

UCH-FC  
LIC-B  
M617  
C.1

U N I V E R S I D A D D E C H I L E

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

VARIABILIDAD DE CARACTERES Y COMPATIBILIDAD

GENETICA EN ESPECIES DEL GRUPO SPINULOSUS

(Amphibia- Anura)

Tesis para optar al grado de Licenciado en

Ciencias con mención en

Biología

PROFESOR GUIA : DR. ALBERTO VELOSO M.

Departamento de Biología Celular y Genética

Facultad de Medicina Santiago-Norte

Profesor Patrocinante: Dr. José Valencia D.

Facultad de Ciencias

A N A M E Z E Y B A L A Z S

1979

A mis Padres

I N D I C E

	Pág.
I. Introducción.....	1
A. Breve reseña de las especies estudiadas.....	2
B. Componentes del análisis poblacional.....	8
II. Métodos de Observación - Experimentos.....	9
III. Resultados	
A. Análisis Biométrico.....	14
B. Cromosomas.....	16
C. Hibridización "In vitro".....	18
D. Híbridos Naturales.....	20
IV. Discusión.....	25
V. Conclusión.....	40
VI. Referencias Bibliográficas.....	43
VII. Tablas.....	49
VIII. Figuras.....	60
IX. Láminas.....	78
X. Anexos I.....	82
II.....	87
III.....	92

## I N T R O D U C C I O N

La variación geográfica de caracteres utilizados en la identificación y diagnosis taxonómica de los anuros chilenos solo ha sido estudiada en unas pocas especies (Cei 1960-61, Duellmann y Veloso, 1978).

Si estos caracteres quieren ser utilizados como criterios evolutivos, resulta importante conocer la calidad y extensión de su variabilidad intraespecífica e interespecífica.

Una primera aproximación para establecer semejanzas o diferencias entre poblaciones, consiste en establecer comparaciones en las que se utilizen caracteres de la morfología externa. Se asume que los análisis comparativos del fenotipo, y en general los análisis fenéticos, son estimadores de las relaciones genéticas entre individuos (Lidicker, 1962).

Tanto en las comparaciones poblacionales intraespecíficas como entre especies biológicamente relacionadas, es importante considerar la distribución geográfica. En el caso de comparaciones entre poblaciones de una misma especie, de un amplio rango distribucional, la distancia geográfica orienta a la explicación de diferencias entre poblaciones mediante hipótesis de restricción de flujo génico, y desarrollo de diferencias adaptativas como respuesta a presiones selectivas locales (Mayr, 1969).

Cuando el análisis está referido a poblaciones de especies alopátricas, resulta útil la determinación de caracteres en poblaciones contiguas, donde puede haber sobreposición ocasional de sus áreas de distribución. Es en la condición de simpatria, en zonas de contacto secundario, donde puede existir un riesgo potencial de hibridización, donde resulta más evidente la magnitud de la divergencia alcanzada. (Blair, 1972, 1973).

A. Breve reseña de las especies estudiadas:

Los ejemplares estudiados son anuros de la familia Bufonidae, del género Bufo. Caracteres diagnósticos del género son la ausencia de dientes vomerianos y maxilares, glándula parótida evidente, la cintura escapular arcífera, y los procesos vertebrales sacrales dilatados (Cei 1962). Las observaciones corresponden a cuatro especies de dos grupos del género: grupo spinulosus y grupo marinus. El término grupo está utilizado aquí para indicar un conjunto de especies filogenéticamente relacionadas (Martin, 1972).

1) Algunos problemas de la distribución geográfica y breves consideraciones ecológicas.

El género Bufo es cosmopolita, se encuentra en América del Norte, América del Sur, Eurasia y África, con excepción de Australia (Blair, 1972).

En Chile, (fig. 1) el grupo spinulosus está representado por cuatro especies. Estas son Bufo spinulosus,

B. chilensis, B. atacamensis y B. rubropunctatus, cuya distribución no ha sido precisada pero que muestra simpatría con B. spinulosus, en las riberas del lago Todos los Santos (Silva et al, 1968), especie que no es considerada en este trabajo. Las restantes especies son alopátricas.

El área de distribución geográfica de B. spinulosus es la Cordillera de los Andes. Sus poblaciones se extienden desde el Altiplano Perú-Boliviano (Vellard 1959), hasta la región del Chubut en la Patagonia Argentina (Cei, 1972). Hacia el Sur, esta especie es simpátrica en algunas localidades de la vertiente atlántica de los Andes, con Bufo arenarum, del grupo marinus (fig. 14). En la vertiente pacífica, B. spinulosus, presenta una distribución disjunta, encontrándose poblaciones en las quebradas y Altiplano del Norte Grande (Lat. 18°-20°S), separadas por regiones desérticas, a partir del valle del Río Elqui (Lat. 30°S), de las poblaciones de la Zona Central. Desde esta latitud y hasta el paralelo 41°S, esta especie (Veloso, com. personal) tiene una cadena de poblaciones que terminan en la Zona Sur, con la diferenciación de B. sp. papillosus (Gallardo, 1965).

En la Zona Central de Chile, B. spinulosus no desciende por debajo de los 1.000 mts. y se continúa en ausencia de una barrera geográfica manifiesta con B. chilensis. El área de distribución geográfica de esta

última, se ve interrumpida hacia el Norte por zonas de desierto, no compatibles con la existencia de anfibios. Para las poblaciones de B. chilensis la barrera desértica determinaría que no haya sobreposición en la distribución geográfica con B. atacamensis, la que esta restringida a los valles del Río Copiapó y del Río Huasco (Lat. 27°-29°S).

Desde el punto de vista ecológico, estas especies muestran diversos grados de dependencia del ambiente acuático. Con la excepción de B. atacamensis, que puede ser observado durante gran parte del año (Primavera, Verano, Otoño) en las proximidades de cursos de aguas, parcialmente sumergido. Las restantes especies concurren a rios, esteros y vegas solo durante el período reproductivo, formando agregaciones de varios cientos de individuos. El comportamiento a la captura de B. atacamensis es el escape por inmersión. (Veloso, 1973). Esta característica es compartida por B. chilensis y en menor grado por B. spinulosus. Este último, concurre a ovipositar a pozas de poca profundidad, con vegetación abundante, al abrigo de corrientes.

## 2) Osteología del Cráneo.

La osteología del cráneo de estas especies ofrece caracteres de utilidad taxonómica que dan base para la sistemática de los anuros. Las diferencias que se observan estan determinadas principalmente por la forma y tamaño de los huesos del cráneo. El valor taxonómico de

los caracteres osteológicos del cráneo es que presentan estabilidad intraespecífica, (Trueb, 1973) lo que los hace más útiles para las comparaciones entre especies que otros caracteres esqueléticos.

Sin pretender un estudio exhaustivo de la osteología craneana, a continuación se hace una redescrición de algunos detalles osteológicos importantes del cráneo de estas especies. En la figura 2 se muestran en forma esquemática los caracteres considerados. Para estas descripciones se complementaron las observaciones de la literatura (Martin, 1972) con observaciones en material de nuestra colección.

B. chilensis. Lámina Ia

El cráneo es ornamentado y tiene mayor osificación que en las restantes especies del grupo spinulosus. Los nasales se encuentran completamente fusionados en la línea media, ubicados por atrás de los premaxilares. Los frontoparietales son moderadamente anchos, tienen la forma de una pirámide truncada de vértice anterior y están completamente fusionados a los nasales. En la zona orbitaria y en las suturas con los nasales y otooccipitales se observan engrosamientos discretos (crestas óseas). El canal occipital parece cubierto en la mitad anterior de su trayecto. En vista dorsal, la lámina ótica del escamoso se observa de gran tamaño y osificada. En vista posterior, la ventana suprapterigoidea es abierta y esta atravesada por la columela. En vista ventral se observa

a la rama medial del pterigoideo que se sobrepone en un tercio con el paraesfenoides. Lateralmente, la rama descendente del escamoso llega hasta el borde inferior de la mandíbula.

B. spinulosus. Lámina Ib.

En esta especie, el cráneo es liso, sin crestas. Los nasales están fusionados en la línea media hasta la mitad, en vista lateral se ubican ligeramente por atrás de los premaxilares. Los frontoparietales son moderadamente anchos, tienen forma rectangular y están solo en contacto parcial con los nasales. El canal occipital aparece cerrado solo en la parte posterior. En vista dorsal, se observa que la lámina ótica del escamoso es reducida y poco osificada. En vista posterior la ventana suprapterigoidea esta abierta, la columela es más delgada que en B. chilensis. En vista ventral se observa la rama medial del pterigoideo sobrepuesto en menos de un tercio con el paraesfenoides. En vista lateral la rama descendente del escamoso alcanza al borde inferior de la mandíbula.

B. atacamensis. Lámina Ic.

La osificación y ornamentación del cráneo de esta especie, representan una condición intermedia respecto a B. chilensis y B. spinulosus. Los nasales se encuentran parcialmente fusionados. En vista lateral, se ubican ligeramente por atrás de los premaxilares. Los

frontoparietales son moderadamente anchos, de forma rectangular y estan solo parcialmente en contacto con los nasales. En esta especie, solo se observan crestas supraorbitales. El canal occipital aparece completamente cubierto en el caso de los machos. En vista dorsal, se observa que la lámina ótica está reducida. En vista lateral, la rama descendente del escamoso no se prolonga más abajo del borde inferior de la mandíbula. El quadratojugal se proyecta posteriormente al escamoso. En vista posterior, la ventana suprapterigoidea no esta ocluida y su ubicación es por debajo de la columela.

B. arenarum. Lámina Id

Esta especie tiene un cráneo corto y ancho, fueretemente ornamentado y osificado. La sutura de los nasales en la línea media es completa y su ubicación está por sobre los premaxilares en una vista lateral. Los frontoparietales son anchos, y estan, como en B. chilensis completamente fusionados a los nasales. Presentan crestas óseas continuas, que abarcan a los frontoparietales y a los nasales. El cráneo tiene además crestas preorbitales postorbitales, timpánicas y supratimpánicas. El canal occipital está completamente cerrado. En vista dorsal, la lámina ótica del escamoso es de gran tamaño. El occipital es extenso y tiene forma trapezoidal. En vista posterior, la ventana suprapterigoidea esta completamente ocluida. En vista ventral, la rama medial del pterigoideo se sobrepone

ampliamente con el paraesfenoides.

B. Componentes del análisis poblacional.

1) VARIABLES MORFOMÉTRICAS.

Las mediciones fueron realizadas en ejemplares de poblaciones de las cuatro especies. Las variables seleccionadas dan cuenta de la talla de los ejemplares, la forma de la cabeza y proporciones relativas de órganos de la piel (parotoides) y las extremidades.

Cei (1961) en estudios previos de los caracteres morfológicos de estas especies, define para el grupo spinulosus, la existencia de 5 subgrupos poblacionales. Estos estudios muestran también la existencia de tendencias clinales latitudinales respecto a la talla. Hay además resultados cualitativos respecto a la variación de los patrones de coloración y modificaciones en la forma de la parótida. La conclusión fué definir sub-especies de Bufo spinulosus (Cei, 1960). En trabajos posteriores Cei (1971, 1972) complementó estos antecedentes con otras evidencias, tales como sustancias secretadas por la piel y análisis serológico (precipitinas) y le asignó el estado de especie a estos grupos poblacionales.

2) CROMOSOMAS.

La determinación del cariotipo es útil en las comparaciones entre poblaciones. Las variables consideradas son, el número diploide, la morfología cromosómica y la localización de la constricción secundaria. Tanto el

número diploide como la morfología cromosómica son caracteres estables en Bufo (Bogart, 1972). La constricción secundaria es variable en el cariotipo de las especies del género y ha permitido establecer relaciones filogenéticas que definen para los grupos Sud-americanos, una posición ancestral (Bogart op. Cit.)

3) Compatibilidad Genética.

Las variables consideradas son los porcentajes de sobrevida alcanzados en cruzamientos experimentales (in vitro) respecto a controles homoespecíficos. Estos valores corresponden a sobrevida en la etapa de desarrollo embrionario y a la metamorfosis. Los valores de compatibilidad genética son útiles en la demostración de las relaciones evolutivas en Bufo. El desarrollo de híbridos hasta ciertas etapas proporciona la evidencia que las especies consideradas son lo suficientemente similares genéticamente, para producir descendencia viable. (Blair 1972).

II Método de observación. Criterios en la selección de variables. Experimentos:

1) Osteología del Cráneo

Para hacer las observaciones osteológicas, se disecaron esqueletos de las especies y se tiñeron las suturas óseas con alizarina. Detalles de la técnica utilizada están incluidas en el Anexo 1.

2) Mediciones morfométricas.

Solo los ejemplares machos fueron medidos vivos, mediante un pie de metro, con precisión 0.05 mm. Teniendo en cuenta el acentuado dimorfismo sexual de estas especies se omitieron las hembras.

Las variables morfométricas consideradas fueron:

- 2.1) Longitud hocico-cloaca (largo total).
- 2.2) Longitud extremidad posterior.
- 2.3) Distancia intertimpánica.
- 2.4) Diámetro del Tímpano.
- 2.5) Distancia Narina-hocico.
- 2.6) Distancia ojo-narina.
- 2.7) Ancho glándula parotoides.
- 2.8) Largo glándula parotoides. (Anexo 1)

Los criterios en la selección de los caracteres de la morfología externa (Variables) fueron:

- 1) Variables fáciles de medir que representan dimensiones longitudinales y transversales del cuerpo de los ejemplares.
- 2) Caracteres que muestran variación según la especie considerada (Forma de la parotoides, distancia narina-hocico).

3) Caracteres que muestren variación posiblemente asociada a condiciones ecológicas del habitat de las especies (longitud de la extremidad posterior, diámetro del tímpano).

Usando los criterios precedentes, se analizaron 8 poblaciones con un total de 156 ejemplares, de las 4 especies analizadas.

Los datos se analizaron mediante pruebas estadísticas simples y multivariadas, estos últimos con prueba discriminante para datos agrupados. Estas pruebas estadísticas se detallan en el Anexo 1.

### 3) Cariotipos.

Se determinó el cariotipo de estas especies a partir de la obtención de placas metafásicas de diversos tejidos de animales previamente inyectados con colchicina.

El procedimiento seguido y las técnicas aplicadas están en el Anexo 2.

Las observaciones de los cromosomas se realizaron en un microscopio Leitz, Orthoplan con contraste de fase o en preparaciones teñidas. Las placas metafásicas fueron fotografiadas y los cariotipos se montaron de reproducciones fotográficas.

Los cromosomas fueron medidos y apareados y se construyeron los idiogramas con propósitos comparativos. El cariotipo se ha considerado como un rasgo más del fe-

notipo de estas especies. En el género, este es un carácter conservador (Bogart, 1972) que contrasta con la varia bilidad fenotípica externa. Se ha identificado a la constricción secundaria como la portadora de la región organizadora del nucleolo (NOR), marcador cromosómico que resulta particularmente útil en el diagnóstico de híbridos naturales y experimentales.

4) Compatibilidad Genética. Cruzamiento "invitro"- Híbridos Naturales.

Se determinó mediante cruzamientos experimentales la compatibilidad genética intraespecífica en B. chilensis hasta la etapa de la eclosión de la larva y la compatibilidad interespecífica hasta alcanzar la metamorfosis y etapas postmetamórficas.

Estos cruzamientos son controles y recíprocos, alternando la proveniencia de los progenitores (Un resumen de los cruzamientos realizados se incluye en el Anexo 3)

Las hembras fueron inducidas a ovular, mediante la implantación intraperitoneal de hipófisis homólogas. Los huevos fueron fecundados con una suspensión de espermios, obtenidos por maceración de testículos. Se determinó actividad de los espermatozoides mediante examen al fresco en microscopio de contraste de fase.

El proceso de segmentación, la gastrulación y desarrollo larvario fue seguido a la lupa. Las etapas al-

canzadas se determinaron según Valencia (1962), anotándose la sobrevida de los embriones y larvas en los distintos estados.

La hibridización experimental y la determinación de la sobrevida de los híbridos, es un criterio para estimar la compatibilidad genómica de las especies parentales hasta el particular estado del desarrollo alcanzado.

Los ejemplares de Bufo considerados en los experimentos de Hibridización "in vitro" se reproducen durante los meses de primavera y verano. Como indicadores del proceso reproductivo en condiciones naturales, se utilizaron diversos parámetros de la actividad reproductiva de estas especies. Entre otros: canto de rechazo sexual (release call) de los machos del grupo spinulosus, canto nupcial de B. arenarum, amplexos, ovipostura y/o presencia de larvas.

Durante los años 1977 y 1978 estas observaciones fueron realizadas en forma sistemática en poblaciones de B. chilensis y B. spinulosus y en forma esporádica para B. atacamensis y B. arenarum. La actividad reproductora de esta se extendería desde mediados de Septiembre hasta fines de Octubre. B. spinulosus empezó a reproducirse a fines de Octubre. Por lo tanto parte del período reproductor de ambas especies se superpuso. Otro tanto ocurre entre B. chilensis y B. atacamensis. Las poblaciones Argentinas de B. spinulosus y B. arenarum también superponen parte de su período reproductor.

## R E S U L T A D O S

### A) Análisis Biométrico

#### - Variabilidad de caracteres

El análisis estadístico de la variabilidad de caracteres de la morfología externa permite determinar:

- a) La variabilidad intra-poblacional.
- b) La variabilidad entre poblaciones de las especies del grupo spinulosus.
- c) Comparar la variabilidad poblacional de B. arenarum de Mendoza, con las especies del grupo spinulosus.

Los resultados de la Tabla 1 muestran distintos grados de variación intrapoblacional. Al determinar los coeficientes de variación se observa que en general la variabilidad intrapoblacional de los caracteres considerados es mayor en las poblaciones de B. chilensis y B. atacamensis que en las otras 2 especies (Tablas 1 y 2). Los caracteres que muestran mayor variabilidad intrapoblacional son el diámetro del tímpano excepto en B. arenarum y el largo y ancho de la glándula parotoides en todas las poblaciones analizadas.

#### - Comparación de poblaciones.

La comparación entre poblaciones se muestra gráficamente en los diagramas de Dice de las figuras 3 al 6, construidas con los valores contenidos en la tabla 1. El valor discriminante de cada una de las 8 variables

consideradas, esta en las tablas 3a y 3b que muestra los resultados de la aplicación de la prueba de Scheffé.

Las poblaciones de B. chilensis de La Dehesa y Quilimarí se diferencian estadísticamente solo en el largo de la extremidad posterior ( $p < 0.05$ ) (fig. 3-6 y tabla 3a).

La comparación de las poblaciones de B. chilensis con B. atacamensis, muestra que la variabilidad en 5 de las variables morfométricas se incrementa en esta última. (Tabla 2).

Las diferencias entre B. chilensis La Dehesa y B. atacamensis (Tabla 3a) se dan en 7 variables ( $p < 0.05$ ), exepcto la distancia ojo-narina. Las diferencias entre B. atacamensis y la población de Quilimarí de B. chilensis som menos y se dan en el largo total (hocico-cloaca) y en el diámetro timpánico ( $p < 0.05$ ).

Para el largo de la extremidad posterior, B. atacamensis se asemeja a B. chilensis de Quilimarí y a la población de Putre de B. spinulosus. Entre este último y B. atacamensis no hay diferencias significativas en el diámetro del tímpano, siendo este menor en B. atacamensis que en las restantes poblaciones. ( $p < 0.05$ ).

La población de Putre (Lat. 18°S) está representada por individuos de talla pequeña. Los rangos y los promedios de otras cuatro de las 8 variables consideradas, que son, extremidad posterior, distancia intertimpánica,

dist. ojo-narina, y dist. narina-hocico (fig. 3-6) siguen la misma tendencia que la disminución de tamaño.

Al comparar las especies del grupo spinulosus con B. arenarum del grupo marinus, con la prueba de Scheffé (Tabla 3b) se observa que las variables largo total, extremidad posterior (con excepción de B. spinulosus de Baños Morales), Diámetro timpánico, Narina-hocico y largo de la glándula parotoides se diferencian ( $p < 0.01$ ), de todas las poblaciones de especies del grupo spinulosus.

Finalmente, para las poblaciones del grupo spinulosus se aplicó el análisis de  $T^2$  (Hotteling) cuyos valores de F se incluyen en la tabla 4. Los resultados de esta prueba estadística muestran diferencias significativas entre todas las poblaciones analizadas.

El grado de afinidad entre poblaciones, se estableció mediante  $D^2$  (Distancia de Mahalanobis) (Tabla 5). A partir de la cual se hizo un análisis jerárquico de similitud expresado graficamente en la fig. 7. En que se observa que la variación entre poblaciones de B. chilensis es menor que en B. spinulosus. B. atacamensis en este análisis resulta mas próximo a B. chilensis.

#### B. Cromosomas.

Las 3 especies de Bufo del grupo spinulosus y B. arenarum del grupo marinus, tienen el mismo número diploide  $2n = 22$  (fig. 8). En el cariotipo ordenado según tamaño decreciente se observan 5 pares de cromosomas grandes,

1 mediano y 5 pares pequeños. No hay diferencias entre machos y hembras.

La comparación de los cromosomas muestra pequeñas diferencias de morfología. Los cromosomas son metacéntricos excepto el par 4 submetacéntrico en B. chilensis, B. spinulosus y B. arenarum. En B. atacamensis, todos son metacéntricos. (Tabla 6 e Idiograma Fig. 9).

B. chilensis, B. atacamensis y B. arenarum muestran en el par 7, una constricción secundaria intercalar en el brazo corto de ambos homólogos. En B. spinulosus, la constricción secundaria se localiza proximal al centrómero del par 11. La longitud de esta constricción secundaria es variable. Ambos homólogos del par portados, muestran una condición homomórfica y/o heteromórfica. La morfología del par portados de la constricción secundaria es una característica individual constante, de todas las placas metafásicas, que define distintos fenotipos en las poblaciones. (fig. 8 y 9).

La región organizadora del nucleolo (NOR) está localizada en correspondencia con la constricción secundaria (fig. 10). La identificación funcional de esta región cromosómica, es un marcador citogenético útil en las comparaciones intra e interespecífica y también en la identificación de híbridos naturales y experimentales como se señala más adelante.

### C. Hibridización Experimentos "In Vitro"

Las hibridaciones experimentales incluyendo los cruzamientos recíprocos se muestran en las Tablas 7 y 8. En estos resultados se muestran los porcentajes de sobrevida alcanzados durante la etapa larvaria y llegan hasta terminada la metamorfosis.

Las comparaciones de sobrevida de los híbridos experimentales, se hicieron según el criterio de "mejor bandeja". Es decir, de los diversos cruzamientos, que se llevan en réplicas se escoje aquella que muestra los porcentajes de sobrevida mas elevados. El diagnóstico de los híbridos experimentales tanto en su etapa larvaria como postmetamórfica, se realizó mediante determinación del cariotipo e identificación de cromosomas marcadores (fig.11).

En todos los cruzamientos se alcanzó la metamorfosis y etapas postmetamórficas. La etapa crítica en el desarrollo tanto de los cruzamientos controles como híbridos, es la eclosión de la larva (Tabla 7). Una situación de excepción se muestra en el cruzamiento ♀ B. arenarum x ♂ B. atacamensis donde hay una ligera disminución en el porcentaje de sobrevida de la gástrula.

En la etapa de eclosión de la larva, que inicia el paso a la etapa larvaria, en el cruzamiento ♀ B. spinulosus x ♂ B. arenarum hay una disminución considerable de la sobrevida que alcanza a menos del 40%. (Tabla 7).

En el cruzamiento ♀ B. chilensis x ♂ B. spinulosus

esta disminución de sobrevivida también es considerable (70%). Los demás cruzamientos tienen porcentajes de sobrevivida semejantes a los controles. En el cruzamiento ♀ B. spinulosus x ♂ B. arenarum hay una marcada disminución en el porcentaje de sobrevivida hasta la metamorfosis, (Tabla 8). El cruzamiento ♀ Bufo arenarum x ♂ B. atacamensis produjo larvas anormales en la implantación y forma de la cola y también ejemplares metamorfoseados ciegos, tuertos y con malformaciones en la cintura pélvica. En la fig. 12 se esquematizan los resultados de cruzamientos en el grupo spinulosus y B. arenarum.

Una vez concluida la etapa larvaria y emergido el primer metamorfoseado de cada uno de los cruzamientos, se hicieron estimaciones del tiempo al que el 50% de los ejemplares sobrevivientes completaron la metamorfosis. Estos resultados se muestran en la fig. 13. Con la excepción de los F<sub>1</sub> provenientes de los cruzamientos en que la hembra fué B. arenarum y que demoran el tiempo de metamorfosis, los restantes cruzamientos controles e híbridos alcanzan el 50% de metamorfosis antes de los 20 días de iniciado el proceso. En el cruzamiento ♀ B. spinulosus x ♂ B. chilensis los F<sub>1</sub> alcanzaron el 50% de metamorfosis antes que los controles. En el recíproco a este cruzamiento, la velocidad de metamorfosis es intermedia respecto a los parentales.

D. Híbridos Naturales.

Con el conocimiento de la distribución geográfica y las observaciones de sobreposición del período reproductor de B. spinulosus tanto con B. chilensis como con B. arenarum se hicieron algunas salidas a terreno a localidades geográficas intermedias a las poblaciones en estudio, donde se encontraron híbridos adultos B. spinulosus x B. chilensis (Cajón del Maipo, 1.200m snm) y B. spinulosus x B. arenarum (San Isidro, Mendoza, 1.200m snm) (fig. 14). Estos individuos son escasos, solo en 2 ejemplares adultos machos se demostró la hibridización natural.

La diagnosis de los híbridos se hizo mediante determinaciones de variables cualitativas y cuantitativas de la morfología externa, que en los híbridos muestran variación en relación a las especies parentales (Tabla 9). Otro elemento útil en la diagnosis, es la determinación del cariotipo. Si bien las especies parentales tienen un mismo número cromosómico ( $2n = 22$ ), la localización de la constricción secundaria (NOR) es en distintos pares de cromosomas homólogos. (fig. 15).

El estado reproductivo de estos ejemplares se determinó mediante histología de la gonada.

Híbrido B. spinulosus x B. chilensis (DBG UCH 269)

Ejemplar macho adulto (Lámina II), en la Tabla 9 se presentan las variables morfométricas consideradas en este híbrido y se comparan estadísticamente mediante

prueba de Student para el caso especial de un ejemplar comparado con la muestra (Sokal y Rohlf, 1969). Las poblaciones con los que se compararon los híbridos son B. chilensis de La Dehesa, B. spinulosus de Farellones y de San Isidro (Mendoza) y B. arenarum de Mendoza. (Tabla 1).

El híbrido no muestra diferencias significativas de la talla respecto a las especies parentales. La extremidad posterior es significativamente más larga en el híbrido en la comparación con B. chilensis. ( $p < 0.05$ ). Con B. spinulosus, las diferencias son mayores ( $p < 0.02$ ). El diámetro timpánico es significativamente mayor en el híbrido que en B. chilensis ( $p < 0.05$ ) y no muestra diferencias con B. spinulosus. El sector anterior de la cabeza que corresponde a la distancia narina-hocico es menor ( $p < 0.05$ ) que en B. spinulosus. La distancia ojo-narina es mayor en el híbrido ( $p < 0.001$ ) que en las especies parentales. El ancho de la parótida, es significativamente menor en las especies parentales. ( $p < 0.05$ ). Exteriormente, el híbrido se puede identificar por la condición intermedia del color, cornificación de la piel, comparado con las especies parentales. B. spinulosus tiene una piel muy granulosa con formaciones glandulares cónicas muy densas y fuertemente cornificadas. (fig. 16). El patrón de coloración presenta manchas pequeñas, redondeadas. B. chilensis presenta piel áspera, con formaciones glandulares cónicas poco numerosas y la coloración de manchas

irregulares.

El cariotipo del híbrido muestra también la combinación de los genomas de las especies parentales. Este hecho queda evidenciado por la localización de la constricción secundaria de un cromosoma homólogo de los pares 7 y 11, en correspondencia con la localización de esta estructura cromosómica en los cariotipos de las especies parentales. Los pares 7 y 11 son en consecuencia heteromórficos en la combinación híbrida respecto a la localización de la constricción secundaria (fig. 15).

Híbrido B. spinulosus x B. arenarum (DBG UCH 197).

Ejemplar macho adulto (Lámina III y IV) para este híbrido también se muestran en la tabla 9 las variables morfométricas y se comparan con los valores promedio de estos caracteres de las especies parentales.

La talla del híbrido es mayor que B. spinulosus ( $p < 0.01$ ) y está comprendida en el rango de B. arenarum. La extremidad posterior es significativamente más larga en el híbrido que en ambas especies parentales,  $p < 0.02$  con B. arenarum y  $p < 0.001$  con B. spinulosus. El diámetro timpánico es menor en el híbrido que en B. arenarum ( $p < 0.01$ ) pero no muestra diferencias con B. spinulosus. La longitud de la parótida del híbrido es intermedia entre las especies parentales, tiene forma alargada como en B. arenarum pero es la mitad de su tamaño.

El desarrollo de las crestas óseas del cráneo es

intermedio en el híbrido, entre B. arenarum que es muy ornamentado y B. spinulosus que carece de ellas.

Otro caracter que tiene una condición intermedia es la piel, tanto en glándulas como en su grado de cornificación. (fig. 16). Este híbrido al igual que el de B. chilensis x B. spinulosus tiene en su cariotipo (fig. 15) la combinación de los genomas de las especies parentales. La localización de la constricción secundaria, en un cromosoma homólogo de los pares 7 y 11 corresponde a la localización de esta diferenciación de la estructura cromosómica en los cariotipos de las especies parentales.

La existencia de híbridos naturales adultos, sugiere un intercambio genético potencial entre estos y las especies parentales. Para verificar el estado reproductivo de los híbridos, se realizaron controles histológicos de la actividad espermatogénica, comparando la histología de las gónadas, de los híbridos (fig. 18) con ejemplares parentales adultos (fig. 17) provenientes de los mismos lugares de captura.

Los resultados de un análisis en que se contabilizan las células de 10 túbulos seminíferos tanto en ejemplares híbridos como en las especies parentales, se muestran en la tabla 10. El híbrido B. arenarum x B. spinulosus tiene un bajo N° de espermatogonios primarios respecto a las especies parentales. Sin embargo, los números de células de los compartimientos de espermatogonios II

y espermatocitos están incrementados. La espermiogénesis no muestra diferencias con las especies parentales.

En cambio en el híbrido B. spinulosus x B. chilensis, si bien los recuentos celulares son comparables a las especies parentales en cuanto a espermatogonios I y II y espermatocitos, los quistes celulares son asincrónicos, existe una mezcla de estados celulares diversos. Además, la espermiogénesis también está alterada, observándose ausencia de gavillas (espermátidas tardías). En el lumen de los túbulos seminíferos no hay espermios libres.

## D I S C U S I O N

Las especies del grupo spinulosus en Chile, pueden reconocerse por caracteres morfológicos y no morfológicos. Entre estos últimos son útiles evidencias serológicas (Cei, 1971) y también productos terminales del metabolismo de aminas biógenas de la piel. (Cei, et al.1968).

Al ser analizadas ocho variables de la morfología externa de muestras de machos provenientes de diversos puntos de la distribución geográfica, se observan diferencias entre poblaciones las que al ser jerarquizadas permiten establecer la correspondencia entre la diferenciación morfológica alcanzada y aspectos de la taxonomía evolutiva de estas especies.

El análisis poblacional de variables morfométricas entre B. chilensis, B. atacamensis y B. spinulosus, permite verificar que la variabilidad intraespecífica en poblaciones de B. chilensis es menor que en B. spinulosus. Además B. atacamensis se encuentra más proxima a B. chilensis que a B. spinulosus en su diferenciación morfológica. En B. spinulosus de Putre, población representada por ejemplares de talla pequeña, se observa una disminución proporcional de medidas de la cabeza, tales como distancia intertimpánica, distancia ojo-narina y narina-hocico. Sin embargo, los ejemplares muestran extremidades posteriores mas largas, lo que no esta en relación con el

tamaño del cuerpo. Tanto el ancho como el largo de la glándula parótida y el diámetro del tímpano están comprendidos en el rango determinado en poblaciones de mayor talla de las restantes localidades. La observación de la disminución de la talla en los ejemplares de Putre, fue señalada por Cei (1961). Vellard (1959) indica para las poblaciones de B. spinulosus del Perú, una disminución latitudinal de la talla, que en las formas del Altiplano Perú-Boliviano alcanza valores promedio semejantes a los de Putre. Las diferencias de tamaño y variación de parámetro de la morfología externa de la población de Putre respecto a las poblaciones del centro de Chile y San Isidro, pueden ser interpretadas como producto de la discontinuidad actual del poblamiento de esta especie entre las localidades de la Alta Puna y las de Chile Central y Argentina.

Al establecer la distancia fenética entre las especies del grupo spinulosus, se observa que hay una mayor similitud entre B. chilensis y B. atacamensis que entre estos y B. spinulosus, lo que estaría de acuerdo con el planteamiento de Cei (1971, 1972), respecto a una separación precoz de B. spinulosus de B. chilensis y B. atacamensis y la derivación de este último de las poblaciones de B. chilensis de la estepa central de Chile.

Bufo arenarum según Gallardo (1965) es una especie que a pesar de su amplia distribución, no tiene

grandes variaciones morfológicas externas al comparar sus distintas poblaciones. Para Cei (1971b), B. arenarum tiene una notable uniformidad taxogenética. Mediante análisis seroinmunológicos, este autor demuestra, al comparar diversas poblaciones, la existencia de tendencias clinales para las relaciones antigénicas y enfatiza en la dificultad de establecer conjuntos subespecíficos. Esta especie, al ser comparada con las del grupo spinulosus, muestra una mayor divergencia morfológica, la que se expresa en diferencias significativas en 5 de las 8 variables consideradas. Otras diferencias morfológicas entre esta especie y las del grupo spinulosus se refieren a caracteres cualitativos tales como la forma de la glándula parotoides y la ornamentación del cráneo.

En conjunto con los caracteres morfológicos anotados, que son habitualmente los utilizados en la diagnosis de estas especies y que proporcionan información relativa a afinidad taxonómica, hemos considerado los cromosomas, dado que a nivel del género Bufo hay una amplia muestra de su utilización (Bogart, 1972). Las especies sudamericanas del género muestran una gran estabilidad del número diploide  $2n = 22$  con cromosomas bibraquidos, especialmente metacéntricos y submetacéntricos. Cuando la estabilidad del número diploide no permite su utilización como caracter diferenciador entre especies, las modificaciones estructurales de determinados pares cromosómicos

pueden ser utilizados a nivel genérico como marcadores citogenéticos relevantes (Veloso, 1977). Una modificación estructural importante del cariotipo son las constricciones secundarias (C.S.). En los cariotipos de diversas especies, estas muestran una localización que define distintos pares o brazos cromosómicos marcadores.

En el cariotipo de las especies del grupo spinulosus, una lectura cuidadosa de la literatura, permite aportar las siguientes observaciones: En Bufo spinulosus de Mendoza-Argentina (Bogart, op. Cit.) sin localidad precisada, se reconocen 3 pares de cromosomas marcadores, portadores de C.S. Par 2 con C.S. submetacéntrica ubicada en el brazo corto, par 7 con C.S. subtelocéntrica o submetacéntrica en el brazo corto y par 3 con 2 C.S. localizadas ambas en el brazo largo. B. chilensis de Zapallar en la zona central de Chile, vecino a Valparaíso, tiene una sola C.S., localizada en el brazo largo del par 11. Por su parte B. atacamensis tiene la C.S. localizada en el brazo corto del par 7. Trabajando en estas mismas especies pero con ejemplares provenientes de otros lugares de la distribución, Formas (1978) encuentra algunas diferencias que señalamos a continuación. En B. chilensis de Santiago y Los Angeles (Bio-Bio) el par 7 en el brazo corto, es el portador de la C.S. Además, B. spinulosus de Malarque (al sur de Mendoza) tendría una sola C.S. localizada en el brazo corto del par 10, a diferencia

de los señalado por Bogart para sus ejemplares provenientes de Mendoza.

En B. arenarum (Bianchi 1964), muestra en ejemplares, sin indicación de proveniencia, que la C.S. sería única y localizada en el brazo corto de ambos homólogos del par 7. En esta especie Bogart (op. Cit.) señala además de la C.S. del par 7, una segunda constricción en el brazo largo del par 1.

Nuestros resultados muestran algunas diferencias con las observaciones precedentes: B. spinulosus de Putre, Baños Morales, Farellones en Chile y San Isidro (Mendoza) en Argentina, tiene un solo par portador de C.S. y este corresponde al 11. Respecto a B. chilensis, en muestras de 5 localidades de Chile Central se encontró solo una C.S., localizada en el brazo del par 7. Una C.S. presumiblemente homóloga de la anterior está también presente en B. atacamensis.

En B. arenarum de Mendoza (Argentina), solo se distingue una C.S. localizada en el par 7, no diferenciándose el cariotipo estudiado por nosotros del determinado por Bianchi (op. Cit).

De las observaciones precedentes, se desprende que la localización de la C.S. en estas especies es un caracter que puede variar según las poblaciones analizadas. Sin embargo, constricciones secundarias presumiblemente homologas se repiten en algunas de estas especies, es el

caso de la constricción secundaria del par 7 presente tanto en B. chilensis como en B. atacamensis y que se encuentra también en B. arenarum del grupo marinus. Además, las C.S. en los cromosomas marcadores se localizan tanto en brazos largos como brazos cortos. El hecho de que la C.S. se encuentre ubicada en distintos cromosomas y que su localización en los cromosomas sea tanto en los brazos largos como cortos, en estas especies congénéricas, permite especular respecto a los posibles mecanismos de reordenamiento que den cuenta de esta variación. Entre estos y para el caso particular de la localización de la C.S. en diferentes pares cromosómicos, pueden señalarse traslocaciones, mientras que la localización, ya sea en brazos largos como cortos apunta a Inversiones paracéntricas o traslocaciones que han modificado la estructura cromosómica de estas especies.

Estudios que utilizan la hibridización "in situ" DNA/RNA han demostrado en plantas y animales que la C.S. corresponde a la región organizadora del nucleolo o NOR, y que es la ubicación en los cromosomas, de los genes que codifican para el RNA ribosomal (DNA r) 18 s + 28 s (Pardue y Hsu, 1975). Esta correspondencia no se cumple siempre. En anuros se ha señalado que no todas las C.S. corresponden a la zona NOR. Pardue (1973) demostró mediante hibridización "in situ" en Xenopus mulleri, especie que tiene 2 pares de cromosomas con C.S., que solo una de ellas

corresponde al NOR.

Goodpasture y Bloom (1975) han demostrado que la técnica del Ag - As permite conocer las mismas áreas cromosómicas (NOR) que pueden ser puestos en evidencia con la técnica de hibridización "in situ". Esta identificación de la constricción secundaria como la zona organizadora del nucleolo, permite usar este sector (NOR) como marcador cromosómico importante, por su actividad funcional conocida.

En las especies del grupo spinulosus hemos encontrado que la C.S. se tiñe preferentemente con la tinción de Ag - As, lo que estaría de acuerdo con lo señalado por los autores antes mencionados. En estas especies se observa la zona NOR sólo en un par de cromosomas homólogos, en correspondencia con la C.S. B. spinulosus presenta una región NOR en el par 11, B. chilensis y B. atacamensis, la tiene en el par 7. La identificación de la zona NOR en B. arenarum fue recientemente señalada por Schmid (1978) en el par Nº7. También Beck y Mahan (1979) encontraron correspondencia entre la C.S. y la zona NOR en otras 4 especies de Bufo para un solo par de cromosomas homólogos.

Estas observaciones tomadas en conjunto, sugieren que en Bufo la condición generalizada es un solo par cromosómico portador de C.S. y en este se localiza el NOR.

En estas especies se ha observado variación en el tamaño del Ag - As. NOR, lo que está relacionado con

heteromorfismo de la C.S. Este heteromorfismo, que consiste en una desigualdad entre homólogos de este sector cromosómico, podría estar en relación con variación en el contenido de DNA r, hecho que ha sido señalado por Miller y Brown (1969) en otras especies de Bufo.

Resultados preliminares de Hibridización "in situ" en especies de leptodactílidos, con RNAr 18 s y 28 s triado revelan diferencias en el tamaño de la marca autoradiográfica en uno de los cromosomas homólogos. La diferencia en el tamaño del Ag - As NOR, indicaría la presencia de distinta cantidad de DNA r en las C.S. de estas especies. Sin embargo, no puede descartarse que la diferencia del tamaño revelada por Ag - As, sea también expresión de una mayor actividad funcional de algunos de los NOR (Iturra y Veloso, en prensa).

El análisis fenotípico de las especies de Bufo, aquí estudiadas pone en evidencia la variabilidad de la morfología externa y de los cariotipos. Si se jerarquiza la variabilidad encontrada entre poblaciones, se observa que esta fundamenta un esquema de relaciones taxogenéticas estableciéndose gradualmente una similitud, que va desde diferencias menores entre poblaciones de una misma especie a diferencias mayores que separan el grupo spinulosus de B. arenarum del grupo marinus.

La afinidad taxonómica demostrada en el análisis fenotípico precedente, se puso a prueba con los experimentos

de compatibilidad genética. Los resultados encontrados son una estimación de afinidad genómica entre especies parentales. Blair (1973) después de un extenso trabajo de compatibilidad genética en Bufo, concluye que las especies de reciente divergencia evolutiva o cuyas afinidades hayan sido demostradas por similitud morfológica, son generalmente estériles. No obstante, nuestros resultados muestran que la compatibilidad genética en el grupo spinulosus es elevada, demostrada por el 70% de sobrevida hasta la etapa de larva y por el alto número de híbridos metamorfoseados. Esta evidencia solo puede interpretarse como un alto grado de similitud genética preservada en el grupo. Por otra parte en los cruzamientos de B. arenarum (grupo marinus) con las especies del grupo spinulosus, el porcentaje de sobrevida desciende al 40% cuando el sentido del cruzamiento corresponde a ♀ B. spinulosus x ♂ B. arenarum. Este último a su vez puede interpretarse como una distancia genética mayor entre especies parentales. Sin embargo, en el recíproco entre estas especies, el porcentaje sube a un 80%, lo que indica la importancia de considerar en estas estimaciones el sexo de los progenitores. A la disminución de porcentajes de sobrevida señalada, se agregan los resultados de los cruzamientos entre B. arenarum y B. atacamensis, donde se observan híbridos malformados, lo que refuerza la hipótesis de una distancia mayor de arenarum con las especies del grupo

spinulosus.

El método de la hibridización experimental tiene limitaciones. Además de la dificultad señalada de que se presentan diferencias en sobrevivencia entre cruzamientos recíprocos, para cuya explicación se ha recurrido a señalar diferencias citoplasmáticas en los huevos de las hembras parentales (Blair, 1973), deja también fuera de acción los mecanismos de aislamiento reproductor precopulatorios (Mayr, 1969) que puedan existir entre estas especies en condiciones naturales y que en último término son los responsables de la mantención de las respectivas identidades genómicas. Además, las estimaciones de la compatibilidad genómica al ser realizadas considerando sólo hasta la etapa de metamorfosis, sólo constituyen una evidencia parcial ya que es posible que la divergencia genómica pueda surgir en etapas posteriores, ya sea deteniendo el desarrollo de los híbridos antes que estos alcancen la edad adulta o bien produciendo combinaciones estériles.

Tomando en consideración, los altos porcentajes de fecundación y metamorfosis obtenidos de los cruzamientos, puede suponerse que la hibridización en condiciones naturales es un riesgo potencial en las zonas de poblamiento donde estas especies sobreponen su distribución geográfica..

La hibridización natural ocurre pero los híbridos son extraordinariamente escasos. Sólo en dos ejemplares

adultos machos se ha detectado la condición híbrida, la que fue puesta en evidencia mediante un análisis de la morfología externa, los cromosomas y observaciones de las características de las vocalizaciones emitidas. (Veloso et al, 1978).

Estos híbridos naturales, permiten extender en forma preliminar el estudio de la compatibilidad genética hasta la etapa adulta.

El cuadro histológico de la gónada de los ejemplares híbridos adultos de B. spinulosus x B. chilensis comparado con la gametogénesis en las especies parentales, muestra alteraciones de la espermiogénesis, con asincronía de estados celulares en los quistes y ausencia de espermátidas en fases finales de maduración. Esto significa una barrera importante en su fertilidad y da cuenta de un posible mecanismo de aislamiento reproductor por esterilidad de la combinación híbrida. La histología de la gonada del híbrido B. spinulosus x B. arenarum, muestra en cambio características normales, reconociéndose todos los estados celulares de la gametogénesis. Desde el punto de vista histológico, este ejemplar híbrido es potencialmente fértil. Observaciones de terreno (Veloso, datos no publicados), permitirían diferenciar esta situación de la precedente: B. arenarum a diferencia de B. spinulosus emite durante la actividad reproductiva vocalizaciones cuyo significado funcional es la atracción de

pareja homoespecífica. (Brown y Guttman, 1970). De esta forma, la hibridización en condiciones naturales de B. spinulosus x B. arenarum demostraría la ruptura de un mecanismo de aislamiento reproductor primario.

Estas observaciones relacionadas con aspectos de la reproducción y fertilidad de ejemplares híbridos se deben considerar, preliminares. La extensión del fenómeno de hibridización natural y su posible papel en la variabilidad genética de las especies parentales requiere de más información tanto de observaciones de terreno como de laboratorio.

Otro aspecto importante del hallazgo de estos híbridos intragenéricos naturales es que el estudio de su fenotipo proporciona información respecto a los mecanismos genéticos de la repartición de los caracteres parentales en la forma híbrida. En el fenotipo de los híbridos se observan caracteres que están presentes en las especies parentales y otros que son propios de la combinación híbrida. Estos caracteres de la morfología externa se refieren tanto a proporciones, como a detalles de la osteología y/u órganos de la piel (parotoides) y los cromosomas.

La variación fenotípica de los híbridos, muestra que la expresión de los diversos caracteres cuantitativos se superpone en diverso grado con proporciones observadas en el rango de variación poblacional de las especies

parentales. Caracteres tales como la talla, ancho de la glándula parótida, distancia intertimpánica, diámetro del tímpano y distancia narina-hocico, permiten discriminar entre la combinación híbrida y solo una de las especies parentales. Estos caracteres los llamaremos de tipo A. Otros caracteres, tales como el largo de la glándula parotoides, la cornificación y detalles glandulares de la piel en ambas combinaciones híbridas y la distancia ojo-narina, en la combinación spinulosus x arenarum (tipo B), presentan una condición claramente intermedia. El último grupo de caracteres (tipo C) son caracteres propios de la combinación híbrida en el sentido de que permiten separar los híbridos de ambas especies parentales. Estos son, B. spinulosus x B. chilensis la forma de la parotoides y la distancia ojo-narina y para spinulosus x arenarum la longitud de la extremidad posterior.

La variabilidad de los caracteres morfométricos estudiados sugiere que son el resultado de modificaciones de un sistema de múltiples genes. Los caracteres tipo A y B en el híbrido son posiblemente el resultado de un sistema de poligenes con cantidades diversas de alelos en ambas especies parentales. Los caracteres tipo C en tanto, requieren para ser interpretados una hipótesis diferente. Esta consistiría en suponer la regulación de su expresión por un mecanismo genético complejo que posiblemente induzca alguna forma de interacción génica entre

ambas especies parentales.

Finalmente, el análisis de estos híbridos, desde el punto de vista de los cromosomas, y en particular de la región NOR es una evidencia de la actividad funcional de los cistrones de DNAr en ambas especies parentales, lo que agrega nueva evidencia al problema de la relación genómica entre estas especies.

En forma independiente a los caracteres fenotípicos externos, las observaciones cromosómicas en especial la que se refiere al marcador cromosómico que es la zona NOR, aportan nuevos antecedentes que demuestran interacción genética en el híbrido, entre especies parentales. En las combinaciones híbridas, los cistrones de DNAr de ambas especies parentales mostrarían actividad transcripcional. Sin embargo, la falta de estudios moleculares que permitan identificar resultados de la transcripción, nos hace ser extremadamente cautos. Honjo y Reeder (1973), han observado que los genes ribosomales de Xenopus mulleri, en un cruzamiento interespecífico X. mulleri x X. leevis, están reprimidos. Un comportamiento similar en la actividad de estos cistrones, fué observado en híbridos de cultivos celulares ratón-humano. (Miller et. al. 1976). La condición observada en nuestras combinaciones híbridas estaría sin embargo de acuerdo con lo observado en híbridos de subespecies de la planta Phlox pilosa (Levin, 1973), y también en cultivos celulares rata-ratón (Kuter y Rodgers,

1975) donde en las células híbridas se producen ribosomas a partir de ambos genomas parentales.

No obstante las limitaciones del presente estudio derivadas principalmente del escaso número de híbridos analizados y la falta de evidencias moleculares para productos de la transcripción de cistrones de DNAr, la conclusión general que puede obtenerse, es que mediante el análisis de caracteres fenotípicos externos y cromosómicos de los híbridos, se establece una gran afinidad entre estas especies del género Bufo, situación que queda evidenciada por las múltiples interacciones génicas que las observaciones realizadas sugieren.

## C O N C L U S I O N E S

1. El análisis de variables morfométricas muestra una menor variación intraespecífica en B. chilensis que en B. spinulosus.
2. El estudio biométrico, conjuntamente con variables cualitativas de la piel, osteología y los cromosomas, muestra un grado de diferenciación menor entre B. chilensis y B. atacamensis que entre estos y B. spinulosus.
3. Las características precedentes a las que se agregan la forma de la glándula parotoides y la ornamentación del cráneo, diferencian a B. arenarum del grupo marinus de las especies del grupo spinulosus.
4. En los ejemplares estudiados solo hay un par cromosómico portador de la constricción secundaria (C.S.).
5. La particular localización de la C.S. en los cariotipos de las especies del grupo spinulosus podría ser el resultado de reordenamientos cromosómicos.
6. La región organizadora del nucleolo (NOR) está localizada en correspondencia con la C.S.
7. La hibridización experimental muestra altos niveles de compatibilidad genómica entre las diversas especies parentales.
8. La compatibilidad genómica entre especies del grupo spinulosus refuerza el esquema de similitud fenética encontrado.

9. Una diferencia genómica mayor separa a B. arenarum de las especies del grupo spinulosus.
10. La hibridización en condiciones naturales se produce entre B. spinulosus y B. chilensis o B. arenarum como consecuencia de la sobreposición ocasional de sus áreas de distribución.
11. La circunstancia que permite la hibridización en condiciones naturales es la sobreposición del período reproductor.
12. El híbrido B. spinulosus x B. chilensis es estéril, presenta un bloqueo de la espermatogénesis que corresponde a la espermiogénesis.

A G R A D E C I M I E N T O

Al Dr. Alberto Veloso, toda mi gratitud por su constante preocupación, por su estímulo y guía sin el cual este trabajo no se hubiera podido realizar. Por su amistad y apoyo en todo momento.

A la srta. Patricia Iturra T.M. por sus enseñanzas en técnicas de laboratorio y su permanente preocupación y ayuda en la realización de este trabajo.

Al Dr. Carlos Valenzuela por su ayuda en el análisis biométrico.

Al Dr. Eduardo Bustos por sus sugerencias sobre reproducción y fertilidad de los híbridos.

Al Dr. José Valencia por sus valiosas sugerencias en la corrección de este manuscrito.

A todos los investigadores del laboratorio de Vertebrados del Depto. de Biol. Cel. y Genética de la Fac. de Medicina. Sede Norte. por sus criticas constructivas.

Esta tesis fué parcialmente financiado por el Servicio de Desarrollo Científico, Artístico y de Cooperación Internacional de la Universidad de Chile - Proyectos B 206-784, B 206-795 del Dr. Alberto Veloso.

R E F E R E N C I A S B I B L I O G R A F I C A S

- Bianchi, N.O., Longuens, R. 1964. Somatic chromosomes of Bufo arenarum. Cytología, 29:151-154.
- Bianchi, N.O., Molina, J.O., 1967. DNA replication pattern in somatic chromosomes of Leptodactylus ocellatus (Amphibia, Anura) Chromosoma 22:391-400.
- Beck, M.L., Mahan, J.T. 1979. Ammoniacal Silver Staining of nucleolar Organizer Regions in four Species of Bufo. Copeia, (2):341-345.
- Blair, F.W. 1972a: Evolution in the Genus Bufo. Univ. of Texas Press. Austin.
- Blair, F.W. 1972b. Evidence from Hibridization. En Evolución in the genus Bufo. Univ. of Texas Press. Austin.
- 1973 Hibridización como una técnica de evolución biológica. Caldasia, XI:63-72.
- Bogart, J.P. 1972. Karyotypes. En Evolution in the genus Bufo. Univ. of Texas Press. Austin.
- 1973 Method for obtaining chromosomes. Caldasia, XI:29-40.
- Brown, L.R. Guttman, S.I. 1970. Natural Hybridization between the Toads Bufo arenarum and Bufo spinulosus in Argentina. The Amer. Midland. Natur. 83:160-166.

- Cei, J.M. 1960. Geographic Variation of Bufo spinulosus in Chile. *Herpetologica* 16:243-250.
1961. Bufo arunco (Molina) y las formas chilenas de Bufo spinulosus Wiegmann. *Inv. Zool. Chilenas*. VII:59-82.
1962. Batracios de Chile. Ediciones de la Univ. de Chile.
- Cei, J.M. 1971a. Análisis sero-inmunológico de diferentes niveles de especialización en Bufo del grupo spinulosus. *Act. Zool. Lillo.*:28:91-105.
- Cei, J.M. 1971b. Análisis sero-inmunológico de la variación geográfica en el conjunto poblacional de Bufo arenarum. *Act. Zool. Lillo.* 28:163-173.
- Cei, J.M. 1972. Bufo of South América. En evolution in the genus Bufo. Univ. of Texas Press. Eds.
- Cei, J.M. Erspamer, V., Roseghini, M. 1968. Taxonomic and evolutionary significance of Biogenic amines and polipeptides in Amphibian skin. Toads of the genera Bufo and Melanophryniscus. *Syst. Zool.* 17:232-245.
- Duellman, W.E., Veloso, M.A. 1977. Phylogeny of Pleurodema (Anura Leptodactylidae): A Biogeographic model. *Occas. pap. Mus. Nat. Hist. Univ. Kansas* 64:1-46.
- Formas, J.R. 1978. The chromosomes of Bufo rubro-punctatus and Bufo chilensis (Anura, Bufonidae) and other species of the spinulosus group. *Experientia* 34:452-454.

- Gallardo, J.M. 1965. Especiación en tres Bufos Neotropicales (Amphibia, Anura). Papeis Avulsos Dep. Zool. (Sao Paulo) 17:57-75.
- Goodpasture, C. Bloom, S.E. 1975. Visualization of Nucleolar Organizer Regions in Mammalian Chromosomes using Silver staining. Chromosoma (Berl) 53:37-50.
- Honjo, T., Reeder, H.R. 1973. Preferential Transcription of Xenopus laevis Ribosomal RNA in Interspecies Hybrids between Xenopus mulleri. J. Mol. Biol. 80:217-228.
- Hsu, T.C., Spirito, S.E., Pardue, M.L. 1975. Distribution of 18S and 28S ribosomal genes in mammalian genomes. Chromosoma (Berl) 53: 25-36.
- Iturra C.P, Veloso M.A. Localización de la zona organizadora del nucleolo (NOR) en cromosomas metafísicos de Anfibios.  
Rev. Mic. Electr. 5 (2) (8 pag. En prensa)
- Kuter, D.J., Rodgers, A. 1975. The synthesis of ribosomal protein and ribosomal RNA in a Rat-Mouse hybrid Cell line Exptl. Cell Res. 91:317-325.
- Levan, A., Fredga, F., Sandberg, A.A. 1964. Nomenclature for centromeric positions on chromosomes. Hereditas 52:201-220.
- Levin, A.D. 1973. Accessory Nucleoli in Microsporocytes of hybrid Phlox. chromosoma 41:413-420.

- Lidicker, W.Z. jr. 1962. The nature of Subspecies Bounderies in a Desert Rodent and its implications for subspecies Taxonomy. Syst. Zool. 11:160-171.
- Martin, R.F. 1972. Evidence from Osteology. En Evolution in the genus Bufo. Univ. of Texas Press.
- Mayr, E. 1969. The population, its variation and Genetics. En Animal Species and Evolution. Oxford Univ. Press.
- Miller, L., Brown, D.D. 1969. Variation in the activity of nucleolar organizer and their ribosomal gene content. Chromosoma 28:430-444.
- Miller, O.J., Miller, D.A., Dev, V.G. Tantravahi R., Croce, C.M. 1976. Expression of human and suppression of mouse nucleolus organizer activity in mouse-human, somatic cell hybrids. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 73:4531-4535.
- Morrison, 1967. Multivariate statistical Methods. Mc Graw-Hill series in Probability and statistics.
- Pardue, M.L. 1973. Localization of repeated DNA sequencies in Xenopus chromosomes. Cold. Spring Harb. Symp. Cuant Biol. 38:476-482.
- Pardue, M.L., Hsu, T.C. 1975. Location of 18s and 28s ribosomal genes on the Chromosomes of the Indian muntjac, J.Cell. Biol. 64:251-254.
- Silva, F., Veloso, A., Solervicens, G., Ortiz, J.C. 1968. Investigaciones Zoológicas en el parque Nacional

- Vicente Pérez Rozales y Zona de Parçua. Not. Mens. Mus. Hist. Nat. Chile. 148:3-12.
- Schimid, M. 1978. Chromosome Banding in Amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in Bufo and Hyla. Chromosoma 66:361-388.
- Snedecor and Cochran. 1978. Statistical Methods. Iowa State Univ. Press. Eds.
- Sokal, R.R., Rohlf, I.F. 1969. BIOMETRY. W.H. Freeman & Co. Eds.
- Trueb, L. 1973. Bones, Frogs and Evolution. in Evolutionary Biology of the Anurans. Ed. James L. Vial. Univ. of Missouri Press.
- Valencia, J.D. 1962. Tablas de desarrollo de B. spinulosus en Batracios de Chile. Cei, J.M. Ed. de la Univ. de Chile.
- Veloso, M.A. 1973. Respuesta cardíaca a la inmersión en diferentes Especies de Anuros Chilenos. Caldasia, 11:129-137.
- Veloso, M.A. 1977. Aggressive Behavior and the Generic relationships of Caudiverbera caudiverbera (Amphibia, Leptodactylidae). Herpetológica 33:434-442.
- Veloso, M.A., Mezey, A., Penna, M. Híbridos Naturales y experimentales en el grupo spinulosus (Amphibia, Bufonidae). Arch. Med. Biol. Exp. 11:218.

Vellard, J. 1959. El género Bufo V, Estudios sobre batracios Andinos Mem. Mus. Hist. Nat. Javier Prado.  
8:1-48.

T A B L A N° 1

MEDICIONES DE PARAMETROS DE LA MORFOLOGIA EXTERNA EN 8 POBLACIONES DE BUFO\*

ESPECIE (Población)	N	LGO. TOTAL $\bar{x} \pm 2E.S.$ (RANGO)	EXT. POSTERIOR $\bar{x} \pm 2E.S.$ (RANGO)	INTERTIMPANICA $\bar{x} \pm 2E.S.$ (RANGO)	DIAM. TIMPANO $\bar{x} \pm 2E.S.$ (RANGO)	NARINA-HOCICO $\bar{x} \pm 2E.S.$ (RANGO)	OJO-NARINA $\bar{x} \pm 2E.S.$ (RANGO)	ANCHO GLANDULA $\bar{x} \pm 2E.S.$ (RANGO)	LGO. GLANDULA $\bar{x} \pm 2E.S.$ (RANGO)
<i>B. chilensis</i> (La Dehesa)	25	88.67 ± 2.07 (79.75 - 96.95)	103.68 ± 2.42 (95.05 - 117.60)	27.20 ± 0.50 (25.05 - 29.65)	2.79 ± 0.17 (2.00 - 3.50)	6.53 ± 0.19 (5.80 - 7.75)	4.48 ± 0.11 (3.95 - 5.15)	9.06 ± 0.44 (7.05 - 11.35)	10.23 ± 0.58 (7.80 - 13.05)
<i>B. chilensis</i> (Quilimarí)	25	87.92 ± 2.27 (78.75 - 103.80)	98.03 ± 2.27 (87.65 - 109.50)	26.31 ± 0.70 (23.95 - 31.33)	3.09 ± 0.38 (2.35 - 3.90)	6.11 ± 0.27 (5.35 - 7.75)	4.49 ± 0.24 (3.80 - 5.90)	8.10 ± 0.54 (6.30 - 12.80)	9.77 ± 0.54 (7.90 - 12.40)
<i>B. atacamensis</i> (Yallénar)	30	79.97 ± 2.24 (65.20 - 91.40)	93.80 ± 2.18 (78.05 - 103.75)	25.28 ± 0.54 (22.40 - 28.29)	2.15 ± 0.11 (1.45 - 2.65)	5.33 ± 0.22 (4.40 - 6.90)	4.71 ± 0.12 (4.25 - 5.60)	7.38 ± 0.26 (5.30 - 10.70)	8.73 ± 0.53 (6.30 - 12.90)
<i>B. spinulosus</i> (Baños Morales)	10	80.53 ± 1.83 (74.40 - 83.85)	105.07 ± 2.99 (100.20 - 112.80)	25.09 ± 0.71 (23.55 - 26.80)	3.07 ± 0.32 (2.20 - 3.90)	6.47 ± 0.26 (5.55 - 7.05)	4.98 ± 0.19 (4.55 - 5.40)	5.98 ± 0.28 (5.25 - 6.65)	7.20 ± 0.50 (5.60 - 8.50)
<i>B. spinulosus</i> (Farellones)	25	86.91 ± 1.28 (80.25 - 92.45)	104.39 ± 1.97 (95.65 - 112.55)	26.54 ± 0.51 (23.30 - 29.00)	3.09 ± 0.16 (2.20 - 3.85)	6.96 ± 0.20 (5.70 - 8.10)	3.78 ± 0.12 (3.20 - 4.30)	7.60 ± 0.25 (6.40 - 8.85)	7.72 ± 0.27 (5.90 - 9.00)
<i>B. spinulosus</i> (San Isidro) Mendoza	17	81.09 ± 2.16 (74.00 - 89.25)	102.50 ± 2.20 (97.30 - 114.00)	25.82 ± 0.59 *(24.05 - 28.85)	3.07 ± 0.24 (2.30 - 4.00)	6.26 ± 0.20 (5.70 - 7.10)	4.02 ± 0.20 (3.50 - 5.05)	6.84 ± 0.25 (5.45 - 7.45)	7.88 ± 0.36 (6.35 - 9.05)
<i>B. spinulosus</i> (Putre)	10	69.52 ± 2.00 (64.10 - 74.10)	91.28 ± 2.57 (84.85 - 97.70)	22.16 ± 0.43 (21.00 - 23.05)	2.76 ± 0.18 (2.20 - 3.20)	5.45 ± 0.30 (4.60 - 6.20)	3.11 ± 0.17 (2.75 - 3.60)	6.10 ± 0.36 (5.30 - 7.15)	6.78 ± 0.61 (5.20 - 8.30)
<i>B. arenarum</i> (Mendoza)	14	97.88 ± 0.98 (87.10 - 106.00)	112.52 ± 0.86 (103.10 - 121.65)	28.55 ± 0.22 (26.30 - 31.47)	5.35 ± 0.06 (4.50 ± 5.85)	8.06 ± 0.10 (6.60 - 8.90)	4.99 ± 0.06 (3.80 - 5.85)	8.33 ± 0.18 (5.35 - 10.10)	23.79 ± 0.30 (19.30 - 23.30)

\* LAS MEDICIONES ESTAN EXPRESADAS EN mm

T A B L A N° 2

COEFICIENTE DE VARIACION (C.V.) DE LAS MEDICIONES (%)

VARIABLES POBLACIONES	LARGO TOTAL	EXT. POSTERIOR	INTERTIMPANICO	DIAM. TIMPANO	OJO-NARINA	NARINA-HOCICO	ANCHO GLANDULA	LARGO GLANDULA
<i>B. chilensis</i> La Dehesa	5.83	5.84	4.63	15.05	7.14	6.03	12.14	14.27
<i>B. chilensis</i> Quilimarí	6.96	5.78	6.49	12.34	11.13	13.36	16.67	13.92
<i>B. atacamensis</i> Vallena	7.68	6.36	5.81	13.95	10.37	6.79	17.07	16.49
<i>B. spinulosus</i> Forellones	3.68	4.71	4.82	12.94	7.18	7.94	8.29	8.68
<i>B. spinulosus</i> Baños Morales	3.60	4.49	4.50	16.61	6.34	6.02	7.36	10.97
<i>B. spinulosus</i> Putre	4.55	4.45	3.43	10.51	8.62	8.68	9.34	14.16
<i>B. spinulosus</i> San Isidro (Mendoza)	5.50	4.43	4.69	16.29	6.55	10.20	7.60	9.52
<i>B. arenarum</i> Mendoza	7.06	5.41	5.32	6.89	7.82	9.22	15.16	9.04

TABLA 3a VARIABLES DISCRIMINANTES ENTRE POBLACIONES DEL GRUPO *SPINULOSUS* (TEST DE SCHEFFE)

VARIABLES POBLACION	LARGO TOTAL	EXT. POSTERIOR	INTERTIMPANICA	DIAM. TIMPANO	OJO-NARINA	NARINA-HOCICO	ANCHO GLANDULA	LARGO GLANDULA
	La Dehesa Quilimarí	-	+	-	-	-	-	-
La Dehesa Vallenar	+	+	+	+	-	+	+	+
La Dehesa Baños Morales	+	-	+	-	-	-	+	+
La Dehesa Farellones	-	-	-	-	+	-	+	+
La Dehesa San Isidro, Mza.	+	-	-	-	+	-	+	+
La Dehesa Putre	+	+	+	-	+	+	+	+
Quilimarí Vallenar	+	-	-	+	-	-	-	-
Quilimarí Baños Morales	+	-	-	-	-	-	+	+
Quilimarí Farellones	-	+	-	-	+	+	-	+
Quilimarí San Isidro, Mza.	+	-	-	-	+	-	+	+
Quilimarí Putre	+	-	+	-	+	-	+	+
Vallenar Baños Morales	-	+	-	+	-	-	+	-
Vallenar Farellones	+	+	-	+	+	+	-	-
Vallenar San Isidro, Mza.	-	+	-	+	+	-	-	-
Vallenar Putre	+	-	+	-	+	-	-	+
Baños Morales Farellones	-	-	-	-	+	-	+	-
Baños Morales San Isidro, Mza.	-	-	-	-	+	-	-	-
Baños Morales Putre	+	+	+	-	+	-	-	-
Farellones San Isidro	+	-	-	-	-	+	-	-
Farellones Putre	+	+	+	-	+	+	-	-
San Isidro, Mza. Putre	+	+	+	-	+	-	-	-

- = NO HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LAS POBLACIONES CONSIDERADAS PARA LAS DISTINTAS VARIABLES  
 + = HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LAS POBLACIONES CONSIDERADAS  $p < 0.05$ .

T A B L A N° 3b

VARIABLES DISCRIMINANTES ENTRE POBLACIONES DEL GRUPO  
*SPINULOSUS* Y *B. arenarum* (TEST DE SCHEFFE)

VARIABLE POBLACION	LARGO TOTAL	EXT. POSTERIOR	INTERTIMPANICA	DIAM. TIMPANO	OJO-NARINA	NARINA-HOCICO	ANCHO GLANDULA	LARGO GLANDULA
	<i>B. arenarum</i> <i>B. chilensis</i> (La Dehesa)	+	+	-	+	-	+	-
<i>B. arenarum</i> <i>B. chilensis</i> (Quilimarí)	+	+	-	+	-	+	-	+
<i>B. arenarum</i> <i>B. atacamensis</i> (Vallenar)	+	+	+	+	-	+	-	+
<i>B. arenarum</i> <i>B. spinulosus</i> (Baños Morales)	+	-	+	+	-	+	+	+
<i>B. arenarum</i> <i>B. spinulosus</i> (Farellones)	+	+	-	+	+	+	-	+
<i>B. arenarum</i> <i>B. spinulosus</i> (San Isidro, Mza.)	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. arenarum</i> <i>B. spinulosus</i> (Putre)	+	+	+	+	+	+	+	+

- =NO HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE POBLACIONES  
 + =HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE POBLACIONES  $p < 0.01$

RESULTADOS DE TEST DE HOTTELING-t<sup>2</sup> VALORES DE F\*

POBLACIONES	<i>B. chilensis</i>			<i>B. atacamensis</i>			<i>B. spinulosus</i>		
	La Dehesa	Quillimarí	Vallenar	Farellones	Baños Morales	San Isidro (Mendoza)	Putre		
La Dehesa									
Quillimarí	5-512								
Vallenar	9-649	16-396							
Farellones	22-579	30-805	30-843						
Baños Morales	23-650	18-536	14-099	11-610					
San Isidro	18-429	12-494	15-001	13-156	10-520				
Putre	22-714	14-166	9-517	28-093	6-832	9-408			

\* TODOS LOS VALORES DE F SON SIGNIFICATIVOS CON UNA P < 0.01

T A B L A N° 5

DISTANCIA DE MAHALANOBIS ( $D^2$ ) ENTRE 7 POBLACIONES DE BUFO

POBLACIONES	<i>B. chilensis</i>		<i>B. atacamenis</i>		<i>B. spinulosus</i>		
	La Dehesa	Quilimarí	Vallenar	Farellones	Baños Morales	San Isidro (Mendoza)	Putre
La Dehesa							
Quilimarí	20						
Vallenar	26	34					
Farellones	41	49	46				
Baños Morales	58	51	44	41			
San Isidro	42	34	37	35	44		
Putre	57	45	36	63	42	41	

T A B L A N° 6  
 MEDICIONES DE LOS COMPLEMENTOS CROMOSOMICOS HAPLOIDES DE  
 ESPECIES DEL GENERO BUFO

ESPECIE	CROMOSOMAS N°										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	M ± E.S.	M ± E.S.	M ± E.S.	M ± E.S.	M ± E.S.	M ± E.S.	M ± E.S.	M ± E.S.	M ± E.S.	M ± E.S.	M ± E.S.
<i>B. chilensis</i>	r 1.17 ± .023 % 16.68	1.11 ± .019 15.57	1.36 ± .029 13.20	1.70 ± .031 12.14	1.12 ± .031 10.90	1.29 ± .028 8.57	1.26 ± .041 6.24	1.29 ± .018 5.26	1.09 ± .015 4.91	1.12 ± .016 3.72	1.18 ± .031 2.57
<i>B. atacamensis</i>	r 1.20 ± .022 % 16.66	1.19 ± .020 15.56	1.31 ± .023 13.16	1.67 ± .036 12.03 <sub>m</sub>	1.14 ± .026 11.20	1.20 ± .020 8.30	1.18 ± .024 6.22	1.21 ± .031 5.22	1.16 ± .018 4.77	1.13 ± .016 3.84	1.18 ± .024 3.05
<i>B. spinulosus</i>	r 1.28 ± .038 % 17.78	1.23 ± .026 16.44	1.45 ± .043 13.96	1.71 ± .054 12.62	1.11 ± .024 10.61	1.44 ± .028 7.76	1.67 ± .040 4.89	1.17 ± .022 4.85	1.17 ± .028 4.23	1.10 ± .019 3.38	1.01 ± .028 3.37
<i>B. arenarum</i>	r 1.31 ± .016 % 17.06	1.16 ± .013 15.80	1.46 ± .010 13.32	1.82 ± .019 11.75	1.14 ± .007 10.80	1.32 ± .012 7.65	1.12 ± .013 6.19	1.16 ± .009 4.70	1.17 ± .012 4.23	1.10 ± .007 2.94	1.11 ± .006 2.62
TIPO	m	m	m	sm	m	m	m	m	m	m	m

r = B. largo/B. corto

% = EL PORCENTAJE DEL PAR CROMOSOMICO CON RESPECTO AL TOTAL DE LOS CROMOSOMAS

m = METACENTRICO

sm = SUBMETACENTRICO

T A B L A N° 7

EXPERIMENTOS DE HIBRIDIZACION ENTRE ESPECIES DEL GENERO *BULO*

COMBINACION	CRUZAMIENTO		N° DE HUEVOS		FECUNDACION		GASTRULA		LARVA	
	N°		N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
♀ <i>B. spinulosus</i>	038		398		314	78,9	312	99,4	261	83,7
♂ <i>B. spinulosus</i>										
♀ <i>B. chilensis</i>	036		165	100	165	100	160	97,0	157	98,1
♂ <i>B. chilensis</i>										
♀ <i>B. arenarum</i>	031		616	100	616	100	608	98,7	576	94,7
♂ <i>B. arenarum</i>										
HIBRIDOS										
♀ <i>B. spinulosus</i>	040		302	70,5	213	70,5	200	93,9	169	84,5
♂ <i>B. chilensis</i>										
♀ <i>B. chilensis</i>	026		89	100	89	100	82	92,13	61	74,4
♂ <i>B. spinulosus</i>										
♀ <i>B. spinulosus</i>	039		671	86,7	582	86,7	571	98,1	215	37,7
♂ <i>B. arenarum</i>										
♀ <i>B. arenarum</i>	033		368	93,2	343	93,2	336	98,0	310	92,3
♂ <i>B. spinulosus</i>										
♀ <i>B. spinulosus</i>	015		294	94,89	279	94,89	262	93,90	210	80,15
♂ <i>B. atacamenensis</i>										
♀ <i>B. chilensis</i>	022		334	97,90	327	97,90	323	98,77	316	97,83
♂ <i>B. atacamenensis</i>										
♀ <i>B. arenarum</i>	035		440	97,5	429	97,5	371	86,48	350	94,33
♂ <i>B. atacamenensis</i>										

% DE SOBREVIDA (MEJOR CRUZAMIENTO) RESPECTO A ETAPA ANTERIOR DEL DESARROLLO

T A B L A N° 8

METAMORFOSIS DE HIBRIDOS EXPERIMENTALES ENTRE ESPECIES DEL GENERO *BUFO*

COMBINACION	CRUZAMIENTO N°	LARVAS N°	METAMORFOSIS N°	METAMORFOSIS %
♀ <i>B. spinulosus</i> ♂ <i>B. spinulosus</i>	038-2	50	38	76,00
♀ <i>B. chilensis</i> ♂ <i>B. chilensis</i>	036-1	32	32	100
♀ <i>B. arenarum</i> ♂ <i>B. arenarum</i>	031-6	40	39	97,5
<b>HIBRIDOS</b>				
♀ <i>B. chilensis</i> ♂ <i>B. spinulosus</i>	028-2	70	66	94,28
♀ <i>B. chilensis</i> ♂ <i>B. atacamensis</i>	030-1	22	16	72,72
♀ <i>B. spinulosus</i> ♂ <i>B. chilensis</i>	040-2	50	34	68,00
♀ <i>B. spinulosus</i> ♂ <i>B. atacamensis</i>	015-1	57	31	54,39
♀ <i>B. spinulosus</i> ♂ <i>B. arenarum</i>	039-1	40	16	40,00
♀ <i>B. arenarum</i> ♂ <i>B. spinulosus</i>	032-1	60	52	86,66
♀ <i>B. arenarum</i> ♂ <i>B. atacamensis</i>	035-1	48	31	64,58

% DE SOBREVIDA, CRITERIO DE MEJOR BANDEJA.

T A B L A N° 9

MEDICIONES DE CARACTERES DE LA MORFOLOGIA EXTERNA\*

HIBRIDOS NATURALES *Bufo spinulosus* x *B. chilensis* y *B. spinulosus* x *B. arenarum*

HIBRIDOS (localidad)	LARGO TOTAL	EXT. POSTERIOR	INTER- TIMPANICA	DIAM. TIMPANO	NARINA- HOCICO	OJO- NARINA	ANCHO GLANDULA	LARGO GLANDULA
<i>B. chilensis</i> x <i>B. spinulosus</i> (San Alfonso - CHILE)	87.85	117.25	22.30	3.70	5.80	5.65	6.50	8.90
<i>B. arenarum</i> x <i>B. spinulosus</i> (San Isidro - MENDOZA)	99.95	129.50	28.55	3.95	7.75	4.65	8.45	14.90

\* LAS MEDICIONES ESTAN EXPRESADAS EN mm.

T A B L A N° 10

RECuento DE CELULAS E INDICES DE DIFERENCIACION CELULAR EN AMPOLLAS SEMINIFERAS DE ESPECIES PARENTALES E HIBRIDOS NATURALES DE BUFO

ESPECIES	<i>B. chilensis</i>		<i>B. spinulosus</i>		<i>B. arenarum</i>		HIBRIDO <i>chilensis x spinulosus</i>		HIBRIDO <i>arenarum x spinulosus</i>	
	Nº cel	I/D	Nº cel	I/D	Nº cel	I/D	Nº cel	I/D	Nº cel	I/D
ESPERMATOGONIOS I	112	1.00	153	1.00	108	1.00	118	1.00	33	1.00
ESPERMATOGONIOS II	770	6.88	1954	12.77	753	6.97	614	5.20	1034	31.33
ESPERMATOCITOS I Y II	1192	10.64	361	2.36	390	3.61	1109	9.39	2916	88.36
ESPERMATIDAS TEMPRANAS	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
ESPERMATIDAS TARDIAS (GAVILLAS)	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
ESPERMIOS EN EL LUMEN	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

\* INDICA PRESENCIA DE QUISTES Y/O ETAPAS DE LA ESPERMIOHISTOGENESIS

I/D = INDICE DE DIFERENCIACION

GONIOS II

GONIOS I

GONIOS I

FIG. 1 MAPA PRELIMINAR DE LA DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE ESPECIES DEL GRUPO SPINULOSUS EN CHILE.

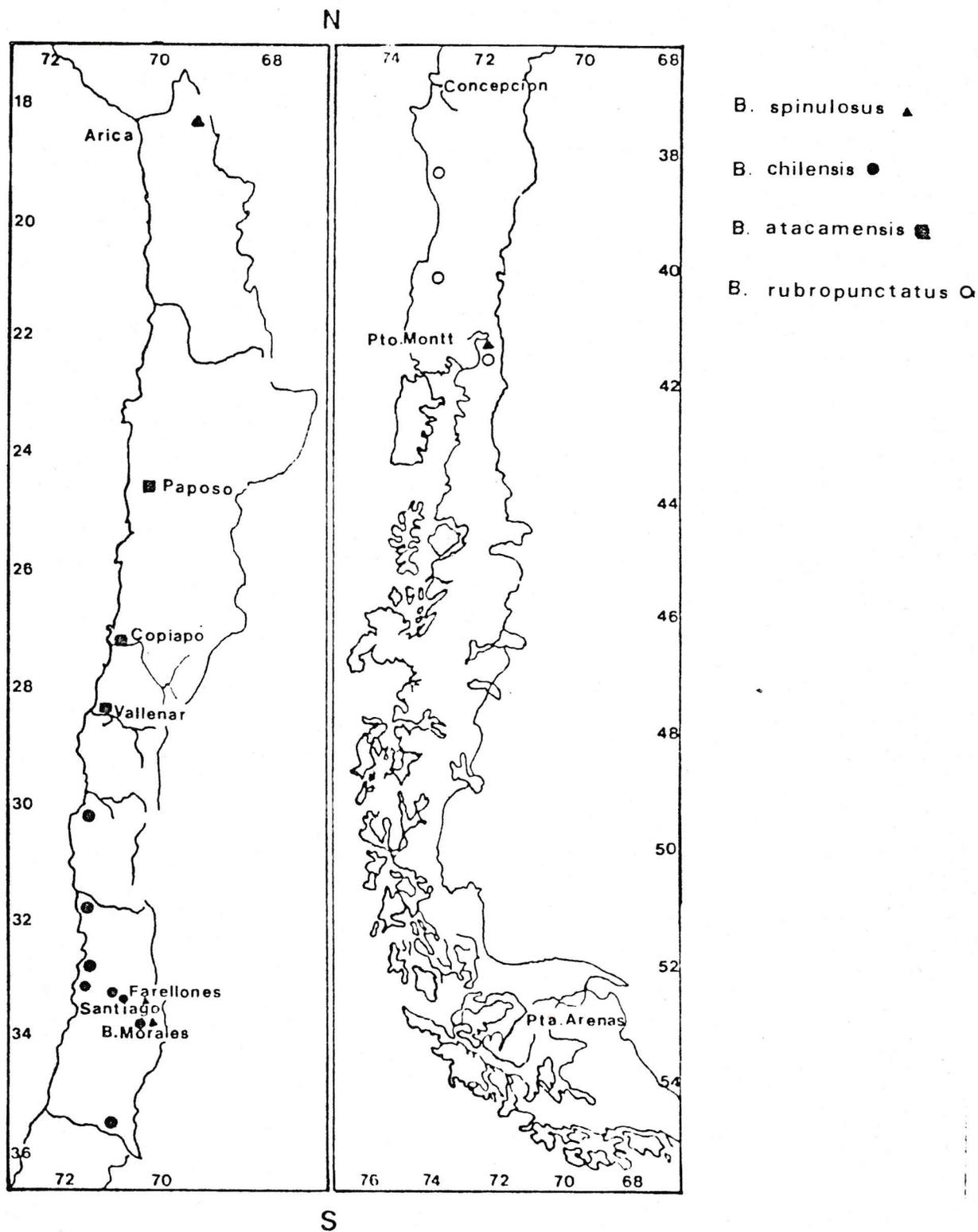
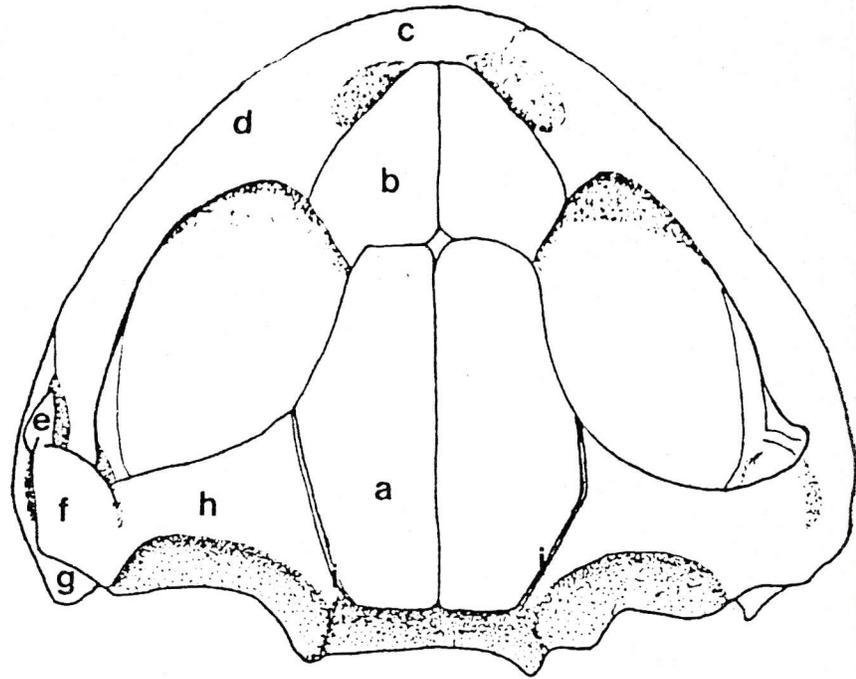


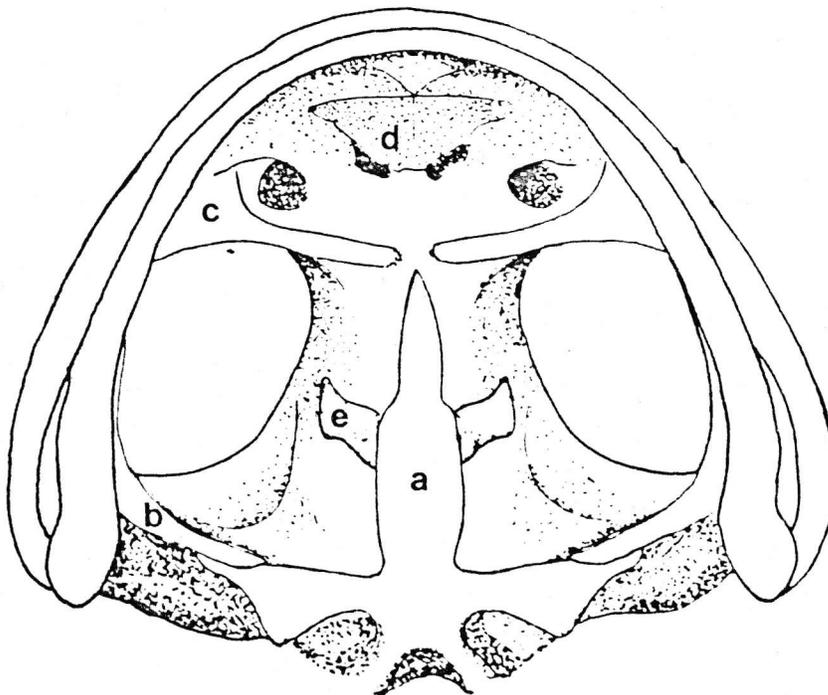
FIG. 2 ESQUEMA del CRANEO de las especies del grupo  
spinulosus

VISTA DORSAL

- a Frontoparietales
- b Nasaes
- c Premaxilares
- d Maxilares
- e Escamoso
- f Lamina otica del Escamoso
- g Quadratojugal
- h Otooccipital
- i Canal occipital

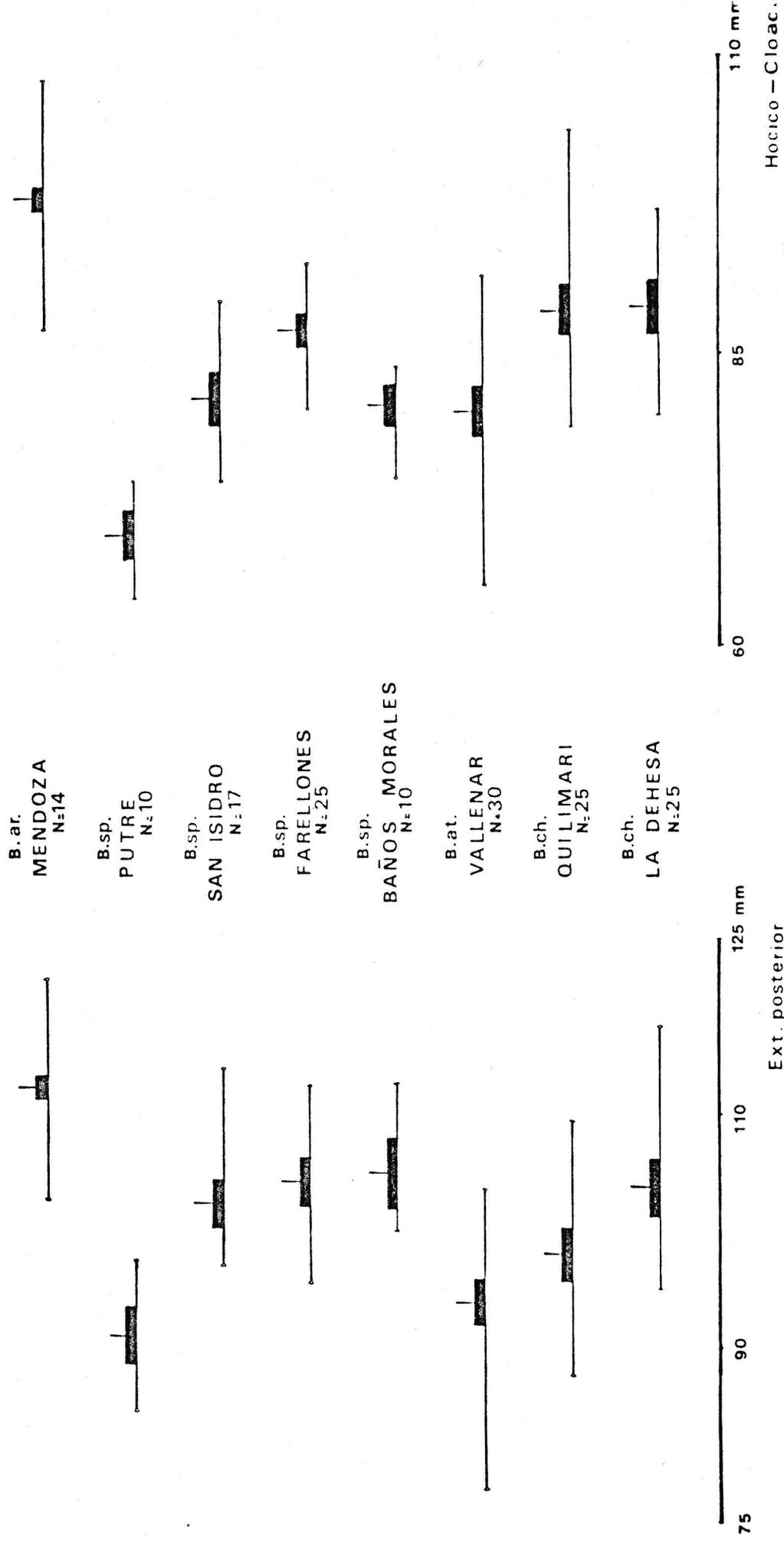


VISTA VENTRAL



- a Paraesfenoides
- b Pterigoides
- c Palatinos
- d Prevomer
- e Foramen otico

FIG. 3 VARIACION DE CARACTERES MORFOLOGICOS EN POBLACIONES DE BUFO



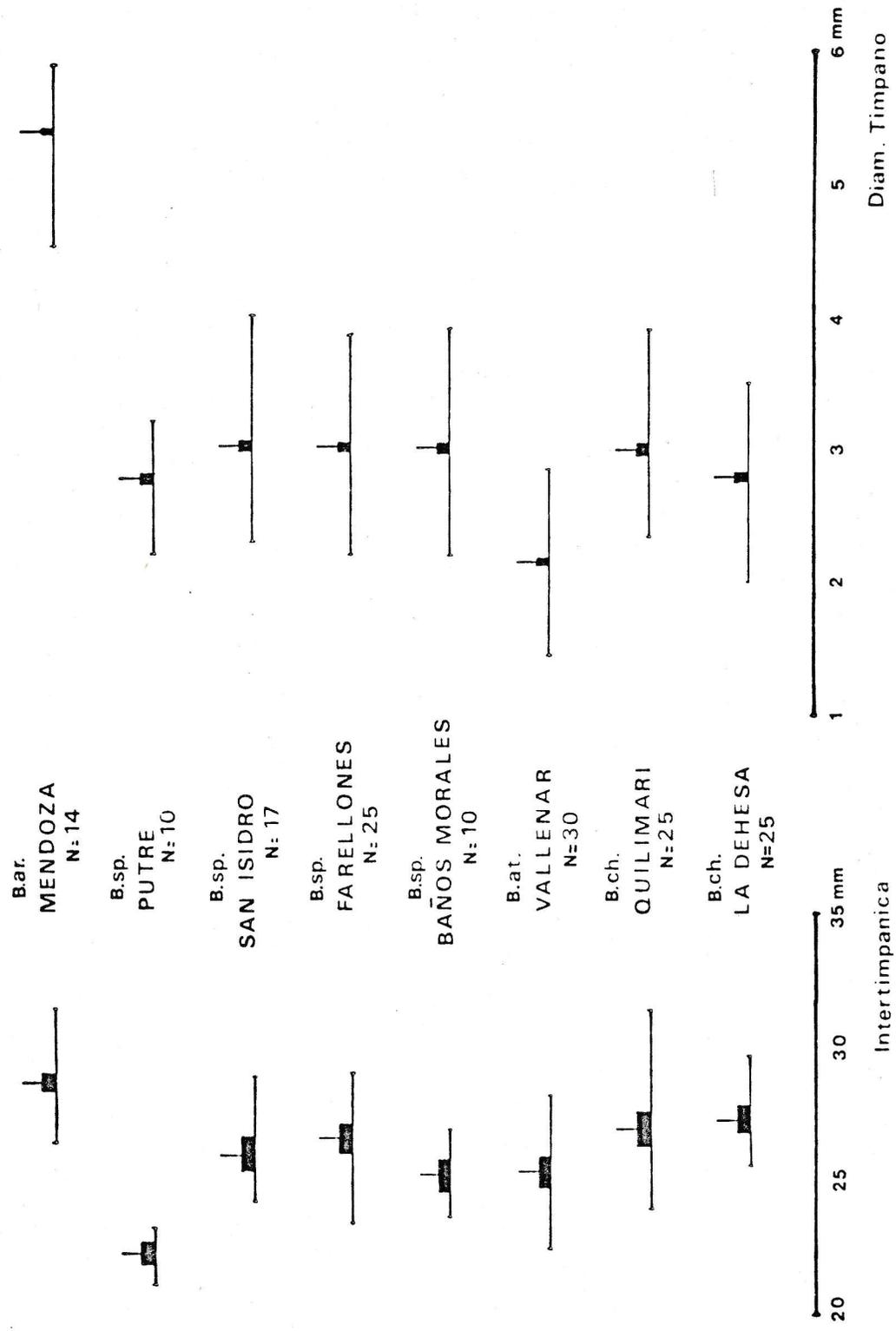
B.ar= B. arenarum B.sp= B. spinulosus

B.at= B. atacamensis B.ch= B. chilensis

Ext. posterior

Hocico - Cloac.

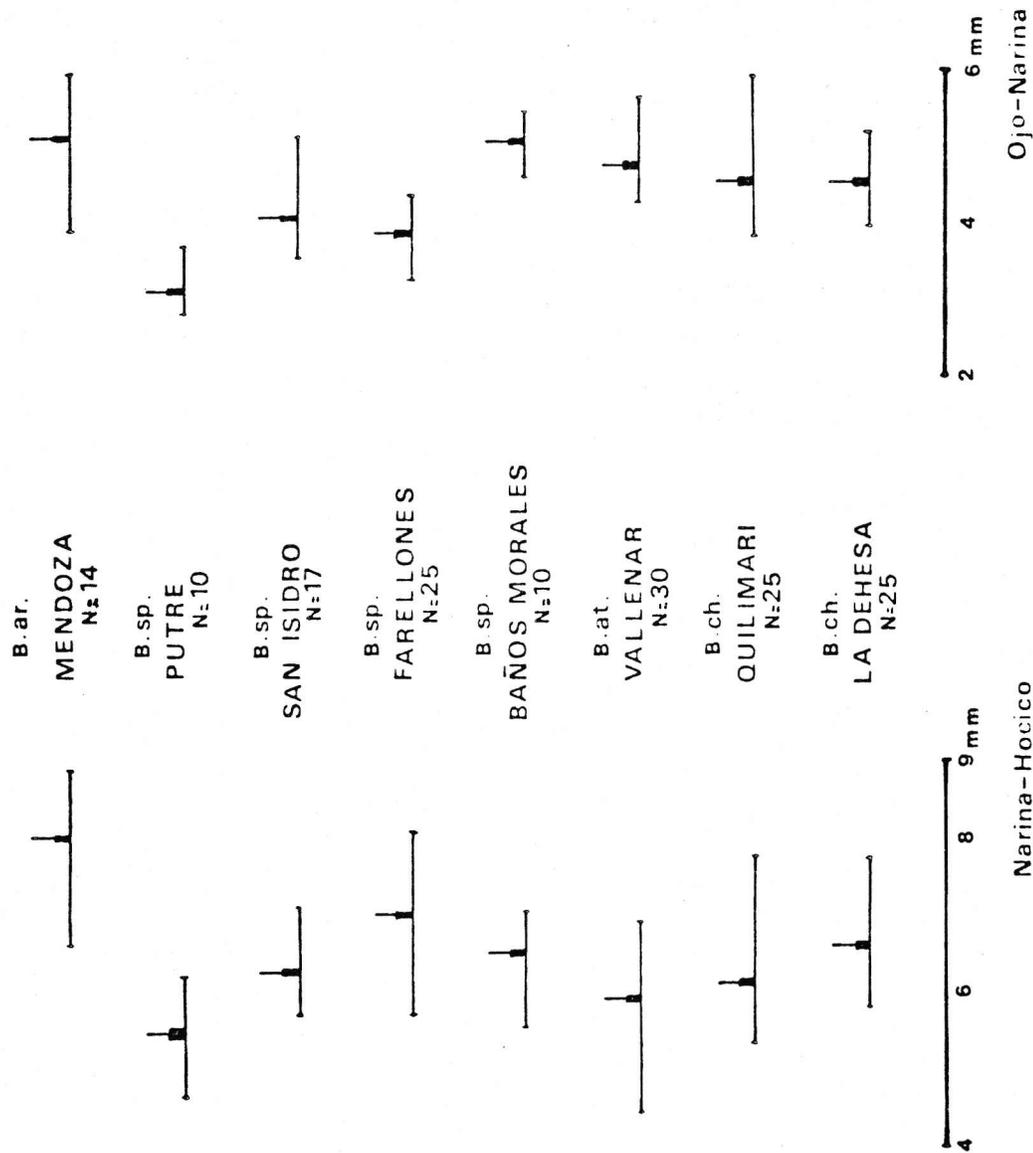
FIG. 4 VARIACION DE CARACTERES MORFOLOGICOS EN POBLACIONES DE BUFO



B.ar= B. arenarum B.sp= B. spinulosus

B.at= B. atacamensis B.ch= B. chilensis

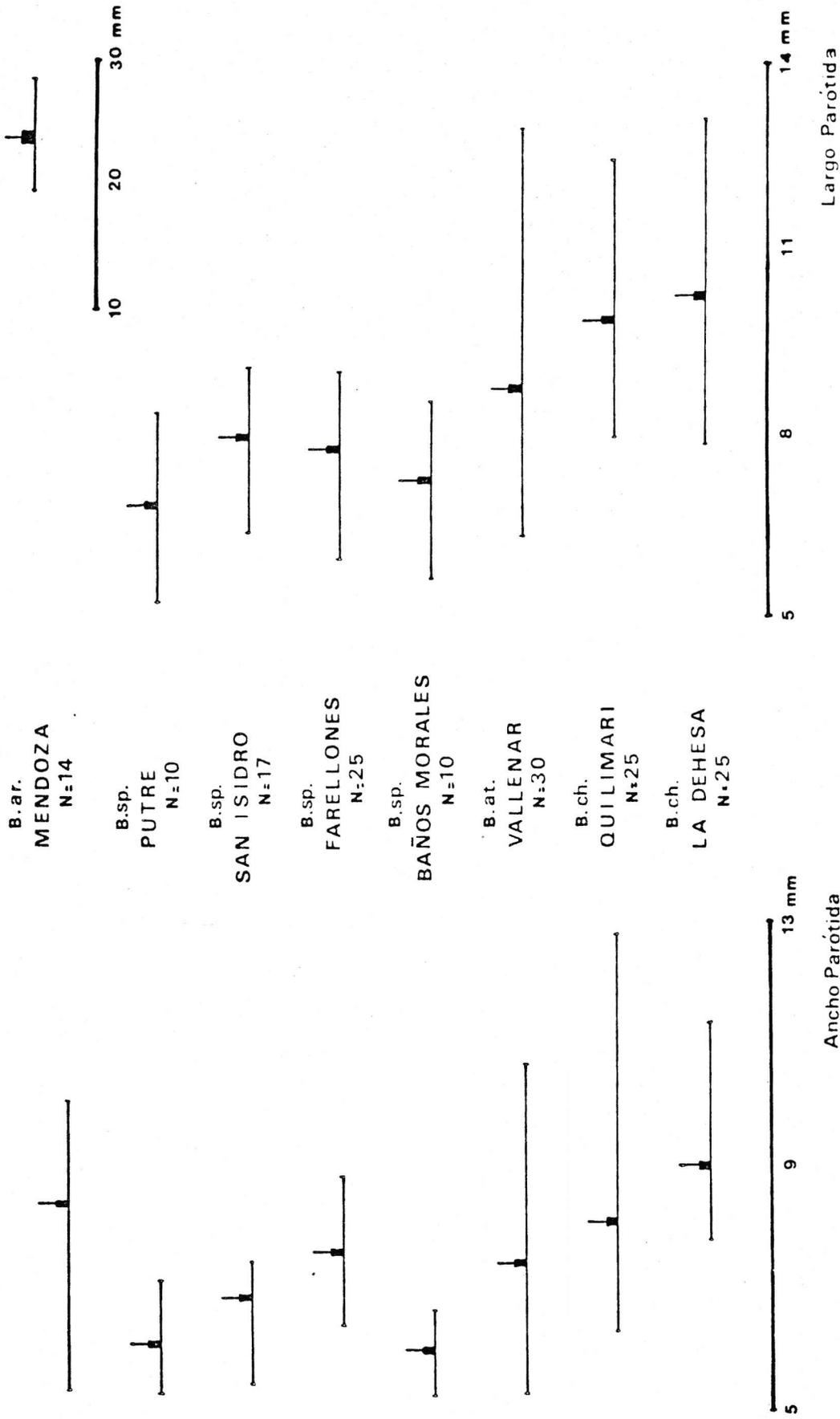
FIG. 5 VARIACION DE CARACTERES MORFOLOGICOS EN POBLACIONES DE DUFUO



B.ar= B. arenarum B.sp= B. spinulosus

B.at= B. atacamensis B.ch= B. chilensis

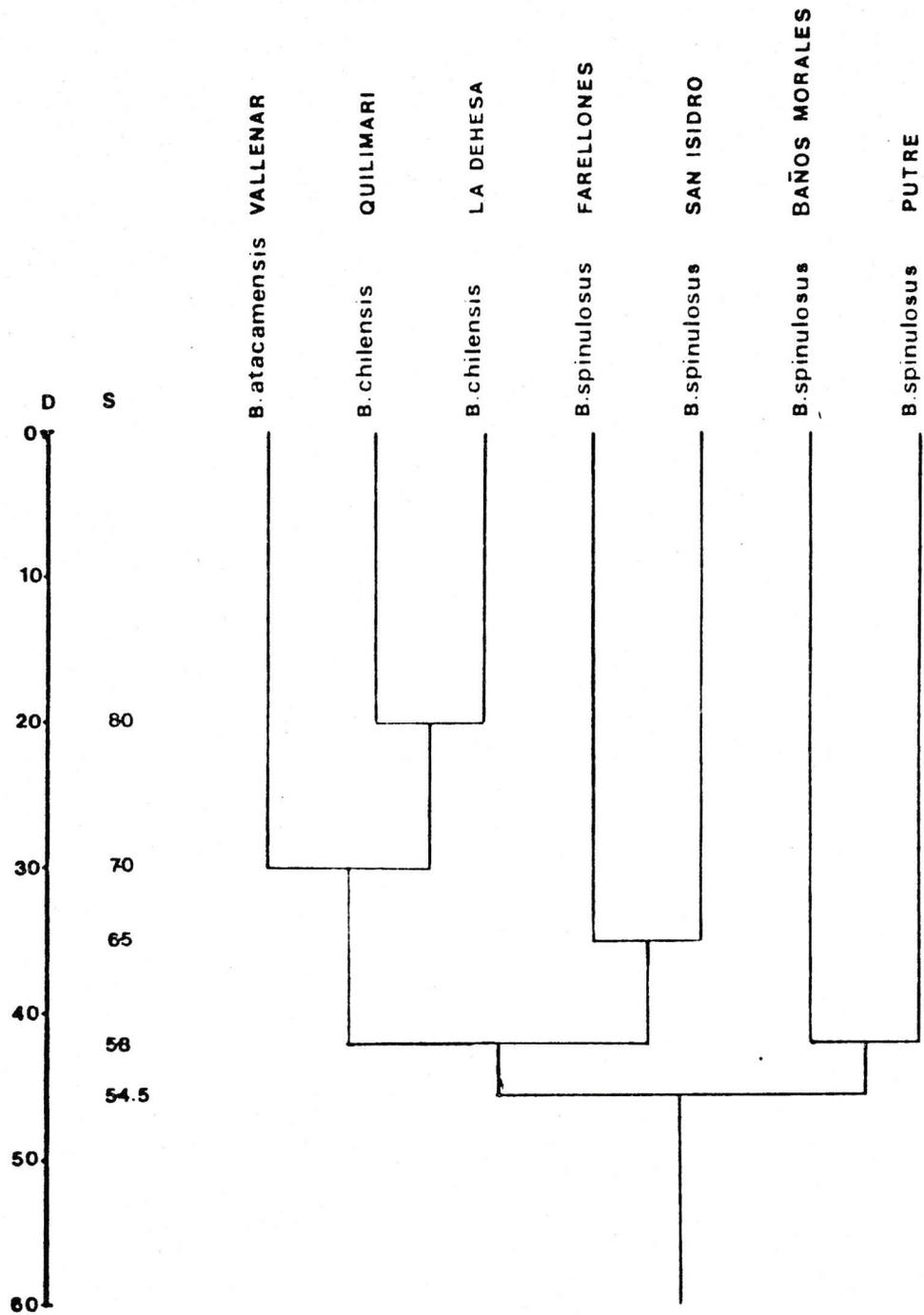
FIG.6 VARIACION DE CARACTERES MORFOLOGICOS EN POBLACIONES DE BUFO



B.ar= *B. arenarum* B.sp= *B. spinulosus*

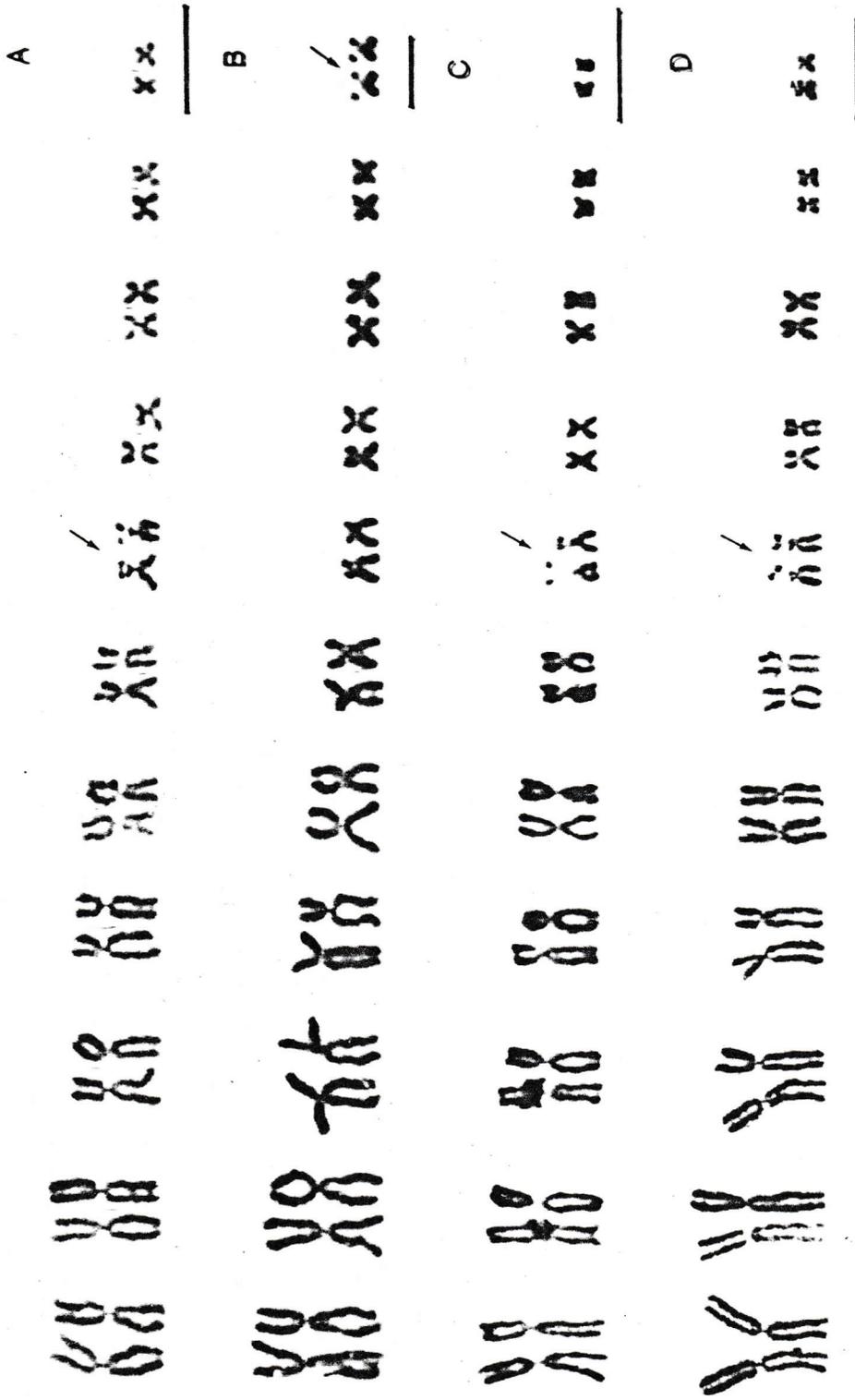
B.at= *B. atacamensis* B.ch= *B. chilensis*

FIG 7 ANALISIS JERARQUICO DE SIMILITUD



A partir de la distancia de Mahalanobis. El nivel de similitud corresponde al complemento entre 1 y 100 de  $D \times 10$ .

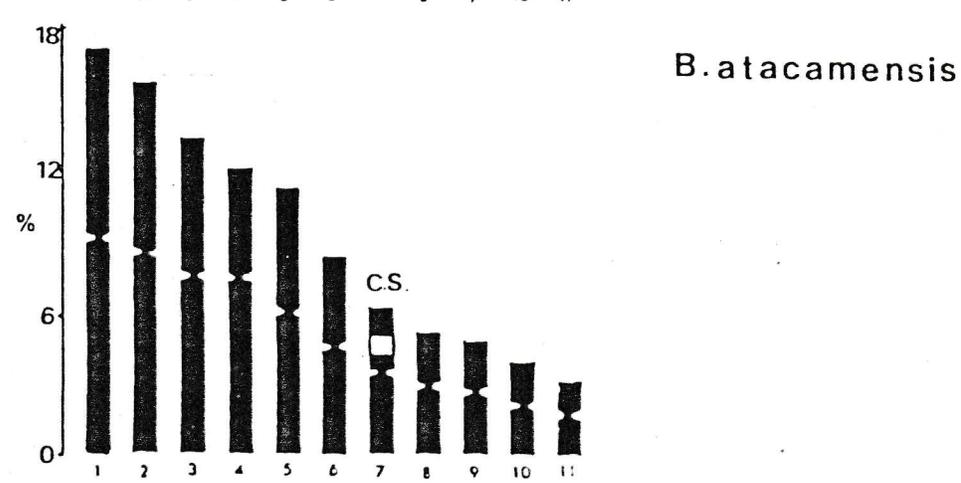
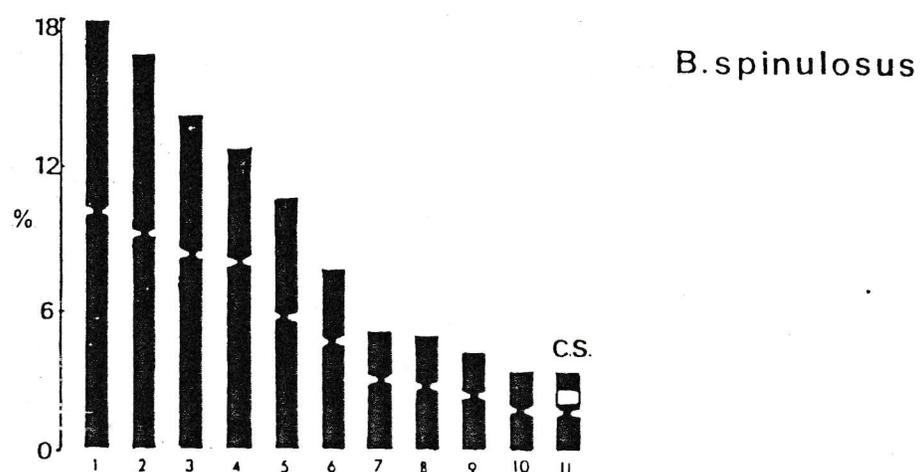
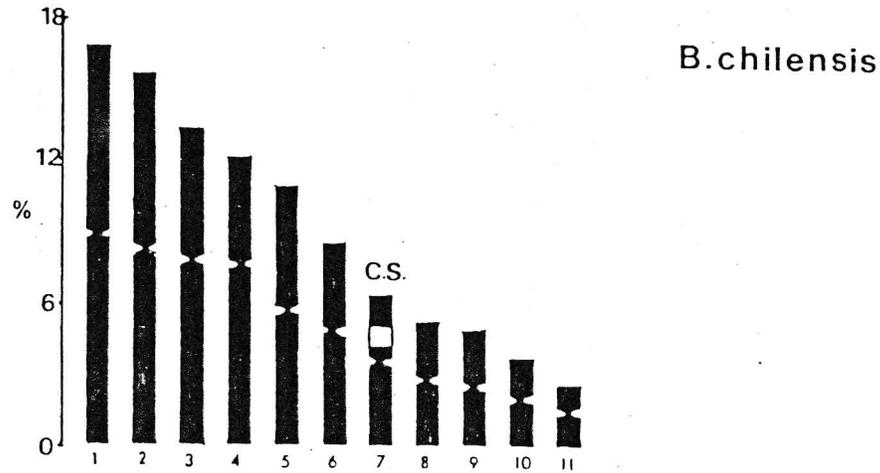
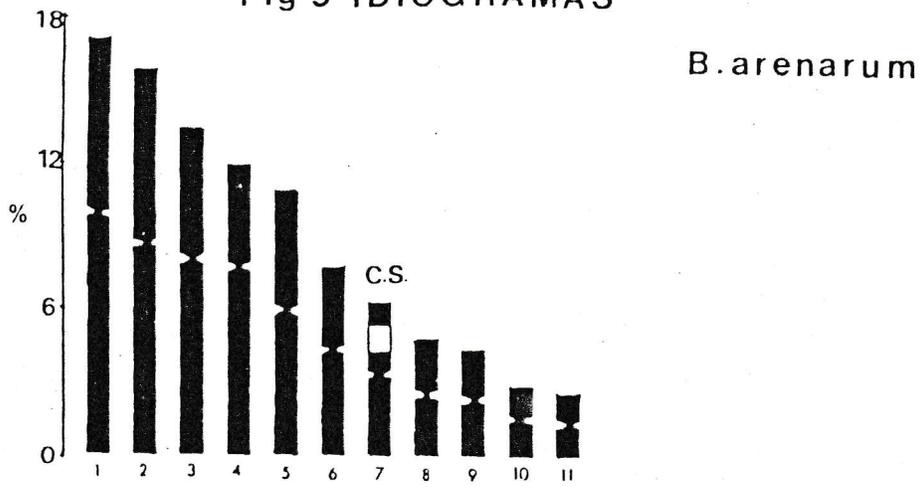
FIG 8 CARIOTIPOS



- A. *Bufo chilensis*
- B. *Bufo spinulosus*
- C. *Bufo atacamensis*
- D. *Bufo arenarum*

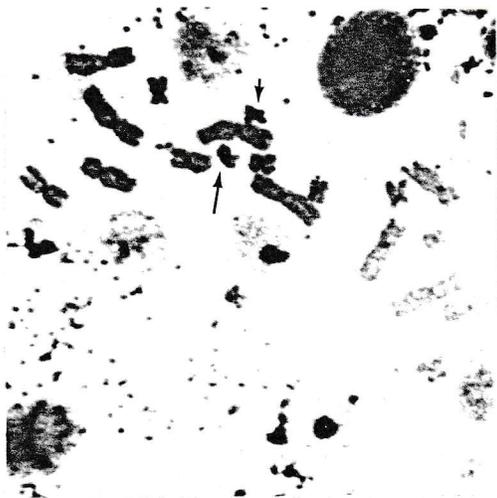
El trazo corresponde a 10μ

Fig 9 IDIOGRAMAS

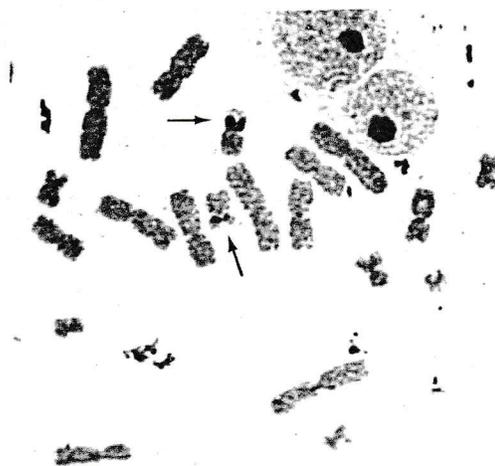


CS. = Constriction Secundaria

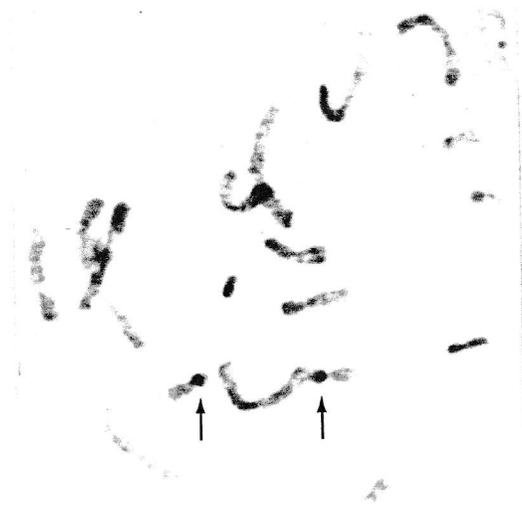
FIG 10 REGION ORGANIZADORA DEL NUCLEOLO NOR



*B. spinulosus*



*B. chilensis*



*B. atacamensis*

FIG 11 CARIOTIPOS DE HIBRIDOS EXPERIMENTALES

Y NOR



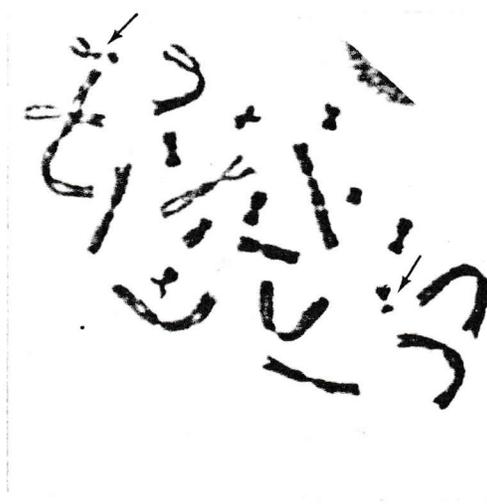
*B. spinulosus* x *B. chilensis*



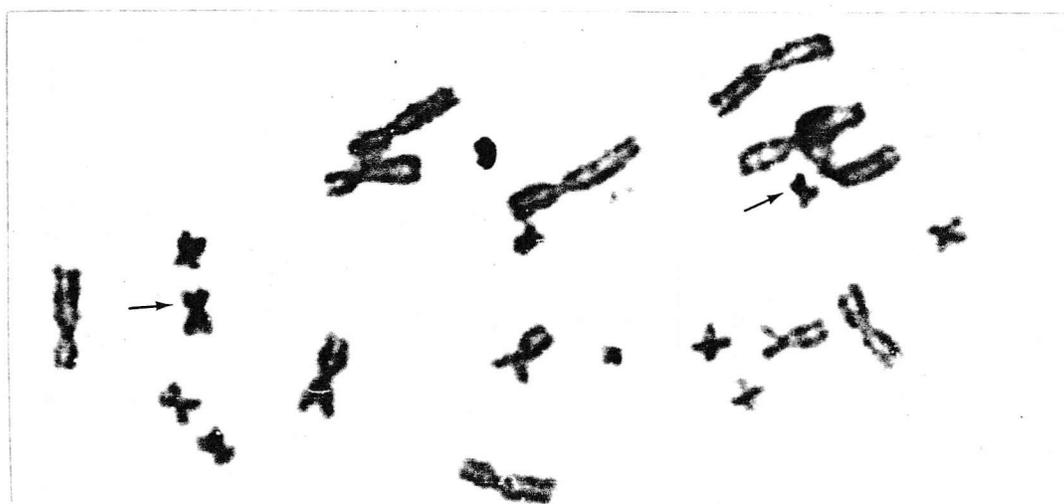
*B. chilensis* x *B. atacamensis*



*B. spinulosus* x *B. arenarum*



*B. spinulosus* x *B. atacamensis*



*B. spinulosus* x *B. chilensis* NOR

FIG.12 CRUZAMIENTOS INTERESPECIFICOS EN EL GENERO BUFO. -  
% DE SOBREVIVIDA A LA ETAPA DE METAMORFOSIS

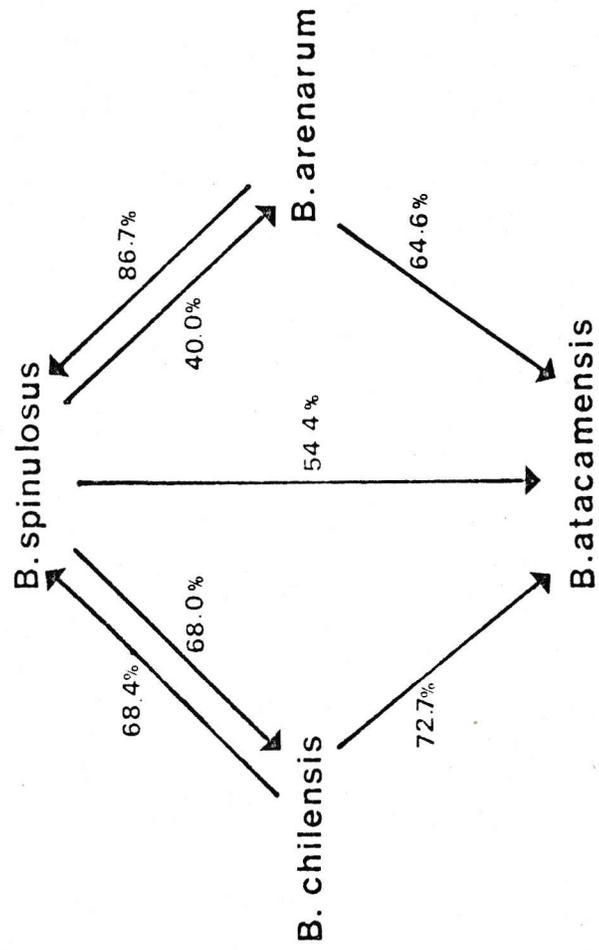
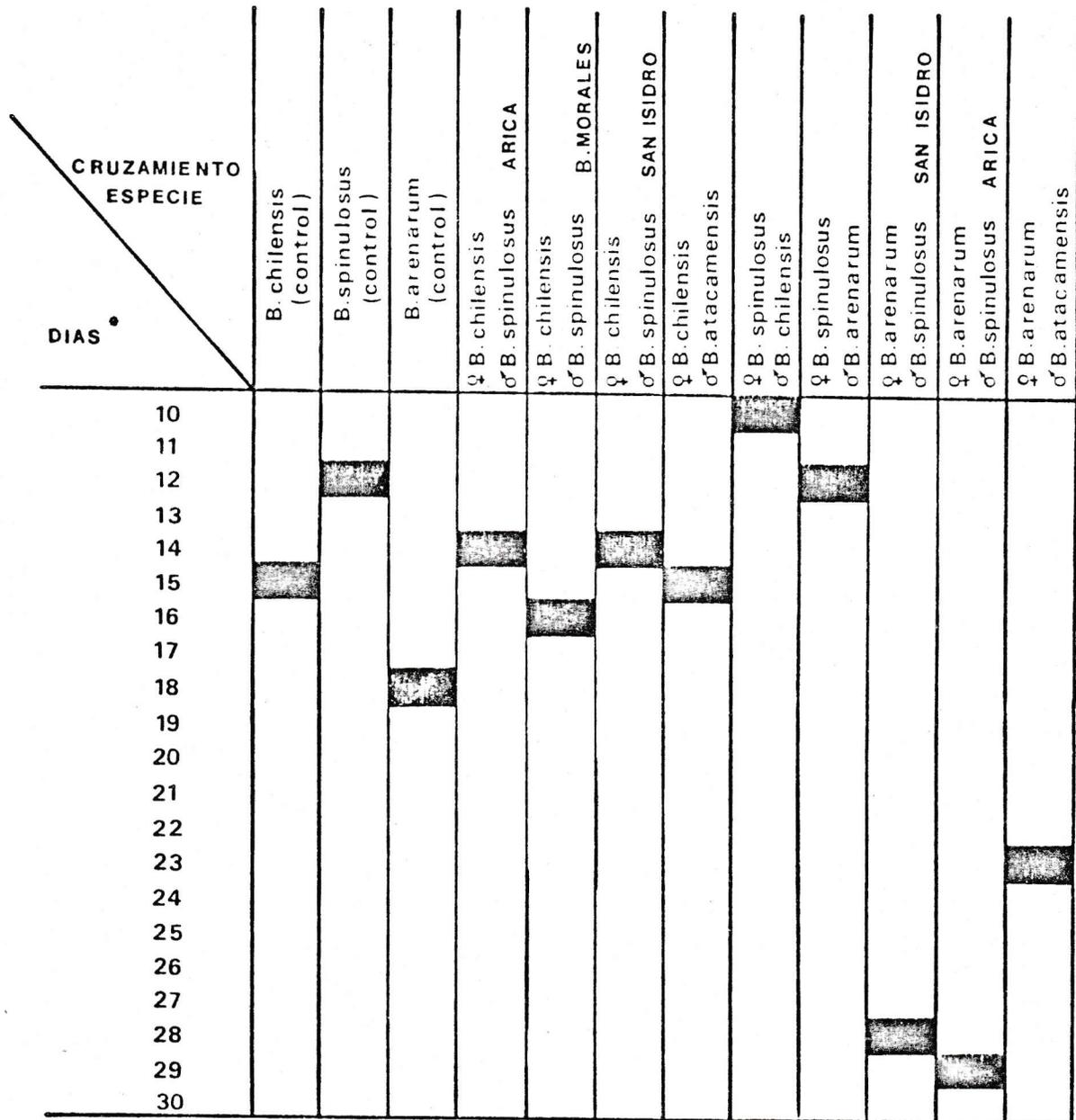


FIG.13 VELOCIDAD DE METAMORFOSIS



\* N° de Días en que se alcanzó el 50% de Metamorfosis

FIG. 14. AREA DE SOBREPOSICION EN LA DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE Bufo spinulosus CON B. chilensis Y B. arenarum.

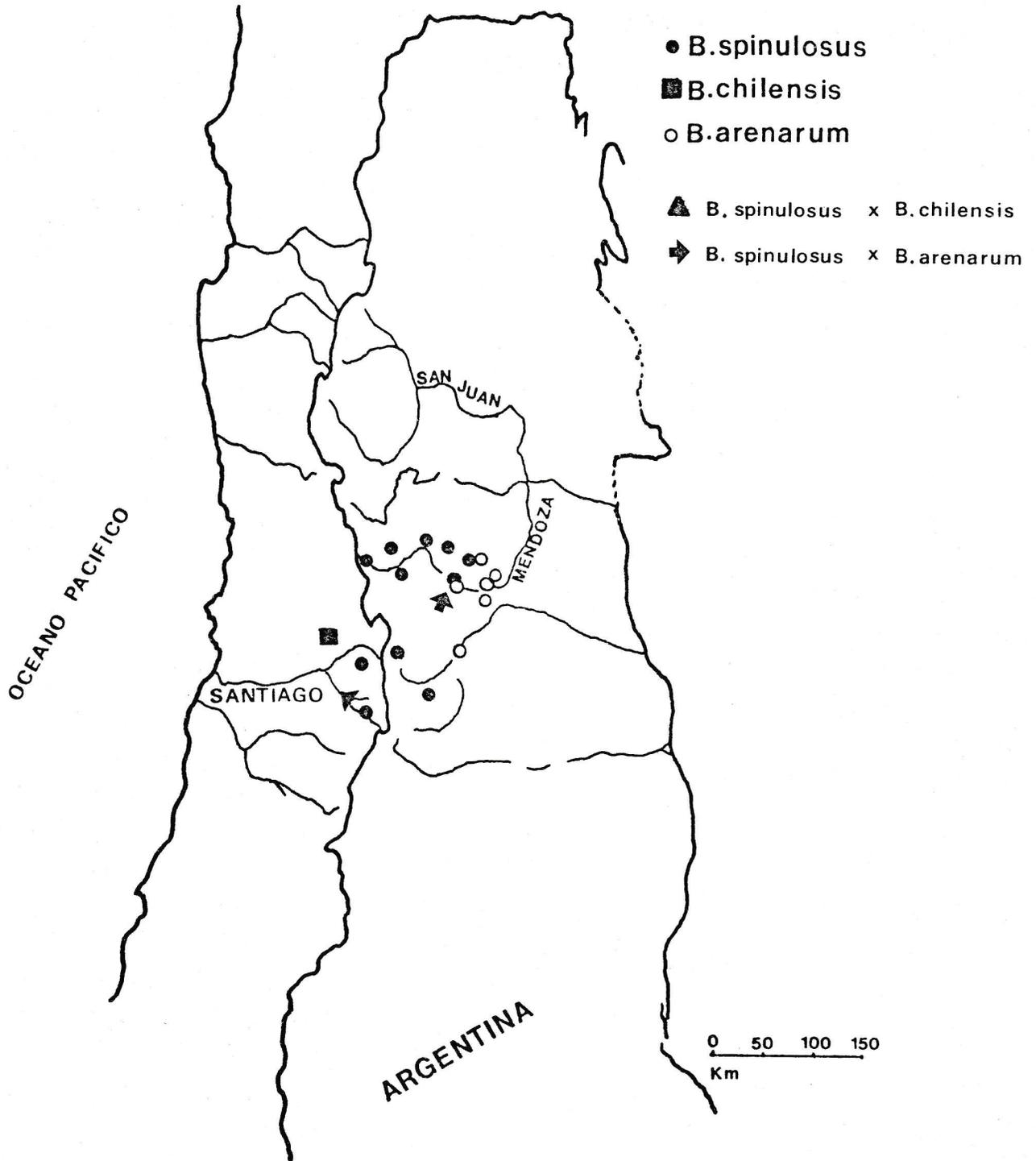
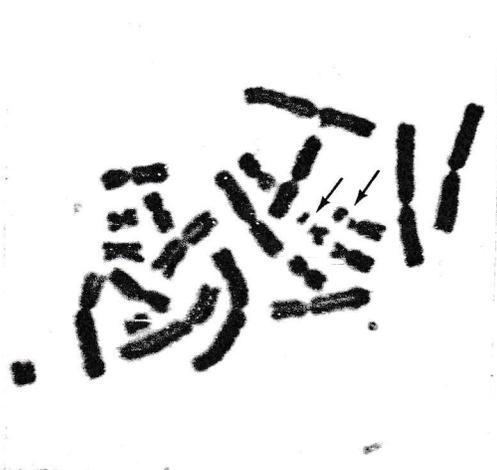
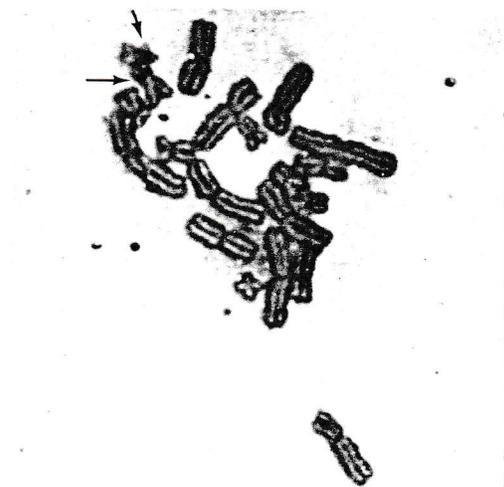


FIG 15 CARIOTIPOS DE HIBRIDOS NATURALES Y NOR



*B. spinulosus* x *B. chilensis*



*B. spinulosus* x *B. chilensis*  
NOR

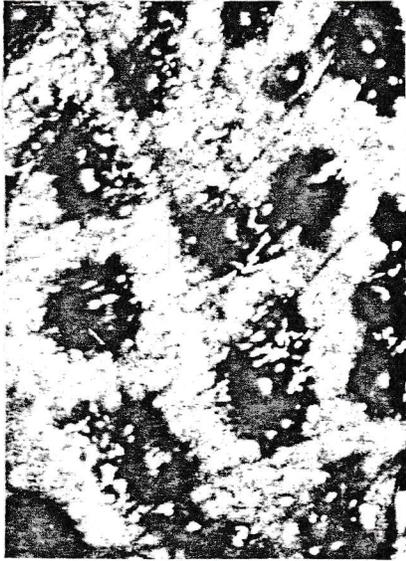


*B. spinulosus* x *B. arenarum*



*B. spinulosus* x *B. arenarum*  
NOR

FIG 16 CORNIFICACION Y GLANDULAS DE LA PIEL



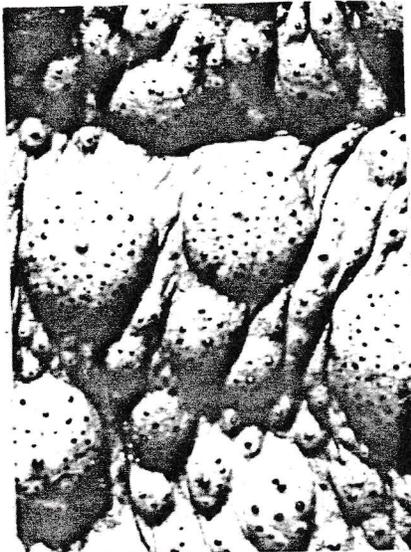
B. chilensis



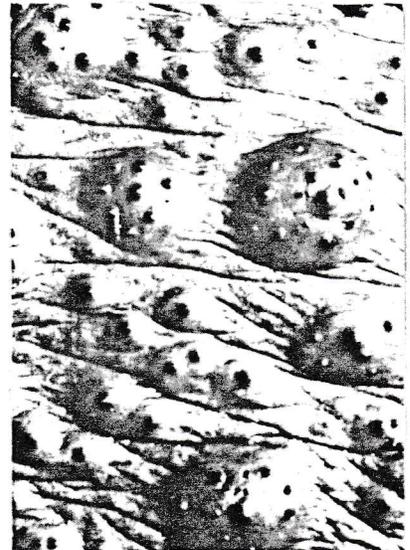
B. spinulosus  
x  
B. chilensis



B. spinulosus

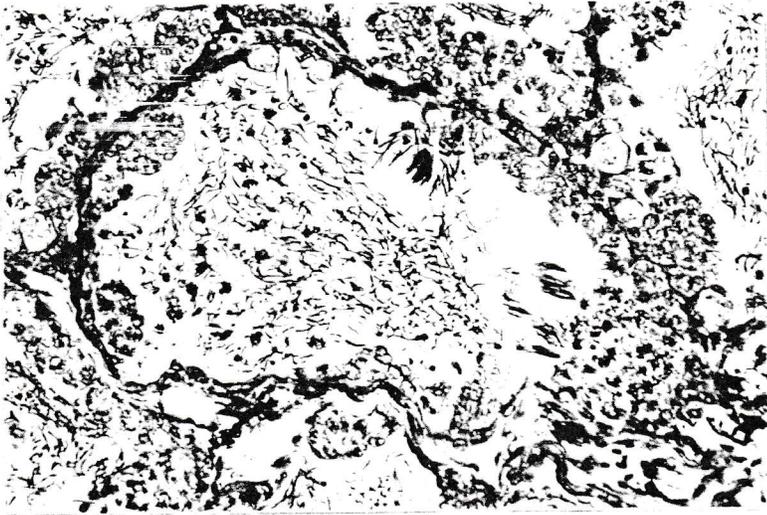


B. arenarum



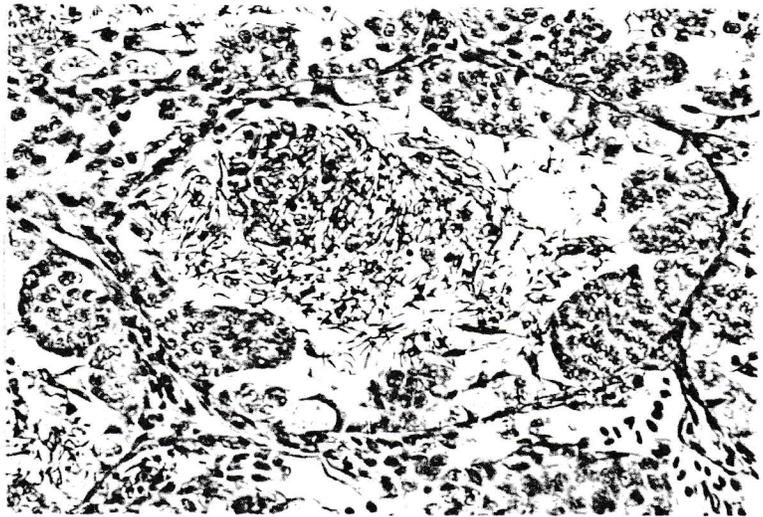
B. spinulosus  
x  
B. arenarum

FIG 17 CORTES HISTOLOGICOS DE LAS GONADAS



*B. chilensis*

*B. spinulosus*



*B. arenarum*

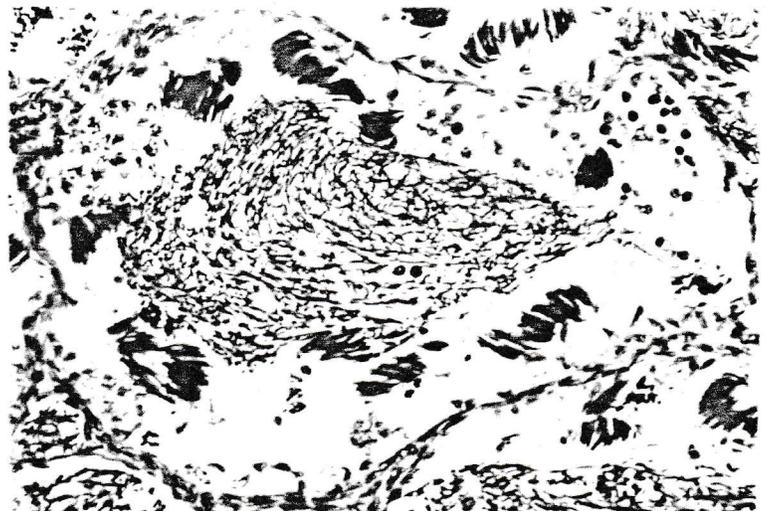
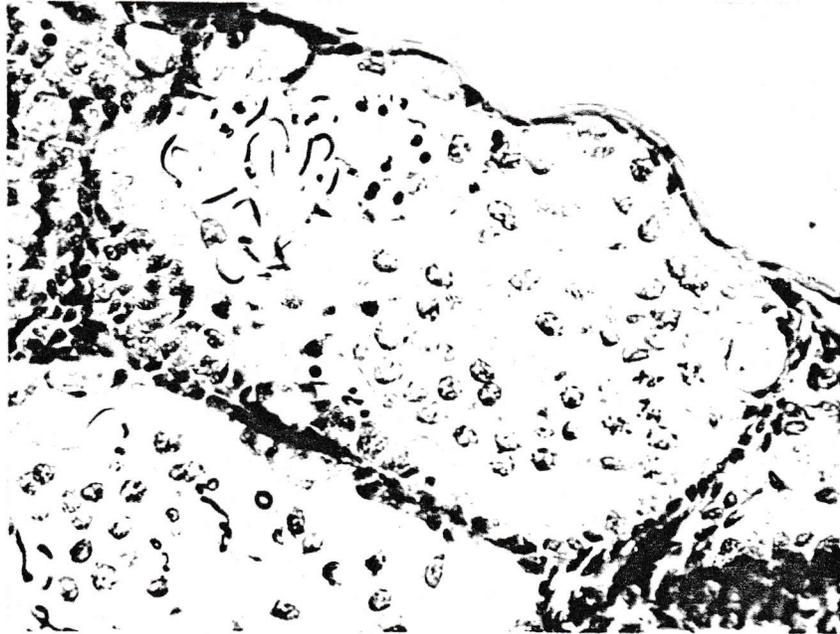


FIG 18 CORTES HISTOLOGICOS DE LAS GONADAS DE  
HIBRIDOS DE BUFO

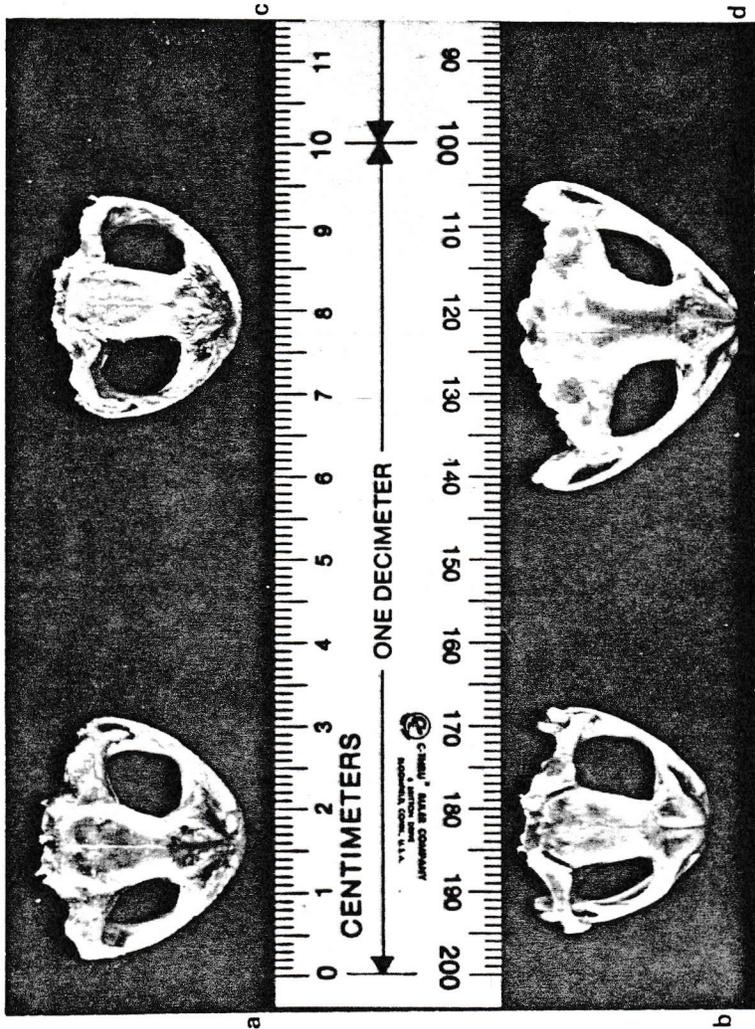


*B. spinulosus* x *B. chilensis*



*B. spinulosus* x *B. arenarum*

LAMINA I ESQUELETO CRANEAL



c *B. atacamensis*

d *B. arenarum*

a *B. chilensis*

b *B. spinulosus*

LAMINA II MORFOLOGIA EXTERNA DE ESPECIES PARENTALES E HIBRIDO NATURAL



*B. spinulosus*



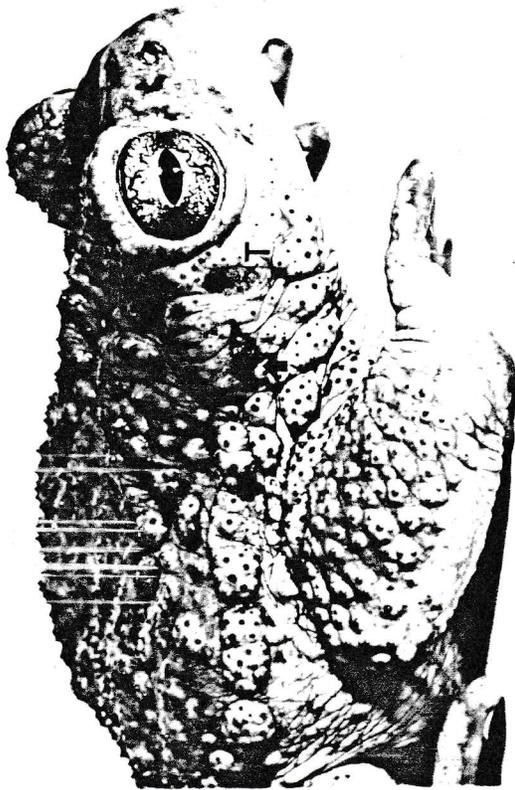
*B. spinulosus* x *B. chilensis*



*B. chilensis*

→ Gl. parotoides

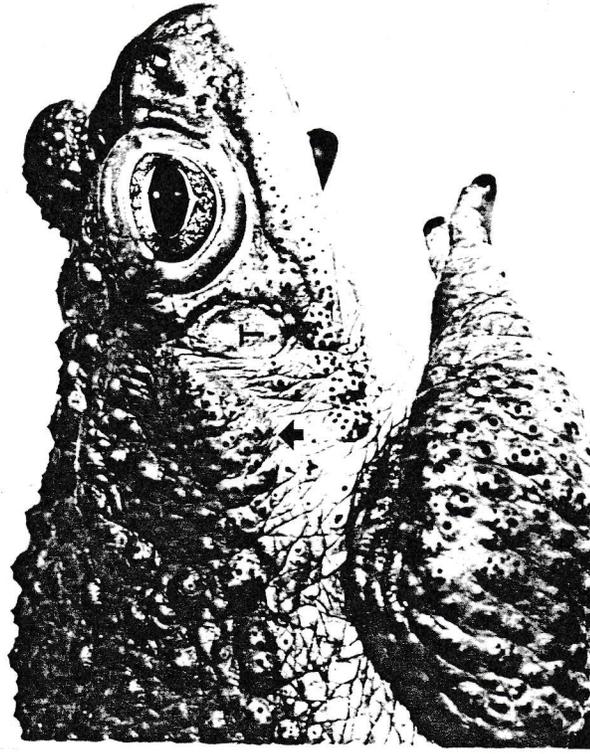
LAMINA III MORFOLOGIA EXTERNA DE ESPECIES PARENTALES E HIBRIDO NATURAL



*B. spinulosus*



*B. arenarum*



*B. spinulosus* x *B. arenarum*

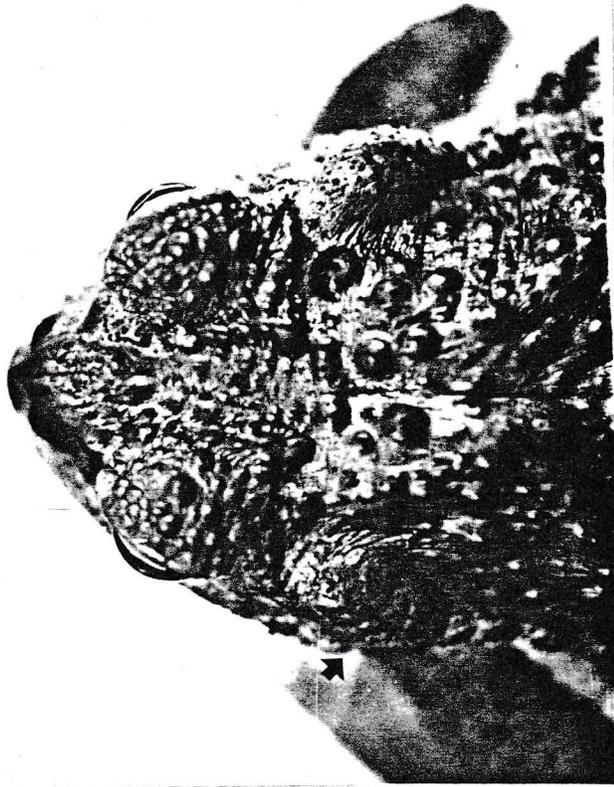
T = Timpano

→ = Gl. parotoides

LAMINA IV MORFOLOGIA EXTERNA DE ESPECIES PARENTALES E HIBRIDO NATURAL



B. spinulosus



B. spinulosus x B. arenarum



B. arenarum

→ = Gl. parotoides

ANEXO Nº 1

I) MORFOLOGIA INTERNA: OSTEOLOGIA

Para hacer las observaciones osteológicas, se procedió a preparar esqueletos de las especies. Una vez limpios, se les sometió a un proceso de diafanización con el fin de visualizar las suturas óseas.

A) Método de diafanización (Gloria Arratia, com. personal)

Soluciones utilizadas

- 1) Solución saturada de Alizarina en H<sub>2</sub>O destilada.
- 2) NaOH al 1%
- 3) Glicerina pura comercial

Etapas

- 1) Tinción en solución de Alizarina en NaOH 1% - 2 días.
- 2) Eliminación de exceso de colorante por pasajes sucesivos de los esqueletos en recipientes de vidrio con glicerina y NaOH en proporciones variables.
  - a) NaOH - glicerina 3:1
  - b) NaOH - glicerina 2:2
  - c) NaOH - glicerina 1:3
- 3) Conservación de esqueletos en glicerina.

II) MORFOLOGIA EXTERNA:

Se colectaron ejemplares de Bufo spinulosus, B. chilensis y B. arenarum, en las localidades indicadas,

a continuación, durante la primavera en la época reproductora. (Entreparéntesis va el Nº de la muestra).

Bufo spinulosus: Baños Morales (10) Farellones (25)

Putre (10) San Isidro (Mendoza) (17).

B. chilensis: La Dehesa (25) Quilimari (25)

B. atacamensis: Vallenar (30)

B. arenarum: Mendoza, localidad de Agrelo (14).

Los ejemplares utilizados en el estudio biométrico se encuentran depositados en la colección herpetológica del Depto. de Biol. Cel. y Genética de la Universidad de Chile (D B G UCH)

Las 8 variables morfométricas, consideradas fueron:

- 1) Longitud hocico-cloaca (Largo Total).
- 2) Extremidad posterior
- 3) Distancia Intertímpanica
- 4) Diámetro del Tímpano
- 5) Distancia Narina -hocico
- 6) Distancia ojo-narina
- 7) Ancho glándula parotoides
- 8) Largo glándula parotoides

Los test estadísticos utilizados se señalan a continuación:

- 1) Valor discriminante de los caracteres:

Test de Scheffé

Se determina si existen diferencias significativas entre los promedios de las variables. El test de

Scheffé permite realizar contrastes múltiples entre promedios y pondera las diferencias de acuerdo al número de ejemplares de la muestra (Snedecor y Cockran 1978).

2) Comparación entre poblaciones

Test de hipótesis de las medias, Test de  $T^2$

(Hotteling). (Morrison, 1967).

Este Test permite probar la validez de la hipótesis de igualdad de 2 vectores de promedios de 2 muestras independientes.

Método de aplicación del Test de Hotteling.

a) Se hace una matriz de datos

b) Calculo de vector promedio  $\sum X/N$  por población

$\bar{X}_i$  = vector de 8 variables para la  $i$ ésima población.

c) Matriz de suma de cuadrados y productos cruzados.

$$X_i \cdot X_j - \frac{X_i \cdot X_j}{N}$$



$A_k$

$X_i$  = Valor de la  $i$ ésima variable

$X_j$  = Valor de la  $j$ ésima variable

$N$  = Tamaño de la muestra de la  $k$ ésima población

$A_k$  = Matriz de 8 x 8 para la  $k$ ésima población

d) Matriz varianza - covarianza

$$S = \frac{1}{N_i + N_j - 2} (A_i + A_j)$$

$A_i$  = Matriz de la  $i$ ésima población.

$A_j$  = Matriz de la  $j$ ésima población.

e) Se invierte la matriz  $S$ .

$S^{-1}$  = matriz de covarianza - varianza invertida

f) Se calcula el valor de  $T^2$

$$T^2 = \frac{N_i N_j}{N_i + N_j} (\bar{X}_i - \bar{X}_j) S^{-1} (\bar{X}_i - \bar{X}_j)$$

$i$  =  $i$ ésima población

$j$  =  $j$ ésima población

g) Test de significancia estadística para el valor de  $T^2$  obtenido.

$$F = \frac{N_i + N_j - p - 1}{(N_i + N_j - 2) p}$$

$p$  = grados de libertad

Para este análisis multivariado los datos se procesaron en una computadora I.B.M. Nº 1130 de la Facultad de Medicina Sede Santiago Norte. Universidad de Chile.

3) Fenograma:

Para construir un fenograma se determina la distancia entre poblaciones. Un método es:

Distancia de Mahalanobis ( $D^2$ ) (Morrison, 1967) que es una distancia generalizada que significa que se maximizan las diferencias entre pares de promedios para aquellas

combinaciones de caracteres que tienen máxima varianza.

La Distancia de Mahalanobis ( $D_2$ ) está incluida en el cálculo de  $T^2$  de Hotteling:  $D^2 = (\bar{X}_i - \bar{X}_j) S^1 (\bar{X}_i - \bar{X}_j)$ .

ANEXO Nº 2

C R O M O S O M A S

I. Obtención de Placas metafásicas

Las placas metafásicas en las que se hizo el análisis cromosómico se obtuvieron de animales previamente inyectados con colchicina intraperitoneal por 18 horas o intracardiaca por 4 horas en dosis de 0.3-0.5mgr/gr de peso ejemplar.

Las preparaciones microscópicas son de dos clases:

A) Preparaciones permanentes.

Se obtienen por suspensión celular de médula ósea, bazo y testículo y/o de cultivo de sangre de corta duración (Bianchi 1967).

B) Preparaciones semipermanentes (Bogart 1973). Para estas preparaciones se utilizó córnea e Intestino.

Técnicas:

A) Preparaciones permanentes:

- 1) El tejido se macera en 2 ml de solución de Hanks (TC. Difco Lab.)
- 2) Se disgregan células mediante pipeteo energético.
- 3) Centrifugación por 8 min. a 800 r.p.m. Se obtiene pellet y se elimina el sobrenadante.
- 4) Hipotonía en solución de KCL (0.075 M) por 18 min. a Tº ambiente.
- 5) Centrifugación por 8 min. a 800 r.p.m.

- 6) Fijación de las células en solución metanol: ácido acético por 30 minutos.
  - 7) Resuspensión de pellet
  - 8) Lavado de células mediante nueva centrifugación por 8 min. a 800 r. p.m. con metanol acético.
  - 9) Se gotea de la suspensión celular sobre portaobjetos limpios.
  - 10) Se deja secar al aire.
  - 11) Se tiñe con giemsa (Merck) al 4% pH 7.2
- B) Preparaciones semipermanentes (Se enuclean los ojos)
- 1) Hipotonía en H<sub>2</sub>O bidestilada por 2 - 4 horas.
  - 2) Fijación con vapor de ácido acético glacial por 2 min.
  - 3) Se desprende el epitelio de la córnea con escalpelo.
  - 4) Se tiñe el tejido con orceína acética por 8 min. y se procede a aplastar (Squash).

Estas preparaciones se fotografían con microscopio de contraste de fase, para su posterior análisis.

Una modificación de la técnica anterior, para Intestino es la siguiente:

- 1) Hipotonía en H<sub>2</sub>O bidestilada por 15 min.
- 2) Fijación en ácido acético al 50% por 15 min.
- 3) Se desprenden células del epitelio y se aplastan.
- 4) Las preparaciones se colocan en Hielo seco por 15 min. y se desprende el cubre.

El resultado es una preparación permanente por aplastado (Squash).

II) Determinación de los cariotípos e Idiogramas

La determinación del Nº cromosómico (2n) se hizo en los ejemplares que se indican a continuación.

Especies	Nº de Individuos		Nº de placas
	♀	♂	
<u>B. spinulosus</u>	13	32	100
<u>B. chilensis</u>	10	25	100
<u>B. atacamensis</u>	3	17	50
<u>B. arenarum</u>	2	1	20
<hr/>			
TOTAL	28	75	270

Para la confección del Idiograma, se midieron los cromosomas con un pie de metro, directamente sobre reproducciones fotográficas. Estas mediciones se realizaron sobre cada cromátida de ambos cromosomas homólogos en forma independiente, de modo que se completan sobre cada par de homólogos 8 mediciones que al ser promediados disminuyen el error de mediciones únicas. El largo relativo de cada cromosoma, corresponde a un valor promedio entre ambos homólogos, referido como porcentaje del complemento haploide. Se determinó el radio centromérico (r), estableciendo la relación Brazo largo/Brazo corto. Los cromosomas se identifican en metacéntricos (m); submetacéntricos (sm), de acuerdo a la posición del centrómero, según Levan et. al. (1964).

El Nº de ejemplares utilizados para la confección del Idiograma se muestra en la Tabla a continuación:

<u>Especies</u>	<u>LOCALIDAD</u>	<u>♀</u>	<u>♂</u>	<u>Nº de placas</u>
<u>B. spinulosus</u>	Farellones	3	3	12
<u>B. chilensis</u>	La Dehesa	3	3	12
<u>B. atacamensis</u>	Vallenar	3	3	12
<u>B. arenarum</u>	Sn. Isidro	2	1	6

(Mendoza)

### III) Determinación de Zona organizadora del Núcleo

Técnica de Ag-As. NOR (Goodpasture y Bloom, 1975)

Tiene por objeto la Identificación de la región organizadora del nucleolo en cromosomas metafásicos. Las determinaciones fueron hechas en células de Intestino y de médula ósea de adultos e híbridos adultos y recién metamorfoseados. ( $F_1$ ).

#### A) Soluciones utilizadas

Sol. 1 :  $AgNO_3$  acuosa al 50%

Sol. 2 : Plata amoniacal: 4 grs. de  $AgNO_3$  en 5 ml de  $H_2O$

Sol. 3 : Solución reveladora: Formalina 3%, se neutraliza con cristales de acetato de sodio y se ajusta a pH 5-6 con ácido fórmico.

#### Tinción Ag - As (NOR)

1) Se pipetea solución  $AgNO_3$  (Sol. 1) sobre el portaobjeto y se cubre.

- 2) Se coloca la preparación bajo una ampolleta de 200-250 Watts a una distancia de 25 cms. por 10 min.
- 3) Se saca el cubreobjeto, sumergiendo la preparación en H<sub>2</sub>O destilada.
- 4) Se revela con solución de plata amoniácal (Sol. 2) y gotas de formalina 3% sobre el portaobjetos.
- 5) Se controla la tinción al microscopio de contraste de fase.
- 6) Al alcanzar la tinción deseada se sumerge la preparación en H<sub>2</sub>O destilada para soltar el cubreobjetos.
- 7) Se deshidrata en una batería de alcohol: 70%, 95%, 100%.
- 8) Se monta la preparación.

ANEXO Nº 3

Experimentos de Hibridización "in vitro"

Ejemplares hembras recién capturados sin ovular detectados por palpación exterior de los ovarios, fueron inducidos a ovular mediante inyección intraperitoneal de macerado de hipofisis obtenidos de ejemplares coespecíficos. En general las hembras inducidas ovulan antes de 48 horas de iniciada la inducción si no se obtiene respuesta se refuerza la inducción cada 24 horas.

Los huevos se extraen por presión digital sobre el abdomen de la hembra inducida. Los cordones de huevos, son colocados en placas de vidrio con 20 ml. de H<sub>2</sub>O de pozo. Se prepara una suspensión de espermatozoides macerando los testículos en 10 ml. de H<sub>2</sub>O de pozo. La fecundación se realiza por goteo de la suspensión de espermios sobre los huevos.

En cada grupo de experimentos hay cruzamientos controles (Homoespecíficos) y experimentales, (Heteroespecíficos). A las 2 horas de verificada la fecundación por aparición del 1er. surco, los huevos son cambiados de las placas a bandejas de plástico de 23 cm X 33 cm con 1.800 ml de H<sub>2</sub>O de pozo, con recambio c/48 horas.

Se diagnostican en cada cruzamiento los estados de gástrula (estadio 7-8), eclosión de larva (estadio 14) y metamorfosis.

La alimentación de las larvas, se efectuó con

lechuga hervida, en tanto que los recién metamorfoseados y etapas más avanzadas son alimentados con dípteros adultos (*Drosophila*) y con larvas de Tenebrionidae (*Tenebrio molitor*).

Los experimentos se efectuaron a tº ambiente, con trolando la Temperatura del agua de las bandejas hasta la etapa de larvas. La Temperatura osciló entre 18ºC y 21ºC.

En el anexo 3a, hay un resumen de los 40 cruzamientos realizados durante los años 1977 y 1978 hasta la etapa de eclosión de larva y presencia de metamorfosis. En el anexo 3b, se resumen los cruzamientos que incluyen las etapas de eclosión de larva y porcentajes de metamorfosis. Los ejemplares metamorfoseados están depositados en la colección Herpetológica del Depto. de Biología Celular y Genética (D B G UCH).

El porcentaje de sobrevivencia se calcula considerando como un 100% a la etapa del desarrollo inmediatamente anterior.

ANEXO Nº 3º

COMBINACION	LOCALIDAD	CRUZAMIENTO Nº	HUEYOS Nº	FECUNDACION		GASTRULA		LARVA		METAMORFOSIS
				Nº	%	Nº	%	Nº	%	
♀ <i>B. chilensis</i> ♂ <i>B. atacamenensis</i>	La Dehesa Vallenar	001	152	100	121	79.06	102	84.29	+	
♀ <i>B. chilensis</i> ♂ <i>B. chilensis</i>	La Dehesa La Dehesa	002	320	84.37	269	99.62	229	85.13	+	
♀ <i>B. chilensis</i> ♂ <i>B. chilensis</i>	La Dehesa La Dehesa	003	168	73.21	99	80.48	40	40.40	+	
♀ <i>B. chilensis</i> ♂ <i>B. atacamenensis</i>	La Dehesa Vallenar	004	141	81.56	107	93.04	33	30.84	+	
♀ <i>B. chilensis</i> ♂ <i>B. atacamenensis</i>	La Dehesa Vallenar	005	158	98.10	143	92.25	44	30.76	+	
♀ <i>B. chilensis</i> ♂ <i>B. chilensis</i>	La Dehesa Ovalle	006	263	56.27	95	64.18	43	45.26	+	
♀ <i>B. chilensis</i> ♂ <i>B. chilensis</i>	La Dehesa Quillimarí	007	233	90.12	161	76.66	67	41.61	+	
♀ <i>B. chilensis</i> ♂ <i>B. chilensis</i>	La Dehesa La Dehesa	008	205	97.56	182	91.0	142	78.02	+	
♀ <i>B. chilensis</i> ♂ <i>B. chilensis</i>	La Dehesa La Dehesa	009	351	85.75	203	67.44	138	67.98	+	
♀ <i>B. chilensis</i> ♂ <i>B. chilensis</i>	La Dehesa Ovalle	010	356	80.89	201	69.79	172	85.57	+	
♀ <i>B. chilensis</i> ♂ <i>B. chilensis</i>	La Dehesa Ovalle	011	272	44.85	89	72.95	71	79.77	+	
♀ <i>B. spinulosus</i> ♂ <i>B. spinulosus</i>	Farellones Farellones	012	277	100	155	55.95	128	82.58	+	
♀ <i>B. spinulosus</i> ♂ <i>B. spinulosus</i>	Farellones Farellones	013	271	100	230	84.87	192	83.47	+	
♀ <i>B. spinulosus</i> ♂ <i>B. chilensis</i>	Farellones La Dehesa	014	281	41.63	113	96.58	34	30.08	+	

COMBINACION	LOCALIDAD	CRUZAMIENTO Nº	HUEVOS Nº	FECUNDACION		GASTRULA		LARVA		METAMORFOSIS
				Nº	%	Nº	%	Nº	%	
♀ <i>B. spinulosus</i> ♂ <i>B. atacamenensis</i>	Farellones Vallenar	015	294	279	94.89	262	93.90	210	80.15	+
♀ <i>B. spinulosus</i> ♂ <i>B. atacamenensis</i>	Farellones Vallenar	016	331	273	82.47	161	58.97	138	85.71	+
♀ <i>B. chilensis</i> ♂ <i>B. chilensis</i>	La Dehesa La Dehesa	017	589	589	100	504	85.56	483	95.83	+
♀ <i>B. chilensis</i> ♂ <i>B. chilensis</i>	La Dehesa La Dehesa	018	391	391	100	332	82.91	297	89.45	+
♀ <i>B. chilensis</i> ♂ <i>B. spinulosus</i>	La Dehesa Farellones	019	447	328	73.37	316	96.34	308	97.46	+
♀ <i>B. chilensis</i> ♂ <i>B. spinulosus</i>	La Dehesa Farellones	020	290	201	69.31	187	93.03	143	76.47	+
♀ <i>B. chilensis</i> ♂ <i>B. atacamenensis</i>	La Dehesa Vallenar	021	416	328	78.84	323	98.47	315	97.52	+
♀ <i>B. chilensis</i> ♂ <i>B. atacamenensis</i>	La Dehesa Vallenar	022	334	327	97.90	323	98.77	316	97.83	+
♀ <i>B. chilensis</i> ♂ <i>B. chilensis</i>	La Dehesa La Dehesa	023 024	269 178	268 176	100 100	231 153	85.87 85.96	-	-	-
♀ <i>B. chilensis</i> ♂ <i>B. spinulosus</i>	La Dehesa Baños Morales	025	274	274	100	96	35.04	-	-	-
♀ <i>B. chilensis</i> ♂ <i>B. spinulosus</i>	La Dehesa Baños Morales	026	89	89	100	82	92.13	61	74.39	+
♀ <i>B. chilensis</i> ♂ <i>B. spinulosus</i>	La Dehesa Arica	027	228	228	100	120	52.63	87	72.5	+
♀ <i>B. chilensis</i> ♂ <i>B. spinulosus</i>	La Dehesa Arica	028	291	291	100	237	81.44	163	68.78	+

COMBINACION	LOCALIDAD	CRUZAMIENTO Nº	HUEVOS Nº	FECUNDACION		GASTRULA		LARVA		METAMORFOSIS
				Nº	%	Nº	%	Nº	%	
♀ <i>B. chilensis</i> ♂ <i>B. atacamenensis</i>	La Dehesa Vallenar	029	328	278	84.78	119	42.81	-	-	-
♀ <i>B. chilensis</i> ♂ <i>B. atacamenensis</i>	La Dehesa Vallenar	030	224	220	98.21	203	92.27	61	30.05	+
♀ <i>B. arenarum</i> ♂ <i>B. arenarum</i>	Mendoza Mendoza	031	616	616	100	608	98.70	576	94.7	+
♀ <i>B. arenarum</i> ♂ <i>B. spinulosus</i>	Mendoza Mendoza	032	486	390	80.24	307	78.71	227	73.94	+
♀ <i>B. arenarum</i> ♂ <i>B. spinulosus</i>	Mendoza Sn Isidro	033	368	343	93.21	336	98.00	310	92.30	+
♀ <i>B. arenarum</i> ♂ <i>B. spinulosus</i>	Mendoza Arica	034	625	415	66.4	296	71.32	250	84.45	+
♀ <i>B. arenarum</i> ♂ <i>B. atacamenensis</i>	Mendoza Vallenar	035	440	429	97.5	371	86.48	350	94.33	+
♀ <i>B. chilensis</i> ♂ <i>B. chilensis</i>	La Dehesa La Dehesa	036	165	165	100	160	97	157	98.1	+
♀ <i>B. chilensis</i> ♂ <i>B. spinulosus</i>	La Dehesa Sn. Isidro	037	464	386	83.18	306	79.27	274	89.54	+
♀ <i>B. spinulosus</i> ♂ <i>B. spinulosus</i>	Farellones Farellones	038	398	314	78.9	312	99.4	261	83.65	+
♀ <i>B. spinulosus</i> ♂ <i>B. arenarum</i>	Farellones Mendoza	039	671	582	86.7	571	98.1	215	37.65	+
♀ <i>B. spinulosus</i> ♂ <i>B. chilensis</i>	Farellones La Dehesa	040	302	213	70.5	200	93.9	169	84.5	+

A N E X O N° 3 b

COMBINACION	LOCALIDAD	CRUZAMIENTO N°	LARVAS N°	METAMORFOSIS N°	METAMORFOSIS %
♀ <i>B. chilensis</i> ♂ <i>B. spinulosus</i>	La Dehesa Baños Morales	026-1	19	13	68.42
♀ <i>B. chilensis</i> ♂ <i>B. spinulosus</i>	La Dehesa Arica	028-1	61	53	86.88
♀ <i>B. chilensis</i> ♂ <i>B. spinulosus</i>	La Dehesa Arica	028-2	70	66	94.28
♀ <i>B. chilensis</i> ♂ <i>B. atacamensis</i>	La Dehesa Vallenar	030-1	22	16	72.72
♀ <i>B. arenarum</i> ♂ <i>B. arenarum</i>	Mendoza Mendoza	031-1 031-2	44 44	41 33	93.18 75.00
♀ <i>B. arenarum</i> ♂ <i>B. arenarum</i>	Mendoza Mendoza	031-3 031-3	49 46	38 25	77.55 54.34
♀ <i>B. arenarum</i> ♂ <i>B. arenarum</i>	Mendoza Mendoza	031-4 031-5	41 40	35 28	85.36 70.00
♀ <i>B. arenarum</i> ♂ <i>B. arenarum</i>	Mendoza Mendoza	031-6 031-7	40 37	39 34	97.5 91.89
♀ <i>B. arenarum</i> ♂ <i>B. arenarum</i>	Mendoza Mendoza	031-8	37	27	72.97
♀ <i>B. arenarum</i> ♂ <i>B. spinulosus</i>	Mendoza Sn. Isidro	032-1 032-2	60 60	52 42	86.66 70.00
♀ <i>B. arenarum</i> ♂ <i>B. spinulosus</i>	Mendoza Arica	034-1 034-2	73 73	60 59	82.19 80.82
♀ <i>B. arenarum</i> ♂ <i>B. atacamensis</i>	Mendoza Vallenar	035-1 035-2 035-3	48 50 47	31 25 19	64.58 50.00 40.42
♀ <i>B. chilensis</i> ♂ <i>B. chilensis</i>	La Dehesa La Dehesa	036-1	32	32	100

COMBINACION	LOCALIDAD	CRUZAMIENTO N°	LARVAS N°	METAMORFOSIS N°	METAMORFOSIS %
♀ <i>B. chilensis</i>	La Dehesa	037-1	60	28	46.66
♂ <i>B. spinulosus</i>	Mendoza	037-2	59	40	67.79
		037-3	50	27	54.00
♀ <i>B. spinulosus</i>	Farellones	038-1	54	31	57.40
♂ <i>B. spinulosus</i>	Farellones	038-2	50	38	76.00
		038-3	51	26	50.98
♀ <i>B. spinulosus</i>	Farellones	039-1	40	16	40.00
♂ <i>B. arenarum</i>	Mendoza	039-2	35	10	28.57
♀ <i>B. spinulosus</i>	Farellones	040-1	51	24	47.05
♂ <i>B. chilensis</i>	La Dehesa	040-2	50	34	68.00
		040-3	51	29	56.86
♀ <i>B. spinulosus</i>	Farellones	015-1	57	31	54.39
♂ <i>B. atacamensis</i>	Vallenar				

