



CARIOTIPO DE ODONTOPHRYNUS CORDOBAE MARTINO & SINSCH, 2002
(ANURA, LEPTODACTYLIDAE)

Salas, Nancy E. & Adolfo L. Martino

Ecología, Departamento de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Rutas 8 y 36,
Km 601 (5800) Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

Dra. Nancy Salas, Departamento de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Rutas 8 y 36, Km 601
(5800) Río Cuarto, Córdoba, Argentina. nsalas@exa.unrc.edu.ar

ABSTRACT

Odontophrynus genus comprises 10 species. *Odontophrynus cordobae* is the one most recently defined. The mitotic and meiotic chromosomes of *O. cordobae* were described by standard techniques. We analyzed 18 males from eight areas of Córdoba province. Their chromosome number is $2n = 22$. Pairs 1, 5-7, 10-11 show metacentric morphology and pairs 2-4 and 8-9 are submetacentric. Spermatocytes I show 11 bivalents. and Spermatocytes II show 11 dyads. All animals analyzed evidenced secondary constrictions in chromosomes of pair 4. Meiotic chromosomes confirm the diploid nature of all specimens studied.

RESUMEN

El género *Odontophrynus* tiene 10 especies descritas hasta la actualidad, siendo *Odontophrynus cordobae* la especie definida más recientemente. Utilizando técnicas estándares se describen los cromosomas mitóticos y meióticos de *O. cordobae*. Los ejemplares estudiados corresponden a 18 individuos machos pertenecientes a ocho localidades de la provincia de Córdoba. El número cromosómico encontrado es de $2n = 22$ con los pares 1, 5-7, 10-11 con morfología metacéntrica y los pares 2-4 y 8-9 como submetacéntricos. Los espermatoцитos I muestran 11 bivalentes y en los espermatoцитos II se contaron 11 díadas. En todos los animales analizados, las constricciones secundarias fueron evidentes en los cromosomas del par 4. El análisis de los cromosomas meióticos confirma la naturaleza diploide de todos los ejemplares estudiados.

Introducción

Desde el punto de vista citogenético las especies del género *Odontophrynus*, particularmente *O. americanus*, han sido estudiadas por diferentes autores (Sáez & Brum, 1959 y 1966; Beçak et al., 1966, 1970; Bogart, 1967; Beçak & Pueyro, 1970; Barrio & Pistol de Rubel, 1972; Beçak & Beçak, 1974; Ruiz & Beçak, 1976 a, b; Schmidtke et al., 1976; Ruiz, 1980; Ruiz et al., 1980, 1981; Beçak & Beçak, 1980; Barale et al., 1981; Schmid et al., 1985, Salas et al., 2000). La mayoría de los traba-

jos citados se han realizado en poblaciones tetraploides y diploides de Brasil, incluso en áreas de simpatria (Beçak et al., 1970a,b). En Argentina, Barrio & Pistol de Rubel (1972) y Baldo et al. (2000) describieron ambas formas diploide/tetraploide, pero siempre referidas a la especie *O. americanus*.

El género *Odontophrynus* tiene 10 especies descritas hasta la actualidad, siendo *Odontophrynus cordobae* la especie definida más recientemente (Martino & Sinsch, 2002), los autores analizaron poblaciones diploides y tetraploides de *Odontophrynus*

americanus en la provincia de Córdoba (zona central de Argentina), con el objeto de evaluar si ellas representaban un par de especies crípticas o si todas las poblaciones pertenecían a la misma especie. Los trabajos anteriores a Martino y Sinsch (2002) relacionados con el par de especies crípticas *O. cordobae*/*O. americanus* fueron todos referidos a *O. americanus* tetraploide ($4n$), lo cual representa una confusión en cuanto a la información relacionada a dichas entidades. El objetivo de este trabajo es describir los cromosomas mitóticos y meióticos de individuos provenientes de diferentes poblaciones de *Odontophrynus cordobae*.

Materiales y Métodos

Los ejemplares estudiados de *O. cordobae* corresponden a 18 individuos machos pertenecientes a ocho localidades, dos de Elena (S 32° 34' -W 64° 22'), dos del Paraje La Escondida (S 32° 40' -W 64° 31'), dos del Arroyo San Francisco (S 32° 35' -W 64° 29'), tres del camino W (S 32° 34' -W 64° 30'), uno de Berrotarán (S 32° 27' -W 64° 23'), dos de Santa Rosa de Calamuchita (S 32° 04' -W 64° 31'), tres de Rodeo Viejo (S 32° 21' -64° 40') y tres de Villa Las Rosas (S 31° 56' -65° 02') (Figura 1).

Figura 1. ★ Terra típica ● Poblaciones de muestreo ● Ciudades de referencia

Par cromosómico	r	i	Longitud cromosómica	Morfología
			relativa (%)	cromosómica
1	1.13 ± 0.09	47.05 ± 2.12	14.09 ± 4.00	M
2	1.54 ± 0.01	39.36 ± 0.17	11.79 ± 3.45	SM
3	1.72 ± 0.23	36.92 ± 3.31	10.64 ± 3.00	SM
4	2.02 ± 0.44	33.59 ± 5.44	11.13 ± 2.59	SM
5	1.23 ± 0.13	45.00 ± 2.78	8.70 ± 2.06	M
6	1.28 ± 0.26	44.14 ± 4.86	7.51 ± 2.10	M
7	1.20 ± 0.16	45.56 ± 3.65	7.12 ± 1.59	M
8	1.75 ± 0.42	36.90 ± 5.22	5.15 ± 0.41	SM
9	1.53 ± 0.39	40.14 ± 5.76	4.29 ± 0.69	SM
10	1.18 ± 0.24	46.30 ± 4.81	4.40 ± 0.73	M
11	1.22 ± 0.09	44.94 ± 1.90	3.53 ± 0.37	M

Los cromosomas mitóticos y meióticos fueron preparados a partir de intestino, médula ósea, bazo y testículo, luego de un tratamiento in vivo con colchicina. Todas las técnicas, tratamiento de hipotonía, fijación de células y tinciones se realizaron siguiendo los métodos descriptos en los trabajos de Barale et al. (1981); Schmid, (1978a, b); Schimid et al. (1979) y Schimid et al. (1990).

Los preparados, una vez secos y teñidos, fueron montados en Bálsamo del Canadá y observados con microscopio de fluorescencia marca Zeiss Axiophot D-7082 con cámara digital Axiocam HRC Zeiss. Las imágenes observadas fueron capturadas con el programa Axio Vision versión 4.3. Los cariotipos fueron confeccionados utilizando el programa de análisis de imágenes Adobe Photoshop versión CS 2. Se armaron dos cariotipos por cada ejemplar de cada localidad, se contaron 300 metafases y 360 figuras meióticas. Se efectuaron mediciones milimétricas del largo de cada cromosoma para obtener la relación entre los brazos cromosómicos (r), el índice centromérico (i) y la longitud cromosómica para cada par, determinando la correspondiente morfología cromosómica, modificada de Levan et al. (1964) por Aiassa et al. (2001). La medición se realizó con calibre digital Mahr 16ES.

Resultados

O. cordobae presenta los pares 1, 5-7, 10-11 con morfología metacéntrica con valores de r entre 1.28 y 1.13, y los pares 2-4 y 8-9 son submetacéntricos, con valores de r entre 2.02 y 1.53 (Tabla I). Los cromosomas 1-4 son grandes, con una longitud cromosómica relativa entre 14.09% y 10.64%. Los pares 5-7 son medianos (longitud cromosómica relativa entre 8.70% y 7.12%), mientras que los pares 8-11 son más pequeños con longitud cromosómica entre 5.15% y 3.53% (Figura 2).

Los espermatoцитos I muestran 11 bivalentes y en los espermatoцитos II se contaron 11 díadas (Figura 3). En todos los animales analizados, las constricciones secundarias fueron evidentes en los cromosomas del par 4 (Figura 2).

Tabla I. Media y desvío estándar de r , i , longitud relativa y morfología de cada par cromosómico de *O. cordobae* ($2n = 22$).

Par cromosómico	r	i	Longitud cromosómica	Morfología
			relativa (%)	cromosómica
1	1.13 ± 0.09	47.05 ± 2.12	14.09 ± 4.00	M
2	1.54 ± 0.01	39.36 ± 0.17	11.79 ± 3.45	SM
3	1.72 ± 0.23	36.92 ± 3.31	10.64 ± 3.00	SM
4	2.02 ± 0.44	33.59 ± 5.44	11.13 ± 2.59	SM
5	1.23 ± 0.13	45.00 ± 2.78	8.70 ± 2.06	M
6	1.28 ± 0.26	44.14 ± 4.86	7.51 ± 2.10	M
7	1.20 ± 0.16	45.56 ± 3.65	7.12 ± 1.59	M
8	1.75 ± 0.42	36.90 ± 5.22	5.15 ± 0.41	SM
9	1.53 ± 0.39	40.14 ± 5.76	4.29 ± 0.69	SM
10	1.18 ± 0.24	46.30 ± 4.81	4.40 ± 0.73	M
11	1.22 ± 0.09	44.94 ± 1.90	3.53 ± 0.37	M

$r = q/p$; $i = 100p / p + q$. q : longitud del brazo largo, p : longitud del brazo corto. M: metacéntrico, SM: submetacéntrico.

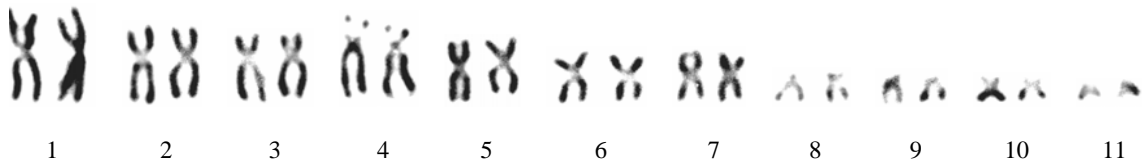
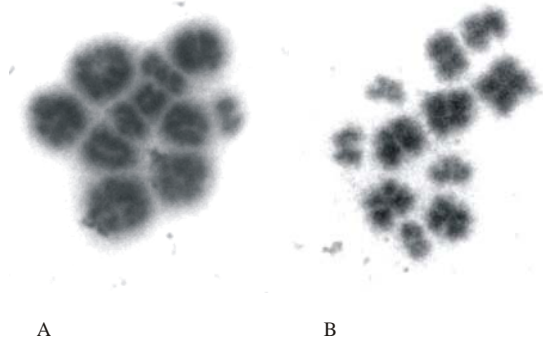
Figura 2. Cariotipo de *Odontophrynus cordobae*

Figura 3. (A) Primera metafase meiótica mostrando los 11 bivalentes. (B) Segunda metafase meiótica mostrando las 11 díadas.



Discusión

La morfología cromosómica observada en las poblaciones analizadas de *O. cordobae* de la zona central de Argentina, fueron comparadas con la información existente de las poblaciones diploides de Brasil. En los trabajos de Beçak et al., 1970a, se describe la morfología de los pares cromosómicos, los cuales en la mayoría de los casos coinciden con nuestros resultados, a excepción del par 4. Los mencionados autores describen aquella morfología como acrocéntrica, mientras que para nosotros el par 4 es submetacéntrico. Bogart & Wasserman (1972) y Barrio y Pistol de Rubel (1972) definen el par 10 como submetacéntrico, mientras que nuestros resultados mostraron una morfología metacéntrica. Debemos mencionar que en el trabajo de Barrio y Pistol de Rubel (1972), la figura 4 no representa el cariotipo de un ejemplar de *O. cordobae* (sensu *O. americanus* diploide) sino a la especie *O. lavillai* Cei, 1985.

La constitución cromosómica de *O. cordobae* conserva la misma morfología de los pares 1-7 y 10-11 que su contrapartida críptica *O. americanus*. La diferencia se presenta en los pares 8 y 9 que son submetacéntricos para *O. cordobae*, mientras que para *O. americanus* la morfología es metacéntrica (Salas, 2004; Salas, en prensa).

Si consideramos la posición de las Constricciones Secundarias (CS) en el par 11, como el cariotipo común diploide de un posible ancestro en común, tal como se registra en *O. occidentalis*, *O. cultripes* y *O. americanus* (este último en poblaciones diploides de Brasil), por

rearrreglos cromosómicos, podrían haberse trasladado al par 4, dando lugar al cariotipo actual de *O. cordobae*. En las poblaciones analizadas de *O. cordobae*, las CS en el par 11 no se observaron en ningún ejemplar. Las observaciones de los cromosomas durante la meiosis I y II son las mismas que las observadas en las demás especies diploides. (Beçak et al., 1967; Beçak & Beçak, 1974; Ruiz et al. 1981).

El análisis de los cromosomas meióticos a partir de testículo, confirma la naturaleza diploide de todos los ejemplares estudiados.

Bibliografía

- AIASSA, D., N. GORLA, L. AVILA & R. MARTORI. (2001). Cariotipo de *Liolaemus koslowskyi* Etheridge, 1993. Nuevo número cromosómico para el género ($2n = 36$). *Rev. Esp. Herp.* 15: 37-43.
- BALDO, D., M.C. PASTORI & A.S. FENOCCHIO. (2000). *Odontophrynus americanus* (Dumeril & Bibrón, 1841): Un caso de triploidía en poblaciones diploides de la provincia de Misiones, Argentina (Anura, Leptodactylidae). Resúmenes XV Reunión de Comunicaciones Herpetológicas, pag. 14.
- BARALE, G. de, G. A. MARIA, I. E. DI TADA & J. A. LISANTI. (1981). Presencia de *Odontophrynus americanus* (Anura, Leptodactylidae) Tetraploide en la Provincia de Córdoba. *Rev. UNRC*, 1(2): 121-125.
- BARRIO, A. & D. PISTOL de RUBEL. (1972). Encuesta cariotípica de poblaciones argentino-uruguayas de *Odontophrynus americanus* (Anura, Leptodactylidae) relacionada con otros rasgos taxonómicos. *Physis*, 31(82): 281-291.
- BEÇAK, W. & M. T. PUEYRO. (1970). Gene regulation in the polyploid amphibian *Odontophrynus americanus*. *Exp. Cell. Res.*, 63: 448-451.
- BEÇAK, M. L. & W. BEÇAK. (1974). Studies on polyploid amphibians-karyotype evolution and phylogeny of the genus *Odontophrynus*. *Herpetol.* 8: 337-341.

- BEÇAK, M. L. & W. BEÇAK. (1998). Evolution by polyploidy in Amphibia: New insights. *Cytogenet. Cell Genet.* 80: 28-33.
- BEÇAK, M. L., W. BEÇAK & M. N. RABELLO. (1966). Cytological evidence of constant tetraploidy in the bisexual south american frog *Odontophrynus americanus*. *Chromosoma*, 19: 188-193.
- BEÇAK, M. L., W. BEÇAK & M. N. RABELLO. (1967). Further studies on polyploid amphibians (Ceratophryidae). I. Mitotic and meiotic aspects. *Chromosoma*, 22: 192-201.
- BEÇAK, M. L., W. BEÇAK & L. D. VIZOTTO. (1970a). A diploid population of the polyploid amphibian *Odontophrynus americanus* and an artificial intraspecific triploid hybrid. *Experientia*, 26: 545-546.
- BEÇAK, M. L., L. DENARO & W. BEÇAK. (1970b). Polyploidy and mechanisms of karyotypic diversification in Amphibia. *Cytogenetics*, 9: 225-238.
- BOGART, J. P. (1967). Chromosomes of the South American amphibian family Ceratophryidae with a reconsideration of the taxonomic status of *Odontophrynus americanus*. *Canad. J. Genet. Cytol.*, 9: 531-542.
- BOGART, J. P. & A. O. WASSERMAN. (1972). Diploid-tetraploid cryptic species pairs: a possible clue to evolution by polyploidization in anuran amphibians. *Cytogenetics* 11: 7-24.
- LEVAN, A., K. FREGA & A. SANDBERG. (1964). Nomenclature of centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- MARTINO, A. L. & U. SINSCH. (2002). Speciation by polyploidy in *Odontophrynus americanus* J. *Zool. Lond.* 257: 67-81.
- RUIZ, I. R. G. & W. BEÇAK. (1976a). Further studies on polyploid amphibians . V. C-banding in diploid and tetraploid species of *Odontophrynus*. *Chromosoma*, 54: 69-74.
- RUIZ, I. R. G. & W. BEÇAK. (1976b). Polimorfismo de constricao secundaria e banda C em cromossomos de anfibios tetraploides *Odontophrynus americanus*. *Cienc. e Cult. supl.*, 28(7): 247.
- RUIZ, I. R. G. (1980). Heterocromatina constitutiva e organizadores nucleolares em anfibios do genero *Odontophrynus*. Tese apresentada ao Instituto de Biociencias da Universidade de Sao Pablo. 143 pp.
- RUIZ, I. R. G., M. F. BONALDO & W. BEÇAK. (1980). In situ localization of ribosomal genes in a natural triploid of *Odontophrynus* (Amphibia-Anura). *J. Hered.*, 71: 55-57.
- RUIZ, I. R. G., M. SOMA & W. BEÇAK. (1981). Nucleolar organizer regions and constitutive heterochromatin in polyploid of the genus *Odontophrynus* (Amphibia, Anura). *Cytogenet. Cell. Genet.*, 29: 84-98.
- SAEZ, F. A. & N. BRUM. (1959). Citogenética de anfibios anuros de America del Sur. Los cromosomas de *Odontophrynus americanus* y *Ceratophrys ornata*. *An. Fac. Med. Montevideo*. 44: 414-423.
- SAEZ, F. A. & N. BRUM-ZORRILLA. (1966). Karyotype variation in some species of the genus *Odontophrynus* (Amphibia-Anura). *Caryologia*, 19: 55-63
- SALAS, N. E. (2004). Las especies del género *Odontophrynus* de la provincia de Córdoba, Argentina. Tesis de doctorado, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. UNRC. 120 pp.
- SALAS, N. E. (2006). Análisis cromosómico de *Odontophrynus americanus*, *O. achalensis*, *O. cordobae* y *O. occidentalis* (Anura, Leptodactylidae) de la provincia de Córdoba, Argentina. *Revista Española de Herpetología* (en prensa).
- SCHMID, M. (1978a). Chromosome banding in Amphibia I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma* 66: 381-388.
- SCHMID, M. (1978b). Chromosome banding in Amphibia II. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Ranidae*, *Microhylidae* and *Rhacophoridae*. *Chromosoma* 68: 131-148.
- SCHMID, M. (1982). Chromosome banding in Amphibia III. Analysis of the structure and variability of NORs in Anura. *Chromosoma*, 87: 327-344.

- SCHMID, M., J. OLERT & C. KLETT. (1979). Chromosome banding in Amphibia III. Sex chromosomes in Triturus. *Chromosoma* 71: 29-55.
- SCHMID, M.; T. HAAF & W. SCHEMPP. (1985). Chromosome banding in Amphibia IX. The polyploid karyotypes of *Odontophrynus americanus* and *Ceratophrys ornata* (Anura, Leptodactylidae). *Chromosoma*, 91: 172-182.
- SCHMID, M.; C. STEINLEIN, Y. NANDA & J. EPPLER. (1990). Chromosome banding in Amphibia. 21-54. E. Olmo (ed.) In *Cytogenetics of Amphibians and Reptiles*. *Advances in Life Science*. Birkhauser Verlag, Basel.
- SCHMIDTKE, J., W. BEÇAK & W. ENGEL. (1976). The reduction of genic activity in the tetraploid amphibian *Odontophrynus americanus* is not due to loss of ribosomal DNA. *Experientia*, 32: 27-28.