

## ANOMALIAS OCULARES EN HIBRIDOS *BUFO PARACNEMIS* ♂ x *BUFO ARENARUM* ♀ (ANURA: BUFONIDAE)

DORA RENGEL<sup>1\*</sup>, ARMANDO PISANÓ<sup>1\*</sup> y DIANA ALONSO<sup>1\*\*</sup>

\* Carrera de Investigador CONICET. \*\* Becaria del CONICET. <sup>1</sup>Laboratorio Investigaciones Embriológicas (LABINE). CONICET. Montevideo 126, 4to. Piso, 1019. Buenos Aires, Argentina.

**SUMMARY:** The hybrids between *Bufo paracnemis* ♂ x *Bufo arenarum* ♀ are counted among the so called "vital hybrids". Our results have revealed relevant ocular anomalies in 90% of cases. In some larvae the lens is lacking in either one or both eyes (20%); in others the lens it is found in an opposite position to normal (25%) or else one normal and one different eye is formed (20%). Histological analysis reveals anomalies in the retinal area, observing flexuous movements in the pigmentary strata (5%). Eyes folded over themselves were also observed (5%). The most severe alterations produced cases of anophthalmia (10%). On occasions (5%), groupings of pigments were found instead of the eyes. 10% of the larvae were normal. The other organs show analogies to those of the larvae of *Bufo paracnemis*, including the dorsal pattern.

**Key words:** *Bufo arenarum*; *Bufo paracnemis*; Hybridization; Teratology.

**RESUMEN:** Los híbridos entre *Bufo paracnemis* ♂ x *Bufo arenarum* ♀ se encuadran en los llamados "híbridos vitales". Los resultados han evidenciado relevantes anomalías oculares que se manifiestan en un 90% de los casos. En algunas larvas falta el cristalino tanto en uno como en ambos ojos (20%); en otras larvas el cristalino se encuentra ubicado en posición opuesta al normal (25%) o bien puede ocurrir que se forme un ojo normal y el otro de forma distinta (20%). El análisis histológico mostró anomalías en la zona retiniana, evidenciándose a partir de los estratos pigmentarios, repliegues y movimientos flexuosos (5%). También existen ojos replegados sobre sí mismos (5%). Las alteraciones más severas llevaron a procesos de anofthalmia (10%). En ocasiones (5%) en lugar del ojo se evidencian grumos de pigmento. Se obtuvo un 10% con ojos normales. Los otros órganos presentan analogía con los de las larvas de *Bufo paracnemis*, inclusive la librea dorsal.

**Palabras claves:** *Bufo arenarum*; *Bufo paracnemis*; Hybridación; Teratología.

### Introducción

En la naturaleza debido a determinados mecanismos que impiden la hibridación, es asegurada la respectiva continuidad de las especies que de tal modo mantienen constantes sus características morfofuncionales. Sin embargo, raramente en la naturaleza o de manera experimental, el bloqueo puede ser suprimido y la cruce interespecífica, eso es la hibridación, puede resultar viable lo que deja abierta la posibilidad de dar origen a nuevas formas, principio de nuevas especies. Desde este ángulo, puede decirse que la hibridación es capaz de servir no sólo para resolver numerosos problemas

biológicos de difícil solución, sino que también aporta datos de valor práctico. En los vegetales, un clásico ejemplo de la constitución de una especie nueva por causa de la hibridación heteroespecífica lo presenta *Raphanobrassica karpechenkoi* que en la naturaleza no existe y que ha sido obtenida cruzando *Raphanus sativus* con *Brassica oleracea*. En los animales, si bien han sido obtenidos híbridos de varias especies, la mayoría de estos resultan estériles, o tienen un solo sexo, o bien un solo sexo fértil (Blair, 1972). Uno de los raros casos en que en la naturaleza ocurre la hibridación entre especies distintas de anfibios, la presenta la combinación *Triton marmoratus* ♂ x *Triton cristatus* ♀ que da

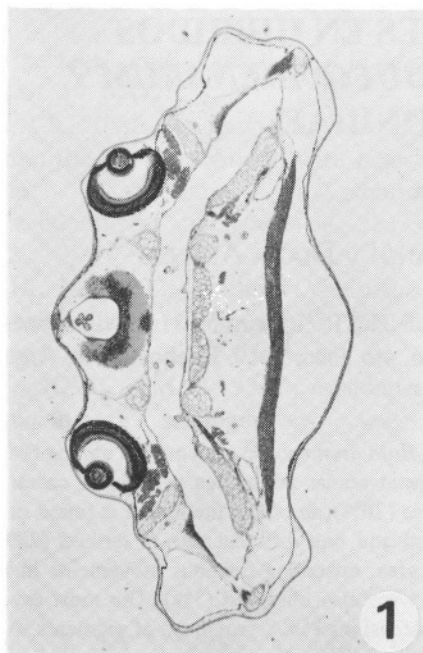


Fig. 1. Corte histológico: ojos de larva de *Bufo paracnemis* control (x 11,25).

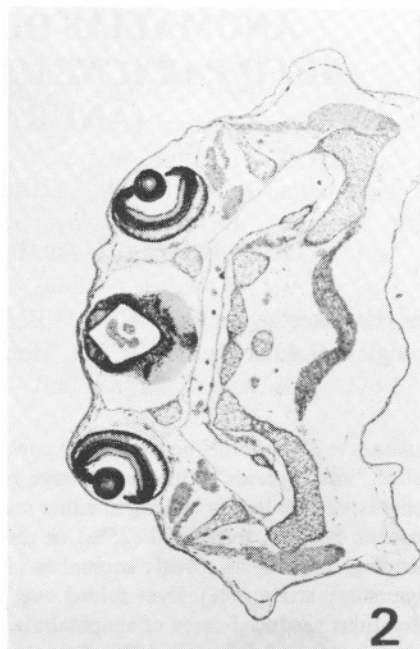


Fig. 2. Corte histológico: ojos de larva de *Bufo arenarum* control (x 11,25).

origen a *Triton blasii* (Bataillon y Tscherniakovski, 1932). Son sus características la esterilidad masculina y la parcial esterilidad de las hembras que pueden cruzarse con los machos de ambas especies.

Por otra parte en los Anfibios Urodelos, numerosas han sido las hibridaciones experimentales entre especies distintas (Baltzer, 1934; Hamburger, 1935, 1936; Twitty, 1936, 1945; Schönmann, 1938; Costello, 1942; Benazzi, 1956). Los Anuros han proporcionado abundante material de estudio para las hibridaciones heteroespecíficas (Bataillon y Tchou-Su, 1929; Montalenti, 1933, 1938; Hamburger, 1935; Moore, 1947, 1948; Thornton, 1955; Volpe, 1956, 1959; Volpe y Harvey, 1958; Quattrocchi, 1964; Flindt y Hemmer, 1967; Blair, 1972). Cabe señalar que en la cruce entre algunas especies distintas de Anuros, los híbridos resultantes pueden ser vitales (Born, 1883, 1886; Hertwig, 1918, 1930; Montalenti, 1933, 1938; Blair, 1972) mientras que en otras el espermatozoide no participaría en el desarrollo (Tchou-Su, 1931) o bien participaría sólo parcialmente (Moore, 1947, 1948). Este tipo de estudio ha

sido poco desarrollado en Argentina especialmente en lo inherente a Vertebrados inferiores (Barbieri y Brauckmann, 1966). Por lo tanto hemos considerado oportuno realizar varios ensayos de hibridación entre *Bufo paracnemis* ♂ x *Bufo arenarum* ♀; y para control entre *Bufo arenarum* ♂ y *Bufo paracnemis* ♀; los datos que se han obtenido justifican por su interés la presente nota previa y servirán de base para ulteriores análisis.

#### Materiales y Métodos

Se emplearon ejemplares adultos de *Bufo arenarum* procedentes de los alrededores de la provincia de Buenos Aires y de *Bufo paracnemis* de la provincia de Chaco.

Las ovulaciones se obtuvieron induciéndolas por inyección de hipófisis homóloga conservada según el método de Pisanó (1957). Los ejemplares hembras en todos los casos fueron previamente mantenidos a temperatura de 12°C durante 24 hs. y después de la inyección hipofisaria a 25°C hasta la ovoposición. Los huevos cuidadosamente extraídos del ovisaco antes que pasaran tres horas para evitar anomalías de desarrollo (Rengel et al., 1986) fueron fertiliza-

dos in vitro con un macerado de testículo homólogo o heterólogo según el caso y se mantuvieron en solución fisiológica.

Se formaron 4 series de la manera siguiente:

#### Controles:

- A) *Bufo arenarum* ♂ x *Bufo arenarum* ♀  
 B) *Bufo paracnemis* ♂ x *Bufo paracnemis* ♀

#### Híbridos:

- C) *Bufo paracnemis* ♂ x *Bufo arenarum* ♀  
 D) *Bufo arenarum* ♂ x *Bufo paracnemis* ♀

El desarrollo de las distintas series se verificó en acuarios donde se colocaron 30 larvas en 3 lts. de solución de Holtfreter standard que se renovaba día por medio; se mantuvo un ciclo circadiano L12/D12. Como alimento se proporcionó lechuga hervida *ad libitum*. Los distintos estadios de desarrollo se identificaron para *Bufo arenarum* con la tabla de Del Conte y Sirlin (1952) y los larvales con la de Martin et al., (1985); para los distintos estadios de *Bufo paracnemis* se usó la tabla de Gosner (1960); los híbridos se identificaron con esta última y con la de Martin et al., (1985).

Como fijadores se usaron según el caso, el líquido de Ancel y Vintemberger (1948), el Bouin o el formol al 4%. Para endurecer y cortar a mano alzada los ovocitos recién fertilizados se usó el método propuesto por Legname (1964). Las secciones seriadas de 5µm fueron teñidas con hematoxilina-eosina o con la mezcla tricrómica de Mallory.

### Resultados

**Serie A y B:** Las fertilizaciones entre *Bufo arenarum* ♂ y *Bufo arenarum* ♀ (serie A) y las entre *Bufo paracnemis* ♂ y *Bufo paracnemis* ♀ (Serie B) fueron usadas como controles; resultaron normales en su desarrollo en un 95% de los casos y sirvieron para una oportuna

comparación con los datos obtenidos de los híbridos *Bufo paracnemis* ♂ x *Bufo arenarum* ♀

**Serie C:** La fertilización de la cruce entre *Bufo paracnemis* ♂ x *Bufo arenarum* ♀ resultó positiva en un 90% de los casos. Mediante rápida fijación según el método propuesto por Legname (1964) y cortando a mano alzada los ovocitos aproximadamente 10' después de la fertilización, se ha podido notar a escaso aumento por la traza pigmentada que deja la cabeza del espermatozoide, que no hubo polispermia y que se realizó la cariogamia contrariamente a lo que ha sido descrito en estos casos en otras especies de Anuros (Tchou-Su, 1931).

La segmentación apareció con retardo y asincrónica con respecto a lo que ocurría en los controles *Bufo arenarum* x *Bufo arenarum* y respectivamente *Bufo paracnemis* x *Bufo paracnemis*. Especialmente cuando se verifican con bastante retardo en los híbridos, los surcos se disponen con una orientación anómala y un tanto al azar, en otros términos se obtiene una segmentación de tipo "barroco".

El desarrollo se detuvo en el estadio de gástrula en un 60% de los caso, observándose procesos más o menos pronunciados de exogastrulación. Alrededor de un 5% de los embriones paró en el estadio de placa neural: de los embriones que siguieron el desarrollo, un 10% al superar el estadio de tubo neural o de brote caudal se desarrolló en forma anómala: se observa microcefalia, hidropesía más o menos generalizada y otras alteraciones que se reflejan en la pérdida de su típica morfología. Las larvas restantes siguieron su desarrollo más o menos

#### ANOMALIAS

Anoftalmia  
 Un ojo casi normal y otro de forma distinta.  
 Falta uno o ambos cristalinos.  
 Ubicación profunda e inversa del cristalino.  
 Complejo retiniano flexuoso.  
 Ojo replegado sobre sí mismo.  
 En lugar del ojo, grumos de pigmento.  
 Sin anomalías oculares.

#### PORCENTAJES

10%  
 20%  
 20%  
 25%  
 5%  
 5%  
 5%  
 10%

Tabla 1. Porcentajes de las anomalías oculares en híbridos interespecíficos de *Bufo paracnemis* ♂ x *Bufo arenarum* ♀ provenientes de 5 ensayos de hibridación. N. ejemplares examinados: 300.

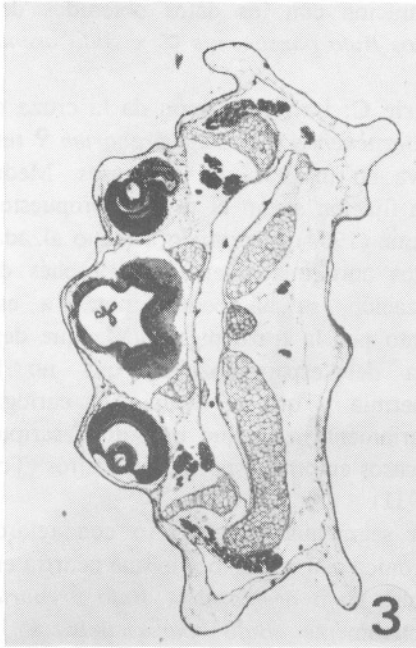


Fig. 3. Corte histológico larva híbrida: un ojo más o menos normal y el otro anómalo (x 11,25).

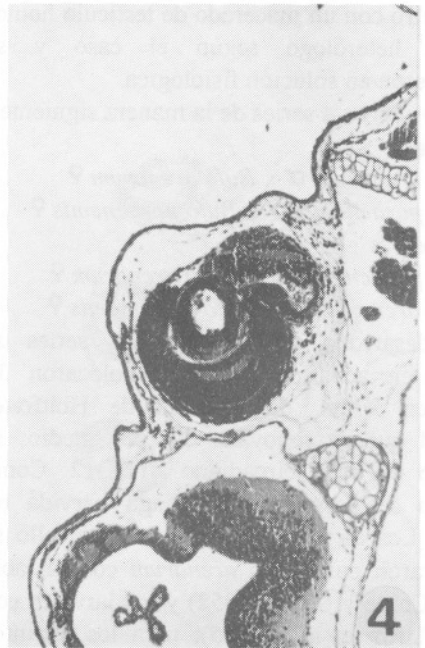


Fig. 4. Corte histológico: ojo anómalo, particular de la fig. 3 (x 28,12).



Fig. 5. Un ojo casi normal y el otro replegado (x 11,25).

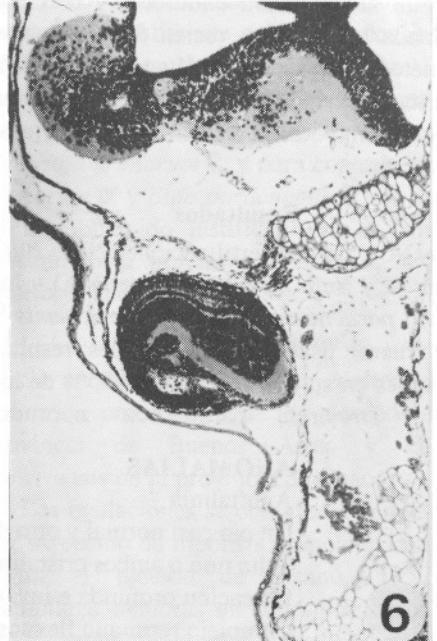


Fig. 6. Particular del ojo anómalo de la fig. 5 (x 28,12).



Fig. 7. Otra anomalía: ojo replegado (x 28,12).



Fig. 8. Otro tipo de anomalía: ojo replegado (x 28,12)

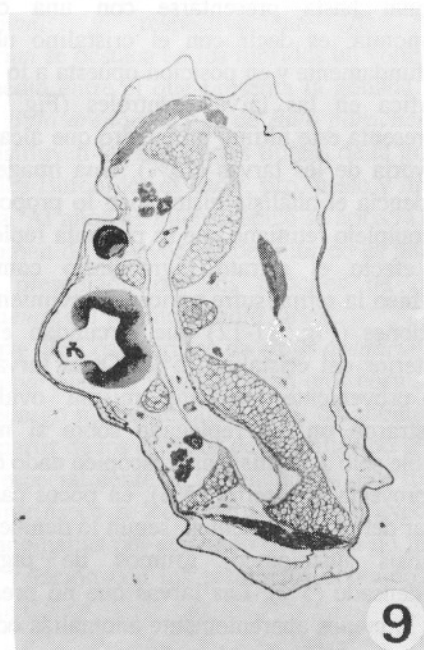


Fig. 9. Larva con un ojo en posición invertida y otro reemplazado por grupos de pigmento (x 11,25).



Fig. 10. Particular de la fig. 9 (x 28,12) nótese la posición invertida del cristalino.



Fig. 11. Larva con el complejo retiniano replegado (x 11,25).

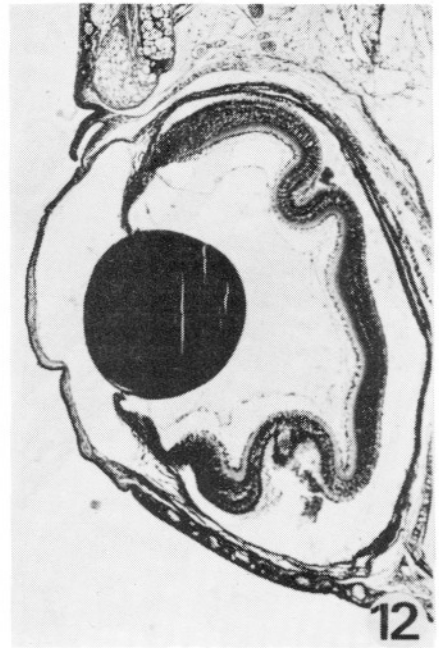


Fig. 12. Particular de la fig. 11 (x 28,12)..

normal, si bien en un 90% mostraron alteraciones oculares relevantes. Metamorfosó normalmente un 10% de los casos.

Cabe señalar que las larvas híbridas tanto en los estadios premetamórficos como en los post-metamórficos, mostraron en la parte dorsal un dibujo y una pigmentación parecida al del *Bufo paracnemis*; así también la forma de la boca larval a veces un tanto anómala, se asemeja a la de las larvas de *Bufo paracnemis*. Conviene señalar también que toda la estructura esquelética cefálica presenta características de la especie paterna.

Los resultados obtenidos destacan una anomalía que representa un dato relevante y común para casi todas las larvas híbridas *Bufo paracnemis* ♂ x *Bufo arenarum* ♀ y que se manifiesta a nivel de los ojos (Tabla 1). En efecto, puede que ninguno de los dos ojos se desarrolle de manera normal obteniéndose ejemplares metamorfosoados ciegos (10%); puede también ocurrir que se forme un ojo casi normal y el otro (Fig. 3-4) de forma radicalmente distinta (20%); hay casos en que falta el cristalino (Fig. 5-8) en uno o en ambos ojos (20%); se registraron también larvas cuyos ojos se desarrollaron en posición distinta del

normal hasta presentarse con una curiosa fisonomía, es decir con el cristalino ubicado profundamente y en posición opuesta a lo que se verifica en las larvas controles (Fig. 9-10); representa este último un cuadro que alcanza la mayoría de las larvas (25%). Una imagen que evidencia el análisis histológico lo proporciona el complejo retiniano que se presenta replegado; en efecto el estrato pigmentario como así también la retina sufre curiosos movimientos de flexiones (Fig. 11-12) que circundan el área posterior del cristalino (5%). Otras larvas aún no provenientes de una misma ovulación, mostraron un ojo replegado sobre sí mismo, visible sólo al análisis microscópico dado que no se proyecta al exterior (5%); en pocos casos en lugar del ojo se presentan, según lo demuestra el análisis histológico, grumos de pigmento condensado (5%). Las larvas que no presentan por lo menos aparentemente anomalías oculares alcanzan a un 10%.

A pesar de la insuficiente visión la mayoría de las larvas se alimentaban, si bien con cierta dificultad, con la lechuga hervida que se les proporcionaba. En cambio debido al grave defecto ocular los recién metamorfosoados tenían una vida efímera en cuanto no se alimen-

taban; aún cuando se disponían *Tubifex* a poca distancia de su boca, no se realizaba el estímulo para que los ingeriesen.

El aparato digestivo de la larva híbrida resulta formado por un intestino con número de espiras y grosor semejante al de las larvas de *Bufo paracnemis* y el corte histológico evidencia restos de alimento en su interior. La estructura histológica del hígado, páncreas y mesonefros tiene similitud con lo observado al respecto en larvas de *Bufo paracnemis*. Llama la atención la vesícula biliar que, voluminosa, muestra casi siempre un cálculo en su interior. El aparato respiratorio del híbrido si bien de aspecto análogo al que se observa en larvas de *Bufo paracnemis* varía un tanto dado que las branquias se implantan en arcos branquiales hipertróficos con respecto especialmente al cuadro manifestado por las larvas normales de *Bufo arenarum*.

Las gónadas, macroscópicamente, en los ejemplares híbridos de un mismo estadio aparecen de aspecto muy similar entre sí. Comparándolas con las gónadas de larvas de *Bufo paracnemis* y respectivamente de *Bufo arenarum* se destaca en los híbridos un volumen intermedio entre el que presenta la gónada larval de *Bufo arenarum* y la de *Bufo paracnemis*. Se constituyen las tres partes típicas de la gónada de los Bufónidos es decir, pro, meso y metagónada. Al análisis microscópico se aprecia que el volumen de los ovocitos del híbrido es análogo al presentado por los ovocitos de *Bufo paracnemis* del mismo estadio larval.

**Serie D:** Los híbridos de *Bufo arenarum* ♂ x *Bufo paracnemis* ♀ presentaron ojos normales, sin embargo muestran otras series de anomalías que a partir de los estadios de gastrulación se reflejan especialmente en los miembros; por su interés intrínseco se considera oportuno exponer estas anomalías por separado dado que no mantienen relación con los resultados obtenidos en la Serie C.

### Discusión

Los datos reunidos demuestran que el resultado más saliente de la Serie C lo proporcionan defectos más o menos graves en la estructura del ojo, que se manifiestan en un 90% de los casos independientemente del macho de *Bufo paracnemis* y de la ovulación de *Bufo arenarum*

utilizados. Es interesante señalar que el tipo de malformación del órgano visual no es único, por el contrario se presentan múltiples condiciones de anomalías que interesan tanto al cristalino, como así también otras estructuras oculares.

En efecto, si bien en la mayoría de los casos la anomalía reside en una inversión total del ojo, replegamientos o sobreposición de los estratos de la retina y del estrato pigmentario, se dan las pautas de severas alteraciones que pueden llegar hasta la anoftalmia del ejemplar que logra superar el estadio metamórfico. Es interesante notar que Hauptman et al., (1993) manteniendo en desarrollo larvas de *Xenopus laevis* en presencia de níquel ( $Ni^{2+}$ ) nota que se determinan anomalías oculares como microftalmia, hipopigmentación, quistes de la coroides y de la retina.

Es de suponer que en nuestro caso la información genética inherente a un desarrollo normal del ojo ha sido alterada a causa del complejo proceso de hibridación. Es de destacar también la mayor frecuencia del cuadro proporcionado por ojos que se han formado en posición inversa, es decir con el cristalino ubicado en regiones opuestas a las que se evidencian en un ojo normal.

En el conjunto las otras estructuras aparentan similitud con las larvas o recién metamorfoseados de *Bufo paracnemis*, es decir se verificó una herencia paterna. En modo particular se destaca el dibujo y la coloración dorsal que los híbridos metamorfoseados presentan con mucha analogía a la que se observa en la librea de adultos de *Bufo paracnemis* y disímil del cuadro respectivo que se observa en *Bufo arenarum*. No hubo alteraciones de interés en otros órganos. En efecto tanto el digestivo como el branquial y la gónada, realizan su desarrollo normalmente salvo pequeñas diferencias volumétricas encontradas tanto en los arcos branquiales como en la gónada en la que los ovocitos ofrecen, en un análogo estadio de los controles de ambas especies, un volumen intermedio entre *Bufo arenarum* y *Bufo paracnemis* aproximándose sin embargo a la fisonomía de la gónada de esta última especie.

Puede agregarse que la hibridación interespecífica entre *Bufo paracnemis* ♂ y *Bufo arenarum* ♀ se encuadra en los así llamados "híbridos vitales" según la terminología pro-

puesta por Born (1883,1886), Hertwig (1918, 1930), Montalenti (1933, 1938). Análogo resultado de hibridación vital obtuvo Blair (1972) en algunas cruas de numerosas especies anfibias anuras, inclusive entre *Bufo paracnemis* y *Bufo arenarum*.

### Agradecimientos

A P. Roig y H. Dinapoli por su aporte técnico. Al Dr. A. Yanoski por proveer los especímenes de *Bufo paracnemis*. Este trabajo ha sido realizado utilizando aportes financieros del CONICET (PID 3378900/92).

### Literatura citada

- ANCEL, P. & P. VINTEMBERGER. 1948. Recherches sur le déterminisme de la symétrie bilaterale dans l'oeuf des Amphibiens. *Bull. Biol. Fr. Belg. Suppl.*, 31:1-182.
- BALTZER, F. 1934. Ueber die Entwicklung der Bastardkombination *Triton palmatus* x *Salamandra maculosa*. *Rev. Suisse., Zool.* 41:405-411.
- BARBIERI, F. & E. BRAUCKMANN. 1966. Hybridization between *Bufo arenarum* and *Leptodactylus chaquensis*. *Acta Embr. et Morph. Experim.*, 9:31-36.
- BATTAILLON, E. & TCHOU-SU. 1929. Analyse de la fécondation chez les batraciens par l'hybridation et la polyspermie physiologique. *Arch. Entw. Mech Org.*, 115:779-783.
- BATTAILLON, E. & P. TSCHERNIAKOVSKI. 1932. Sterilité des hybrides mâles issus du croisement entre *Molge marmorata* et *M. cristata*. *C. R. Acad. Sci. Paris.*, 195:97-99.
- BENAZZI, M. 1956. Nuove osservazioni sulla sessualità in ibridi di Tritoni. *Boll. Zool.*, 23:383-387.
- BLAIR, W. 1972. Evolution in the Genus *Bufo*. University of Texas Press. Austin and London. 196-232.
- BORN, G. 1883. Beiträge zur Bastardierung zwischen den einheimischen Anurenarten. *Pflüger's Arch.*, 32:453-458.
- BORN, G. 1886. Weitere Beiträge zur Bastardierung zwischen den einheimischen Anurenarten. *Arch. mikr. Anat.*, 27:192-197.
- COSTELLO, D. P. 1942. Induced haploidy and triploidy in california *Triturus*. *Anat. Rec.*, 84:50-65.
- DEL CONTE, E. & J. SIRLIN. 1952. Pattern series of the first embryonary stages in *Bufo arenarum*. *Anat. Rec.* 112(1):125-136.
- FLINDT, R. & H. HEMMER. 1967. Nachweis natürlicher Bastardierung von *Bufo calamita* und *Bufo viridis*. *Zool. Anz.*, 178:419-429.
- GOSNER, K. 1960. A simplified table for staging Anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetológica*, 16:183-190.
- HAMBURGER, V. 1935. Malformations of hind limbs in species hybrids of *Triton taeniatus* (and *palmatus*) ♀ x *Triton cristatus* ♂. *J Exp Zool.*, 70:43-49.
- HAMBURGER, V. 1936. The larval development of reciprocal species hybrids of *Triton taeniatus* Leyd (and *Triton palmatus*, Duges) x *Triton cristatus* Laur. *J. Exp. Zool.*, 73:319-322.
- HAUPTMAN, O.; D. ALBERT; M. PLOWMAN; S. HOPFER & W. SUNDERMAN. 1993. Ocular malformations of *Xenopus laevis* exposed to Nickel during embryogenesis. *Annuals of clinical and laboratory Science*. 23(6):397-406.
- HERTWIG, G. 1918. Kreuzungsversuche an Amphibien. Wahre und falsche Bastarde. *Arch. Mikr. Anat.*, 91:203-207.
- HERTWIG, G. 1930. Kern- und Zellgrößenunterschiede der Eltern als Ursache des verschiedenen Ausfalles reziproker Krötenkreuzungen. *Z. Anat. Entw. Gersch.*, 92:718-721.
- LEGNAMÉ, A. 1964. Método de fijación para huevos de Anfibios. *Arch. Bioq. Quim. Tuc.*, 141-143.
- MARTIN, M. C. DE; A. NUÑEZ & N. TOMATIS. 1985. Metamorfosis en Anfibios. I. Desarrollo metamórfico en larvas de *Bufo arenarum* Hensel. *Historia Natural*, 5(32)289-302.
- MONTALENTI, G. 1933. L'ontogenesi degli ibridi fra *Bufo vulgaris* e *Bufo viridis*.



*Physiol. Zool.*, 6:994-998.

MONTALENTI, G. 1938. L'ibridazione interspecifica degli Anfibi anuri. *Attualità Zool.* 4:157-159.

MOORE, J. 1947. Hybridization between *Rana pipiens* from Vermont and Eastern Mexico. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 33:72-79.

MOORE, J. 1948. Studies in the development of frog hybrids. Introductory ability of the dorsal lip region of *Rana pipiens* ♀ x *Rana sylvatica* ♂ hybrids. *J. Exp. Zool.*, 108:127-132.

PISANO, A. 1957. Efficienza funzionale e struttura della ipofisi di Anfibi mantenuta in medio oleoso. *Arch. Zool. Ital.*, 42:221-227.

QUATTROCCHI, F. 1964. Gli allotriploidi dell'incrocio: *Bufo vulgaris* ♀ x *Bufo viridis* ♂. *Ricerca Sci.*, 34:495-500.

RENGEL, D.; D. PAZ; A. PISANO & L. PASINA. 1986. Developmental capacity of aged *Bufo arenarum* oocytes. *Micr. Electr. y Biol. Cell.*, 10(2):101-108.

SCHÖNMANN, W. 1938. Die diploide *Triton palmatus* ♀ x *Salamandra* ♂. *Arch. Entw. Mech. Org.*, 138:343-349.

TCHOU-SU. 1931. Etude cytologique sur l'hybridation chez les Anoures. *Arch. Anat. Micr.*, 27:1-8.

THORNTON, W. 1955. Interspecific hybridization in *Bufo woodhousei* and *Bufo valliceps*. *Evolution.*, 9:455-468.

TWITTY, V. 1936. Correlated genetic and embryological experiments on *Triturus* I and II. *J. Exp. Zool.*, 74:239-243.

TWITTY, V. 1945. The Developmental analysis of specific pigment patterns. *J. Exp. Zool.*, 100:141-147.

VOLPE, E. 1956. Experimental F<sub>1</sub> hybrids between *Bufo valliceps* and *Bufo fowleri*. *Tulane Studies Zool.*, 4(2):61-75.

VOLPE, E. & M. HARVEY. 1958. Hybridization and larval development in *Rana palmitis*. *Copeia.*, 3:197-207.

VOLPE, E. 1959. Hybridization of *Bufo valliceps* with *Bufo americanus* and *Bufo terrestris*. *Texas J. Sci.*, 11:335-342.