (NMW 15817·1 y 15817·2) que medían 4,84 y 4,00 cm de longitud, carecían del mismo.

C. varia que es el representante de mayor tamaño del género, posee un sólido escudo dorsal óseo de conspicuas dimensiones. Su forma puede verse claramente en la figura 35 y 36. Hemos de hacer notar que un individuo (NMW 4600) de 8,60 cm (Fig. 38 B) era poseedor de un escudo poco desarrollado, en comparación con los demás representantes de la especie.

Los ejemplares de C. calcarata y C. stolzmanni carecían totalmente de escudo dorsal; debe tenerse en cuenta que entre la primera de las especies mencionadas las longitudes oscilaban entre 5,10 y 7,75 cm. El único C. stolzmanni estudiado (NMW 4632) (Fig. 42) medía 5,0 cm de longitud. Hemos leído en el trabajo de Peters (1967) que otros ejemplares de C. stolzmanni pueden medir de 2,97 a 6,06 cm de longitud.

En la tabla 20 figuran los índices mencionados anteriormente (ver materiales y métodos) calculados para cada especie.

C. cranwelli y C. ornata han sido separados en 2 y 3 grupos respectivamente para comprobar la existencia de un clin. A pesar que la zona de distribución de C. varia es también extensa, no hemos verificado ninguna variación clinal.

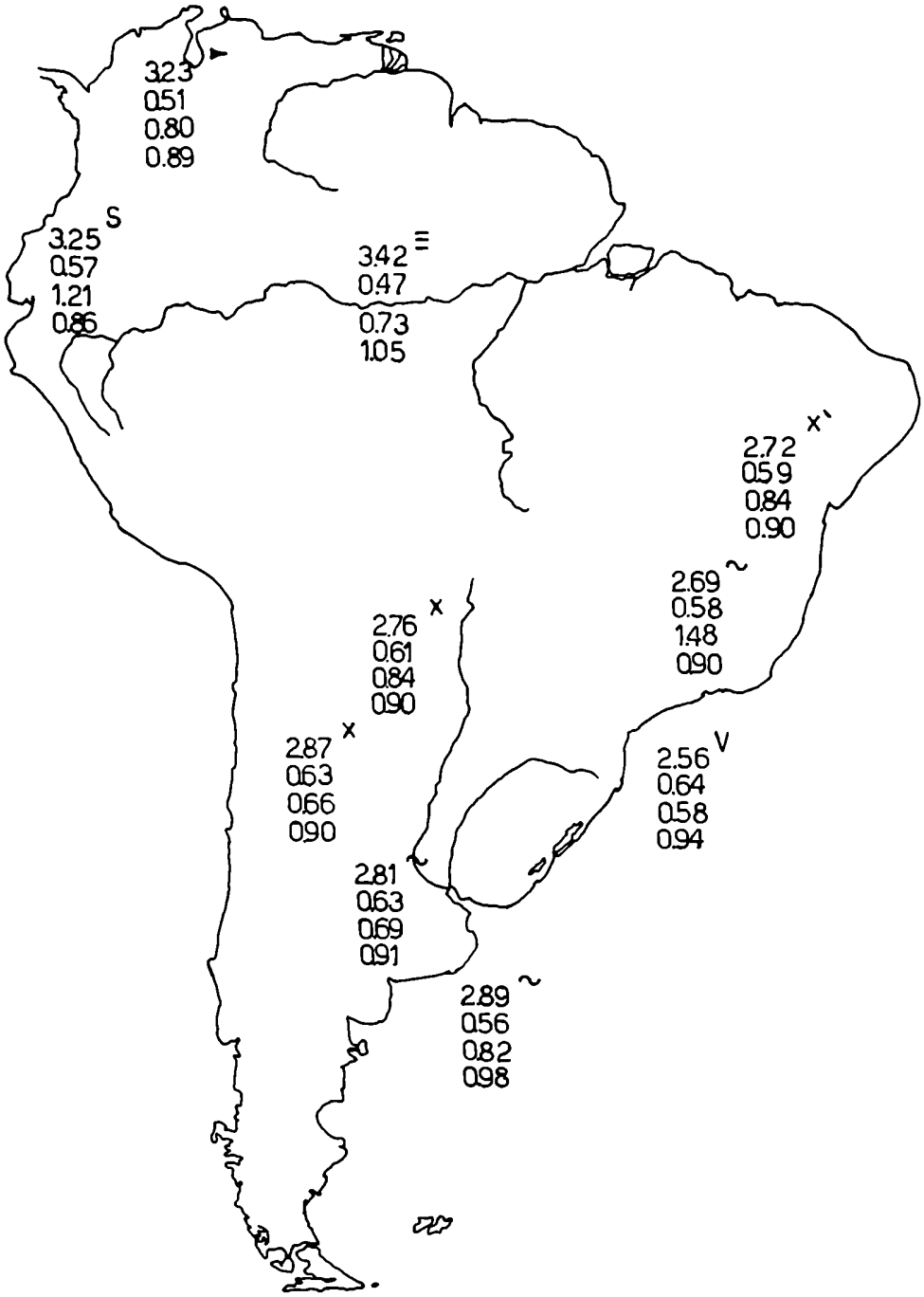
Algunos valores han sido volcados en un mapa (Fig. 29) facilitando así la visualización de la variación de los distintos índices en especial el índice longitud total/largo de la cabeza. Observamos que C. stolzmanni, C. calcarata y C. cornuta poseen un valor

| | a) Long.total / Long.cab. | b) Long.cab. / Ancho cab. | c) b) / Dist.naso-orbital | d) Long.tibia long.pie / Long.total | e) Ancho cab. / Long.total |
|---|---|---|---|---|---|
| C.ornata (Brasil) | n=2<br>2,690<br>s=±0,33 | 0,586<br>s=±0,23 | 1,482<br>s=±0,33 | 0,903<br>s=±0,14 | 0,637<br>s=±0,18 |
| C.ornata Bs. As. (Argent.) | n=4<br>2,815<br>s=±0,31 | 0,630<br>s=±0,18 | 0,685<br>s=±0,29 | 0,912<br>s=±0,22 | 0,565<br>s=±0,11 |
| C.ornata La Plata (Argent.) | n=5<br>2,894<br>s=±0,23 | 0,559<br>s=±0,03 | 0,819<br>s=±0,24 | 0,980<br>s=±0,08 | 0,621<br>s=±0,03 |
| C.varia (Brasil) | n=19<br>2,564<br>s=±0,13 | n=19<br>0,643<br>s=±0,04 | n=19<br>0,581<br>s=±0,14 | n=26<br>0,942<br>s=±0,04 | n=26<br>0,604<br>s=±0,03 |
| C.sp. Joazeiro (Brasil) | n= 8<br>2,719<br>s=±0,28 | 0,593<br>s=±0,18 | 0,840<br>s=±0,42 | 0,898<br>s=±0,29 | 0,616<br>s=±0,13 |
| C.cranw. Bolivia y N.de Arg.) | n=5<br>2,757<br>s=±0,40 | n=5<br>0,605<br>s=±0,16 | n=5<br>0,836<br>s=±0,32 | n=6<br>0,902<br>s=±0,17 | n=6<br>0,602<br>s=±0,18 |
| C.cranw. Sgo.Estero (Argent.) | n=4<br>2,874<br>s=±0,23 | 0,630<br>s=±0,19 | 0,661<br>s=±0,22 | 0,892<br>s=±0,23 | 0,568<br>s=±0,15 |
| C.cornuta (Surinam) | n=2<br>3,424<br>s=±0,29 | 0,471<br>s=±0,07 | 0,731<br>s=±0,17 | 1,049<br>s=±0,16 | 0,621<br>s=±0,10 |
| C.stolz. (Perú) | n=1<br>3,247 | 0,568 | 1,209 | 0,860 | 0,542 |
| C.calca. (Colombia) | n=7<br>3,226<br>s=±0,20 | n=7<br>0,511<br>s=±0,03 | n=7<br>0,796<br>s=±0,19 | n=9<br>0,926<br>s=±0,13 | n=9<br>0,618<br>s=±0,04 |

Tabla 20 - Indices entre 5 caracteres merísticos estudiados en material vivo (C.ornata procedentes de Buenos Aires y C.cranwelli de Santiago del Estero) y preservado.

Fig. 29 - Indices obtenidos a partir de 5 caracteres merísticos y ubicados de acuerdo a la distribución de las distintas especies de Ceratophrys, mostrando algunos de ellos variación clinal. Por orden descendente están representados los siguientes índices: a) longitud total/long. cabeza, b) long. cabeza/ancho cabeza, c) índice b/distancia naso-orbital, d) long. tibia + pie/long. total.

► C. calcarata
≡ C. cornuta
X C. cranwelli
X' C. sp. de Joazeiro
~ C. ornata
V C. varia
S C. stolzmanni


3.23
0.51
0.80
0.89
3.25
0.57
1.21
0.86
3.42
0.47
0.73
1.05
2.72
0.59
0.84
0.90
2.69
0.58
1.48
0.90
2.76
0.61
0.84
0.90
2.87
0.63
0.66
0.90
2.56
0.64
0.58
0.94
2.81
0.63
0.69
0.91
2.89
0.56
0.82
0.98

elevado para dicho índice a diferencia de C. cranwelli, C. ornata, C. varia y la especie procedente de Joazeiro. Lo contrario verificamos para el índice longitud de la cabeza/ancho de la cabeza, es decir, es menor en las 3 primeras especies y ligeramente mayor en las 4 últimas.

Si analizamos en particular lo que ocurre con las poblaciones de C. cranwelli y los Ceratophrys sp. (determinados erróneamente como C. dorsata) de Joazeiro encontramos una mayor similitud de éste último con aquellos C. cranwelli del norte que con los del centro de la Argentina.

## Caracteres morfognósticos

Para cada especie hemos podido verificar un patrón característico de manchas en la cabeza. (Fig. 30).

C. ornata (Fig. 32) posee una banda oscura interorbital cuyos extremos aguzados no llegan hasta la punta de los párpados. Pueden tener otra mancha alargada que no toca la anterior banda y se dirige hacia adelante, terminando en algunos casos a la altura de las narinas. Debajo de los ojos nace una banda (banda I) oscura, que casi nunca es atravesada por prolongaciones de las franjas claras que la rodean. Otra banda (banda II) oscura nace debajo de los ojos e internamente se dirige hacia las narinas, a partir de donde corren paralelas hasta alcanzar la boca. Puede o no estar cruzada por una pequeña banda a la altura de las narinas. Entre las bandas I y II mencionadas puede encontrarse otra pequeña en medio de una

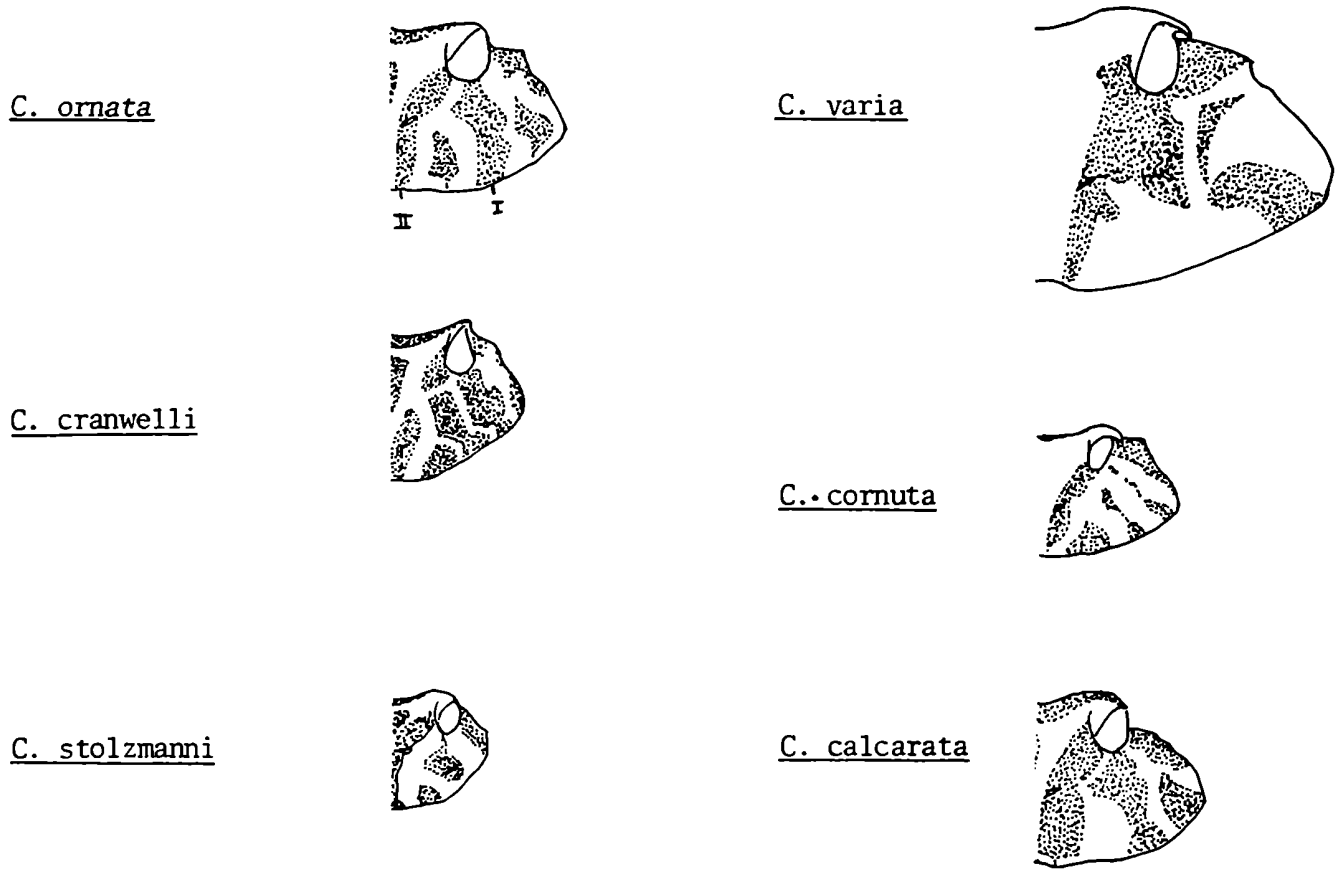



Fig. 30 - Representación esquemática de los patrones de manchas de la cabeza de las especies de *Ceratophrys*. Aumento 1x.

zona clara.

El diseño de la cabeza de C. cranwelli (Fig. 33 B) se diferencia del de C. ornata en que la banda clara ubicada entre las franjas I y II no aparece; además la frecuencia en que aparece la banda I cruzada por las proyecciones provenientes de las bandas claras que la rodean es mucho mayor, encontrándosela en casi todos los ejemplares estudiados.

C. cornuta no presenta una banda alargada que nace en el espacio interorbital y que se dirige hacia las narinas. Está presente la banda II oscura que corre sobre las narinas, pero no llega a tocar el borde de la boca. Dos bandas claras nacen debajo de los ojos (de la parte externa) y se dirigen más o menos paralelamente hacia la comisura oral. Entre ellas aparecen periódicamente pequeños espacios oscuros, siendo más grande el último. Una proyección clara que sale de la banda clara que rodea a la banda II corre paralela a las 2 franjas claras que nacían del ojo dejando con éstas un espacio oscuro.

C. varia muestra una mayor variación del diseño, sin embargo es característica la ancha franja dorsal anteroposterior (Fig.35, 36,37 y 38). Una finísima elevación cutánea de otra tonalidad corriendo en el espacio interorbital de la punta de un párpado a la otra se presenta a veces interrumpida a distintos niveles. La banda II está presente. De acuerdo a Miranda Ribeiro (1920, 1926), envolviendo los ojos hay 4 bandas de forma triangular que, en su conjunto forman una cruz de Malta (Figs. 38, 39 y 40). Esta no ha sido observada con mucha claridad en algunos de los ejemplares con que hemos

contado para el presente estudio.

C. calcarata (Fig. 41). La franja interorbital es ancha y - llega hasta el extremo de cada párpado, la banda oscura que nace en el espacio interorbital y que se dirige hacia las narinas posee distinto desarrollo. Dos proyecciones claras que nacen en la zona clara central y que cruzan la banda II a la altura de las narinas, se bifurcan al llegar al maxilar. La banda I es entera y entre ésta y la II se ubica otra. La banda I se ubicaría en el mismo lugar que las pequeñas manchas oscuras de C. cornuta que se encuentran entre las 2 grandes bandas claras laterales.

C. stolzmanni. (Fig. 42). La banda interorbital está bien desarrollada al igual que la banda II. La banda I está desviada hacia la comisura oral. Una banda clara que nace debajo del ojo se bifurca fuertemente a la altura de las narinas formando sólo una pequeña mancha oscura en el borde del maxilar.

Los ejemplares de Ceratophrys provenientes de Joazeiro presentan un patrón muy similar al de C. cranwelli (Fig. 43 y 44). Se pudo observar que la banda interorbital, en los individuos más pequeños, no alcanza el extremo de los párpados (Fig. 43 D).

El apéndice palpebral está bien desarrollado en C. varia y C. cornuta poseyendo un aspecto digitado (Figs. 35, 38 B y C, 38). C. cranwelli, C. calcarata y los provenientes de Joazeiro poseen - una cresta medianamente pronunciada. Finalmente C. ornata y C. stolzmanni presentan una cresta triangular no desarrollada.

C. cornuta es el único representante del género cuya región loreal es aproximadamente plana.

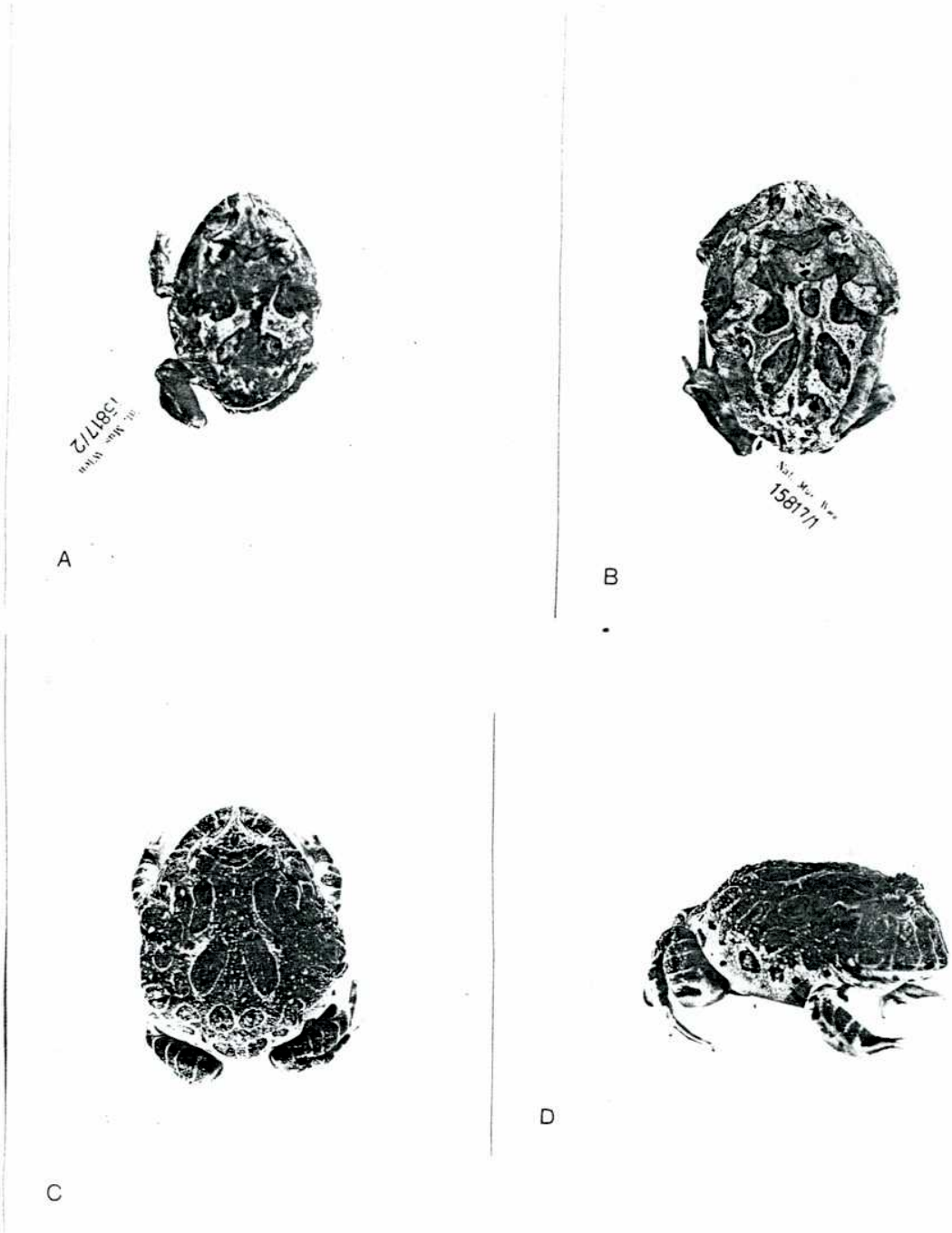



Fig. 31 - Ejemplares de C. ornata. A: NMW 15817/2. B: NMW 15817/1. C: ZSM 49/1922.3. D: ZSM 49/1922.3 (vista sagital).Aumento 8/10x.

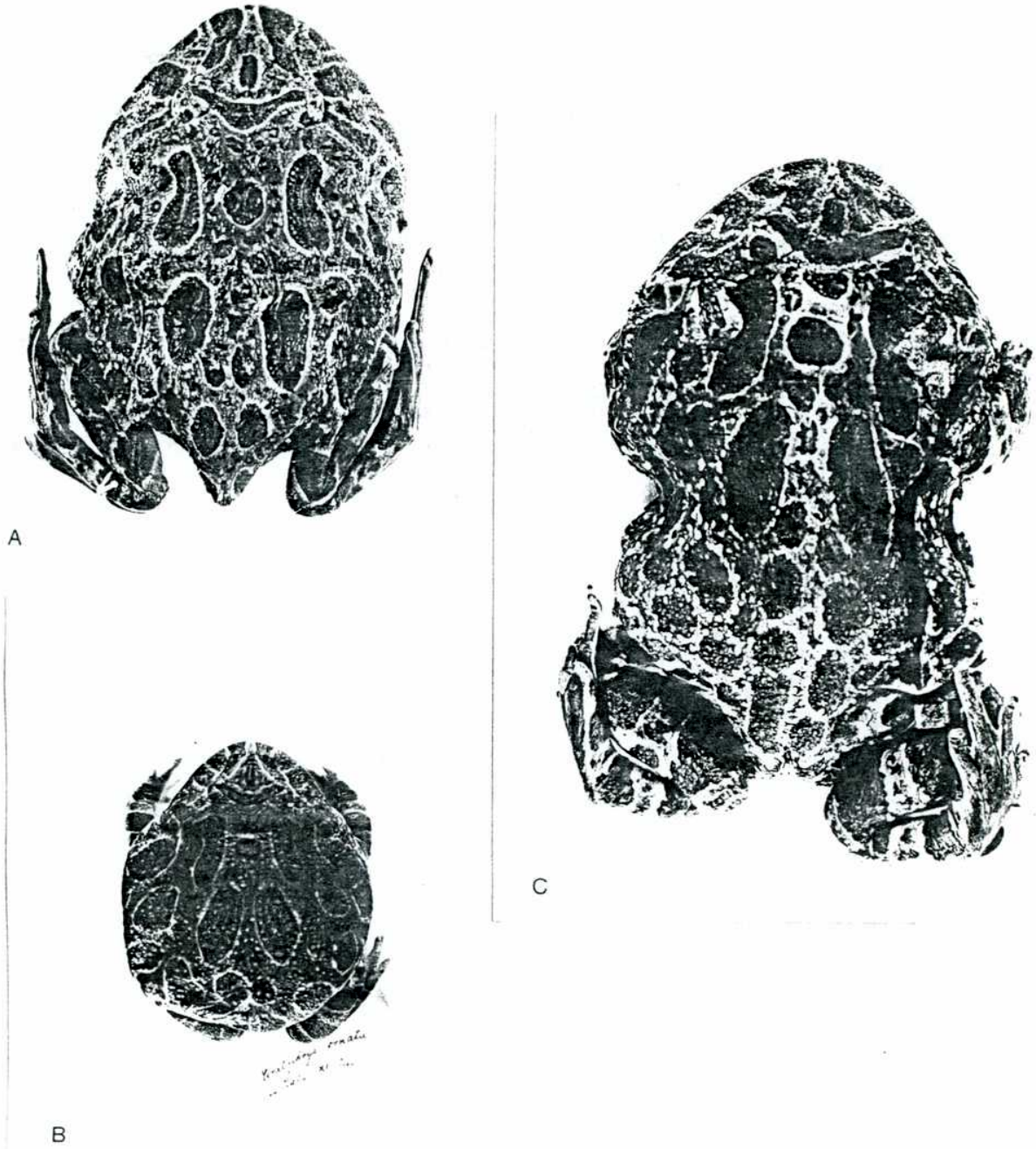



Fig. 32 - Ejemplares de C. ornata. A: NMW 8312.2. B: ZSM 49/1922.1. C: NMW 8312.1.Aumento 8/10x.

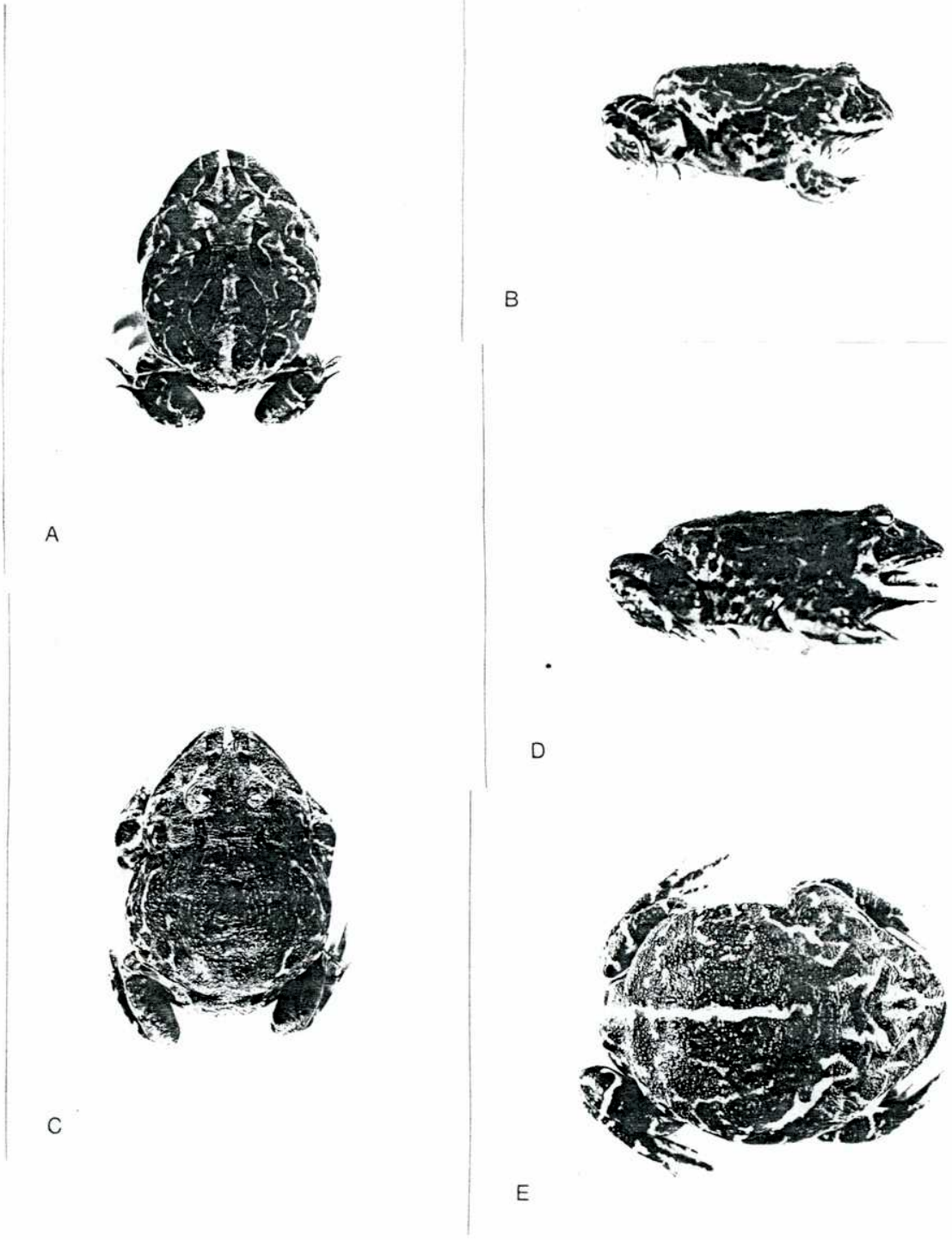



Fig. 33 - Ejemplares de C. cranwelli. A: ZSM 312/1980.1. B: ZSM 312/1980.1(vista sagital). C: ZSM 312/1980.2. D: ZSM 312/1980.2 (vista sagital). E: ZSM 312/1980.3. Aumento 8/10x.

A

B

C

Fig. 34 - Ejemplares de C. cornuta. A: ZSM 1057/0. B: ZSM 1058/0. C: ZSM 1058/0 (vista sagital). Aumento 8/10x.

Fig. 35 - C. varia NMW 7109. Aumento 8/10x.

Fig. 36 - C. varia NMW 7110.1. Aumento 8/10x.

Fig. 37 - C. varia NMW 10.313. Aumento 8/10x.

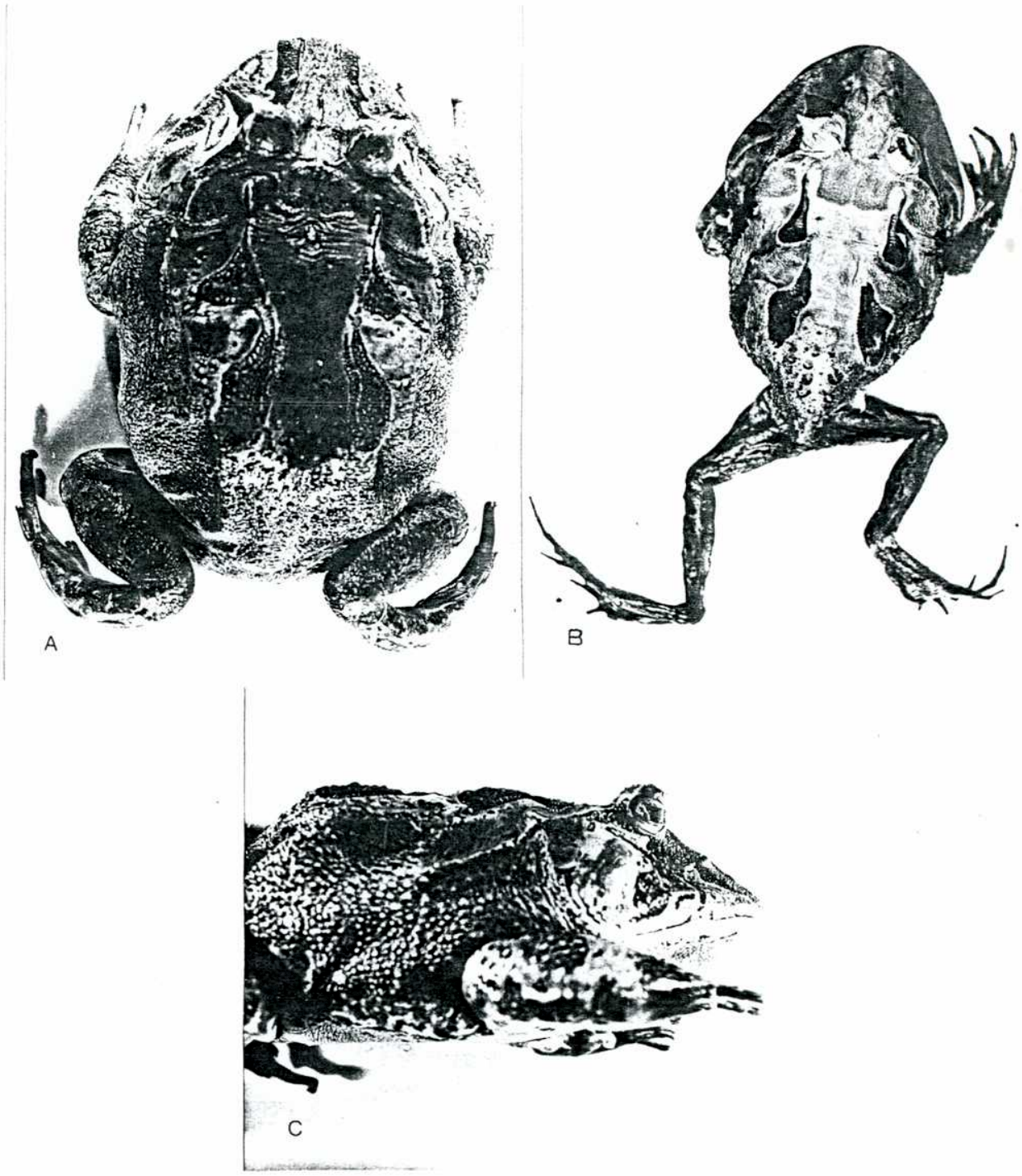
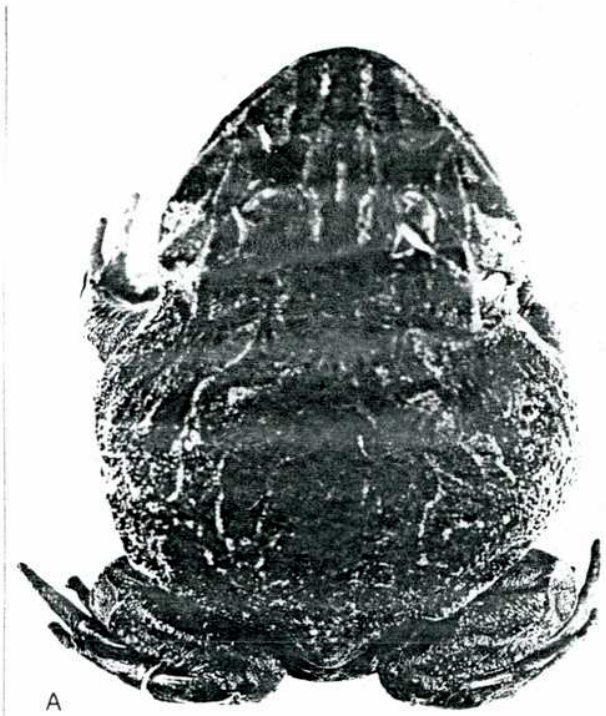



Fig. 38 - Ejemplares de C. varia. A: ZSM 79/1931. B: ZSM 79/1931 (vista sagital). C: NMW 4600. Aumento 8/10x.



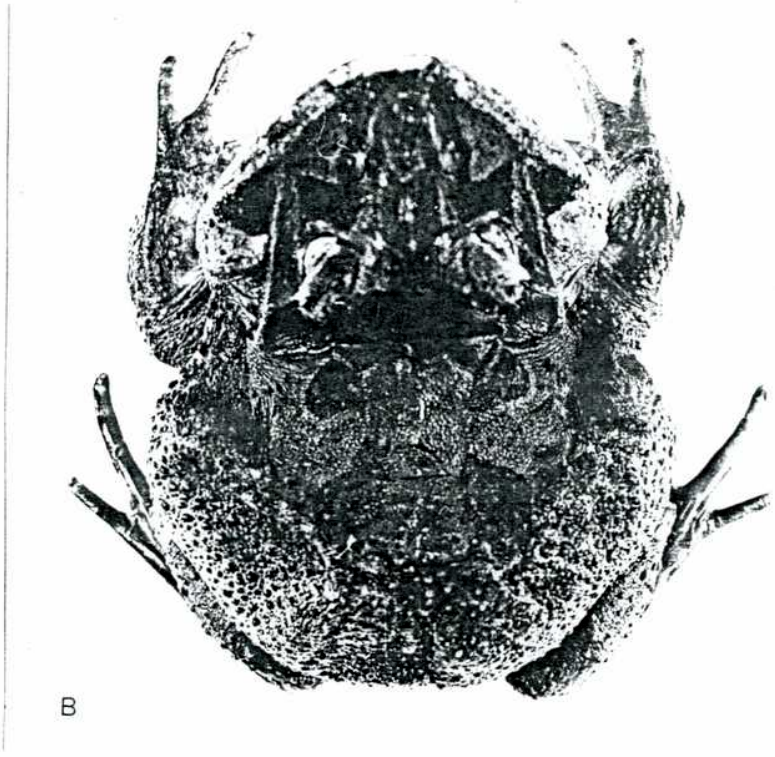




Fig. 39 - Ejemplares de C. varia. A: NMW 8311. B: NMW 7110.3. Aumento 8/10x.

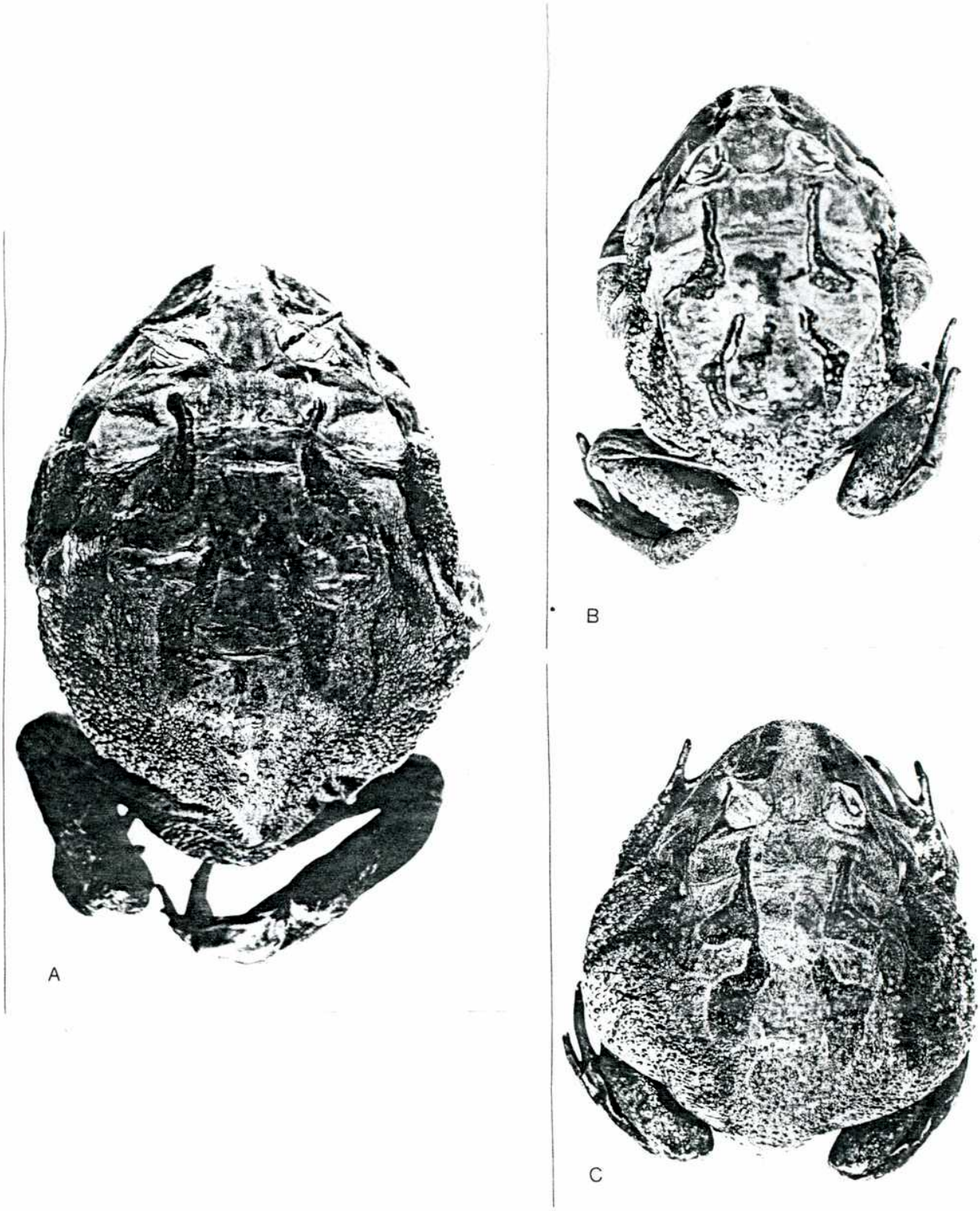



Fig. 40 - Ejemplares de C. varia. A: ♀SMNS 1736. B: ♂SMNS 1736. C: NMW 4584. Aumento 8/10x.

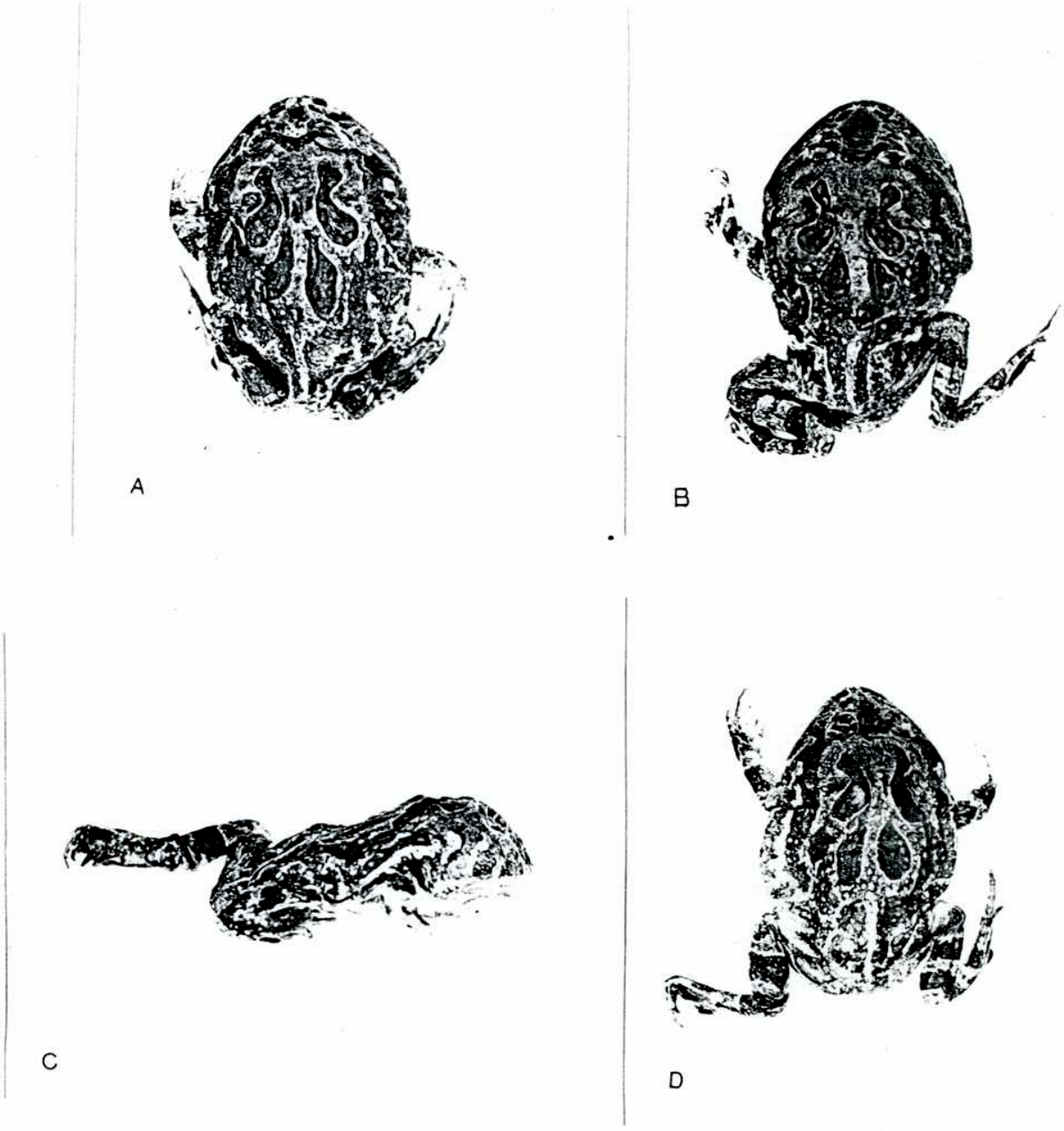



Fig. 41 - Ejemplares de C. calcarata SMNS 4771.

C: vista sagital de D. Aumento 8/10x.

Fig. 42 - C. stolzmanni. NMW 4632. Aumento 8/10x.

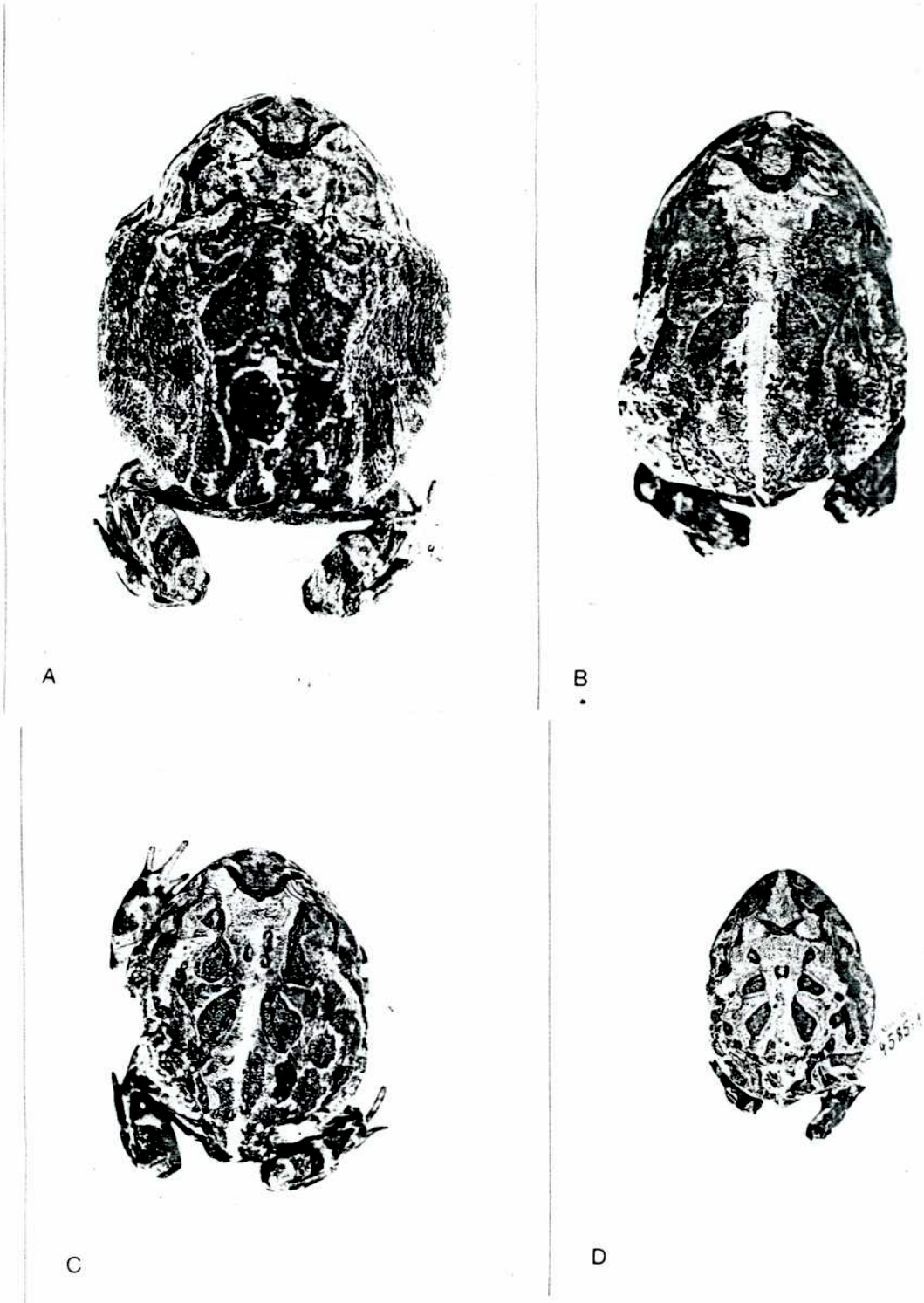



Fig. 43 - Ejemplares de Ceratophrys procedentes de Joazeiro (Brasil). A: NMW 4592. B: NMW 4591. C: NMW 4588. D: NMW 4585.1. Aumento 8/10x.

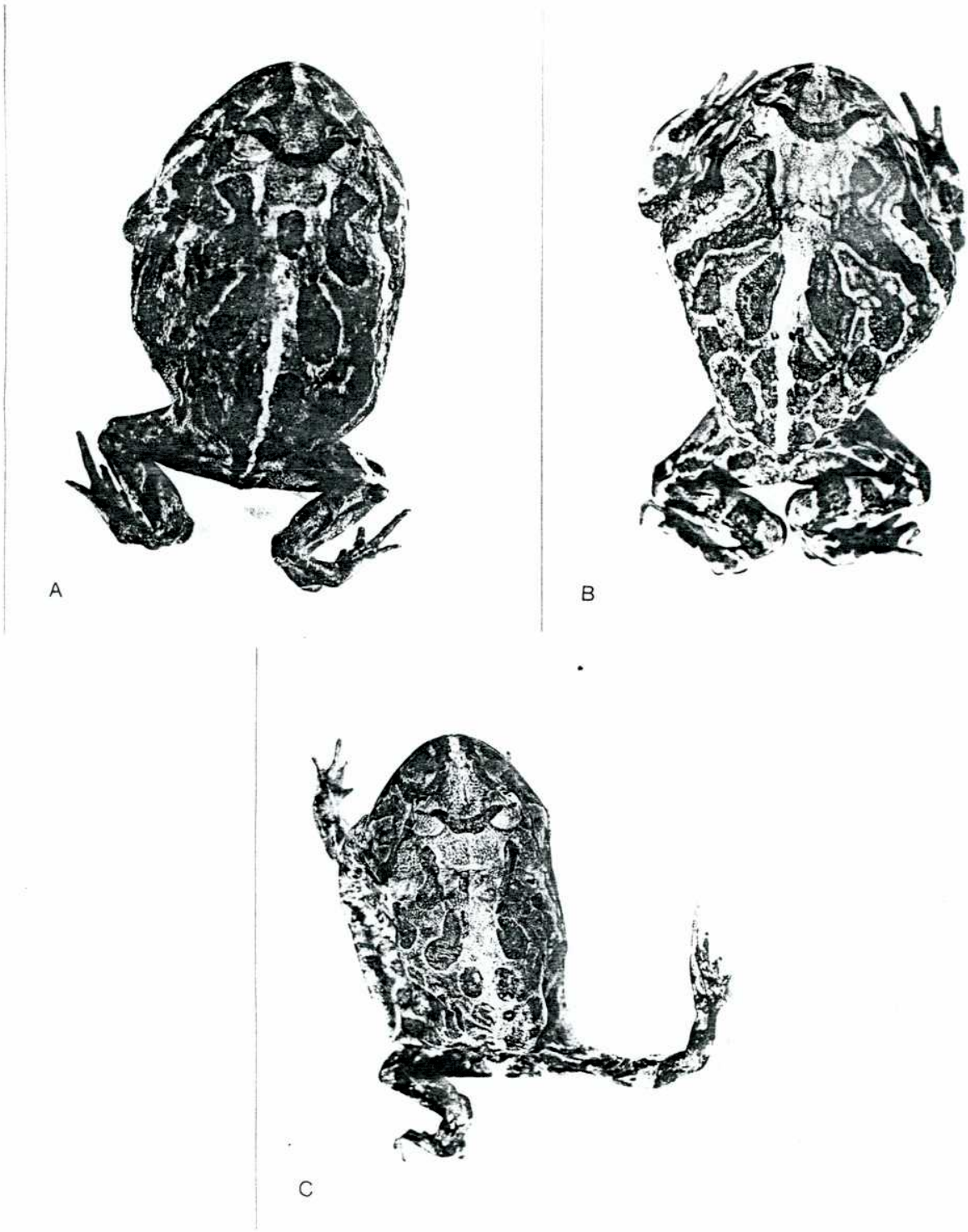



Fig. 44 - Ejemplares de Ceratophrys procedentes de Joazeiro (Brasil). A: NMW 4587. B: NMW 4582. C: NMW 4585.2. Aumento 8/10x.

C. stolzmanni, C. cranwelli, C. ornata, C. calcarata y los Ceratophrys de Joazeiro poseen tubérculo metatarsal con borde cornificado oscuro. (Fig. 42, 33 B, 32 C, 41 C y D, 44).

El escamosal en C. cornuta y en C. calcarata es alargado y relativamente angosto, siendo en las demás especies lanceolado y bastante ancho.

Existen restos de membrana interdigital en la base de los dedos del pie en C. ornata (Fig. 32 C), C. cranwelli (Fig. 33 A), C. varia (Fig. 39 y 40), C. stolzmanni y en los de Joazeiro. En C.calcarata (Fig. 41 A) los dedos del pie están 1/3 cubiertos por dicha membrana y en C. cornuta 2/3 (Fig. 34), estando lobulada en el borde libre, especialmente entre los dedos 3-4 y 4-5.

## DISCUSION

Es innegable la valiosa herramienta que constituyen las técnicas bioquímicas (en especial la electroforesis) para la taxonomía clásica o morfológica sobre todo para la identificación y/o caracterización de especies. Sin embargo en el estudio del par de especies diploide-octoploide Ceratophrys cranwelli-C. ornata tal caracterización se torna ímproba debido al particular comportamiento que la condición poliploide conferiría a esta última especie.

En el estudio de proteínas miógenas, la mayoría de los patrones electroforéticos fueron compartidos por ambas especies. La especie diploide era tan polimorfa como la octoploide.

Considerando las proteínas séricas verificamos que los 8 ge-

nomas en C. ornata eran activos para el locus de las proteínas que migran como albúmina. Este hecho es evidenciado en el efecto de dosis génica. Tanto en la especie diploide como en la octoploide se presentaron 1 ó 2 bandas simultáneamente, sin embargo fue posible detectar 4 distintas posiciones para C. ornata a diferencia de C. cranwelli que presentó 3. Como ya dijéramos en la sección de resultados, existe una variación clinal en la frecuencia de las bandas 1 y 3 especialmente, aumentando una en sentido inverso al que aumenta la otra, siendo la 3 (de mayor velocidad de migración) la de mayor frecuencia en las poblaciones más australes.

Si tenemos en cuenta las pre-albúminas, éstas se presentan únicamente en C. ornata, con la excepción de algunos C. cranwelli pertenecientes a las poblaciones de la zona de transición de ambas especies (Corral de Bustos, Rosales y Rufino). Es importante destacar este hecho dado que dichos individuos poseen caracteres morfognósticos similares a los de C. ornata.

Si bien comprobamos que C. ornata y C. cranwelli comparten la mayoría de los patrones electroforéticos de isoenzimas (LDH, MDH-NAD dependiente, XDH, y G-6PDH), se evidencia un mayor polimorfismo en algunos órganos de la especie octoploide procedentes de una misma localidad (por ejemplo la LDH en riñón, corazón e hígado).

Nuevamente observamos que individuos diploides provenientes de la zona de transición (James Craik y Rufino) repiten esquemas electroforéticos de la especie octoploide. Este es el caso de la LDH en suero, cuyas isoenzimas migran a mayor velocidad en la especie diploide y a menor en la octoploide y diploide de la zona de

contacto. En los patrones de MDH existe gran similitud en ambas entidades, mientras que los patrones electroforéticos de XDH y G-6PDH en C. ornata se complican debido a la aparición de subbandas. Es por esta razón que ciertos patrones son encontrados únicamente en la especie octoploide. No obstante la presencia de dichas subbandas no pueden ser atribuibles a su condición poliploide; muchos patrones son similares en ambas especies. No hemos podido aún, de la serie de zimogramas analizados, hallar algún conjunto de patrones enzimáticos propios de una u otra especie.

Del recién expuesto análisis electroforético podrían ser valederas las hipótesis sostenidas por Beçak (1969) para explicar la reducción en la actividad sintética en la especie tetraploide Odontophrynus americanus. Una sería la existencia de una asincronía de los genomas en la especie poliploide que conduciría a una situación donde un genoma diploide es activo a un tiempo. Otra posibilidad sería la existencia en la especie tetraploide de doble cantidad de la normal de genes reguladores que causaría una superrepresión de los genes estructurales. Schwantes y colaboradores (1977) descartan ésta última posibilidad de inactivación de genes puesto que sus resultados sobre la 6-PGDH en híbridos triploides de Odontophrynus sugieren que los 3 genes están activos para esa enzima. Existiría por lo tanto una replicación ulterior de DNA o una asincronía en la síntesis de DNA; pero ésto no ha sido aún comprobado (Schwantes et al., 1977).

Sin embargo esta asincronía no afectaría a los mismos genomas en todas las células puesto que en la fracción que migra como

albúmina en C. ornata se revela el efecto por dosis génica, es decir estarían activos al mismo tiempo los 8 genomas.

En base a nuestras mediciones de la concentración de hemoglobina por volumen de sangre y por unidad de superficie del eritrocito (considerado como un elipsoide) surge que la hemoglobina, si bien en ambos casos está en una proporción semejante en C. ornata y en C. cranwelli, es sintetizada en forma correlativa a la dimensión de la superficie celular. En otras palabras, como la relación de superficies es de 1:2, la hemoglobina es producida en una cantidad tal que se mantiene la relación por unidad de superficie 1:1 para ambas especies. De acuerdo a los resultados del contenido de hemoglobina obtenidos por Beçak y Pueyo (1970) para Odontophrynus cultripes (2n) y O. americanus (4n) existiría en ésta última especie una reducción de la actividad del material genético puesto que la media del contenido de hemoglobina por corpúsculo es similar al de la especie diploide. Debemos advertir que estos autores no han tenido en cuenta el cálculo de la cantidad de hemoglobina por unidad de superficie, ya que la distribución de la misma es cortical, sino tan sólo por eritrocito.

Observamos que los resultados del contenido de hemoglobina por unidad de superficie son consonantes con aquéllos obtenidos en la determinación del consumo de oxígeno. Salvo desviaciones debidas a errores en la técnica, los valores son prácticamente similares en la especie octoploide y en la diploide.

Refiriéndonos ahora al análisis citométrico en ejemplares conservados hemos podido determinar el grado de ploidía de 2 especies (C. stolzmanni y C. cornuta) que aún no figuran en la bibliografía. Nos basamos para ello en la existencia de una correlación directa entre volumen nuclear y el contenido nuclear de DNA (Fankhauser, 1945). Varios autores han basado sus estudios sobre esta relación. McGregor y Uzzel (1964) caracterizan hembras triploides del complejo Ambystoma jeffersonianum por el tamaño de los eritrocitos, lo cual corroboran con mediciones de DNA. Uzzel y colaboradores (1975) distinguen adultos triploides y diploides de Rana esculenta, lo cual confirman por conteo cromosómico. Günther (1977) recalca las ventajas del método para la distinción del grado de ploidía en Rana esculenta. George y Lennartz (1980) aplican este método en el género Xenopus.

En el caso de C. stolzmanni (a pesar de haber tenido a disposición sólo un ejemplar) es evidente que se trataría de un organismo diploide cuyo contenido en DNA es semejante al de C. cranwelli. C. calcarata y C. cranwelli (ambas especies diploides) mantienen con C. cornuta una relación aproximada de volúmenes nucleares de 1:1 (Tabla 14), por lo tanto C. cornuta sería también diploide. La relación calcarata:cranwelli se aproxima a 2:1, lo que significaría que el contenido nuclear de DNA es mayor en la primer especie. Olmo y Morescalchi (1978) han determinado el contenido nuclear de DNA de C. calcarata (5,5 pg.) pero bajo distintas condiciones a las aquí expuestas. Calculando el contenido nuclear de DNA para C. calcarata, teniendo en cuenta los datos de Olmo y Morescalchi (op. cit.) y -

Hemmer y colaboradores (1980), resultaría ser aproximadamente igual a 7,37 pg. Por el mismo análisis citométrico verificamos que los individuos procedentes de Joazeiro (identificados como C. dorsata (=varia) y morfológicamente similares a C. cranwelli) resultaron ser octoploides y su contenido en DNA sería similar al de C. ornata o al de C. varia.

Como puede observarse en la tabla 14, C. cornuta posee mayor contenido de DNA que C. cranwelli, pero se encontraría más próximo al de éste último que al de C. calcarata. (Fig. 13).

El hecho de que especies pertenecientes al mismo género y con igual número cromosómico posean distinto contenido nuclear de DNA lo observamos también en los géneros Odontophrynus, Stombus, Cycloramphus, Leptodactylus (Beçak et al., 1970), Bufo, Hyla, Rana (Oeldorf et al., 1978), Limnodynastes (Olmo y Morescalchi, 1978), etc.

Si nos referimos a la tabla 12 observamos una gran dispersión de valores. Schreiber et al., (1966) han constatado que las células de los diferentes tejidos somáticos tienen volúmenes que se desvían, a veces fuertemente, del valor que deberían tener en base a la ploidía. Esto significa que los núcleos se encuentran en aquella situación que Bloch define de interfase heterosintética. Esta se verifica cuando el DNA no se duplica pero trabaja produciendo RNA, y en forma subsecuente proteínas citoplasmáticas específicas de función celular. A pesar de estas variaciones es reconocida la correlación existente entre el tamaño nuclear y el contenido nuclear de DNA. La relación nucleocitoplasmática puede sufrir fluctua

ciones, pero si se hacen las mediciones en células homólogas y en estado funcional similar, ésta es usualmente uniforme (Szarski,1970).

De acuerdo a Balardi y Amaldi (Schmid, 1978) las diferencias en el contenido de DNA entre genomas de anfibios no sería sólo atribuíble a las secuencias altamente repetitivas sino también a la diferente cantidad de secuencias repetitivas intercalares (y que no son detectables por técnicas de bandeo).

En los cariotipos de C. ornata y C. cranwelli encontramos una distribución coincidente de heterocromatina constitutiva, lo cual nos haría pensar que durante la especiación no se produjeron rearreglos del genoma, dando asimismo una idea del lapso en que pudo haberse producido. El número de bandas C es ligeramente mayor en C. ornata que en C. cranwelli. Nosotros podríamos suponer que si la replicación tardía del DNA es llevada a cabo por la heterocromatina constitutiva, en las formas poliploides habría un mayor número de bandas C y explicaría la similitud de los esquemas electroforéticos con su contraparte diploide. A pesar de no encontrar un número tan alto de regiones heterocromáticas en la especie poliploide para afirmar esto último, existirían regiones heterocromáticas (con secuencias no tan altamente repetitivas) que no son reveladas por las técnicas de bandeo y se trataría de secuencias intercalares que estarían presentes en diferentes cantidades de acuerdo a los resultados obtenidos por Balardi y Amaldi (op. cit.) sobre cinética de reasociación del DNA.

* * * *

El estudio del contenido nuclear de DNA en C. ornata y en C. crawelli arroja como resultados 27,2 pg. para la primer especie

y 6,8 pg. para la segunda. Estos valores son significativos ya que son cifras muy elevadas y relativamente bajas respectivamente. De la literatura podemos constatar que los valores más elevados los poseen: Bombina variegata (21,1 pg.) (Olmo y Morescalchi, 1978), Bombina orientalis (20,4), Hyla versicolor (20,7) (Oeldorf et al., 1978), Rana catesbeiana (18,0) (Bachmann y Blommers-Schlösser, 1975). Los más bajos son encontrados en: Scaphiopus bombifrons (2,8), - S. hammondi (3,1), S. couchi (3,6) (Bachmann, (1972)), Aglyptodactylus madascariensis (6,1), Pyxicephalus labrosa (6,5), Ptychadena mascareniensis (6,7), Boophis tephracomystax (7,0) (Bachmann et al., 1975). De acuerdo a los trabajos de Stebbins (1966), Goin et al. (1968), Bachmann (1972), Oeldorf et al. (1978) existe una correlación entre el contenido de DNA, la velocidad o tasa de metabolismo basal (y por ende de desarrollo embrionario) y la preferencia ecológica, tanto en plantas, como lo señala el primer autor, como en anfibios. Aquellos individuos cuyo desarrollo embrionario es lento, poseen en general un elevado contenido de DNA y sería adaptativo en ambientes húmedos y de baja temperatura, con cuerpos de agua permanentes; en cambio los que poseen un reducido contenido de DNA su desarrollo es más acelerado y estarían restringidos a ambientes cálidos, con cuerpos de agua temporarios. Esto no sería absoluto puesto que aquellos anfibios con menor contenido podrían desarrollar más o menos rápidamente dependiendo de las fuerzas selectivas (factores físicos como la temperatura principalmente, competición interespecífica, etc.). En anuros el contenido de DNA límite entre un tipo de desarrollo y otro estaría dado por 10 pg. Esta presión de selección

sobre el fenotipo fisiológico de un animal afectaría directamente el sistema genético y al ser el contenido de DNA el que influiría en la velocidad de desarrollo hasta podría hacer cambiar el tamaño del genoma si la presión de selección está dirigida hacia un desarrollo más veloz (Oeldorf et al., 1978).

En base a las conclusiones de dichos autores y volviendo a nuestras especies en estudio verificamos que esta situación también se cumple en C. ornata y en C. cranwelli, teniendo en cuenta la ecología y el contenido nuclear de DNA. No hemos podido comprobar aún la velocidad de desarrollo en ambas especies.

C. ornata, con su elevado número de cromosomas y por lo tanto alto contenido de DNA, se distribuye en zonas de cuerpos de agua permanente, con una temperatura media anual entre 14 y 18°C y precipitaciones entre 1000 y 800 mm anuales. C. cranwelli, poseedor de un bajo contenido de DNA se adapta a ambientes cálidos (entre 18 y 22°C como temperatura media anual) y, si bien en ciertas regiones la precipitación alcanza los 1300 mm anuales, ésta desciende hasta 500 mm, siendo éste uno de los factores de la formación de lagunas temporarias (además de la elevada tasa de evaporación). Es así que a través de nuestros estudios y relacionándolo con lo acontecido en anfibios anuros diploides (cuyo contenido nuclear de DNA ha sido determinado), encontramos una posible explicación de la ocurrencia de poblaciones de especies crípticas diploide-poliploide de hábitos terrestres. La misma estaría basada en la correlación existente entre condiciones ecológicas y contenido nuclear de DNA. Daremos a continuación una breve reseña de esta correspondencia refiriéndonos al

género Ceratophrys en particular y a otras poblaciones poliploides bisexuales de hábitos terrestres en particular:
C. stolzmanni, especie diploide como lo constatamos por mediciones citométricas, vive en una de las regiones más secas del mundo y posee un volumen nuclear aproximado al de C. cranwelli. C. calcarata, especie diploide, se distribuye en una región semiárida. Otra especie diploide, C. cornuta, ocupa áreas que, si bien las correspondientes precipitaciones medias anuales son relativamente abundantes, se distinguen por tener un régimen de estación húmeda y seca. Por lo tanto su época de reproducción estaría restringida, al igual que en las 3 especies recién nombradas, a los meses húmedos. Bajo estas condiciones estarían forzados a desarrollar más rápidamente.
C. varia (octoploide) se distribuye en la región costera del Brasil donde las precipitaciones son uniformes durante todo el año y no se producen estaciones secas (como sucede en las zonas de distribución de C. ornata). Finalmente es de hacer notar la presencia de Ceratophrys de la región de Joazeiro que se caracteriza por poseer un clima semidesértico, lo cual contradiría lo anteriormente argüido. Análogamente se ha encontrado en plantas algunos casos en los que tampoco se verifica dicha relación. Stebbins (1966) reporta la existencia de ciertos pastos, leguminosas y liliáceas de clima templado, de alto contenido de DNA y que no estarían directamente adaptados a bajas temperaturas. Otros grupos estrictamente tropicales (Rhoeo: Commelinaceae, miembros de la familia del muérdago Loranthaceae y miembros de las Proteaceae) tienen relativamente gran número de cromosomas y probablemente un alto contenido de DNA.

Hasta el presente no se ha podido esclarecer la razón de estas excepciones. Deberían estudiarse las presiones selectivas que expliquen el significado adaptativo de dichos casos.

En los géneros Odontophrynus y Pleurodema no se produjo una diferencia tan abrupta en el número de cromosomas entre la especie diploide y la poliploide como en Ceratophrys. En estos géneros también verificamos la relación entre tamaño del genoma (por ende contenido de DNA) y condiciones ecológicas (que ya hemos descripto). Bufo viridis y B. oblongus, teniendo en cuenta las regiones que habitan (B. viridis 4n y B. oblongus 3n y 4n habita en zonas montañosas húmedas, B. viridis 2n en estepas y desiertos de Asia Central), obedecen dicha correlación. En Bufo sp. (kerinyagae) y Tomopterna delalandii, si bien faltaría aún un estudio más detallado, todo indicaría que responden a lo ya expuesto. Como hemos hecho resaltar anteriormente, C. cranwelli tiene un contenido nuclear diploide de DNA (6,8 pg.) muy bajo, casi la mitad del que poseen otras especies de anuros diploides. Si nos referimos a los pares de especies diploide-poliploide que se distribuyen en la misma área (o próximo a ella) que C. cranwelli o C. ornata, vemos que las formas diploides poseen valores cercanos a C. cranwelli, o sea 6,8 pg. para Pleurodema bibronii (Olmo y Morescalchi, 1978) y 6,5 pg. para Odontophrynus occidentalis (Beçak et al., 1970). Estos valores fueron calculados teniendo como referencia el valor de C. calcarata (ya que ésta figura en ambos trabajos), que fue recalculado por nosotros para hacerlo comparable al método aquí utilizado (como ya lo hemos visto).

De lo recién expuesto, la ausencia de la forma tetraploide

en Ceratophrys es una incógnita puesto que en las entidades recién nombradas está comprobada la existencia de formas tetraploides y que conviven en la misma región que C. ornata. Las mismas poseen alrededor de 14 pg. de DNA (O. americanus 13,95 pg. de acuerdo a nuestros cálculos a partir de los datos de Beçak y colaboradores (1970)).

Bufo viridis diploide (de Asia Central), a pesar de habitar en regiones áridas, posee un contenido nuclear de DNA igual a 13,3 pg. (Bachmann et al., 1978). Si hubiésemos considerado tan sólo a B. viridis en esta exposición, podríamos pensar que C. cranwelli debió cuadruplicar su contenido diploide de DNA para alcanzar el valor de la forma tetraploide que se encuentra también en ambientes húmedos, explicando en cierto modo la existencia de organismos octoploides en Ceratophrys. Lamentablemente el panorama no es tan simple, debiendo esperar los resultados de futuras investigaciones.

Debemos hacer aquí una aclaración referente a Pleurodema bibroni. Esta entidad está considerada en el trabajo de Olmo y Morecalchi (1978) como diploide, por lo cual deducimos que se trataría de otro taxión. Barrio y Rinaldi de Chieri (1970) demuestran que P. bibroni (al igual que P. kriegi) es tetraploide. P. bibroni (procedente de Uruguay) ha suscitado numerosos problemas de carácter taxionómico (Barrio, 1977) confundiéndola, entre otras, con la especie chilena P. thaul.

* * * *

Commoner (Goin et al., 1968) sugiere que la formación de RNA no es la única función del DNA nuclear sino que el contenido de DNA es de por sí un importante carácter especie-específico que está inversamente correlacionado con el metabolismo básico. Otros autores

también confirman esa tesis. Es curioso sin embargo observar que de acuerdo a nuestros datos de consumo de oxígeno en organismos adultos de C. ornata y de C. cranwelli no se registran diferencias notables como podría haberse pensado de la gran diferencia en el contenido nuclear de DNA. Por lo tanto el mayor contenido de DNA no reportaría ninguna ventaja adaptativa en el individuo adulto. De modo similar, teniendo presente el comportamiento electroforético de algunas de sus proteínas, no se evidencian diferencias apreciables. (Nos parece oportuno mencionar lo demostrado por Avise, Kornfield y Koehn en peces, (Larson y Higton, 1978), los cuales no muestran divergencias electroforéticas a pesar de haberse producido divergencias morfológicas. Nixon y Taylor (Larson y Highton, 1978) obtuvieron evidencias que muestran que organismos evolutivamente conservativos (como los urodelos) pueden divergir genéticamente sin diferenciación morfológica.

Por lo tanto esa correlación (contenido de DNA/tasa metabólica) debería restringirse al embrión. Posiblemente las ventajas adaptativas del incremento en el tamaño del genoma beneficiaría al organismo en sus primeros estadíos. Se supone que sería más bien el metabolismo de ácidos nucleicos del oocito en desarrollo el responsable de la tasa de desarrollo embrionario (Oeldorf et al., 1978). (Es probable que exista una relación directa entre el consumo de $O_2$ y la síntesis de DNA (Brachet, 1974)).

Queremos, después de lo expuesto, restringir las aseveraciones que se encuentran en muchos trabajos respecto a las mayores ventajas que los anuros poliploides poseen frente a los organismos di-

ploides. Las ventajas asignadas serían que la poliploidía confiere a los organismos de un alto polimorfismo genético y en general, como consecuencia, un mayor rango ecológico y geográfico (Beçak et al., 1970; Bogart y Wasserman, 1972). Los genes duplicados proporcionarían la materia prima para nuevas mutaciones proveyendo así mayor plasticidad y podrían explotar un mayor rango de condiciones ambientales del que le sería posible a una especie diploide. Sin embargo no observamos tal marcado aumento del polimorfismo (como se supondría de su elevado número de cromosomas) en C. ornata respecto a - C. cranwelli, por ejemplo en sus proteínas miógenas e isoenzimas. Su metabolismo (consumo de $O_2$) es semejante (en el adulto) al de la especie diploide, y por último, la distribución geográfica de ésta última es mayor que la de la especie octoploide. Además C. cranwelli soporta condiciones ambientales más adversas que C. ornata (siendo más notable por tratarse de un anfibio). Se ha comprobado que C. cranwelli pierde menos agua por evaporación de la superficie corporal que C. ornata (Canziani y Cannata, 1980).

Si nuestras suposiciones acerca del grado de ploidía de C. cornuta son correctas (por haber tenido a disposición tan sólo 2 ejemplares) vemos que también posee una muy amplia distribución geográfica. Agregamos a todo ésto el hecho que aquellos anfibios con un contenido de 10 pg. DNA tendrían virtualmente un mayor rango de la tasa de desarrollo, dependiendo de la presión selectiva qué velocidad de desarrollo posea. En cambio los de elevado contenido estarían limitados a desarrollar sólo lentamente (Oeldorf et al., 1978).

Por lo tanto no se ha podido elucidar hasta el presente el

valor adaptativo que reportaría la poliploidía a los anfibios anuros aquí tratados, tan sólo se conoce su papel en los primeros estadios de desarrollo. Se han esbozado muchas hipótesis sobre la formación de especies poliploides en anuros, pero es de común acuerdo que, en base a que están morfológicamente relacionados entre sí, se originarían de una especie diploide similar. Existe poca información concerniente a la dinámica de las poblaciones de especies de anuros poliploides bisexuales (Bogart, 1980), pero se admite que la mayoría fue recientemente descubierta y no fue analizada intensamente. La mayoría de los tetraploides y de alta ploidía son capaces a través de recombinación genética y selección de desplazar a sus ancestros diploides y aún de sufrir especiación como poliploides en una forma normal (Bogart, 1980).

* * * *

Con el objeto de establecer posibles vinculaciones entre las distintas especies de Ceratophrys queremos hacer notar, teniendo en cuenta los primeros índices que hemos transportado sobre un mapa, que es posible trazar una línea divisoria imaginaria que separaría a C. calcarata, C. cornuta y C. stolzmanni de C. ornata, C. cranwelli, C. varia y C. sp. Dicha línea separaría por un lado la cuenca del Tocantins y por el otro la cuenca del río Paraguay, Paranaiba y río San Francisco. Las primeras tres especies estarían al norte de la mencionada línea.

Snethlage dividió a Brasil, con fines ornitológicos, por una línea que pasaría por la misma zona (Lutz, 1972), al norte con la hilea y al sur los campos, los cuales son cortados por ríos y bosques. En crestas y picos se encuentran los campos altitudinales y

en el valle del río San Francisco y SE de Brasil los campos de tierras bajas. El NE de Brasil y provincia chaqueña serían zonas de transición (Lutz, 1972).

Dado que el número de especímenes analizados tanto de C. cornuta como de C. calcarata y C. stolzmanni fue muy bajo y el área distributiva es muy amplia, en especial el de la primer especie, lo que expondremos en el presente trabajo podría ser modificado por estudios posteriores. Sin embargo, considerando el primer índice (longitud total/long. de la cabeza), la diferencia es bastante importante con respecto a los de las demás especies estudiadas.

El género Ceratophrys, si bien es muy antiguo, es muy especializado. Este grado de especialización está indicado por el desarrollo de curiosas osificaciones dérmicas, su etiología (grito, agresividad, etc.) y su morfología (Cei, 1968). Estudios de campo muestran según Lutz (1972) que los anuros con escudos óseos son semicavadores, donde el dermatocráneo bien desarrollado haría de cierre del orificio de dicha cavidad. Tales adaptaciones tendrían valor de supervivencia sobre todo en ambientes áridos, además todo indicaría que ésta sería la adaptación básica de los ceratófridos, y que las adaptaciones a la vida semicavadora permitirían secundariamente el acceso a ambientes boscosos (Heyer, 1975).

Verificamos que existen ciertos caracteres comunes entre pares de especies. Primeramente mencionamos los hallados entre C. calcarata y C. cornuta, como ser la forma del escamosal, cuya rama ótica no está tan expandida en sentido lateral sino ántero-posterior, y la membrana interdigital más desarrollada. Mientras que en los

C. calcarata de 7 cm de longitud no ha sido constatada la presencia de escudo dorsal óseo, en los C. cornuta de iguales dimensiones se puede verificar la presencia de 2 placas dorsales óseas a cada lado de la columna vertebral. Se observa también que el patrón de manchas de la cabeza es semejante.

C. stolzmanni tiene en común con C. calcarata la presencia de tubérculo metatarsal cornificado y ausencia de escudo dorsal óseo, por lo menos en individuos de dimensiones equiparables. A pesar que a C. stolzmanni lo ubicamos también como perteneciente al grupo del lado norte de la línea divisoria, muestra mayor semejanza de caracteres morfognósticos con C. ornata y C. cranwelli (y por ende con Ceratophrys sp.). Steindachner (1882) encuentra también gran similitud morfológica con C. ornata (recordamos que hasta aquel momento se conocían C. cornuta, C. ornata y C. varia). Los caracteres considerados por nosotros son: escamosal con rama ótica fuertemente expandida en sentido lateral, además de ántero-posterior, formando como una placa lanciforme; vestigios de membrana interdigital en los miembros posteriores; tubérculo metatarsal cornificado; apéndice palpebral triangular no desarrollado que se asemejaría más al de C. ornata.

Circunscribiéndonos ahora a C. cranwelli verificamos que las poblaciones del centro y norte de Argentina, sur de Bolivia y Paraguay y la del NE de Brasil (Joazeiro), son poseedoras de caracteres morfognósticos similares(entre otros, las manchas claras dorsales en forma de tridente). Desde el punto de vista morfométrico comprobamos la existencia de un clin, en especial de los índices long.

total/long. cabeza y long. cabeza/ancho cabeza que aumentan hacia el sur, y éste último índice sobre distancia naso-orbital que disminuye hacia el sur. Queremos hacer destacar la notable cercanía de los valores de los índices de las poblaciones del norte de la Argentina, sur de Bolivia y Paraguay con la población de Joazeiro.

En las poblaciones de C. ornata del norte y sur de la provincia de Buenos Aires comprobamos asimismo un clin de los caracteres morfométricos. No podemos asegurar la existencia de un clin con la población de Río de Janeiro debido a que fueron analizados sólo individuos juveniles y no adultos como en el caso anterior. Queremos destacar aquí la gran similitud en cuanto a la morfología de C. ornata y C. cranwelli. Si bien la segunda especie posee un apéndice palpebral levemente más desarrollado, sus colores (en vivo) más apagados y posee manchas claras dorsales en forma de tridente, estas características desaparecen en la zona de contacto con C. ornata. Hasta el presente no se han descubierto híbridos naturales. Por análisis del cariotipo de individuos de esa zona de transición se ha verificado que son diploides. No se han presentado casos de convergencia morfológica hacia C. cranwelli en individuos octoploides. Después de varios años de intentos en la obtención de híbridos artificiales entre C. ornata y C. cranwelli hemos logrado la supervivencia de sólo 4, los cuales han alcanzado la edad de más de 2 años. Fueron obtenidos de la cruza de C. ornata hembras y C. cranwelli machos (se utilizaron varios individuos de cada sexo para cada cruzamiento). El cruzamiento inverso nunca fue positivo, ni siquiera para la obtención de renacuajos. Los principales problemas que presen

taron los híbridos del primer tipo de cruzamiento fueron la regulación hídrica tanto en renacuajos como en los ya metamorfoseados, - gran susceptibilidad por micosis, diversas teratologías como microcefalia en renacuajos, deformaciones craneales, de las extremidades en los ya metamorfoseados, contando algunos de ellos con 2 pares de miembros posteriores, sin pigmentación ni verrugosidades en algunos sectores de la piel. En los 4 híbridos obtenidos se aprecia que la coloración se aproxima más a la de C. ornata, el diseño de las manchas del rostro era el de una u otra especie. Estos no son normales totalmente, sino que presentan deformaciones, pigmentación del rostro anormal y detención del crecimiento. (71,63,53 y 43 mm). No se ha determinado el contenido nuclear de DNA ni registrado el cariotipo de los mismos.

Entre las poblaciones de C. varia, a pesar de tener una extensa distribución a lo largo de la costa atlántica, desde Bahía - hasta Río Grande, no pudo comprobarse variación clinal de sus caracteres morfométricos. Si bien hemos constatado la simpatría entre - C. varia (1 ejemplar NMW 4589) y C. sp. de Joazeiro, no existe ningún indicio (morfométrico ni morfognóstico) de hibridación.

Existe un hecho particular referido al desarrollo del escudo dorsal de origen dérmico. Mientras algunos ejemplares de C. ornata de 40 a 50 mm de longitud no poseían escudo dorsal, otros individuos de iguales dimensiones eran portadores de 2 pequeñas placas a cada lado de la columna vertebral. Lo mismo se repite en especímenes de 65 mm que poseen 2 placas laterales y otros de igual longitud cuyo escudo óseo ya está completamente formado. Un ejemplar

procedente de Joazeiro de 50 mm no poseía escudo, pero sí algunos de 70 mm (en otros no estaba perfectamente formado) y todos los de mayores dimensiones. Ningún ejemplar de C. stolzmanni estudiado por Peters (1967) cuyas longitudes oscilaban entre 30 y 61 mm tenían escudo dorsal. Cabe preguntarnos si individuos de mayores dimensiones lo poseerían. Ningún C. calcarata entre 50 y 70 mm de longitud mostraba la existencia de escudo. Los 2 C. cornuta estudiados, de aproximadamente 70 mm de longitud, poseían 2 pequeñas placas laterales. Por lo tanto corregimos el concepto de que C. cornuta no posee escudo óseo dorsal. También, en estas dos últimas entidades, nos preguntamos lo mismo que en el caso de C. stolzmanni. En C.varia observamos un escudo óseo dorsal bien desarrollado cuya relación longitud/ancho aumentaba en forma independiente al incremento de la longitud del cuerpo, a diferencia de C. ornata y C. cranwelli en los que hallamos una correlación positiva entre dichos parámetros. Es de hacer notar que el escudo de C. varia es una estructura mucho más sólida que el de las dos últimas especies. Por lo tanto existiría una sucesión en la aparición de este carácter en el animal adulto, la cual es más temprana en C. varia, C. ornata y C. cranwelli siguiéndoles C. sp. En un segundo grupo, de aparición más tardía, estarían C. cornuta, C. stolzmanni y C. calcarata en último término.

Considerando los caracteres morfológicos analizados en el presente trabajo como caracteres simplesiomorfos y sinapomorfos, de acuerdo a los criterios de Lynch (1971) y Heyer (1975), podemos hacer un intento de ordenar a las entidades aquí tratadas según el grado decreciente de primitivez. No hemos tenido en cuenta caracte-

res osteológicos, miológicos, etológicos ni embrionales, sino los de su morfología externa y cromosómicos. Son considerados primitivos: posesión de tubérculo metatarsal interno normal sin cornificación, membrana interdigital del pie presente, ausencia de escudo óseo dorsal (Lutz, 1972), y número de cromosomas igual a 26. Consideramos que la posesión de tímpano visible (carácter primitivo que es poco evidente en las especies cavadoras) juega aquí un papel poco significativo, ya que, si bien se corresponde con la ausencia de tubérculo metatarsal cornificado, presencia de membrana interdigital y escudo dorsal poco desarrollado en C. cornuta, no encontramos tal relación en C. varia ni en C. stolzmanni. Por esta razón no lo hemos tratado.

Si ordenamos a las especies según el grado de primitivez creciente (de acuerdo a los caracteres mencionados) y a esta ordenación le adicionamos aquella que corresponde a la aparición del escudo dorsal, obtenemos la siguiente serie: C. ornata, C. sp., C. varia, C. cranwelli, C. stolzmanni, C. calcarata y C. cornuta. Nos aventuramos diciendo que esta serie reflejaría, en orden creciente, un mayor avance evolutivo y, basándonos en la sinapomorfía, C. ornata, C. sp. y C. cranwelli conformarían un grupo monofilético, en el cual la inclusión de C. varia es cuestionable. Tal incertidumbre es debida a que esta entidad es poseedora de ciertos caracteres considerados primitivos que pudo haberlos mantenido en su adaptación secundaria a ambientes boscosos. Suponemos que C. stolzmanni presenta convergencia de algunos caracteres con el grupo monofilético. Observamos que el carácter apomorfo más sobresaliente lo constituye la

posesión de escudo dorsal óseo. En el gráfico 45 esquematizamos las posibles relaciones filogenéticas de parentesco.

Constatamos que las entidades ubicadas al norte de la línea divisoria imaginaria son las que reúnen mayor número de caracteres morfológicos primitivos y que los habrían retenido después de su diversificación de la especie ancestral.

Es probable que la presente distribución del género deba ser ampliada y/o modificada teniendo en cuenta que en muchas regiones de Sudamérica no se han hecho relevamientos de la fauna batracológica. En el mapa de distribución geográfica hemos trazado tentativamente límites de acuerdo a la bibliografía consultada y revisión de material museológico. En base a los actuales datos coincidimos en parte con el mapa de distribución de Ceratophryinae de Lynch - (1971), el cual le adjudica la cuenca del Amazonas, Madeira, costa oriental del Brasil, Chaco y cuenca del Río de la Plata. Consideramos en cambio incorrecta la distribución presentada por Savage (1973); sin embargo este autor traza un puente entre la región amazónica y la chaqueña (el cual nosotros también encontramos, pero desplazado hacia el sudoeste) que no aparece en el trabajo de Lynch.

Debemos recalcar lo anteriormente mencionado sobre modificar el área de distribución de algunas especies. Esto surge del estudio de ejemplares de distintos museos, los cuales han sido identificados como pertenecientes a una especie, pero por sus caracteres tanto morfognósticos como morfométricos y citométricos, no cabe ninguna duda que han sido mal ubicados dentro de esa entidad, lo cual - trae aparejado errores en la determinación de los respectivos ran-

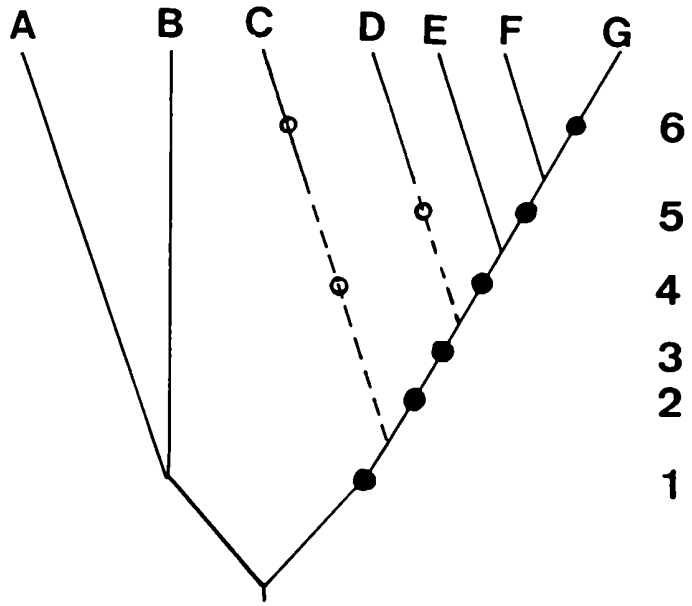



Fig. 45 - Esquema de las vinculaciones filogenéticas de parentesco entre las especies del género Ceratophrys.

Círculos negros (1-6): caracteres apomorfos. Los caracteres plesiomorfos no están indicados. Se considera incierta la ubicación de C. stolzmanni y C. varia en el esquema.

A-C. cornuta

B-C. calcarata

C-C. stolzmanni

D-C. varia

E-C. cranwelli

F-C. sp.

G-C. ornata

1-Ausencia de membrana interdigital desarrollada.

2-Presencia de escudo dorsal óseo.

3-Aparición temprana del escudo.

4-Tubérculo metatarsal interno cornificado.

5-Número de cromosomas mayor de 26.

6-Apéndice palpebral no pronunciado.

gos geográficos. Podemos citar por ejemplo el caso de C. varia -(=dorsata) que es citada para Salta (Rep. Argentina) por Freiberg (Cei, 1956), pero a través del estudio de sus eritrocitos y caracteres morfológicos de dicho material, refutamos tal afirmación, -identificándola como C. cranwelli. Encontramos en la misma fuente bibliográfica que C. varia ocupa la región de Mato Grosso. Lamentablemente por falta de material disponible no pudimos aseverar o negar dicho dato. Del mapa de distribución geográfica del género podríamos suponer que se trataría más bien de C. cranwelli (u otra especie cercana) que de C. varia. Otros casos de mala identificación los observamos en la tabla 12. Hay.una cita para C. cornuta (MNH,SI) en Buena Vista (Bolivia) que es muy interesante ya que está muy cerca de Parapati (300 km), donde es citada C. cranwelli -(considerado C. ornata). Estas especies no han sido tampoco constatadas en el presente trabajo. Del trecho comprendido entre Buena Vista (C. cornuta) y Llullapichis (C. cornuta) (1600 km) tampoco -tenemos ningún dato. Hasta el momento no existe información de la región comprendida entre la zona de distribución de C. cranwelli y C. sp., es decir entre Serra de Maracaju, Meseta de Mato Grosso,Serra das Divisões, Serra Geral de Goiás y valle del río São Francisco.

Creemos interesante mencionar que las distintas entidades se distribuyen en regiones cuya altitud sobre el nivel del mar no sobrepasa los 500 m. Buena Vista (C. cornuta) a 481 msnm y Frías (C. cranwelli) a 323 msnm serían las localidades más altas.

* * * *

Savage (1973) sostiene que el stock leptodactílico básico se

diferenció durante el Cretáceo en las áreas templadas, penetrando y expandiéndose posteriormente en la América del Sur subtropical y tropical. Un evento muy importante en la diversificación de los mismos fue el cambio climático (aparición de climas xéricos) y de las zonas de vegetación durante el Paleoceno.

Se tiene cierta información de una forma de Ceratophrys en el Plioceno Superior de Argentina que es apenas separable de C. ornata. Wawelia gerholdi del Mioceno tardío ha sido referida a la familia Ceratophryidae, pero el material es muy incompleto para servir de evidencia de la historia de esta familia (Reig, 1972).

Poco se sabe del origen de las especies del género Ceratophrys, sin embargo es probable, según la opinión de Haffer y Müller (Müller, 1972), que la mayoría de las especies se hayan originado en refugios boscosos durante el Terciario y durante el período interpluvial (o período de clima seco). Esta sería una razón de la presencia de centros de refugio, que son más bien centros de dispersión, durante las fases regresivas en el Postglacial, favoreciendo la existencia de la aislación necesaria para la especiación (Müller, 1972; van der Hammen, 1974). Tandy (1973) sostiene que la especiación dentro del grupo Bufo regularis se habría iniciado por la aislación ecológica surgida de los cambios climáticos durante el Pleistoceno (variación de la extensión de las zonas de precipitación).

Estas hipótesis se verían refutadas ante los actuales datos suministrados por la técnica de fijación de microcomplemento (MC'F) (Hemmer. comunicación personal). A través de dichos tests inmunológicos se ha podido calcular la distancia inmunológica de la albúmi-

na entre distintas especies de anfibios, encontrando asimismo una equivalencia aproximada en millones de años por cada unidad de distancia inmunológica. Estos estudios arrojan por resultado que la especiación de los anfibios pudo haberse producido recién en el Terciario y no en el Pleistoceno como consecuencia de los acontecimientos acaecidos durante el período Postglacial.

Podemos hacer una correspondencia entre la distribución geográfica de Ceratophrys y los centros de dispersión de Müller (1972 b). C. cranwelli ocuparía el centro Chaco y parte del centro Pampa; C. ornata los centros Pampa, Uruguay y Serra do Mar, C. varia los centros Uruguay y Serra do Mar, C. sp. el centro Caatinga, C. cornuta los centros del Amazonas, Madeira, Pará y Guayana, C. calcarata los centros Caríbico y Barranquilla y C. stolzmanni parte del centro - Andino-Pacífico. Estos centros estuvieron en comunicación durante el período postglacial de clima cálido, donde se produjo un intercambio faunístico, en especial entre los centros no boscosos (por ejemplo cubiertos por sabanas). Se puede mencionar una comunicación entre el norte y centro de Sudamérica (llanos venezolanos y centro de Campo Cerrado respectivamente) a través de los ríos Xingu y Tocantins. Existirían también contactos, que permitieron un intercambio genético, entre los centros no boscosos de Chaco, Campo Cerrado y Caatinga y los centros arbóreos de Serra do Mar por un lado y Madeira, Amazonas y Pará por otro durante el período anterior a la - fase de aridez postglacial. Se supone que en los primeros tres centros mencionados eran más arbóreos que en la actualidad por la existencia de bosques en galería. De acuerdo al mismo autor hay un gran

parentesco a nivel específico y subespecífico de mamíferos, reptiles y aves entre los centros de Chaco, Campo Cerrado y Caatinga. En aves sería aún más marcado el parentesco entre Chaco y Caatinga. La mayoría de los anuros del NE de Brasil son los mismos que los del Chaco o subespecíficamente distintos (Lutz, 1972).

Estos hechos soportarían nuestra opinión de la existencia de un vínculo entre C. cranwelli y C. sp. de Joazeiro. Dado que la primer especie es diploide y la segunda octoploide y no contamos con material procedente del centro de dispersión Campo Cerrado, cabría formularnos si existe en la actualidad una forma intermedia en el grado de ploidía, ya que morfognóstica y morfométricamente son similares.

Asimismo nos preguntamos por la contraparte diploide de C. varia que le pudo haber dado origen. (Nos formulamos si no pudo originarse directamente a partir de otra forma con un nivel de ploidía superior al diploide, inclusive octoploide en el caso de no encontrarse ninguna evidencia de la forma diploide). Existen zonas de contacto de C. varia con C. sp. y con C. ornata, pero ambas son muy distintas morfológicamente y no se han encontrado indicios de hibridación. Debemos aclarar que las investigaciones a este respecto son muy escasas.

Con respecto a C. stolzmanni su presencia sobre la costa pacífica pudo haberse producido antes del levantamiento de los Andes de acuerdo a Heyer (1975). Basándonos en su morfología es más probable que haya evolucionado a partir de C. cranwelli a pesar que sus índices se acercan más a C. calcarata, pero ésto es a su vez poco

verosímil como lo demuestran los límites de distribución de C. cranwelli. Como dijimos anteriormente ésto es susceptible a futuras modificaciones. Sería también factible que hubiesen desaparecido las poblaciones de C. cranwelli que mantuvieron el contacto y que el área hubiese sido ocupada posteriormente por C. cornuta (en el caso que los C. cornuta de dicha región fuesen tales).

Heyer sostiene que el centro de radiación primaria de los ceratófridos está en el Chaco y habría un centro de radiación secundaria en el SE de Brasil, desde allí se enlazaría con la región del Amazonas y costa oeste. Debemos aclarar que los centros de radiación según el criterio de Heyer fueron establecidos tomando como unidad del análisis al género, mientras que Müller utilizó la especie y subespecie. No compartimos totalmente la opinión de Heyer debido a que considera incluídos dentro de los "ceratofrinos", además de los géneros Ceratophrys y Lepidobatrachus, a Macrogenioglottus, Odontophrynus y Proceratophrys. Estos tres últimos géneros forman un grupo aparte dentro de la familia Leptodactylidae y no de Ceratophrynidae (Barrio, 1963; Reig y Cei, 1963; Reig, 1972 y Laurent, 1979). Es muy probable que el centro de radiación primaria fuese el Chaco, pero no existiría un centro de radiación secundario en el SE del Brasil para el género Ceratophrys, sino que del Chaco irradiarían a los demás centros.

* * * *

Para concluir queremos recalcar el nuevo caso de octoploidía descubierto a través del estudio de volúmenes nucleares en animales conservados. Dichos ejemplares (NMW 4582, 4585:1, 4585:2, 4587, 4588, 4591 y 4592) procedentes de Joazeiro (NE de Brasil), identificados

como C. dorsata, poseen caracteres morfognósticos y morfométricos semejantes a C. cranwelli (en especial con los del norte de la Argentina (Salta y Formosa), Bolivia y Paraguay).

Es curioso el hecho que esta población habita en una zona cuyo clima presenta una estación seca, lo cual, como se ha discutido anteriormente, sería particular de los individuos diploides. En esta misma región hemos verificado la ocurrencia de C. varia (=dorsata) (NMW 4589). Ni este ejemplar ni los demás arriba mencionados mostraban, desde el punto de vista de su morfología y medidas, indicios de hibridación. Esto nos lleva a considerar a dichos individuos como una nueva especie que, decididamente no son C. varia (por su morfología) ni C. cranwelli (por su nivel de ploidía). Queremos proponer aquí el nombre Ceratophrys joazeirensis a dichos especímenes. No habiendo tenido a disposición material vivo para un mejor estudio de su anatomía, comportamiento electroforético de proteínas, etc. hacemos esta designación previa.

Ceratophrys joazeirensis sp. n.

Holotypus: NMW 4582, adulto, proveniente de Joazeiro (Estado de Bahía) NE de Brasil. (Fig. 44 B).

Paratypen: NMW 4585:1, juvenil Joazeiro; NMW 4585:2, adulto, Joazeiro; NMW 4587, adulto, Joazeiro; NMW 4588, adulto, Joazeiro; NMW 4591, adulto, Joazeiro; NMW 4592, adulto, Joazeiro.

Todos los ejemplares han sido identificados como C. dorsata Wied, recolectados por la Bras. Exp. 1904-12.

Locus typicus: Joazeiro, Estado de Bahía, Brasil.

Distribución: Conocido únicamente de la localidad tipo.

Descripción: Cabeza grande, más ancha que larga, el ancho está contenido una vez y media en el largo del cuerpo. Cabeza con exostosis, escamosal ancho, de aspecto lanceolado. Tímpano poco visible. Distancia nasoorbital menor que la interorbital. Apéndice palpebral en forma de cresta triangular moderadamente pronunciada. Dedos de la mano cortos y libres, con punta redondeada, no ensanchada. Primer dedo más largo que el segundo. Dedos del pie cortos, de punta redondeada, con rudimentos de membrana interdigital en la base. Tubérculo metatarsal interno en forma de pala con borde cornificado oscuro. Piel del dorso rugosa con algunos pequeños tubérculos puntiagudos distribuídos en forma irregular, especialmente sobre las manchas oscuras. Presenta un escudo óseo dorsal desarrollado.

La cabeza presenta 2 bandas oscuras (oliváceo oscuro en alcohol) que salen del borde inferior de los ojos y llegan hasta el borde del maxilar superior, pasando por las narinas. Otras 2 bandas oscuras que salen del borde inferior externo de los ojos y se dirigen hacia el maxilar superior están angostadas en su tercio inferior

por 2 proyecciones de forma triangular emitidas por las zonas claras que rodean dicha banda oscura. Estas proyecciones apenas llegan a tocarse. Presenta una banda interorbital oscura que llega hasta la punta de los apéndices palpebrales. A partir de dicha banda sale otra clara y gruesa en dirección céfalo-caudal que se va estrechando en sentido caudal.

Detrás de las órbitas nace una franja clara que se dirige en sentido látero-posterior. El conjunto de estas tres bandas semeja un tridente. En el dorso existen manchas oscuras dispuestas casi simétricamente a la banda central del tridente. Dichas manchas están bordeadas de claro. Las rodillas y talones de los miembros posteriores presentan manchas oscuras. En la tibia se observan 3 bandas oscuras transversales (2 en los paratipos). Existen 2 manchas oscuras dorsales sobre el lado externo del antebrazo.

Medidas: Están dadas en la tabla 21 junto a las de los paratipos.

Diagnosis: C. joazeirensis es morfognóstico y morfométricamente muy similar a C. cranwelli Barrio, en especial con las poblaciones de Bolivia, Paraguay y norte de la Argentina. Morfognósticamente tienen en común la presencia del tridente -

| | Holo | Paratipos | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | NMW 4582 | NMW 4588 | NMW 4591 | NMW 4592 | NMW 4587 | NMW 4585:1 | NMW 4585:2 |
| Largo total | 86,9 | 68,6 | 82,5 | 83,9 | 82,4 | 49,6 | 70,0 |
| Largo de la tibia | 31,5 | 24,6 | 28,6 | 29,0 | 27,2 | 10,3 | 24,8 |
| Largo del pie | 49,5 | 37,8 | 41,8 | 44,2 | 33,6 | 26,0 | 37,0 |
| Largo de la cabeza | 30,0 | 25,7 | 29,8 | 37,0 | 34,0 | 18,5 | 26,2 |
| Ancho de la cabeza | 53,2 | 44,2 | 50,4 | 50,9 | 50,7 | 31,2 | 41,0 |
| Dist.interorbital | 10,2 | 8,7 | 10,0 | 9,0 | 8,4 | 5,5 | 8,6 |
| Dist.internasal | 9,3 | 6,9 | 8,1 | 7,5 | 6,7 | 4,9 | 7,0 |
| Dist.nasoorbital | 8,5 | 6,6 | 8,0 | 7,1 | 7,1 | 5,3 | 6,6 |

Tabla 21 - Medidas del holotipo y de los paratipos de *C. joazeirensis* sp. n. (expresadas en mm.).

dorsal, cresta de los párpados algo pronunciada y de forma triangular y el patrón de manchas de la cabeza. El escudo dorsal óseo poseería - (en ambas especies) el mismo grado de desarrollo. En un individuo juvenil de C. joazeirensis no se presentaba. La única diferencia encontrada con C. cranwelli es su nivel de ploidía, C. cranwelli con 2n=2X=26, mientras que, a través del estudio citométrico, C. joazeirensis resultaría tener 2n=8X, guardando con dicha entidad una relación de volúmenes nucleares igual a - 3,78:1.

No comparte ningún carácter con C. varia (=dorsata), nombre bajo el cual ha sido identificado, excepto por su nivel de ploidía.

AGRADECIMIENTOS

Estoy profundamente agradecida al Prof. Dr. H. Hemmer por sus sugerencias vertidas para el desarrollo del presente trabajo y la revisión crítica del mismo. Además quiero expresar mi reconocimiento por su infinita paciencia y el estímulo brindado.

Al Prof. Dr. K. Bachmann bajo cuya dirección fue posible el desarrollo de la técnica de determinación del contenido nuclear de DNA (Universidad de Heidelberg: Biologie für Mediziner).

A todas las personas que de algún modo u otro contribuyeron a la realización del presente estudio: Dra. Fernández, por la técnica de coloración de la LDH; Dr. Frank, por sus sugerencias en la técnica de determinación de oxígeno; Prof. Dr. W. Hödl, Prof. Dr. J. M. Savage, Dr. W. R. Heyer y Dr. J. T. Collins por los datos referentes a la distribución del género; Dr. Schleiermacher y Dr. Beck por la ayuda brindada en el cultivo de leucocitos, como así también al Dr. Ebendal; Dr. Schmid por la técnica de bandeo C.

A los museos: Naturhistorisches Museum Wien, Senckenberg Museum Frankfurt, Zoologische Staatssammlung München y Museum Ludwigsburg-Stuttgart por la provisión de ejemplares.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y al Deutscher Akademischer Austauschdienst que han subvencionado en parte el presente trabajo.

Finalmente deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Avelino Barrio con quien me inicié en la investigación científica y bajo cuya dirección me dediqué al estudio de la quimiosistemática de anfibios anuros.

BIBLIOGRAFIA

Andersson, L.G. 1945. Batrachians from east Ecuador. Arkiv för Zoologi 37 A (2): 22-24.

Bachmann, K. 1972. (1974). Nuclear DNA and developmental rate in frogs. Quart. Jour. Florida Acad. Sci. 35 (4): 225-231.

Bachmann, K., Konrad, A., Oeldorf, E. and Hemmer, H. 1978. Genome size in the green toad (Bufo viridis) group. Experientia 34: 331-332.

Bachmann, K., Blommers-Schlösser, R. 1975. Nuclear DNA amounts of the frogs of Madagascar. Zool. Anz., Jena 194 (1/2): 13-21.

Balinsky, B.I. 1969. The reproductive ecology of amphibians of the Transvaal Highland. Zoologica Afr. 4 (1): 37-93.

Barrio, A. 1963. Consideraciones sobre comportamiento y "grito agresivo" propio de algunas especies de Ceratophrynidae (Anura). Physis XXIV (67): 143-148.

1964. Caracteres etoecológicos diferenciales entre Odontophrynus americanus (Duméril et Bibron) y O. occidentalis (Berg) (Anura, Leptodactylidae). Physis XXIV (68): 385-390.

1964. Especies crípticas del género Pleurodema que conviven en una misma área, identificadas por el canto nupcial (Anura, Leptodactylidae). Physis XXIV (68): 471-489.

1976. Estudio cariotípico y análisis audioespectográfico de los cantos de las especies de Phyllomedusa (Anura, -

Hylidae) que habitan en la Argentina. Physis 35 (90): 65-74.

1977. Aportes para la elucidación del "status" taxonómico de Pleurodema bibroni Tachudi y Pleurodema kriegi. (Müller) (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). Physis 37 (93): 311-331.

1980. Una nueva especie de Ceratophrys (Anura, Ceratophrydae) del Dominio Chaqueño. Physis 39 (96): 21-30.

Barrio, A. y Pistol de Rubel, D. 1972. Encuesta cariotípica de poblaciones argentino-uruguayas de Odontophrynus americanus (Anura, Leptodactylidae).relacionadas con otros rasgos taxonómicos. Physis XXXI (82): 281-291.

Barrio, A. y Rinaldi de Chieri, 1970: Estudios citogenéticos sobre el género Pleurodema y sus consecuencias evolutivas (Amphibia, Anura, Leptodactylidae). Physis 30 (80): 309-319.

, 1970: Relaciones cariosistemáticas de los Ceratophryidae de la Argentina (Amphibia, Anura) Physis XXX (80): 321-329.

Batistic, R. F., Soma, M., Beçak, M. L. and Beçak, W. 1975. Further studies on polyploid amphibians.A diploid population of Phyllomedusa burmeisteri. J. Hered. 66 : 160-162.

Beçak, W.1969. Genic action and polymorphism in polyploid species of amphibians. Genetics Supplement 61: 183-190.

Beçak, W., Beçak, M.L., Lavalle, D. and Schreiber, G. 1967. Further studies on polyploid amphibians (Ceratophrydidae).

Chromosoma (Berl.) 23: 14-23.

Beçak, M.L. and Beçak, W. 1974. Studies on polyploid amphibians. Karyotype evolution and phylogeny of the genus Odontophrynus. J. Herpet. 8 (4): 337-341.

Beçak, M. L., Beçak, W, and Rabello, M. N. 1966. Cytological evidence of constant tetraploidy in the bisexual South American frog Odontophrynus americanus. Chromosoma /Berl.) 19: 188-193.

1967a:Evolução cromossômica por poliploidia em anuros da familia Ceratophrydae. Ciencia e Cultura.19 (2): 274.

1967b:Further studies on polyploid amphibians (Ceratophrydidae) I. Mitotic and meiotic aspects. Chromosoma (Berl.) 22: 192-201.

Beçak, M. L., Denaro, L. and Beçak, W. 1970. Polyploidy and mechanisms of karyotype diversification in Amphibia. Cytogenetics 9: 225-238.

Beçak, W. and Goissis, G. 1971. DNA and RNA content in diploid and tetraploid amphibians. Experientia 27: 345-346.

Beçak, W. and Pueyo, M. T. 1970. Gene regulation in the polyploid amphibian Odontophrynus americanus. Exptl. Cell Res. 63: 448-451.

Beek, K. J. and Bramao, D. L. 1968. Nature and geography of South American soils. IN: Biogeography and ecology in South America. Vol. I. Filtkan, Illies, Klinge, Schwabe and Sioli (Eds.). Monographiae biol. 18: 82-112.

Bianchi, N. O. and Molina, J. O. 1968. The aneuploid complement of Ceratophrys ornata. J. Hered. 59: 183-186.

Bogart, J. P. 1967. Chromosomes of the south american amphibian family Ceratophridae with a reconsideration of the taxonomic status of Odontophrynus americanus. Can. J. Genet. Cytol. 9: 531-542.

Bogart, J. P. 1980. Evolutionary implications of polyploidy in amphibians and reptiles. IN: Polyploidy. Biological Relevance. Basic Life Science. Vol. 13. Lewis, W. H. (Ed.). Plenum Press (New York).

Bogart, J. P. and Tandy, M. 1976. Polyploid amphibians: Three more diploid-tetraploid cryptic species of frogs. Science 193: 334-335.

Bogart, J. P. and Wasserman, A. O. 1972. Diploid-polyploid cryptic species pair: a possible clue to evolution by polyploidization in anuran amphibians. Cytogenetics 11: 7-24.

Boulenger, G.A. 1882. Catalogue of the Batrachia Salientia. s. Ecaudata in the collection of the British Museum. Second Edition. British Museum, London: XVI+503 pp.

Boulenger, G.A. 1890. Batrachian collection in the British Museum. Proc. zool. Soc. London, 1890: 327.

Brachet, J. 1974. Introduction to molecular embryology. Springer Verlag. New York Inc. 176 pp.

Braun, P.C y Braun, C.A.S. 1980. Lista previa dos anfibios do Estado do Río Grande do Sul, Brasil. Iheringia. Ser.Zool., Porto Alegre 56: 121-146.

Cabrera, A. L. 1953. Esquema fitogeográfico de la República Argentina. Rev. Mus. La Plata VIII: 87-168.

Cabrera, A. L. y Willink, A. 1973. Biogeografía de América Latina. Serie de Biología. Monografía Nº 13. Secretaría General de la O.E.A. 120 pág.

Canziani, G. y Cannata, M. A. 1980. Water balance in Ceratophrys ornata from two different environments. Comp. Biochem. Physiol. 66 (4): 599-604.

Cash, M.N. and Bogart, J. P. 1978. Cytological differentiation of the diploid-tetraploid species pair of North American Tree frogs (Amphibia, Anura,.Hylidae). J. Herpet. 12 (4): 555-558.

Castagnino,J.M. 1970. Electroforesis. Editorial Universitaria de Buenos Aires. 405 pág.

Cei, J. M. 1954-1957. Notas batracológicas y biogeográficas argentinas (Región cuyana y provincias limítrofes) I-II-III-IV. Ann. Dept. Invest. Cient. 2: 1-11.

1955. Chacoan batrachians in central Argentina. Copeia 1955. (4): 291-293.

1956. Nueva lista sistemática de los batracios de Argentina y breves notas sobre su biología y ecología. Investigaciones Zoológicas Chilenas III (3-4): 31-77.

1965. The relationships of some ceratophryid and leptodactylid genera as indicated by precipitin test. Herpetologica 20 (4): 217-224.

1968. Distribution et spécialisation des batraciens sudaméricains. Bilogie de l'Amerique australe. Publ. sous la dir. de Claude Delamare Deboutteville. Paris 4: 199-214.

1980. Amphibians of Argentina. Monitore Zool. Ital. Monog. 2. 609 pp.

Cochran, D.M. 1955. Frogs of southeastern Brazil. Bull. U.S. Nat. Mus. (Smith. Inst.) 206: 1-409.

di Tada, I. E., Salusso, M. M. y Martori, R. A. 1976. Lista de los batracios de Córdoba. Bol. Acad. Nac. Ciencias, Córdoba, Argenina 51 (3-4): 325-362.

Dixon and Webb. 1964. Enzymes. Longmans,.Green and Co. Ltd.

Ebendal, T. 1977. Karyotype and serum protein pattern in a swedish population of Rana lessonae (Amphibia, Anura). Hereditas 85: 75-80.

Fankhauser,G. 1945. Chromosome number and development. Quart. Rev. Biol. 20: 20-78.

Fernández, L. G., Segovia, M. B., Singerman, A. 1967. Separación y determinación cuantitativa de isoenzima (LDH) Láctico Dehidrogenasa por gel de poliacrilamida (en prensa).

Ferris, T. G., Easterling, R. E., Nelson, K. J. and Budd, R. E. 1966. Determination of serum-hemoglobin binding capacity and haptoglobin type by Acrylamide gel electrophoresis. Amer. J. Clin. Path. 46 (3): 385-389.

Florey, E. 1975. Lehrbuch der Tierphysiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.574 pp.

Gallardo, J. M. 1964. Los anfibios de la provincia de Entre Ríos,

Argentina, y algunas notas sobre su distribución geográfica y ecológica. Neotropica 10 (31): 23-28.

1965. Consideraciones zoogeográficas y ecológicas sobre los anfibios de la provincia de La Pampa argentina. Rev. Mus. Argentino Cs. Nats., I (2): 57-77.

Gans, C. 1960. Notes on a herpetological collecting trip through the southeastern lowlands of Bolivia. Annals of the Carnegie Museum 35: 283-314.

Ganssen, R. 1957. Bodengeographie. Koehler Verlag Stuttgart.

García, J. E. 1972. Ampliación de la distribución geográfica de Ceratophrys ornata (Bell) (Anura, Ceratophrynidae) y algunas observaciones etoecológicas. Physis XXXI (83): 656-658.

Geijkes, D.C. 1959-1960 (1961). Zoogeografía de Surinam. Actas y Trabajos I Cong. Sudam. Zool.: 253-258.

George, S.A. and Lennartz, M. R. 1980. Methods for determining ploidy in amphibians: nucleolar number and erythrocyte size. Experientia 36 (6): 687-688.

Goin, O. B., Goin, C. J. and Bachmann, K. 1968. DNA and amphibian life history. Copeia, 1968 (3): 532-540.

Griffith, J.F. 1972. Ethiopian Highlands. IN: World Survey of Climatology. Landsberg, H.E. (Ed.). Vol. 10: Climates of Africa. Chpt 11.

Günther, R. 1977. Die Erythrozytengröße als Kriterium zur Unterscheidung diploider und triploider Teichfrösche, Rana "esculenta" L. (Anura). Biol. Zbl. 96 457-466.

Hallmann, L. 1952. Klinische Chemie und Mikroskopie. Georg Thieme,

Leipzig. 594 pp.

Hemmer, H., Konrad, A. and Bachmann, K. 1980. Hybridization within the Rana ridibunda complex of North Africa. Amphibia-Reptilia 1 (1): 41-48.

Hemmer, H., Schmidtler, J. F. und Böhme, W. 1978. Zur Systematik zentral-asiatischer Grünkröten (Bufo viridis-Komplex). Zool. Abh. Mus. Tierk. Dresden 34 (24): 349-384.

Hennig, W. 1968. Elementos de una sistemática filogenética. EUDEBA. Editorial Universitaria de Buenos Aires. 535 pp.

Heyer, W. R. 1975. A preliminary analysis of the intergeneric relationships of the frog family Leptodactylidae. Smithsonian Contributions to Zoology. 199: I-III and 1-55.

1977. Taxonomic notes on frogs from the Madeira and Parus Rivers, Brasil. Papéis Avulsos Zool., S. Paulo 31 (8): 141-162.

Hungerford, D.A. 1965. Leukocytes Cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KC1. Stain Technology 40 (6): 333-338.

Johnson, A.M. 1976. The climate of Peru, Bolivia and Ecuador. IN: World Survey of Climatology. Landsberg, H.E. (Ed. in chief). Vol. 12: Climate of Central and Southamerica. Schwerdtfeger, W. (Ed.) Chpt. 4.

Keith, R. 1968. A new species of Bufo from Africa, with comments on the toads of the Bufo regularis complex. American Museum Novitates 2345: 1-22.

Larson, A. and Highton, R. 1978. Geographic protein variation and divergence in the salamanders of the Pletohodon welleri group (Amphibia, Pletohodontidae). Syst. Zool. 27: 431-448.

Lauer, W., Schmidt, R. D., Schröder, R. und Troll, C. 1952. Studien zur Klima - und Vegetationskunde der Tropen. Bonner Geographische Abhandlungen. Heft 9. 182 pp.

Laurent, R.F. 1979. El origen de los anfibios sudamericanos. Acta zool. Lilloana 34: 83-89.

Levan, A., Fredga, K. and Sandberg, A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas 52: 201-220.

Lutz, B. 1954. Anfibios anuros do Distrito Federal. Mem. Inst. O. Cruz 52 (1): 155-238.

1972. Geographical and ecological notes on cisandine to platine frogs. J. Herp. 6 (2): 83-100.

Lynch, J. D. 1971. Evolutionary relationships, osteology and zoogeography of leptodactyloid frogs. Misc. Publ. Univ. Kansas Mus. Nat. Hist. 53: 1-238.

Maxson, L., Pepper, E. and Maxson, R. D. 1977. Immunological resolution of a diploid-tetraploid species complex of tree frogs. Science 197: 1012-1013.

Mazik, E. Ju., Kadyrova, B. K. and Toktosunov, A. T. 1976 (1977). Karyotype patterns in the green toad (Bufo viridis) in the Kirgiz SSR. Zoologiceskij Zurnal 55 (11)

Mcgregor, H. C. and Uzzel, Jr. T. M. 1964. Gynogenesis in salamanders related to Ambystoma jeffersonianum. Science 143. 1043-1045.

Mertens, R., Hennig, W. and Wermuth, H. 1966. Liste der rezenten Amphibien und Reptilien (Ascaphidae, Leiopelmatidas, Pipidae, Discoglossidas, Pelobatidae, Leptodactylidae, Rhinophrynidae). Das Tierreich, Berlin 85: I-XVI, 1-222.

Miranda Ribeiro, A. de. 1920. Algunas considerações sôbre o gênero Ceratophrys e suas especies. Rev. Mus. Paul. XII: 291-304.

1923. Observações sobre algumas fases evolutivas de Ceratophrys e Stombus. Arch. Mus. Nac. R. Jan. XXIV: 201-305.

1926. Notas para servirem ao estudo dos Gymnobatrachios (Anura) brasileiros. Arch. Mus. Nac. R. Jan. XXVII: 1-227.

Müller, L. und Hellmich, W. 1936. Wissenschaftliche Ergebnisse der Deutschen Gran Chaco-Expedition. Amphibien und Reptilien I. Teil: Amphibia, Chelonia, Loricata. 29.

Müller, P. 1972 a. Die Bedeutung der Ausbreitungszentren für die Evolution neotropischer Vertebraten. Zool. Anz., Leipzig 189 (3/4): 121-159.

1972 b. Centres of Dispersal and Evolution in the Neotropical Region. Studies on the Neotropical Fauna 7: 173-185.

Noble, G. K. 1954. The biology of the Amphibia. Dover Publications, Inc. New York. 577 pp.

Oeldorf, E., Nishioka, M. and Bachmann, K. 1978. Nuclear DNA amounts and developmental rate in holartic anura. Z. zool. Syst. Evolut.-forsch. 16 (3): 216-224.

Olmo, E. and Morescalchi, A. 1978. Genome and cell sizes in frogs: A comparison with salamanders. Experientia 34: 44-46.

Peacock, A.C., Busting, S. L. and Queen, K. G. 1965. Haptoglobins-separation and staining in E. C. Apparatus Corporation. Technical Bulletin 145.

Pechere, J. F., Capony, J. and Densille, J. 1974. Evolutionary aspects of the structure of muscular parvalbumins. Syst. Zool. 22: 533-548.

Peracca, M. G. 1897. Viaggio del Dott. Alfredo Borelli nel Chaco boliviano e nella Republica Argentina. Boll. Mus. Zool. Anat. Comp. Torino XII (274): 1-19.

Peters, J. A. 1954-1955. Herpetological type localities in Ecuador. Rev. Ectuat. Ent. Par. 2 (3-4): 335-352.

Peters, J. A. 1967. The generic allocation of the frog Ceratophrys stolzmanni Steindachner, with the description of a new subspecies from Ecuador. Proc. Biol. Soc. Wash. 80: 105-112.

Pisanets, E. M. 1978. On a new polyploid species of Bufo danatensis Pisanetz, sp. nov. from Turkmenistan SSR. Sopov. Akad. Nauk. Ukr. Rsp. Ser. B Heol. Biol. Nauky (3): 277-282.

Prohaska, F. 1976. The climate of Argentina, Paraguay and Uruguay. IN: World Survey of Climatology. Landesberg, H. E. (Ed. in chief) Vol. 12: Climate of Central and Southamerica. Schwerdtfeger, W. (Ed.) Chpt. 2.

Ralin, D. B. 1978. Resolution of diploid-tetraploid tree frogs.

Science 202: 335-336.

Ralin, D. B. and Selander, R. K. 1979. Evolutionary genetics of diploid-tetraploid species of tree frogs of the genus Hyla. Evolution 33 (2): 595-608.

Ratisbona, L. R. 1976. The climate of Brazil. IN: World Survey of Climatology. Landsberg, H. E. (Ed. in chief). Vol. 12: Climate of Central and Southamerica. Schwerdtfeger, W. (Ed.) Chpt. 5.

Reig, O. A. 1972. Macrogenioglottus and the South American Bufonid Toads. IN: Evolution in the genus Bufo. Blair, W. F. (Ed.) University Texas Press. Austin/Texas.

Reig, O. A. y Cei, J. M. 1963. Elucidación morfológico-estadística de las entidades del género Lapidobatrachus Budgett (Anura, Ceratophrynidae), con consideraciones sobre la extensión del distrito chaqueño del dominio zoogeográfico subtropical. Physis XXIV (67): 181-204.

Reig, O. A. y Limeses, C. E. 1963. Un nuevo género de anuros ceratofrínidos del distrito chaqueño. Physis XXIV (67): 113-128.

Riggs, A., Sullivan, B. and Agree, J. R. 1964. Polymerization of frog and turtle hemoglobins. Proc. Nat. Acad. Sci. 51: 1127.

Rivero, J. A. 1961. Salientia of Venezuela. Bull. Mus. Comp. Zool. Cambridge 126 (1): 1-207.

Saez, F. A. y Brum, N. 1959. Citogenética de anfibios anuros de América del Sur. Los cromosomas de Odontophrynus ame-

ricanus y Ceratophrys ornata. Anales de la Facultad de Medicina, Univ. Montevideo 44: 414-421.

Savage, J. M. 1973. The geographic distribution of frogs: patterns and predictions. IN: Evolutionary biology of the anurans. Vial, J. L. (Ed.). Univ. Missouri Press, Columbia, Missouri.

Schmid, M. 1978. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in Bufo and Hyla. Chromosoma 66: 361-388.

Schmidtke, J., Beçak, W. and Engel, W. 1976. The reduction of genic activity in the tetraploid amphibian Odontophrynus americanus is not due to loss of ribosomal DNA. Experientia 32: 27-28.

Schreiber, G., Melucci, N. M. B., Gerken, S. E., Sant'Ana, Y. X., Fallieri, L. A. e Amorim, O. 1966. Pesquisas de citología quantitativa. XIX DNA e volume nuclear nos tecidos somáticos dos vertebrados. Mem. Inst. Butantan 1: 135-150.

Schulze, B. R. 1972. South Africa. IN: World Survey of Climatology. Landsberg, H. E. (Ed. in chief). Vol. 10: Climates of Africa. Griffiths (Ed.) Chpt. 15.

Schwantes, A. R., Schwantes, M. L. and Beçak, W. 1969. Electrophoretic patterns of G-6PD, 6-PGD and LDH in polyploid amphibians (Ceratophrydidae). Rev. Bras. de Pesquisas Méd. Biol. 2 (1): 41-44.

1971. Padroes elec

troforéticos de G-6PGD e LDH em quatro espécies de anfibios Ceratophrydidae. Arquivos do Museu Nacional LIV: 279-280.

1977. Electrophoretic studies on polyploid amphibians. I. 6-Phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD). Comp. Biochem. Physiol. 56 B: 393-396.

Selander, R. K., Smith, M. H., Yang, S. Y., Johnson, W. E. and Gentry, J. B. 1971. Biochemical polymorphism and systematics in the genus Peromyscus. I. Variation in the old-field mouse (Peromyscus polionotus). Studies in Genetics VI. Texas Publ. 7103: 49-90.

Snow, J. W. 1976. The climate of Northern South America. IN: World Survey of Climatology. Landsberg, H. E. (Ed. in chief). Vol. 12: Climate of Central and Southamerica. Schwerdtfeger, W. (Ed.) Chpt. 6.

Stebbins, G. L. 1966. Chromosomal variation and evolution. Science 152: 1463-1469.

Steindachner, F. 1882. Batrachologische Beiträge. Sitzungsb. Akad. Wiss. Wien, math. naturwiss. Kl. 85 (1): 188-189.

Stelle, M. W., Young, W. J. and Childs, B. 1968. Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase in Drosophila melanogaster: Starch gel electrophoretic variation due to molecular instability. Biochem. Genet 2: 159-175.

Strubing, H. 1954. Über Vorzugstemperaturen von Amphibien. Z. Morph. u. Ökol. Tiere 43: 357-386.

Sumner, A. T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exptl. Cell Res. 75: 304-306.

Szarski, H. 1970. Changes in the amount of DNA in all nuclei during vertebrate evolution. Nature 226: 651-652.

Tandy, R. M. 1972. The evolution of african Bufo. Dissertation Abstr. int. 33B (7): 3392-3393.

Toft, C.A. and Duellman, W. E. 1979. Anurans of the lower Rio Llullapichis, amazonian Peru: A preliminary analysis of community structure. Herpetologica 35 (1): 71-77.

Tymowska, J. and Fischberg, M. 1973. Chromosome complements of the genus Xenopus. Chromosoma (Berl.) 44: 335-342.

Uzzel, T., Berger, L. and Günther, R. 1975. Diploid and triploid progeny from a diploid female of Rana esculenta (Amphibia, Salientia). Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia 127 (11): 81-91.

van der Hammen, T. 1974. The Pleistocene changes of vegetation and climate in tropical South America. J. Biogeog. 1: 3-26.

Vellard, J. 1948. Batracios del Chaco argentino. Acta zool. Lilloana V: 137-174.

Wall, D.A. and Blackler, A. W. 1974. Enzyme patterns in two species of Xenopus and their hybrids. Dev. Biol. 36: 379-390.

Walter, H. und Lieth, H. 1960. Klimadiagramm Weltatlas. Gustav Fischer Verlag, Jena.

Wasserman, A. O. 1970. Polypoidy in the common tree toad Hyla versicolor. Le Conte. Science 167: 385-386.