

VCH-FC
MA6-B
N874

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS Y FARMACEUTICAS

ESPECIALIZACION CARIOLOGICA EN ANUROS
(AMPHIBIA - LEPTODACTYLIDAE)

IRMA MARGOT NORTHLAND LEPPE

- 1983 -

Op. Port. G. rods

ESPECIALIZACION CARIOLOGICA EN ANUROS

(*AMPHIBIA - LEPTODACTYLIDAE*)

TESIS

ENTREGADA A LA

UNIVERSIDAD DE CHILE

EN CUMPLIMIENTO PARCIAL DE LOS REQUISITOS

PARA OPTAR AL GRADO DE

MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

CON MENCIÓN EN GENÉTICA

FACULTAD DE CIENCIAS
BÁSICAS Y FARMACÉUTICAS

POR

IRMA MARGOT NORTHLAND LEPPE

MARZO DE 1983

PATROCINANTE : DR. ALBERTO VELOSO MARTINEZ

Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magister presentada por la Candidata:

IRMA MARGOT NORTHLAND LEPPE

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Genética.

Patrocinante de Tesis:

Dr. Alberto Veloso M.

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Juan Fernández H.

Prof. Madeleine Lamborot Ch.

Dr. Angel Spotorno O.

The image shows four handwritten signatures, each written over a horizontal line. The first signature is in black ink and is the most prominent. The second signature is in blue ink. The third and fourth signatures are in black ink. The signatures are written in a cursive, somewhat stylized script.

A mi hijo Roland

A mi madre

A mi familia

A mis amigos

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Alberto Veloso M., Director de esta Tesis, por su estímulo, orientación y críticas en la realización de esta Tesis, y por la buena disposición con que me ha recibido siempre en su laboratorio.
- A la Prof. Juana Capetillo, de la Universidad de Antofagasta, por su colaboración y permanente preocupación en el desarrollo de esta Tesis.
- Al Dr. Lafayette Eaton por su guía y valiosas sugerencias en la parte estadística.
- A los Profesores y amigos del Departamento de Biología Celular de la Universidad de Chile, en especial a Jorge Sans quien me orientó en algunos aspectos experimentales de este trabajo. También agradezco a Sylvia Leiva por sus oportunas sugerencias.
- A los colegas del grupo de Biología de la Universidad de Antofagasta, quienes hicieron posible mi estadía en el programa de Post Grado.

- A los amigos del Grupo de Biología de Vertebrados: Alberto, Patricia, Pepe, Michel, Nelson, Mario, Sonia y Dr. Valencia, de quienes he recibido un constante estímulo y ayuda en el transcurso del trabajo.

- Esta Tesis ha sido parcialmente financiada por el Depto. de Desarrollo de la Investigación U. de Chile. Proy. 922-835 del Dr. A. Veloso M.

INDICE DE MATERIAS

| | PAG. |
|--|------|
| A. PAGINAS PRELIMINARES | |
| Página de título | i |
| Informe de aprobación | |
| Dedicatoria | ii |
| Agradecimientos | iii |
| Indice de materias | v |
| Lista de Tablas | vii |
| Lista de Figuras | x |
| Resumen | xi |
| B. PAGINAS DE TEXTO | |
| INTRODUCCION | 1 |
| MATERIALES Y METODOS | |
| 1. Determinación cuantitativa de ADN por <u>Ci</u> tofluorometría | 9 |
| 2. Determinación cuantitativa de ADN por el método Fotocolorimétrico | 13 |
| 3. Mediciones Celulares | 15 |
| RESULTADOS | |
| 1. Estandarización del método citofluorome- trico y determinación de las cantidades | |

INDICE DE MATERIAS (CONT.)

| | PAG. |
|---|------|
| de ADN (UA) en algunas especies de anfibios. | 17 |
| 2. Determinación de valores absolutos de ADN por el método fotocolorimétrico. | 26 |
| 3. Mediciones nucleares y celulares | 29 |
| DISCUSION | 38 |
| CONCLUSIONES | 49 |
| LISTA DE REFERENCIAS | 50 |

LISTA DE TABLAS

| | PAG. |
|--|------|
| 1. Tiempo de desarrollo embriona <u>rio</u> y larvario en algunas especies de Telmatobiinae | 8 |
| 2. Cantidad de ADN nuclear (UA) de trece especies de anfibios determinada por Citofluorometría | 21 |
| 3. Anova jerarquizado de la cantidad de ADN presente en eritrocitos de doce especies de anfibios | 24 |
| 4. Agrupaciones de las especies estudiadas según el contenido de ADN (UA) de sus eritrocitos. | 25 |
| 5. Cantidades de ADN (pg/N de eritrocitos de tres especies de anfibios obtenidos por el método fotolorimétrico | 28 |

| | PAG. |
|--|------|
| 6. Mediciones Celulares | 33 |
| 7. Anova jerarquizado del área <u>nu</u> clear de eritrocitos en doce especies de anfibios | 34 |
| 8. Anova jerarquizado del volu - men nuclear de eritrocitos en doce especies de anfibios | 35 |
| 9. Anova jerarquizado del área <u>ce</u> lular de eritrocitos en doce especies de anfibios | 36 |
| 10. Anova jerarquizado del tamaño celular de eritrocitos en do- ce especies de anfibios. | 37 |
| 11. Número cromosómico (2n), Núme <u>r</u> o fundamental (NF) , cantidad de ADN estimado por citofluorome <u>r</u> tría (UA) y estimación de ADN (pg/N) por el método de Hatch | |

| | PAG. |
|---|------|
| y col. de doce especies de anfibios (Anura-Leptodactylidae). | 45 |
| 12. Coeficiente de correlación (r) para área nuclear, área celular, volumen nuclear y tamaño celular versus contenido de ADN de eritrocitos de doce especies de anfibios. | 46 |

LISTA DE FIGURAS

| | PAG. |
|---|------|
| 1. Intensidad de la reacción de <u>Feul</u> gen en núcleos de eritrocitos de <i>Bufo chilensis</i> sometidos a dife- rentes tiempos de hidrólisis. | 20 |
| 2. Histograma de las cantidades de ADN presentes en los eritrocitos de <i>Eupsophus migueli</i> después de 30 minutos de Hidrólisis. | 22 |
| 3. Microfotografías de contraste de fases de eritrocitos de: a) <u>Tel</u> <i>matobius pefauri</i> , b) <i>Alsodes tu-</i> <i>multuosus</i> , c) <i>Batrachyla lepto-</i> <i>pus</i> , d) <i>Eupsophus roseus</i> , e) <u>Ca</u> <i>diverbera caudiverbera</i> . | 31 |
| 4. Cantidades de ADN y mediciones - celulares en doce especies de <u>an</u> fibios. | 47 |

RESUMEN

En este trabajo se estudiaron las variaciones del contenido de ADN nuclear de 12 especies de anfibios de la familia Leptodactylidae, subfamilia Telmatobiinae.

Mediante la utilización de técnicas de citofluorometría y fotolorimetría se determinó cuantitativamente el ADN nuclear en preparaciones microscópicas y el ADN extraído de suspensiones celulares de concentración conocida.

En frotis sanguíneos se hicieron mediciones de área nuclear, área celular, volumen nuclear y tamaño celular, que permitieron estimar la cantidad de ADN nuclear de las diversas especies.

El análisis de conjunto de la cantidad de ADN nuclear y de los cariotipos de estas especies permiten proponer una tendencia de evolución cariológica para Telmatobiinae. Los reordenamientos cromosómicos en el grupo se habrían producido conjuntamente con una disminución importante de la cantidad de ADN nuclear. Las especies más avanzadas presentan una cantidad menor de ADN nuclear que las especies más primitivas.

Se analizaron conjuntamente las variaciones cuantitativas del ADN y las características del desarrollo embrionario y larvario conocidas. Para tres especies con que se cuenta in

formación, la duración del período embrionario estaría directamente correlacionada con la cantidad de ADN nuclear.

El posible significado evolutivo de las variaciones de las cantidades de ADN nuclear en este grupo de especies, tiene relevancia por el hecho de que constituyen un grupo natural, lo que supone que comparten un sustrato genético común.

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

Las especies de anfibios anuros que se encuentran en Chile están agrupadas en dos familias: Leptodactylidae y Bufonidae. Telmatobiinae es una subfamilia de Leptodactylidae a la cual pertenecen las diferentes especies de anfibios consideradas en este trabajo.

El origen de los anfibios de la subfamilia Telmatobiinae estaría asociado al Bosque Temperado Austral. Esta es una región caracterizada por su uniformidad climática a lo largo de las distintas estaciones del año (1). Los géneros que agrupan estas especies son poco diversificados con excepción de *Telmatobius* (19 especies). Este género está representado en Chile por cinco especies: *T. peruvianus*, *T. marmoratus*, *T. montanus*, *T. halli* y *T. pefauri*. Algunas de las especies de Telmatobiinae no están restringidas al Bosque Temperado. Las especies de *Telmatobius* son todas andinas y se distribuyen hacia el Norte, fuera de los límites del Bosque. En *Eupsophus* se describen tres especies: *E. roseus*, *E. vittatus* y *E. migueli*, restringidas en su distribución al Bosque Temperado. El género *Batrachyla* está formado por tres especies: *B. leptopus*, *B. antartandica* y *B. taeniata*. *B. leptopus* y *B. antartandica* extienden su distribución desde Angol hasta Aysén; *B. taeniata* tiene un rango de distribución más extenso que incluye también

la estepa semiárida centrochilena (2). En *Alsodes* se reconocen cuatro especies: *A. monticola* y *A. barrioi* distribuidas en el Bosque Temperado, y *A. nodosus* y *A. tumultuosus* presentes en la estepa semiárida y Cordillera de los Andes, respectivamente. El género *Caudiverbera* es monotípico, *C. caudiverbera* se distribuye en Chile desde la zona Central hasta Puerto Montt (3).

Los tiempos de desarrollo embrionario y larvario de las especies consideradas en esta tesis aparece en la Tabla 1; los tiempos de desarrollo embrionario de las tres especies con que se cuenta información se determinaron a una temperatura de 18°C y los tiempos de desarrollo larvario corresponden a observaciones en los lugares de colecta a excepción de *B. leptopus* y *C. caudiverbera*, que se determinaron en el laboratorio.

En Telmatobiinae un número importante de las especies de los géneros *Telmatobius*, *Batrachyla*, *Caudiverbera* y *Alsodes* (en parte) tienen un cariotipo de $2n = 26$ cromosomas que son principalmente del tipo metacéntrico o submetacéntrico. *Alsodes nodosus* es una excepción, con $2n = 22$ cromosomas; sin embargo, esta especie mantiene las características de un cariotipo simétrico, en el cual todos los cromosomas son aproximadamente del mismo tamaño y tienen el centrómero en posición mediana o submediana (4).

Otro aspecto de la variabilidad cromosómica en *Telma*

tobiinae está presente en las especies del género *Eupsophus*, - con números diploides que varían entre un $2n = 28$ y $2n = 30$. - Estos cariotipos son asimétricos y se caracterizan por la disminución gradual del tamaño de los cromosomas y por la presencia de cromosomas telocéntricos. El número cromosómico ($2n$) de las especies de estos géneros se muestra en la Tabla 11.

En las especies de Telmatobiinae, la heterocromatina constitutiva se presenta en cantidades variables y con un patrón de distribución particular (5). En estos Telmatobinos, el aumento de heterocromatina constitutiva es considerado como un mecanismo modificador de la morfología cromosómica (6).

Las diferencias en el contenido de ADN nuclear entre especies relacionadas, dependen en parte de variaciones de la cantidad de ADN repetitivo (7). La localización de este ADN en los cromosomas se corresponde con la de la heterocromatina constitutiva (8).

La cantidad de ADN nuclear, o tamaño del genoma en una misma especie, en diversos tejidos con un mismo grado de ploidía, es una constante (9) (10). En los distintos grupos de vertebrados en que estas mediciones se han realizado, las formas más avanzadas parecen tener valores más bajos que las especies más primitivas. El estudio comparativo del ADN adquiere relevancia cuando se compara un conjunto de especies relacionadas. (11).

En los peces dipnoicos y los urodelos hay altos contenidos de ADN, alcanzando estos últimos valores de 180 picogramos por núcleo (pg/N). En las aves y los mamíferos la cantidad de ADN nuclear no excede de 10 pg/N. En anfibios anuros es característica la variabilidad interespecífica de este parámetro. Las especies estudiadas se agrupan en torno a un valor modal de alrededor de 8 pg/N con un rango de variación entre 2 y 20 pg/N (12).

Respecto a las cantidades de ADN en los anfibios chilenos, existe sólo un trabajo previo en el cual se determinaron las cantidades de ADN por citofotometría en 2 especies de la familia Leptodactylidae (13).

No parece haber una correlación entre las cantidades de ADN y el número de cromosomas en los urodelos en tres especies de una misma familia o de distintas familias (14). Sin embargo, se ha demostrado que hay una relación entre la cantidad de ADN y el número fundamental de brazos cromosómicos en los cariotipos (15), además, midiendo el cariotipo en fotografías aumentadas de placas metafásicas se puede determinar que el contenido de ADN nuclear es proporcional al tamaño de los cromosomas (16)

Se ha planteado que tanto en Leptodactylidae, como en la subfamilia Telmatobiinae existe una tendencia a la reducción del número de cromosomas (17) (18). Con la medición de la car

tividad de ADN nuclear se podría determinar si esta tendencia, que se expresa en diversos reordenamientos de los cariotipos con disminución del número diploide y modificaciones extensas de la morfología cromosómica, está asociada a disminución o aumento del tamaño del genoma.

Otro grupo de observaciones en anuros muestran que existe una correlación inversa entre la cantidad de ADN y la velocidad de los primeros estados del desarrollo embrionario y también con el tiempo que demoran las especies en completar la metamorfosis. Se demostró que la velocidad del desarrollo desde el estado de dos células hasta la etapa de circulación branquial, a 20°C, en *Scaphiopus*, *Bufo* y *Rana*, está correlacionada con sus respectivas cantidades de ADN: 3, 11 y 18 pg/N de ADN respectivamente (19) (20).

Al comparar un mismo tipo celular en distintas especies de anuros, se ha determinado que las células más grandes tienen a su vez núcleos más grandes. La relación núcleo citoplasmática que se establece en estas células más grandes es a favor del núcleo. Tanto la evolución del tamaño del genoma como la evolución del tamaño celular, estarían estrechamente ligados y obedecerían a causas comunes. Cambios en el tamaño del genoma y en el tamaño celular, serían mutuamente interdependientes expresando factores selectivos que operan sobre las características metabólicas del crecimiento y desarrollo de las especies. (21) (22)

En resumen, en este grupo de anfibios chilenos de la subfamilia Telmatobiinae se conocen varias características citogenéticas como: número, forma y tamaño de los cromosomas, distribución de heterocromatina, modalidades reproductivas, velocidad de desarrollo embrionario y larvario, etc. de modo tal que, si las variaciones del ADN tienen una correlación con estas características, los telmatobinos son un grupo apropiado para probar algunas hipótesis sobre el significado evolutivo de la variación del ADN.

De acuerdo a los antecedentes presentados, los objetivos principales de esta tesis son:

1. Determinar el contenido de ADN nuclear en especies de anfibios de la subfamilia Telmatobiinae (Anura-Leptodactylidae), estableciendo los rangos de variación existente.
2. Determinar las tendencias de evolución cariológica en el grupo de los telmatobinos, incorporando al estudio de los cariotipos (número y morfología cromosómica), la cuantificación del contenido de ADN nuclear.
3. Verificar si hay una relación entre la cantidad de ADN y parámetros citológicos como área nuclear, área celular, volumen nuclear y tamaño celular.
4. Explorar las posibles relaciones entre la cantidad de AIN

y las características de la reproducción y del desarrollo de estas especies.

T A B L A 1

TIEMPO DE DESARROLLO EMBRIONARIO Y LARVARIO EN ALGUNAS
ESPECIES DE TELMATOBIINAE

| ESPECIES | DESARROLLO EMBRIONARIO (DIAS) | DESARROLLO LARVARIO (MESES) | LOCALIDAD DONDE SE HICIERON LAS OBSERVACIONES | REFERENCIAS |
|----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|--|---------------|
| <i>Eupsophus roseus</i> | - | 1 | VALDIVIA (39°40'S; 73°15'0) | (23) |
| <i>Eupsophus vittatus</i> | - | 1 | MEHUIN (39°27'S; 7°10'0) | (23) |
| <i>Batrachyla taeniata</i> | 10 | 2 | MELIPILLA (33°42'S; 71°15'0) | (24) (25) |
| | | 6 | VALDIVIA (39°49'S; 73°15'0) | (24) |
| <i>Batrachyla leptopus</i> | 11 | 7 | RINIHUE (39°43'S; 72°26'0) | (26) |
| <i>Alsodes tumultuosus</i> | - | 12 | LA PARVA (33°18'S; 70°20'0) | (27) |
| <i>Telmatobius marmoratus</i> | - | 12 | PARINACOTA (18°12'S; 69°16'0) | (28) |
| <i>Telmatobius halli</i> | - | 12 | CALAMA (22°27'S; 68°55'0) | (29) |
| <i>Caudiverbera caudiverbera</i> | 20 | 24 | SANTIAGO (33°27'S; 70°40'0) | (3) (30) (31) |

- = No se cuenta con información

MATERIALES Y METODOS

1. DETERMINACION CUANTITATIVA DE ADN POR CITOFUOROMETRIA

La determinación cuantitativa de ADN se realizó en 12 especies de anfibios, correspondientes a 5 géneros de la familia Leptodactylidae: *Telmatobius halli*, *Telmatobius peruvianus*, *Telmatobius marmoratus*, *Telmatobius pefauri*, *Eupsophus migueli*, *Eupsophus roseus*, *Eupsophus vittatus*, *Alsodes nodosus*, *Alsodes tumultuosus*, *Barachyla taeniata*, *Batrachyla leptopus* y *Caudiverbera caudiverbera*. Se utilizó como patrón la especie *Bufo chilensis*, por ser fácil de obtener y por pertenecer a una familia (Bufonidae) extensamente estudiada de la que se conocen los rangos de variación interespecíficos de las cantidades de ADN de 12 especies. (11).

Los ejemplares empleados en esta tesis están depositados en la colección de anfibios de la Unidad de Biología de Vertebrados del Departamento de Biología Celular y Genética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Las determinaciones de ADN se hicieron en frotis de eritrocitos teñidos con la técnica de Feulgen. Se utilizó una técnica de Feulgen modificada. (32). Las etapas son las siguientes:

1.1. OBTENCION DE LA MUESTRA

La sangre se obtuvo de ejemplares anestesiados mediante punción cardíaca con una jeringa heparinizada. Se realizaron los frotis, y una vez que se secaron al aire durante 10 minutos, se fijaron en ALFAC (etanol de 95°, 85 cc; formaldehído 40%, 10 cc; y ácido acético glacial, 5 cc) durante 1 hora. (33). Luego los frotis se dejaron secar al aire.

1.2. HIDROLISIS

La hidrólisis se realizó en HCl 5 N a 20°C, previa hidratación de las muestras en agua destilada durante 10 minutos. El tiempo óptimo de hidrólisis se determinó sometiendo los frotis de las 12 especies estudiadas a tres tiempos diferentes: 30, 60 y 180 minutos.

En la especie *Bufo chilensis* usada como patrón, se obtuvo la curva de hidrólisis sometiendo el ADN de frotis de eritrocitos a tiempos diferentes de hidrólisis; el resultado aparece en la Figura 1.

- Se realizó un control de hidrólisis incubando los frotis de eritrocitos de cada una de las especies estudiadas en agua destilada y tiñendo posteriormente con reactivo de Schiff.

Cuando se realizaron las hidrólisis del ADN de cada una de las especies en estudio a los diferentes tiempos, se incluyó un frotis de eritrocitos de *Bufo chilensis*.

La hidrólisis se detuvo lavando los frotis dos o tres veces en agua destilada fría, durante 5 a 10 minutos.

1.3. TINCION

Los frotis se tiñeron durante 40 minutos, con el reactivo de Schiff modificado (pararosanilina Gurr C.I. N° 42500 al 0,01%) al cual se le burbujeó SO₂ hasta su total decoloración (pH 1,6). Posteriormente, los frotis se lavaron tres veces en agua sulfurosa (metabisulfito de sodio 10%, 5 ml; HCl 1 N, 5 ml; agua destilada, 100 ml), 2 minutos en agua destilada y finalmente 5 minutos en agua corriente.

1.4. DESHIDRATACION Y MONTAJE DE LA PREPARACION

Se deshidrató en alcoholes de graduación ascendentes (70°-95° y 100°). El montaje de la preparación se realizó en fluormount.

1.5. CUANTIFICACION DEL ADN

Se utilizó un Citofluorómetro Zeiss modelo 0,1 con el set de filtros Zeiss para la reacción de Feulgen

(BP 546, FT 580, LP 590), siendo BP 546 el filtro excitador.

Se cuantificó el ADN de tres individuos de cada especie, utilizando tres tiempos diferentes de hidrólisis por cada uno; en cada tiempo se midieron por lo menos 100 núcleos.

La medición citofluorométrica de ADN se expresó en unidades arbitrarias (UA). Se denomina unidad arbitraria de ADN al valor resultante de la conversión de la fluorescencia de un núcleo en un pulso eléctrico registrado en un inscriptor. La inscripción se desplaza entre un valor mínimo de 1 y un valor máximo de 100.

1.6. ANALISIS ESTADISTICO

Con los datos obtenidos se realizó un análisis estadístico en un computador IBM 370 del Centro de Computación de la Universidad de Chile. Utilizando un programa SPSS se realizó la estadística básica, kurtosis y asimetría de las cantidades de ADN de cada una de las 12 especies de anfibios estudiadas. Se realizó una prueba de normalidad de los datos, obteniéndose los histogramas de estas 12 especies y el de la especie *Bufo chilensis*, en los tiempos de hidrólisis -

considerados. Mediante un programa Fortran modificado (34), se realizó un análisis de varianza jerarquizada considerando comparaciones interespecíficas, intraespecíficas y variaciones entre las mediciones de las cantidades de ADN de un mismo individuo.

2. DETERMINACION CUANTITATIVA DEL ADN POR EL METODO FOTOCOLORIMETRICO.

El ADN se extrajo de un número conocido de células (eritrocitos) y se cuantificó por la técnica colorimétrica de la difenilamina (35). Las etapas consideradas fueron las siguientes:

2.1. DETERMINACION DEL NUMERO DE CELULAS

La cantidad de glóbulos rojos se determinó mediante recuentos en una cámara de Neubauer, diluyendo un volumen conocido de sangre en solución salina para anfibios de concentración al 6:1000.

2.2. EXTRACCION DEL ADN

Un volumen conocido de sangre diluída se trató con ácido tricloroacético (ATC) frío al 10%. Se homogeneizó y se centrifugó a 1000 g por 8 minutos a temperatura ambiente. Se lavó el sedimento con ATC frío

al 5%. Posteriormente el sedimento se resuspendió tres veces con etanol 80% frío, y dos veces con alcohol éter (3 volúmenes de etanol 95° con un volumen de éter etílico) frío, centrifugándose cada vez.

El sedimento se resuspendió en 2 ml de ácido perclórico (APC) 0,5 N; posteriormente se calentó a 90°C durante 30 minutos, se enfrió y se centrifugó. El sobrenadante contiene los ácidos nucleicos y el sedimento las proteínas. (36)

2.3. CUANTIFICACION DEL ADN

Se tomaron alícuotas del sobrenadante obtenido en 2.2 Se agregó APC 0,5 N frío y reactivo de difenilamina (difenilamina 0.75 gr; ácido acético glacial 50 ml ; ácido sulfúrico 0.75 ml y acetaldehído 0.25 ml). Las alícuotas consideradas estuvieron de acuerdo al óptimo de la difenilamina (20-100 µg de ADN). Posteriormente se dejó en la oscuridad durante 18 horas a 30°C El blanco contenía sólo APC 0,5 N. Al mismo tiempo, se incubaron con el reactivo alícuotas de 20, 40, 60, 80 y 100 µl de solución de ADN de timo de ternero (Sigma), cuya concentración era de 1 mg/ml. Se leyó la densidad óptica a 600 nm. (34)

Se determinó la cantidad de ADN por célula dividiendo

do la cantidad de ADN total por el número de células en que se realizó la extracción.

3. MEDICIONES CELULARES

Las mediciones celulares de 12 especies de anfibios: *Telmatobius halli*, *Telmatobius peruvianus*, *Telmatobius pefauri*, *Eupsophus migueli*, *Eupsophus roseus*, *Eupsophus vittatus*, *Alsodes nodosus*, *Alsodes tumultuosus*, *Batrachyla taeniata*, *Batrachyla leptopus* y *Caudiverbera caudiverbera*, fueron realizadas en frotis de eritrocitos fijados en ALFAC (ver 1-1)

Los diámetros de las células y de sus núcleos se midieron con un ocular micrométrico Baush y Lomb (0,001 mm). Con estas mediciones se estimó: área nuclear, área celular, volumen nuclear y tamaño celular. Para ello se utilizaron las fórmulas más usadas por diversos autores para este tipo de células ya que de este modo se puede establecer comparaciones:

$$\text{Area Nuclear} \quad AN = a \times b \quad (37)$$

$$\text{Area Celular} \quad AC = c \times d \quad (38)$$

$$\text{Volumen Nuclear} \quad VN = \frac{a^2 \times b}{1.91} \quad (39)$$

$$\text{Tamaño Celular} \quad TC = \sqrt{c \times d} \quad (40)$$

siendo a = Diámetro menor del núcleo

b = Diámetro mayor del núcleo

c = Diámetro mayor de la célula

d = Diámetro menor de la célula

1,91 = Constante para células elipsoides

Los datos obtenidos de área nuclear y celular, volumen nuclear y tamaño celular fueron sometidos a los mismos análisis estadísticos indicados en 1.6.

R E S U L T A D O S

1. ESTANDARIZACION DEL METODO CITOFUOROMETRICO Y DETERMINACION DE LAS CANTIDADES DE ADN EN UNIDADES ARBITRARIAS (UA) EN ALGUNAS ESPECIES DE ANFIBIOS.

Los frotis de sangre de dos individuos de *Bufo chilensis* se tiñeron con el método de Feulgen después de someterlos a distintos tiempos de hidrólisis. Se determinó el valor promedio de ADN para cada tiempo de hidrólisis y con estos valores se confeccionó la curva de la Figura 1. El test de Anova, aplicado para comparar los dos individuos (considerando los tiempos diferentes de hidrólisis), reveló que no hay diferencias significativas entre ellos.

La Tabla 2 muestra los promedios de los valores de ADN determinados por citofluorometría de las doce especies de anfibios estudiadas y de la especie patrón, *Bufo chilensis*. Estos valores oscilan entre 32.09 ± 1.2 (UA) en *Telmatobius pefauri* y 79.43 ± 0.64 (UA) en *Caudiverbera caudiverbera*. La cantidad de ADN determinada para la especie patrón, *Bufo chilensis* es de 62.48 ± 0.6 (UA).

Los análisis estadísticos de normalidad para las mediciones en cada individuo y en cada tiempo de hidrólisis dieron curvas normales en todos los casos. La Figura 2 muestra

una distribución normal de las cantidades de ADN a los 30 minutos de hidrólisis obtenida en los eritrocitos de *Eupsophus migueli*.

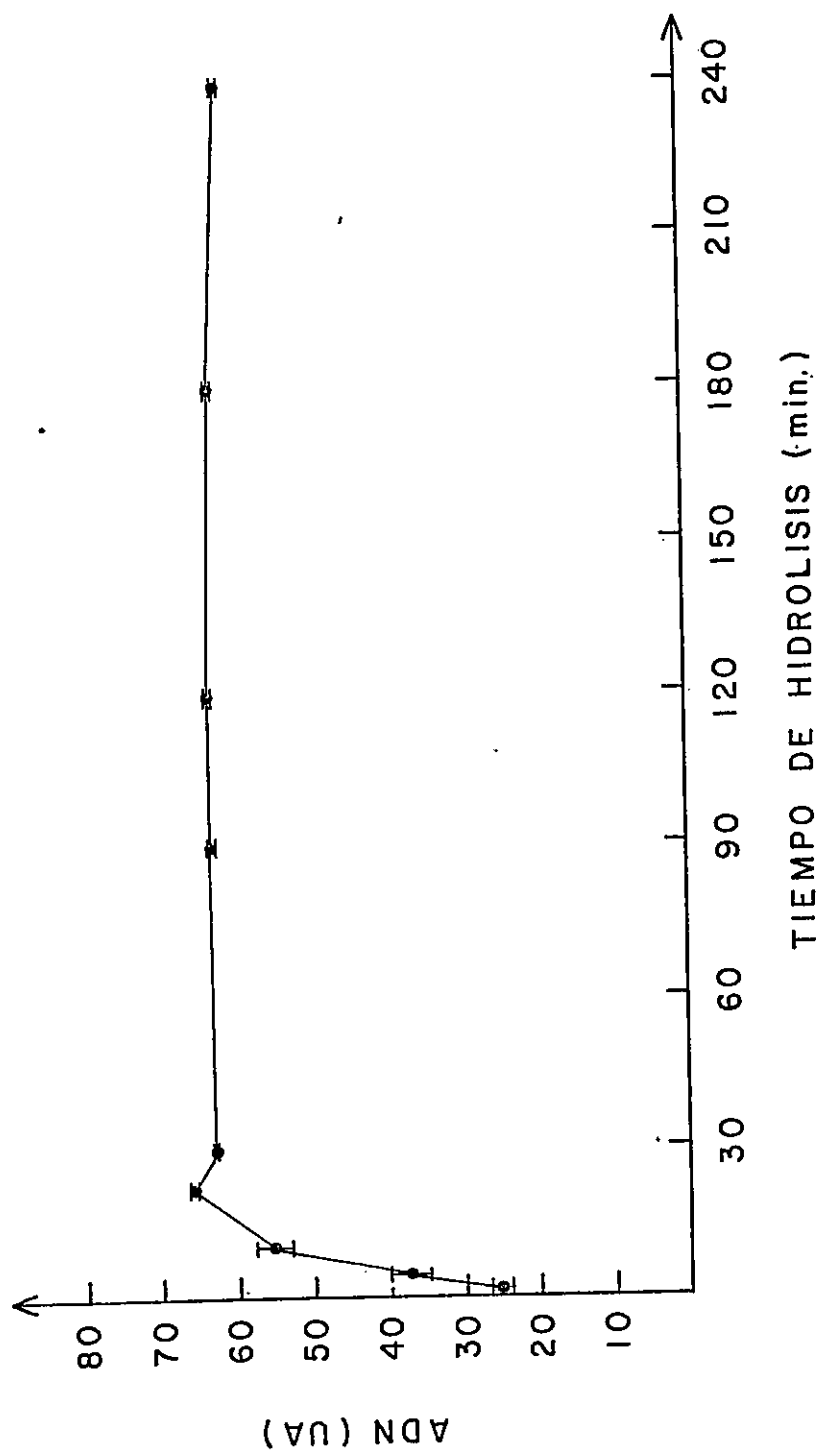
Para analizar la variación existente en las cantidades de ADN presentes entre diferentes especies, entre individuos de una misma especie y entre medidas de cada individuo, se aplicó un test de Anova jerarquizado (Tabla 3). Dichos análisis muestran que existe una mayor variación entre las distintas especies con respecto a la de los individuos de una misma especie y respecto de las medidas provenientes de un mismo individuo. Las diferencias de las varianzas de los tres niveles comparados fueron significativas ($p < 0.001$).

Para determinar la magnitud de las diferencias en el contenido de ADN entre las distintas especies se aplicó el test "a posteriori" de Student - Newman - Keuls (34); con los resultados obtenidos es posible formar cuatro grupos de anfibios que difieren en forma significativa en sus cantidades de ADN. Las especies que están dentro de cada grupo no presentan diferencias significativas en el contenido de ADN (Tabla 4). En el primer grupo de anfibios se encuentran: *Telmatobius pefauri*, *Telmatobius marmoratus*, *Batrachyla taeniata* y *Telmatobius peruvianus*, cuyas cantidades de ADN oscilan entre 32 y 36 UA. En el segundo grupo de anfibios; que incluye *Alsodes nodosus*, *Batrachyla leptopus* y *Alsodes tumultuosus*, la cantidad de ADN fluc

tua entre 43 y 47 UA. Las especies que se encuentran en los bordes de las dos agrupaciones anteriores son : *Batrachyla taeniata*, *Telmatobius peruvianus* y *Telmatobius halli*, entre estas especies no hay diferencias significativas en las cantidades de ADN. En el tercer grupo se encuentran *Eupsophus roseus*, *Eupsophus vittatus* y *Eupsophus migueli*, cuyo contenido de ADN oscila entre 65 y 70 UA. En el cuarto grupo está *Caudiverbera caudiverbera*, con 79 UA de ADN.

FIGURA 1

INTENSIDAD DE LA REACCION DE FEULGEN EN NUCLEOS DE ERITROCITOS DE *Bufo chilensis*
SOMETIDOS A DIFERENTES TIEMPOS DE HIDROLISIS



T A B L A 2

CANTIDAD DE ADN NUCLEAR (UA) DE TRECE ESPECIES DE ANFIBIOS DETERMINADA POR CITOFLUOROMETRIA

| ESPECIE | N | SEXO | | n | ADN. (U A) | |
|----------------------------------|---|------|---|-----|-------------|--------|
| | | ♀ | ♂ | | \bar{X} | ES |
| <i>Telmatobius halli</i> | 3 | 2 | 1 | 370 | 39.97 | + 1.38 |
| <i>Telmatobius peruvianus</i> | 3 | 1 | 2 | 392 | 36.52 | + 1.97 |
| <i>Telmatobius marmoratus</i> | 3 | 2 | 1 | 337 | 32.3 | + 1.77 |
| <i>Telmatobius pefauri</i> | 3 | 2 | 1 | 339 | 32.09 | + 1.2 |
| <i>Eupsophus miguelyi</i> | 3 | 1 | 2 | 373 | 70.98 | + 1.88 |
| <i>Eupsophus roseus</i> | 3 | 2 | 1 | 313 | 64.35 | + 1.38 |
| <i>Eupsophus vittatus</i> | 3 | 1 | 2 | 343 | 69.17 | + 2.31 |
| <i>Alsodes nodosus</i> | 3 | 2 | 1 | 327 | 43.44 | + 1.04 |
| <i>Alsodes tumultuosus</i> | 3 | 1 | 2 | 294 | 47.88 | + 1.14 |
| <i>Batrachyla taeniata</i> | 3 | 3 | 0 | 358 | 34.69 | + 1.22 |
| <i>Batrachyla leptotus</i> | 3 | 1 | 2 | 336 | 44.2 | + 0.54 |
| <i>Caudiverbera caudiverbera</i> | 3 | 1 | 2 | 338 | 79.43 | + 0.64 |
| <i>Bufo chilensis</i> | 2 | 1 | 1 | 224 | 62.48 | + 0.6 |

N = Número de individuos

n = Número de núcleos medidos

UA = Unidades arbitrarias de ADN

FIGURA 2

Histograma de las cantidades de ADN presentes en los eritrocitos de *Eupsophus migueli* después de 30 minutos de hidrólisis. (Los números entre paréntesis indican la frecuencia de cada medición.)

```

CODE
67. **** ( 3)
I
I
68. *****( 7)
I
I
69. *****( 8)
I
I
70. *****( 16)
I
I
71. *****( 21)
I
I
72. *****( 22)
I
I
73. *****( 15)
I
I
74. *****( 11)
I
I
75. *****( 13)
I
I
76. **** ( 5)
I
I

```

HISTOGRAMAS, ETC.

FILE DATOS1 (CREATION DATE = 12/02/81)
SUBFILE EM21

```

77. **** ( 3)
I
I
78. ** ( 1)
I
I

```



T A B L A 3

ANOVA JERARQUIZADO DE LA CANTIDAD DE ADN PRESENTE EN ERITROCITOS DE DOCE ESPECIES DE ANFIBIOS

T A B L A D E A N O V A

| FUENTE DE VARIACION | gl | CM | F _s |
|--|------|----------|----------------|
| ENTRE LAS 12 DIFERENTES ESPECIES | 12 | 91388.75 | 87.27 |
| ENTRE INDIVIDUOS DE LA MISMA ESPECIE | 25.2 | 1047.13 | 228.64 |
| ENTRE MEDIDAS DE UN MISMO INDIVIDUO | 4626 | 4.51 | |
| $F_{0.001(12,25)} = 4.31$ $F_{0.001(30,120)} = 2.26$ | | | |

P < 0.001

gl = Grados de libertad

CM = Cuadrados medios

F_s = Cuociente de cuadrados medios

T A B L A 4

AGRUPACION DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS SEGUN EL CONTENIDO
DE ADN (UA) DE SUS ERITROCITOS

| ADN (UA) | ESPECIES |
|-------------|--|
| 32 - 36 | <p><i>Telmatobius pefauri</i> <i>Telmatobius marmoratus</i> <i>Batrachyla taeniata</i> <i>Telmatobius peruvianus</i></p> |
| 43 - 47 | <p><i>Telmatobius halli</i> <i>Alsodes nodosus</i> <i>Batrachyla leptopus</i> <i>Alsodes tumultuosus</i></p> |
| 64 - 70 | <p><i>Eupsophus roseus</i> <i>Eupsophus vittatus</i> <i>Eupsophus migueli</i></p> |
| 79 | <i>Caudiverbera caudiverbera</i> |

2. DETERMINACION DE VALORES ABSOLUTOS DE ADN EN ERITROCITOS POR EL METODO FOTOCOLORIMETRICO

Se determinó la cantidad absoluta (pg/N) de ADN presente en los eritrocitos de diez individuos de la especie patrón *Bufo chilensis* (Tabla 5). El valor promedio fue de 11.32 pg/N.

Como se indicó en la Tabla 2, la cantidad de ADN determinada por citofluorometría de los eritrocitos de *Bufo chilensis* es de 52.48 UA. La determinación citofluorométrica en UA y la determinación fotocolorimétrica en pg/N de la especie patrón tienen por objeto poder transformar los valores de ADN en UA de las especies de telmatobinos estudiadas, en valores absolutos (pg/N), de acuerdo a Hatch y col. (41).

$$\text{pg/N de ADN de cada especie} = \text{pg/N de la especie patrón} \times \frac{\text{UA de ADN de cada especie}}{\text{UA de ADN de la especie patrón}}$$

Los valores de ADN en unidades absolutas determinados para las doce especies estudiadas aparecen en la Tabla 11.

Para comprobar la exactitud de los valores obtenidos por la conversión de los datos (41) se determinaron fotocolorimétricamente las cantidades absolutas de ADN presentes en los eritrocitos de *T. halli* y *C. caudiverbera* (Tabla 5).

Los resultados demostraron que la cantidad de ADN determinada por los dos métodos es muy similar. La cantidad de ADN presente en los eritrocitos de *T. halli* y *C. caudiverbera* es de 7.88 y 14.25 pg/N respectivamente y los resultados obtenidos según la conversión de los datos son de 7.24 pg/N y 14.39 pg/N respectivamente.

T A B L A 5

CANTIDADES DE ADN (pg/N) DE ERITROCITOS DE TRES ESPECIES DE ANFIBIOS OBTENIDAS POR EL METODO FOTOCOLORIMETRICO

| ESPECIE | N | $\bar{x} \pm ES$ | RANGO |
|----------------------------------|----|------------------|-------------|
| <i>Telmatobius halli</i> | 14 | 7.88 \pm 0.14 | 7.0 - 8.6 |
| <i>Bufo chilensis</i> | 10 | 11.32 \pm 0.21 | 10.2 - 12.0 |
| <i>Caudiverbera caudiverbera</i> | 6 | 14.26 \pm 0.18 | 13.6 - 14.8 |

N = Número de individuos

3. MEDICIONES NUCLEARES Y CELULARES

Los datos originales de las mediciones celulares realizadas en esta tesis se encuentran depositados en el archivo de la Unidad de Biología de Vertebrados del Departamento de Biología Celular y Genética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

En la Figura 3 aparecen las microfotografías de contraste de fases de los eritrocitos de algunas especies incluidas en este estudio, que ilustran las relaciones de tamaño entre el núcleo y el citoplasma.

La Tabla 6 muestra el valor promedio del área nuclear y celular, así como del volumen nuclear y tamaño celular de los eritrocitos de las doce especies de anfibios estudiadas. El promedio del área nuclear oscila entre $10.2 \mu\text{m}^2$ y $34.1 \mu\text{m}^2$. El promedio del volumen nuclear oscila entre $14.3 \mu\text{m}^3$ y $90.26 \mu\text{m}^3$ y el promedio del área celular oscila entre $177.6 \mu\text{m}^2$ y $384.9 \mu\text{m}^2$. Por último, el diámetro mayor celular oscila entre $13.3 \mu\text{m}$ y $19.6 \mu\text{m}$.

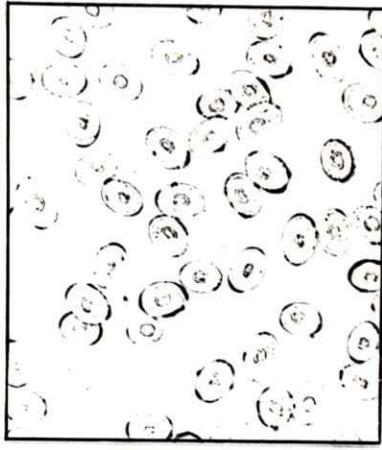
Los análisis estadísticos de normalidad para las mediciones celulares realizadas en cada individuo de las doce especies de anfibios estudiadas dieron curvas normales en todos los casos.

Para establecer las correlaciones entre las mediciones celulares y la cantidad de ADN fue necesario determinar previamente la variabilidad existente entre las mediciones celulares obtenida de un mismo individuo, de distintos individuos de una misma especie y entre especies diferentes. Se aplicó un test de Anova en cada caso. Los análisis revelaron que existe mayor variación del área nuclear, volumen nuclear, área celular y tamaño celular entre diferentes especies que entre los individuos de una misma especie y mayor variación entre los individuos de una misma especie que en las mediciones de un mismo individuo. (Tablas 7, 8, 9 y 10).

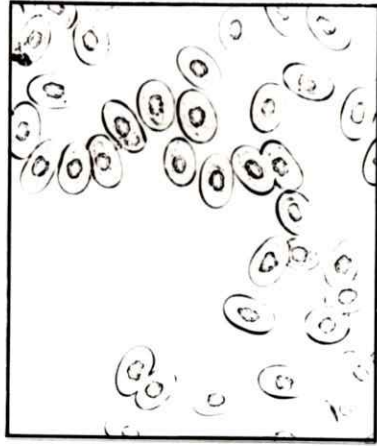
FIGURA 3

Microfotografías de contraste de fases de
eritrocitos de:

- (a) *T. pefauri*
- (b) *A. tumultuosus*
- (c) *B. leptopus*
- (d) *E. roscus*
- (e) *C. caudiverbera*



a



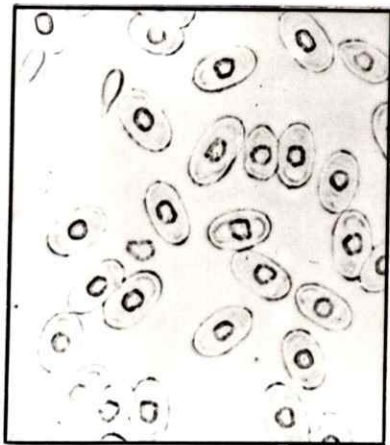
b



c



d



e

 $I = 20 \mu m$

T A B L A 6

MEDICIONES CELULARES

| ESPECIE | N | SEXO | Nc | AN (μm^2) \bar{X} | VN (μm^3) \bar{X} | AC (μm^2) \bar{X} | TC (μm) \bar{X} |
|------------------------------------|---|------|-----|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Telmatobius halli</i> | 3 | 2 ♀ | 600 | 26.4 | 61.5 | 231.2 | 15.2 |
| <i>Telmatobius peruvianus</i> | 2 | 1 ♀ | 40 | 17.1 | 30.6 | 217.8 | 14.8 |
| <i>Telmatobius marmoratus</i> | 2 | 0 ♀ | 340 | 16.3 | 29.8 | 187.2 | 13.7 |
| <i>Telmatobius pefauri</i> | 2 | 1 ♀ | 40 | 10.2 | 14.3 | 186.5 | 13.9 |
| <i>Eupsophus migueli</i> | 2 | 1 ♀ | 40 | 30.1 | 68.7 | 343.2 | 18.5 |
| <i>Eupsophus roseus</i> | 2 | 1 ♀ | 80 | 27.3 | 57.4 | 256.7 | 16.0 |
| <i>Eupsophus vittatus</i> | 1 | 0 ♀ | 40 | 34.1 | 90.3 | 302.2 | 17.4 |
| <i>Alsodes nodosus</i> | 1 | 1 ♀ | 40 | 23.8 | 51.7 | 214.3 | 14.6 |
| <i>Alsodes tumultuosus</i> | 1 | 1 ♀ | 80 | 19.0 | 33.5 | 241.4 | 15.5 |
| <i>Batrachyla taeniata</i> | 1 | 1 ♀ | 50 | 17.3 | 29.3 | 179.0 | 13.3 |
| <i>Batrachyla leptopus</i> | 2 | 1 ♀ | 55 | 21.5 | 41.5 | 177.6 | 13.3 |
| <i>Caudiuverbera caudiuverbera</i> | 2 | 1 ♀ | 60 | 33.1 | 90.2 | 384.9 | 19.6 |

N = Número de Individuos

Nc = Número de Células

AN = Área nuclear

VN = Volumen nuclear

AC = Área celular

TC = Tamaño celular

T A B L A 7

ANOVA JERARQUIZADO DEL AREA NUCLEAR DE ERITROCITOS EN DOCE ESPECIES DE ANFIBIOS

T A B L A D E A N O V A

| FUENTE DE VARIACION | gl | CM | F _s |
|--------------------------------------|------|---------|-----------------|
| ENTRE LAS 12 DIFERENTES ESPECIES | 11 | 4514.56 | 9.27 p < 0.002 |
| ENTRE INDIVIDUOS DE LA MISMA ESPECIE | 9.0 | 487.00 | 53.99 p < 0.001 |
| ENTRE MEDIDAS DE UN MISMO INDIVIDUO | 1504 | 12.61 | |

$$F_{0.002(11,9)} = 8.12 \quad F_{0.001(9,120)} = 3.38$$

gl = Grados de libertad
 CM = Cuadrados medios
 F_s = Cuociente de cuadrados medios

T A B L A 8

ANOVA JERARQUIZADO DEL VOLUMEN NUCLEAR DE ERITROCITOS EN DOCE ESPECIES DE ANFIBIOS

T A B L A D E A N O V A

| FUENTE DE VARIACION | gl | CM | F _s |
|--------------------------------------|------|----------|-----------------|
| ENTRE LAS 12 DIFERENTES ESPECIES | 11 | 46284.27 | 5.70 p < 0.01 |
| ENTRE INDIVIDUOS DE LA MISMA ESPECIE | 9.5 | 8116.09 | 66.65 p < 0.001 |
| ENTRE MEDIDAS DE UN MISMO INDIVIDUO | 1504 | 169.67 | |

$$F_{0.01}(11,10) = 4.77$$

$$F_{0.001}(10,120) = 3.24$$

gl = Grados de libertad

CM = Cuadrados medios

F_s = Cuociente de cuadrados medios

T A B L A 9

ANOVA JERARQUIZADO DEL AREA CELULAR DE ERITROCITOS EN DOCE ESPECIES DE ANFIBIOS

T A B L A D E A N O V A

| FUENTE DE VARIACION | gl | CM | F _s |
|--------------------------------------|------|----------------------------------|----------------|
| ENTRE LAS 12 DIFERENTES ESPECIES | 11 | 365352.68 | 60.17 |
| ENTRE INDIVIDUOS DE LA MISMA ESPECIE | 8.2 | 6071.98 | 16.56 |
| ENTRE MEDIDAS DE UN MISMO INDIVIDUO | 1504 | 535.55 | |
| F _{0.001(11,9) = 9.72} | | F _{0.001(9,120) = 3.38} | |

p < 0.001

gl = Grados de libertad

CM = Cuadrados medios

F_s = Cuociente de cuadrados medios

T A B L A 10

ANOVA JERARQUIZADO DEL TAMAÑO CELULAR DE ERITROCITOS EN DOCE ESPECIES DE ANFIBIOS

T A B L A D E A N O V A

| FUENTE DE VARIACION | gl | CM | F _s |
|--------------------------------------|------|----------------------------------|----------------|
| ENTRE LAS 12 DIFERENTES ESPECIES | 11 | 344.09 | 54.70 |
| ENTRE INDIVIDUOS DE LA MISMA ESPECIE | 8.2 | 6.29 | 16.78 |
| ENTRE MEDIDAS DE UN MISMO INDIVIDUO | 1504 | 0.54 | |
| F _{0.001(11,9)} = 9.72 | | F _{0.001(9,120)} = 3.38 | |

p < 0.001

gl = Grados de libertad

CM = Cuadrados medios

F_s = Cuociente de cuadrados medios

D I S C U S I O N

Las estimaciones cuantitativas del ADN, determinadas por citofluorimetría y fotocolorimetría, de los eritrocitos de las doce especies de telmatobinos estudiadas, varían entre 5.81 pg/N a 14.32 pg&N (Tabla 11). La especie patrón *Bufo chilensis* presenta 11.32 pg/N de ADN. Estas cantidades están dentro del rango de variación de lo observado en otros anuros (12). Las variaciones interespecíficas de las cantidades de ADN nuclear en Telmatobiinae representan un carácter taxonómico útil para incorporarlo en el análisis citotaxonómico.

El análisis de conjunto de los cariotipos y de las cantidades de ADN por núcleo muestra que hay cierta correspondencia entre el número cromosómico y la cantidad de ADN. En general, especies de números cromosómicos más altos presentan también una mayor cantidad de ADN y las especies de números cromosómicos bajos presentan menor cantidad de ADN (Tabla 11).

Como ha sido sugerido para diversas especies de vertebrados, existiría también correspondencia entre la heterocromatina constitutiva y el ADN repetitivo (8) (44). Con la

excepción de *C. caudiverbera*, los telmatobinos presentan cantidades notables de heterocromatina constitutiva en los cromosomas metafásicos (5). Aún sin contar con datos cuantitativos al respecto, resulta interesante plantear que posiblemente la radiación adaptativa de Telmatobiinae se produjo con una variación importante de este tipo de ADN.

Cuando se incluye *C. caudiverbera* en el análisis del número cromosómico y de la cantidad de ADN nuclear, el grupo de los telmatobinos pierde uniformidad. *C. caudiverbera* con $2n = 26$, tiene una mayor cantidad de ADN nuclear que otras especies con números diploides similares. La notable cantidad de ADN nuclear agregaría, a las evidencias morfológicas y conductuales que se tienen de esta especie (45), un nuevo elemento a favor de su aislamiento en Leptodactylidae (46). Por estas razones *C. caudiverbera* no lo consideraremos en los análisis que intentan relacionar las cantidades de ADN con el número fundamental de brazos representados en los cariotipos.

En las restantes especies de Telmatobiinae se ha señalado una tendencia hacia la reducción del número cromosómico. El mecanismo responsable de estos cambios cromosómicos sería la fusión céntrica (17). Sin embargo, el número fundamental de los cariotipos de las especies estudiadas oscilan entre un número fundamental bajo, representado en las especies primitivas (*Eupsophus*) y un número fundamental alto, en las más avanzadas. Por

si solo, el mecanismo de fusión céntrica propuesto, no puede dar cuenta de este aumento del número fundamental. Se requiere, entonces, la participación de otros mecanismos para poder explicar la modificación de la morfología cromosómica. Entre estos mecanismos se puede invocar la translocación y posiblemente también la adición de heterocromatina constitutiva (5).

Las especies de número fundamental bajo tienen una mayor cantidad de ADN. Las especies con un número fundamental alto tienen, en cambio, una cantidad menor de ADN, a excepción de *E. vittatus*. El incremento del número fundamental que se observa en Telmatobiinae, al comparar especies primitivas con avanzadas, sólo podría explicarse considerando que, conjuntamente con las fusiones céntricas responsables de la disminución del número cromosómico se produjeron también delecciones que originaron una disminución del tamaño del genoma. Por otro lado, la adición de heterocromatina constitutiva que da origen a los nuevos brazos cromosómicos podría ser considerada un mecanismo independiente vinculado a una evolución posterior de las especies de Telmatobiinae.

E. vittatus tiene un número fundamental mayor que sus otras dos especies congénéricas. Para esta especie se han reportado números fundamentales 56 (47) y 54 (48) (18). Las observaciones en placas metafásicas de individuos en los cuales se hizo la determinación de ADN nuclear permitieron de-

terminar un número fundamental 52 (49). Es necesario, entonces, realizar un análisis más detallado del cariotipo de esta especie contando con una muestra mayor de ejemplares. En todo caso, esta especie de alto número fundamental sería una excepción importante en el género, lo que no permite generalizar en telmatobiinae la tendencia del incremento del número fundamental con la disminución del ADN. Futuros estudios del cariotipo de esta especie en los que se incluyan observaciones de bandeo cromosómico para precisar la naturaleza eucromática o heterocromática de los brazos de los cromosomas, permitirían resolver si el alto número fundamental de *E. vittatus* es o no el producto de la adición de heterocromatina constitutiva como mecanismo modificador de la morfología cromosómica.

Las cantidades de ADN en eritrocitos de especies de un mismo género, con excepción de *Batrachyla*, muestran una cierta uniformidad. Esto resulta evidente en el género *Alsodes*, en el cual existen especies con distintos números de cromosomas sin diferencias notables en sus cantidades de ADN nuclear. Los reordenamientos intragenéricos en *Alsodes* se habrían producido aparentemente en un marco estable de variación de ADN nuclear. *A. nodosus* y *A. tumultuosus* presentan preferencias ecológicas similares, situación que es diferente a la de las especies de *Batrachyla*. *B. leptopus* es una es

pecie restringida a los biotopos boscosos de la selva húmeda Austral. *B. taeniata* extiende su distribución hasta el Norte y coloniza la estepa centrochilena. Las diferencias intragenéricas en el tamaño del genoma podrían considerarse respuestas de naturaleza adaptativa a las presiones selectivas que enfrentarían estas especies en sus respectivas áreas de poblamiento. Esta hipótesis está reforzada por el hecho que, *B. leptopus* con poblaciones restringidas al bosque temperado, es la que presenta una mayor cantidad de ADN. Esto también se observa en las especies de *Eupsophus*, de distribución igualmente restringida en la misma área de poblamiento. La disminución del tamaño del genoma en *B. taeniata* estaría asociada a la colonización de zonas más septentrionales, en las cuales una disminución del tamaño del genoma, acompañado de una mayor velocidad de desarrollo larvario o embrionario, podría significar un mejor aprovechamiento de los recursos tróficos que dispondría esta especie en su nueva área de poblamiento.

La cantidad de ADN nuclear y las mediciones celulares y nucleares tienen una correlación positiva (Tabla 12 y Figura 1). Las células de mayor tamaño de *Caudiverbera caudiverbera* y las especies de *Eupsophus*, tienen a su vez núcleos grandes y mayor cantidad de ADN que las células de menor tamaño y núcleos pequeños presentes en *Telmatobius*, *Also*des y *Batrachyla*. Las diversas mediciones celulares son bue

nos estimadores de la cantidad de ADN, lo que corrobora lo en contrado en otras especies de anfibios (14) (22) (50).

La información incompleta que se tiene de la cronología de los procesos de desarrollo larvario y embrionario de los telmatobinos hace posible abordar, sólo de un modo par cial, el problema del significado de la variabilidad de la cantidad de ADN nuclear en relación a la duración de estos procesos.

La duración del período larvario de los telmatobinos está correlacionada negativamente con la cantidad de ADN nuclear. Las especies de *Eupsophus*, *roseus* y *E. vittatus*, con altos contenidos de ADN nuclear, tienen un período larvario breve, que no excede los 30 días. Por su parte, las especies de *Batrachyla* y de *Alsodes*, con una cantidad de ADN nuclear no tablemente menor, extienden su período larvario a 6 y 12 meses respectivamente. Esta evidencia se contrapone con las observadas en especies de los géneros *Scaphiopus*, *Hyla*, *Bufo* y *Gastrotheca* en las cuales, sus respectivas cantidades de ADN están correlacionadas positivamente con la duración de los períodos larvarios (20). Estas especies de referencia pertenecen a distintas familias de anuros. La variabilidad de sus períodos larvarios podría ser el resultado de una respuesta adaptativa convergente, a las condiciones ecológicas particulares en las que se llevan a cabo sus respectivos desarrollos larvarios.

Con la evidencia disponible, no es posible determinar si hay una relación causal entre cantidad de ADN nuclear y duración del período larvario.

En este punto de la discusión conviene nuevamente insistir en que la variación cuantitativa del ADN, adquiere un significado evolutivo cuando las determinaciones y las comparaciones son realizadas en conjuntos naturales de especies, es decir, cuando existe una base para suponer que las especies analizadas participan de un sustrato genético común.

Hay evidencias en otras especies de anuros, de que la cantidad de ADN nuclear determinaría una condición límite a la velocidad de desarrollo embrionario, es decir, que los anuros con genomas más grandes (sobre 10 pg/N) tienen un desarrollo más lento (51).

Para los anfibios considerados en esta Tesis, esta "condición límite" no sería evidente, existiendo una correlación inversa entre la cantidad de ADN y la velocidad del desarrollo embrionario, al menos para las especies con que se cuenta con información de sus tiempos de desarrollo. En *B. taeniata*, con 6.22 pg/N y *B. leptopus*, con 8.0 pg/N, los tiempos de desarrollo a 18°C, son de alrededor de 10 días. *C. caudiverbera*, en tanto, que tiene 14,39 pg/N extiende su tiempo de desarrollo embrionario a 20 días en condiciones similares de temperatura.

T A B L A 11

NUMERO CROMOSOMICO (2n), NUMERO FUNDAMENTAL (NF)*, CANTIDAD DE ADN ESTIMADO POR CITOFUOROMETRIA (UA) Y ESTIMACION DE ADN (pg/N) POR EL METODO DE HATCH Y COL. DE DOCE ESPECIES DE ANFIBIOS (ANURA-LEPTODACTYLIDAE)

| ESPECIES | 2n* | NF* | CANTIDAD ADN (UA) | CANTIDAD ADN (pg/N)*** |
|----------------------------------|-----|-----------------------|-------------------|------------------------|
| <i>Telmatobius halli</i> | 26 | 52 | 39.97 | 7.24 |
| <i>Telmatobius peruvianus</i> | 26 | 52 | 36.52 | 6.61 |
| <i>Telmatobius marmoratus</i> | 26 | 52 | 32.30 | 5.85 |
| <i>Telmatobius pefauri</i> | 26 | 52 | 32.09 | 5.81 |
| <i>Eupsophus migueli**</i> | 30 | 45♂ 44♀ | 70.98 | 12.86 |
| <i>Eupsophus roseus</i> | 30 | 46 | 64.35 | 11.65 |
| <i>Eupsophus vittatus</i> | 28 | 52.54-56 ⁺ | 69.17 | 12.53 |
| <i>Alsodes nodosus</i> | 22 | 44 | 43.44 | 7.87 |
| <i>Alsodes tumultuosus</i> | 26 | 52 | 47.87 | 8.67 |
| <i>Batrachyla taeniata</i> | 26 | 50 | 34.69 | 6.29 |
| <i>Batrachyla leptopus</i> | 26 | 52 | 44.20 | 8.00 |
| <i>Caudiverbera caudiverbera</i> | 26 | 52 | 79.43 | 14.39 |

* Tomado de Díaz y Veloso, 1979 (42)

** Tomado de Iturra y Veloso, 1981 (43)

*** Conversión de ADN en UA a pg/N según Método de Hatch y col. (41)

+ Número fundamental de brazos no bien definido (49) (48) (18) (47)

T A B L A 12

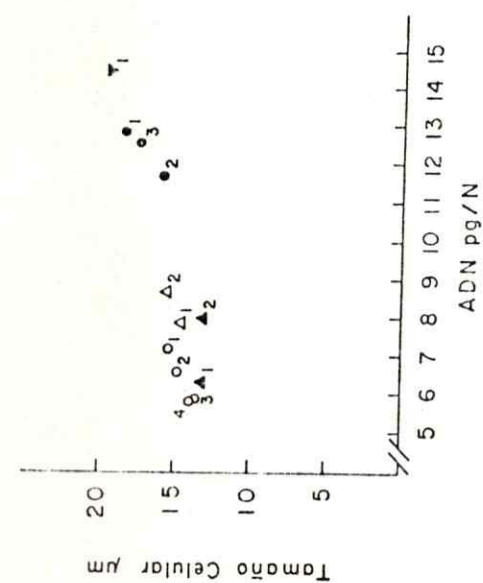
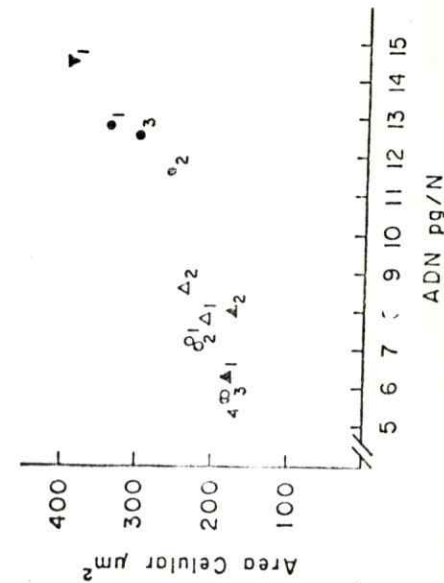
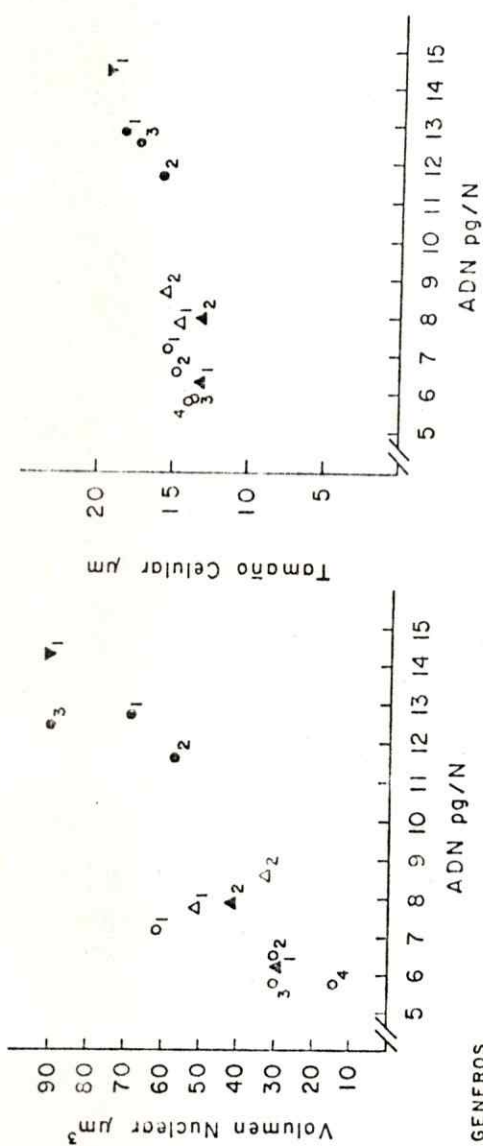
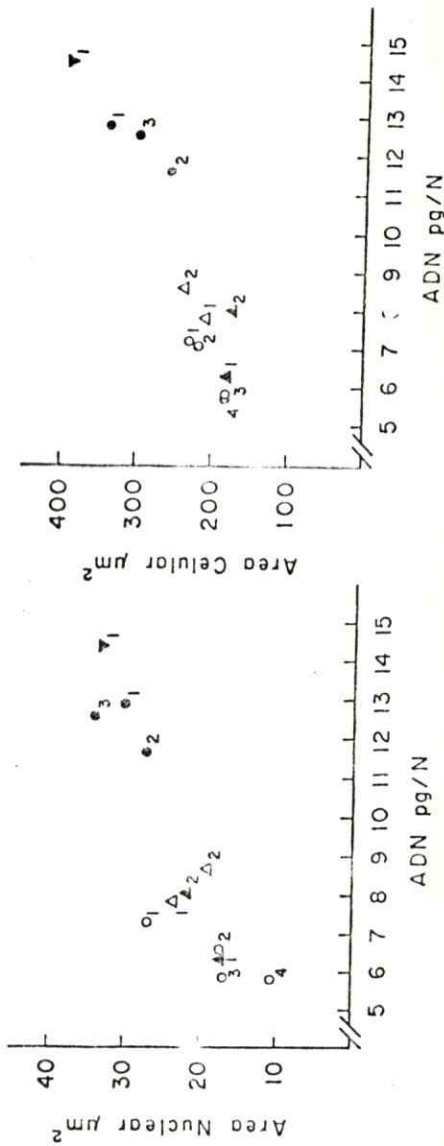
COEFICIENTES DE CORRELACION (r) PARA AREA CELULAR,
AREA NUCLEAR, VOLUMEN NUCLEAR Y TAMAÑO CELULAR VERSUS
CONTENIDO DE ADN DE ERITROCITOS DE DOCE ESPECIES DE ANFIBIOS

| | r | p |
|-----------------|-------|----------|
| AREA CELULAR | 0.932 | < 0.0001 |
| AREA NUCLEAR | 0.887 | < 0.0002 |
| VOLUMEN NUCLEAR | 0.879 | < 0.0002 |
| TAMAÑO CELULAR | 0.930 | < 0.0001 |

FIGURA 4 :

Cantidades de ADN y Mediciones celulares en doce especies de anfibios.

- Género *Telmatobius*: 1. *T. halli*, 2. *T. peruvianus*, 3. *T. marmoratus*, 4. *T. pefauri*.
- Género *Eupsophus*: 1. *E. migueli*, 2. *E. roseus*, 3. *E. vittatus*.
- △ Género *Alsodes*: 1. *A. nodosus*, 2. *A. tu multuosus*.
- ▲ Género *Batrachyla*: 1. *B. taeniata*, 2. *B. leptopus*
- ▼ Género *Caudiverbera*: 1. *C. caudiverbera*.



GENEROS

- = *Telmatochilus* △ = *Aisodes* ▽ = *Caudiverbera*
- = *Eupsophus* ▲ = *Batrachyla*

CONCLUSIONES

1. En esta Tesis se informa sobre la cantidad de ADN nuclear presente en 12 especies de anfibios de la familia Leptodactylidae, subfamilia Telmatobiinae. La cantidad oscila entre 5.81 pg/N y 14.39 pg/N.
2. Al estudio de la evolución cariológica en Telmatobiinae, que consideraba sólo número y morfología cromosómica, se incorporan las estimaciones de ADN nuclear. En general las especies más avanzadas en el grupo, de menor número diploide y cromosomas principalmente bibraquiados tienen menor cantidad de ADN que las especies más primitivas.
3. Las cantidades de ADN muestran una alta correlación con algunas medidas celulares tales como área nuclear, área celular, volumen nuclear y tamaño celular. Por lo tanto estas mediciones son razonables estimadores de la cantidad de ADN nuclear en las diversas especies.
4. En tres especies de anfibios telmatobinos existe una relación inversa entre la cantidad de ADN y la velocidad de desarrollo embrionario.

B I B L I O G R A F I A

- (1) Lynch, J.D. (1971). Evolutionary relationships, osteology, and zoogeography of Leptodactyloid frogs . Univ. Kansas. Mus. Nat. Hist. Misc. Publ., 53: 1-238.
- (2) Sallaberry, M., Valencia, J. y Díaz, N. (1981). Distribución y ambientes de *Batrachyla taeniata* (Girard) en Chile. Bol. Mus. Hist. Nat. Chile., 38: 61-67.
- (3) Cei, J.M. (1962). Batracios de Chile. Ed. Univ. Chile. Santiago de Chile. 128 pp.
- (4) Stebbins, L.G. (1971). Chromosomal Evolution in Higher Plants. Barrington y Willis Eds. Addison - Wesley Publishing Company. California.
- (5) Veloso, A. (1977). Cytogenetic and cytotaxonomic evidences of chilean amphibians. De III Congreso Latinoamericano de Genética. Drets, M.E. Brum-Zorri-lla, G.A. Folle (Eds). 188-194, Montevideo, Uruguay.
- (6) Veloso, A. e Iturra, P. (1979). Posibilidades del análisis citogenético en un estudio de bandeo cromosó

- mico en dos especies de anfibios (*Anura Leptodactylidae*). Arch. Biol. Med. Exp., 12: 91-96.
- (7) Morescalchi, A. (1977). Adaptation and Karyotype in Amphibia. Boll. Zool., 44: 287-294.
- (8) Pathak, S., Hsu, T.C. y Arrighi (1973). Chromosomes of *P. Myscus* (Rodentia, Cricetidae) IV The role of heterochromatin in karyotypic evolution. Cytogenet. Cell. Genetic., 12: 315-326.
- (9) Boivin, A., Vendrely, R. y Vendrely, C. (1948). L'acide désoxyribonucleíque da noyau cellulaire dépositaire des caracteres héréditaires; arguments d'ordre analytique. SR. Acad. Sci., 226: 1061-1063.
- (10) Vialli, M. (1957). Volume et contenu en ADN par noyau Exp. Cell. Res. Suppl., 4: 284-293.
- (11) Bachmann, K., Goin, O.B. y Goin, C.J. (1972). Nuclear DNA amounts in vertebrates. Brookhaven Simp. Bol., 23: 419-450.
- (12) Olmo, E. (1973). Quantitative variations in the nuclear DNA and Phylogenesis of the Amphibia. Caryologia. 26: 43-68.

- (13) Barros, M.A. y Castelli, P.F. (1976). Cariotipos y Variaciones cuantitativas de ADN en *Calyptocephalella caudiverbera*, *Alsodes nodosus* y *Pleurodema thaul* (Amphibia Leptodactylidae). Tesis, Universidad de Chile.
- (14) Morescalchi, A. (1975). Chromosome evolution in the Caudate amphibians. Evol. Biol., 8: 339-387.
- (15) Manfredi Romanini, M.G. (1973). The DNA nuclear content and the evolution of vertebrates. En: Cytotaxonomy and vertebrate evolution. A.B. Chiarelli y E. Capanna (Eds). 39-81 Acad. Press. New York and London.
- (16) Atkin, N.B., Mattinson, G., Becak, W. y Ohno, S. (1965). The comparative DNA content of 19 species of placental mammals, reptiles and birds. Chromosoma. 17: 1-10.
- (17) Bogart, J.P. (1973). Evolution of anuran karyotypes. En: Evolutionary Biology of the anurans. Vial (Ed). 337-349. Univ. of Missouri Press.
- (18) Veloso, A., Galleguillos, R. y Díaz, (1974). Anfibios (*Anura-Leptodactylidae*) del Parque Nacional "Vicente Pérez Rosales". Consideraciones citotaxonomías. Anales Mus. Hist. Nat., Valpo., 7: 297-310.

- (19) Bachmann, K. (1972). Nuclear DNA and developmental rate in frogs. Quart. J. Fla. Acad. Sci., 35: 225 - 231.
- (20) Goin, O.B., Goin, C.J. y Bachmann, K. (1968). DNA and amphibian life history. Copeia, 3: 532-540.
- (21) Szarsky, H. (1970). Changes in the amount of DNA in cell nuclei during vertebrate evolution. Nature - 226:651-652.
- (22) Szarsky, H. (1976). Cell size and nuclear DNA content in vertebrates. Int. Rev. Cytol., 44: 93-111.
- (23) Formas, J.R. y Pugin, E. (1978). Tadpoles of *Hylorina sylvatica*, *Eupsophus vittatus* and *Bufo rubropunctatus* in Southern Chile. Herpetologica, 34: 355-358
- (24) Jorquera, B. y Molinari, E. (1979). Estados de desarrollo normal de *Batrachyla taeniata*. Medio ambiente, 4: 89-102.
- (25) Sallaberry, M.P. (1979). Autecología de *Batrachyla taeniata* (Amphibia Leptodactylidae). Tesis Universidad de Chile.
- (26) Busse, K. (1971). Desarrollo de *Batrachyla leptopus* - *Bell* con observaciones sobre su ecología y comportamiento (Amphibia Leptodactylidae). Inv. Zool. Chil., 15: 5-63.

- (27) Comunicación personal de Nelson Díaz.
- (28) Díaz, N. (1982). Estrategia reproductiva de *Telmato -
bius marmoratus* (Anura Leptodactylidae) del Alti -
plano chileno. En: A. Veloso y E. Bustos (Eds.) -
Vol I. La vegetación y los vertebrados inferiores
de los pisos altitudinales entre Arica y el Lago -
Chungará. 317-327. UNESCO, MONTEVIDEO.
- (29) Observaciones personales
- (30) Jorquera, B. e Izquierdo, L. (1964). Tabla de desarro -
llo normal de *Calyptocephalella gayi* (Rana Chile -
na). *Biologica*. 36: 43-53.
- (31) Hermosilla, I. y Coloma, L. (1981). Desarrollo tempr -
no de *Caudiverbera caudiverbera* bajo condiciones -
naturales. Arch. Biol. Med. Exp., 14: 269.
- (32) Prenna, G., Leiva, S. y Mazzini, G. (1974). Quantita -
tion of DNA by cytofluorometry of the conventional
Feulgen reaction. Histochem J., 6: 467-489.
- (33) Decosse, J.J. y Aiello, N. (1966). Feulgen Hidroly -
sis: effect of acid and temperature. J. Histochem.
14: 601-604.

- (34) Sokal, R.R. y Rohlf F.J. (1969). *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research.* W.H. Freeman and Company. San Francisco
- (35) Burton, K.A. (1956). A study of the conditions and mechanisms of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. - Biochem. J., 62: 315-323.
- (36) Schneider, W. (1957). Determination of nucleic acids - in tissues by pentose analysis. En: *Methodos in enzymology.* Colowinck, S.P. and Kaplan, N.O. (Eds), Vol III 680-684. Academic. Press, New York.
- (37) Bachmann, K. Cowden, R.R. (1967). Specific DNA amounts and nuclear size in fish hepatocytes and erythrocytes. Trans. Amer. Micr. Soc., 86: 463-471.
- (38) Szarsky, H. y Czopek, G. (1966). Erythrocyte diameter in some Amphibians and Reptiles. Bull. de l'Acad' - Polonaise des sciences. Cl. II 14: 433-437.
- (39) Becak, W. y Becak, M.L. (1967). Further studies on polyploid Amphibians (Ceratophrydidae) II. DNA Content and nuclear volume. Chromosoma. 23: 14-23.
- (40) Kuramoto, M. (1981). Relationships between number, size and shape of red blood cells in amphibians. Comp Biochem. Physiol., 69: 771-775.

- (41) Hatch, F.T., Bodner, A.J. Marzrimas, J.A. y Moore, D.H. (1976). Satellite DNA and Cytogenetic Evolution. - DNA Quantity, Satellite DNA and karyotypic Variations in Kangaroo Rats (Genus *Dipodomys*). Chromosoma. 58: 155-168.
- (42) Díaz, N.F. y Veloso, M. (1979). Sistemática y evolución de los anfibios de Chile. Arch. Biol. Med. Exper. 12: 59-70.
- (43) Iturra, P. y Veloso M. (1981). Evidence for heteromorphic sex chromosomes in male amphibians (Anura-Leptodactylidae). Cytogenet. Cell. Genet. 31: 108-110
- (44) Morescalchi, A. (1973). Amphibia. En: Cytotaxonomy and vertebrate evolution. A.B. Chiarelli y E. Capanna (Eds). 233-348. Acad. Press. New York and London.
- (45) Veloso, A. (1977). Aggressive behavior and the generic relationships of *Caudiverbera caudiverbera* (Amphibia: Leptodactylidae). Herpetologica. 33: 434-442
- (46) Reig, O. (1959). Las relaciones genéricas del anuro chileno *Calyptocephalella gayi* (Duméril y Bibron). Actas y Trab. 1.er Cong. Sudamer. Zool. 4: 113.
- (47) Formas, R. (1978). Systematic problems in the frog species *Eupsophus roseus* (Anura Leptodactylidae) de

- tected by karyological analysis. Exp. 34: 446.
- (48) Bogart, J.P. (1970). Systematic problems in the amphibian family leptodactylidae (Anura) as indicated by karyotypic analysis Cytogenetics. 9: 369-383.
- (49) Comunicación personal de Patricia Iturra.
- (50) De Smet, W. (1981). The Nuclear feulgen DNA content of the vertebrates (Specially Reptiles), as measured by fluorescence cytophotometry, with notes on the cell and the chromosome size. Acta Zool Pathol Antverpiensia. 76: 119-167.
- (51) Oeldorf, E., Nishioka, M. y Bachmann, E. (1978). Nuclear DNA amounts and developmental rate in holarctic anura. Sonderdruck aus Z. f. zool. Systematik u. Evolutions-forschung 16: 216-224.