

EL CARIOTIPO DE LA RANA CHILENA *EUPSOPHUS CONTULMOENSIS* (ANURA, LEPTODACTYLIDAE), CON COMENTARIOS SOBRE LA EVOLUCION CARIOLOGICA DEL GENERO *EUPSOPHUS* *

The karyotype of the Chilean frog *Eupsophus contulmoensis* (Anura, Leptodactylidae) with commentaries about the karyological evolution of the genus *Eupsophus*

J. RAMÓN FORMAS**

RESUMEN

Se describe el cariotipo de *Eupsophus contulmoensis*. Esta especie tiene 30 cromosomas y su cariotipo posee 7 pares monobraquiados y 8 pares bibraquiados. Se hacen algunos comentarios acerca de la evolución cariológica de las ranas del género *Eupsophus*.

ABSTRACT

The karyotype of *Eupsophus contulmoensis* is described. This species has 30 chromosomes and the karyotype has 7 monoarmed pairs and 8 biarmed pairs. The karyological evolution of the genus *Eupsophus* is commented.

KEYWORDS: Anura. Leptodactylidae. *Eupsophus*. Chromosomes. Chile.

INTRODUCCION

Eupsophus contulmoensis es una rana endémica de la Cordillera de Nahuelbuta (Monumento Natural de Contulmo; 37°02' S, 73°12' W; provincia de Arauco, sur de Chile). Este anuro se distingue de sus congéneres (*E. roseus*, *E. migueli*, *E. calcaratus*, *E. insularis*, *E. vertebralis* y *E. emiliopugini*) por su pigmentación dorsal oscura, el abdomen amarillo brillante, la parte superior del iris amarillo bronceado (en animales vivos) y

el tubérculo palmar interno prominente (Ortiz et al., 1989). *Eupsophus contulmoensis* es un anuro de tamaño mediano (34,0 - 42,5 mm, distancia hocico-cloaca) lo mismo que *E. calcaratus* (X= 35,1 mm, Formas & Vera 1982), *E. migueli* (X= 35,5 mm, Formas 1978), *E. roseus* (X=36,0 mm) y *E. insularis* (X= 39,3 mm, Formas & Vera 1982). Este grupo de especies es menor en tamaño que *Eupsophus vertebralis* (X= 59,4 mm, Grandison 1961) y *E. emiliopugini* (X= 50,6 mm, Formas 1989a).

Desde el punto de vista cariológico (Formas, 1991) se dividió al género *Eupsophus* en dos grupos. En el primero de ellos se incluyeron las ranas de tamaño mediano con fórmula $2n = 30$ y en el segundo las grandes que poseen 28 cromosomas. La descripción del cariotipo de

* Resultado del Proyecto Fondecyt 0050-89 y del Proyecto DID S 89-6, Universidad Austral de Chile.

** Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile.

Eupsophus insularis ($2n = 30$) hecha por Cuevas (1990) permite incluir a este anuro en el primer grupo de especies junto a *E. roseus*, *E. calcaratus* y *E. migueli*.

En el siguiente trabajo se describe el cariotipo de *Eupsophus contulmoensis* y se plantean sus eventuales relaciones y similitudes cariológicas. Basados en toda la información cromosómica de las especies del género *Eupsophus*, se comentan algunos aspectos citotaxonomicos y citoevolutivos de este taxón.

MATERIAL Y METODOS

Tres machos y cinco hembras de *Eupsophus contulmoensis* fueron capturados en la localidad tipo (Monumento Natural de Contulmo, provincia de Arauco) e inyectados con 0,3 ml de solución de colchicina (0,1%) por 12 horas. Los cromosomas se obtuvieron de la mucosa intestinal. Trozos de intestino fueron hipotonizados en agua destilada, fijados en alcohol-acético (3:1) y posteriormente trasladados a ácido acético al 45%. Pequeños fragmentos de tejido se apretaron entre un porta y un cubreobjeto, éstos se sumergieron en nitrógeno líquido, levantándose el cubreobjeto con un bisturí. Después de tres días las preparaciones fueron teñidas por 10 minutos en buffer fosfato Sörensen (pH 6,8) que contenía 4% de Giemsa. Para el análisis del cariotipo, la longitud de los cromosomas se midió en microfotografías de placas metafásicas ampliadas (7 placas mitóticas de hembras y 6 de machos). Con estas

medidas se calculó la longitud relativa de cada cromosoma y la razón entre los brazos (longitud del brazo largo/ longitud del brazo corto). La longitud relativa de los cromosomas fue determinada de acuerdo a Bogart (1970). La posición centromérica se determinó según Levan et al. (1964).

Los especímenes y preparaciones cromosómicas fueron depositados en la colección de anfibios del Instituto de Zoología de la Universidad Austral de Chile, Valdivia (IZUA).

RESULTADOS

El examen de 13 placas metafásicas provenientes de cinco machos y tres hembras de *Eupsophus contulmoensis* mostró un número diploide de $2n = 30$. El cariotipo de *E. contulmoensis* está en la Fig. 1 y en el material examinado no se reportó dimorfismo sexual. Cuando los cromosomas se ordenan en longitud decreciente se observa que los pares 1 - 3 son grandes (> 100 unidades), el par 4 es intermedio (80 - 100 unidades) y los pares 5 - 15 son pequeños (< 80 unidades). Los pares 1, 6, 7, 10, 11 y 14 son metacéntricos; el par 2 es submetacéntrico; el par 3 es submetacéntrico y los pares 4, 5, 8, 9, 12, 13 y 15 son telocéntricos. El par 3 muestra una notoria constricción secundaria en el brazo corto. Un resumen de la posición de los centrómeros y la longitud relativa de los pares cromosómicos se indica en la Tabla 1.

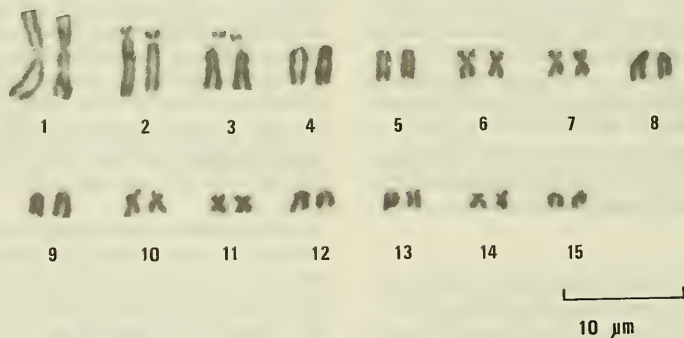


FIG. 1. Cariotipo de *Eupsophus contulmoensis*.

TABLA I. Longitud relativa, razón de los brazos (promedio y desviación típica) y tipos de cromosomas (m = metacéntrico; sm = submetacéntrico; st = subtelocéntrico; t = telocéntrico) de *Eupsophus contulmoensis*. Cromosoma con constricción secundaria (*).

Par N°	Longitud relativa	Razón de los brazos	Tipo
1	175,00 ± 4,58	1,36 ± 0,07	m
2	137,66 ± 3,05	4,31 ± 0,37	st
3*	121,33 ± 3,21	3,00 ± 0,35	sm
4	80,33 ± 1,52	∞	t
5	62,06 ± 2,10	∞	t
6	55,63 ± 2,28	1,50 ± 0,19	m
7	50,80 ± 1,31	1,61 ± 0,09	m
8	49,76 ± 0,40	∞	t
9	48,80 ± 0,43	∞	t
10	42,96 ± 0,15	1,33 ± 0,07	m
11	40,16 ± 0,66	1,30 ± 0,01	m
12	36,03 ± 0,15	∞	t
13	34,23 ± 0,49	∞	t
14	33,16 ± 0,47	1,53 ± 0,05	m
15	31,83 ± 0,86	∞	t

DISCUSION

En la Tabla II se presenta un resumen de los cariotipos de todas las especies de *Eupsophus*. Al comparar sus fórmulas cromosómicas (2n = 28 - 30) con los otros miembros de la subfamilia, se observa que existe una marcada diferencia entre *Eupsophus* y el resto de los *Telmatobiinae*. En este taxón subfamiliar la fórmula predominante es

2n = 26 y casi todos los cromosomas son bibráquidos. Esto ha sido reportado en las especies de los géneros *Caudiverbera*, *Telmatobufo*, *Batrachyla*, *Thoropa*, *Atelognathus*, *Hylorina*, *Insuetophrynus*, *Limnomedusa* y algunas especies de *Alsodes* (Lynch, 1978). Un número inusualmente bajo dentro de la subfamilia (2n = 22) se reportó en *Somuncuria somuncurensis* (Cei, 1969), *Alsodes nodosus* (Bogart, 1970) y las especies de *Alsodes* del grupo *marmoratus* (Brum-Zorrilla y Sáez, 1968). Veloso et al. (1981) describieron el cariotipo de *Alsodes barrioi*, que muestra el número más alto de cromosomas (2n = 34) entre los *Telmatobiinae*. Los cariotipos con 28 ó 30 cromosomas (muchos de ellos telocéntricos) en *Eupsophus*, permiten una clara identificación del taxón entre los géneros de *Telmatobiinae* y dan la definición citotaxonómica al género.

Desde el punto de vista de la diversidad de fórmulas cariotípicas intragenéricas, *Eupsophus* ocupa un lugar intermedio en la subfamilia, pues presenta sólo dos fórmulas cromosómicas (2n = 28, 30). Una situación similar se ha encontrado en *Telmatobius* (2n = 22 y 26). Son precedidos por *Alsodes* (2n = 22, 26 y 34) y seguidos por la serie de géneros anteriormente citados, que no muestran diversidad intragenérica y en los cuales predomina la fórmula 2n = 26 (excepto *Somuncuria* 2n = 22). Reig (1972) propuso un cariotipo con 26 cromosomas bibráquidos como primitivo para los *Telmatobiinae*. Aunque es teóricamente posible que de un cariotipo con tales características se

TABLA II. Resumen de la información ca. e las especies del género *Eupsophus*.

Especie	2N	NF	N° de cromosomas bibráquidos	N° de cromosomas monobráquidos	Procedencia
<i>E. contulmoensis</i>	30	46	16	14	Este trabajo (Cuevas, 1990)
<i>E. insularis</i>	30	45 macho 44 hembra	15 macho 14 hembra	15 macho 16 hembra	
<i>E. emiliopugini</i>	28	56	28	0	(Formas, 1991)
<i>E. vertebralis</i>	28	54	26	2	(Formas, 1991)
<i>E. roseus</i>	30	46	16	14	(Iturra y Veloso, 1989)
<i>E. calcaratus</i>	30	46	16	14	(Formas, 1980)
<i>E. migueli</i>	30	45 macho 44 hembra	15 macho 14 hembra	15 macho 16 hembra	(Iturra y Veloso, 1989)

han derivado los cariotipos de *Eupsophus*, es difícil proponer un modelo de evolución cariológica. Recurriendo a los mecanismos corrientes de cambio cromosómico (translocaciones, inversiones, adición o pérdida de heterocromatina, cambios robertsonianos) es teóricamente posible generar un modelo que nos permita llegar a los cariotipos de *Eupsophus* desde la fórmula $2n = 26$. Sin embargo éste sería tan complicado y tendría un número tan alto de pasos que parece poco probable que los cariotipos de *Eupsophus* se hayan originado de acuerdo a un modelo tan complejo. Alternativamente al "cuello de botella" que impone la derivación de los cromosomas de *Eupsophus*, a partir de 26 cromosomas bibrariados, se propone otra hipótesis basada en el origen de los leptodactylidos.

Heyer (1975) postuló que la familia Leptodactylidae se originó en los bosques templados de Sudamérica a partir de un tronco liopelmatoleptodactyloideo. Si los leptodactylidos se originaron "in situ" de este grupo ancestral, es posible que sus miembros más primitivos (Telmatobiinae) hayan conservado algunas características cariológicas del tronco liopelmatolepto-dactyloideo, que según Heyer (op. cit) derivó de los liopelmátidos. Basándose en esta hipótesis se propone que los cariotipos de *Eupsophus* corresponderían a un carácter cariológico presente en el tronco primitivo, el que se conservó en las especies actuales del género. Aunque es improbable conocer el cariotipo ancestral de *Eupsophus*, es posible que haya tenido algunas características presentes hoy en la familia Liopelmatidae (*sensu* Savage, 1973). Entre ellas destaca especialmente la presencia de cromosomas telocéntricos (6 pares en *Liopelma hochstetteri* y un par en *L. hamiltoni* y *L. archeyi*) (Stephenson et al., 1974). Desde el punto de vista filogenético Morescalchi (1968, 1973) sugirió que la presencia de cromosomas telocéntricos es un carácter cariológico primitivo para los anuros. El hecho que liopelmátidos y *Eupsophus* presenten caracteres primitivos en sus cariotipos sugiere que los cromosomas telocéntricos estuvieron también en el ancestro liopelmatoleptodactyloideo, del cual se sugiere que ha derivado el cariotipo de las especies de *Eupsophus*.

Las similitudes cromosómicas entre las siete

especies de *Eupsophus* (Tabla II) permiten reconocer claramente dos grupos. *Eupsophus contulmoensis* y *Eupsophus insularis* son incorporadas al grupo *roseus* (*E. roseus*, *E. migueli* y *E. calcaratus*) porque tienen la fórmula $2n = 30$ y poseen 14 - 16 cromosomas telocéntricos. Los miembros del grupo *vertebralis* (*E. vertebralis* y *E. emiliopugini*) comparten la fórmula $2n = 28$ y poseen pocos cromosomas telocéntricos (0 - 2). Estas dos agrupaciones intragenéricas basadas en la cariología son apoyadas por antecedentes etológicos (canto) (Formas y Brieva; en prensa), morfométricos (Fernández de la Reguera, 1987) y bioquímicos (Formas et al., 1983). Esta suma de antecedentes nos sugeriría que estamos frente a dos géneros distintos; sin embargo, el tipo de larva derivada compartida entre *E. vertebralis* (Formas, 1992), *E. emiliopugini* (Formas, 1989a), *E. roseus* (Formas y Pugin, 1978) y *E. calcaratus* (Formas, 1989b) es una sinapomorfía que le daría consistencia taxonómica al género, siempre y cuando no fuera una convergencia o paralelismo.

Al comparar los cromosomas de las especies del grupo *vertebralis* con las del grupo *roseus* se observan diferencias tan marcadas (Tabla II) que es difícil establecer el cariotipo ancestral de ambos grupos. Esto se debe especialmente a que no existen cariotipos intermediarios entre ellos que permitan establecer un modelo de evolución cromosómica intragenérica. Sin embargo, dentro de cada grupo en particular, tanto en *vertebralis* como *roseus*, es factible hacer proposiciones sobre la evolución de los cariotipos. Formas (1991) propuso que una inversión pericéntrica o la adición de heterocromatina habría actuado en la evolución cromosómica de *Eupsophus vertebralis* y *Eupsophus emiliopugini*. Dentro del grupo *roseus*, Iturra y Veloso (1981, 1989) y Cuevas (1990) demostraron la existencia de cromosomas sexuales en *Eupsophus roseus*, *E. migueli* y *E. insularis*. Estos autores han propuesto que la pérdida de heterocromatina y las inversiones pericéntricas han intervenido en el establecimiento del sistema sexual de estas especies (XXXY).

El conocimiento de los cariotipos de todas las especies de *Eupsophus* es un avance importante en el estudio citológico del género. Estos antecedentes permiten plantear algunas hipótesis acerca

del origen del taxón, establecer proposiciones citotaxonómicas y proponer algunos mecanismos de evolución cariológicos. El estudio completo de los cromosomas de las especies de *Eupsophus* con bandeos C y N y el conocimiento de la cantidad de ADN por núcleo son antecedentes necesarios para plantear una hipótesis acerca de la evolución cariológica de las especies de *Eupsophus*.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Proyecto FONDECYT (0050-89) y el Proyecto S 89-6 (Dirección de Investigación, Universidad Austral de Chile). Lila Brieva, César Cuevas y Raúl Arriagada prestaron ayuda en la captura de especímenes. La Corporación Nacional Forestal (CONAF) facilitó los permisos para ello en el Monumento Nacional de Contulmo. Sonia Lacrampe mecanografió el manuscrito.

BIBLIOGRAFIA

- Bogart, J.P. 1970. Systematic problems in the amphibian family Leptodactylidae (Anura) as indicated by karyotypic analysis. *Cytogenetics* 9:369-383.
- Brum-Zorrilla, N. y F.A. Sáez. 1968. Chromosome of Leptodactylidae (Amphibia-Anura). *Experientia* 24: 969.
- Cei, J.M. 1969. La meseta basáltica de Somuncura, Río Negro. Herpetofauna endémica y sus peculiares equilibrios biocenóticos. *Physis* 28:257-271.
- Cuevas, C. 1990. Comparación cromosómica entre *Eupsophus roseus* (Anura: Leptodactylidae). Tesis Licenciatura en Ciencias Biológicas. Fac. Cs. Universidad Austral de Chile.
- Fernández de la Reguera, P. 1987. Identifying species in the Chilean frogs by principal components analysis. *Herpetologica* 43:173-177.
- Formas, J.R. 1978. A new species of leptodactylid frog (*Eupsophus*) from the Coastal Range in Southern Chile. *Studies Neotrop. Fauna Env.* 13:1-9.
- Formas, J.R. 1980. The chromosomes of *E. calcaratus* and the karyological evolution of the genus *Eupsophus* (Leptodactylidae). *Experientia* 36: 1163-1164.
- Formas, J.R. 1989a. A new species of *Eupsophus* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae) from Southern Chile. *Proc. Biol. Soc. Wash.* 102:568-576.
- Formas, J.R. 1989b. The tadpole of *Eupsophus calcaratus* in Southern Chile. *J. Herpetol.* 23:195-197.
- Formas, J.R. 1991. The karyotypes of the Chilean frogs *Eupsophus emiliopugini* and *E. vertebralis* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae). *Proc. Biol. Soc. Wash.* 104:7-11.
- Formas, J.R., 1992. The tadpole of *Eupsophus vertebralis*. *Herpetologica* 48: 115-119.
- Formas, J.R. y L. Brieva, en prensa. The advertisement calls and relationships of the Chilean frogs *Eupsophus contulmoensis* and *E. insularis* (Amphibia: Anura: Leptodactylidae). *Proc. Biol. Soc. Wash.*
- Formas, J.R. y E. Pugin. 1978. Tadpoles of *Eupsophus roseus* and *Bufo variegatus* (Amphibia, Anura) in Southern Chile. *Hepertol.* 12:243-246.
- Formas, J.R. y M.J. Vera. 1982. The status of two frogs of the genus *Eupsophus* (Anura: Leptodactylidae). *Proc. Biol. Soc. Wash.* 95:594-601.
- Formas, J.R., M.I. Vera y S. Lacrampe. 1983. Allozymic and morphological differentiation in the South-American frog genus *Eupsophus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 75:475-478.
- Grandison, A. 1961. Chilean species of the genus *Eupsophus* (Anura: Leptodactylidae). *Bull. Mus. (Nat. Hist.) Zool* 8:111-149.
- Heyer, W.R. 1975. A preliminary analysis of the intergeneric relationships of the frog family Leptodactylidae. *Smithsonian Contrib. Zool.* 199:1-55.
- Iturra, P. y A. Veloso. 1981. Evidence of heteromorphic sex chromosomes in male amphibians (Anura-Leptodactylidae). *Cytogenetics Cell Genet.* 31:108-110.
- Iturra, P. y A. Veloso. 1989. Further evidence for early sex chromosome differentiation of Anuran species. *Genetica* 78:25-31.
- Levan, A., K. Fredga y A.A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric positions on chromosomes. *Hereditas* 52:201-220.
- Lynch, J.D. 1978. A re-assessment of the telmatobiine leptodactylid frogs of Patagonia. *Occas. Pap. Mus. Nat. Hist. Univ. Kansas* 72:1-57.
- Morescalchi, A. 1968. Hypothesis on the phylogeny of the Salientia based on the karyological data. *Experientia* 24:964-966.
- Morescalchi, A. 1973. *Amphibia In: A.B. Chiarelli y E. Capanna (eds.). Cytotaxonomy and vertebrate evolution Academic Press, London y New York.* pp. 233-348.
- Ortiz, J.C., H. Ibarra-Vidal y J.R. Formas. 1989. A new species of *Eupsophus* (Anura: Leptodactylidae) from Contulmo, Nahuelbuta Range, Southern Chile. *Proc. Biol. Soc. Wash.* 102:1031-1035.
- Reig, O. 1972. *Macrogenioglottus* and the South-American bufonoid toads. *In: W. Frank Blair (ed.). Evolution in the genus Bufo.* Univ. Texas Press. Austin pp. 14-36.
- Savage, J. 1973. The geographic distribution of frogs:

- patterns and predictions In: J.L. Vial (ed). Evolutionary biology of the anurans. Univ. Missouri Press, Columbia pp. 351-446.
- Stephenson, E.M., E.S. Robinson y N.G. Stephenson, 1974. Interspecific relationships of *Liopelma* (Amphibia: Anura): further karyological evidence. *Experientia* 30:1248-1250.
- Veloso, A., N. Díaz, P. Iturra y M. Penna. 1981. Descripción de una nueva especie de Telmatobino del género *Alsodes* (Amphibia, Leptodactylidae) de la Cordillera de Nahuelbuta (sur de Chile). *Medio Ambiente* 5:72-77.