

## DIFERENCIACION SEXUAL DE *PHYLLOMEDUSA BOLIVIANA* (ANURA. HYLIDAE).

DORA RENGEL \*<sup>1</sup>, ARMANDO PISANÓ \*<sup>1</sup> Y ESTEBAN LAVILLA \*\*<sup>1</sup>

\*Laboratorio Investigaciones Embriológicas (CONICET). Montevideo 126, 4° piso (1019) Buenos Aires, Argentina. \*\*Instituto de Herpetología (CONICET). Fundación Miguel Lillo, (4000) San Miguel de Tucumán, Argentina. <sup>1</sup> Carrera del investigador (CONICET)

**SUMMARY :** *Phyllomedusa boliviana* (Hylidae) is a species that distributes from mid Bolivia and west of Brazil to the north of Argentine, occupying different habitats in a wide altitudinous range (350-2000 m). *P. boliviana*'s gonad is differentiated before metamorphosis in a structure orientated at the formation of the testicle or ovary. For this reason, this species is framed in the concept of "differentiated sexual race" (Wistchi 1924). This observation is different that reported in *Phyllomedusa sauvagii*, which has been considered an "indifferentiated race of masculine type". This matter is unique in anurans (Rengel y Pisanó, 1981).

**Key words:** *Phyllomedusa boliviana*, gonad, sex differentiation.

**RESUMEN :** *Phyllomedusa boliviana* (Hylidae) es una especie que se distribuye desde el centro de Bolivia y oeste de Brasil hasta el Norte de Argentina, ocupando diversos ambientes en un amplio rango altitudinal (350-2000 m.s.n.m.). La gónada de *Phyllomedusa boliviana* se diferencia antes de llegar a los procesos de metamorfosis en una estructura orientada a la formación de un testículo o hacia la constitución de un ovario; lo que encuadra a esta especie en el concepto de "raza diferenciada" en el sentido de Witschi (1924) a diferencia de lo reportado en *Phyllomedusa sauvagii*, que ha sido considerada una "raza indiferenciada de tipo masculino", hecho único entre los anuros conocidos (Rengel y Pisanó, 1981).

**Palabras clave:** *Phyllomedusa boliviana*, gónada larval, diferenciación sexual.

### Introducción

Las especies Anfibias argentinas, numerosas y variadas por sus modalidades de vida, se distribuyen en un área muy vasta de climas distintos y por lo tanto ofrecen amplia posibilidad de estudiar en forma comparada las modalidades morfo-fisiológicas de sus gónadas, en modo particular, las inherentes a los procesos de diferenciación sexual.

Este último problema enfrentado por primera vez por Pflüger (1882), sucesivamente por Witschi (1924, 1927, 1930, 1956) quien amplió esta temática y luego por otros autores (Cheng, 1932; Pisanó y Pizarro, 1962; Rengel, 1962; Morescalchi y Marinucci, 1966; Rengel y Pisanó 1980, 1981; Das y Mochanty-Heimadi, 1982; Shirane, 1982, 1986; Rengel et al., 1991) representa un argumento poco tratado en Argentina. De las especies que se encuentran distribuidas en

ese amplio territorio geográfico sólo se sabe que según el concepto de Witschi (1924) *Bufo arenarum* es una "raza indiferenciada" (Pisanó y Pizarro, 1962), que *Telmatobius hauthali* (Rengel, 1962) representa una especie de "raza diferenciada" como así también *Pleurodema borellii* (Rengel et al., 1991) y que *Phyllomedusa sauvagii* se encuadra en una raza indiferenciada de carácter "masculino" tipo no antes señalado (Rengel y Pisanó, 1981). En función de este último resultado hemos considerado oportuno analizar la diferenciación de la gónada de *Phyllomedusa boliviana* y comparar los resultados con lo conocido para la especie chaqueña *Phyllomedusa sauvagii*. Cabe recordar que *Phyllomedusa boliviana* se distribuye desde el centro de Bolivia y oeste de Brasil hasta el norte de Argentina, ocupando diversos ambientes en un amplio rango altitudinal (350-2000 m s.n.m.) (Cannatella, 1983) y en Argentina ha sido regis-



Figura 1. Gónada masculina de larvas de estadio 31-33. Nótase el aspecto filiforme (x 11,25).



Figura 2. Gónada femenina de larvas de estadio 31-33. Nótase el mayor volumen de la gónada en comparación con la fig. 1. (x 11,25).

trada en ambientes de selva de las Provincias de Salta y Jujuy entre 450 y 600 m s.n.m.

#### Material y método

Las larvas de *Phyllomedusa boliviana* analizadas han sido recolectadas en áreas de yungas próximas a Libertador General San Martín, Dpto. Ledesma, provincia de Jujuy (alrededor de 600 m s.n.m.) en la región que constituye el límite austral de distribución de la especie.

Ejemplares intactos de referencia se conservan en la Colección del Instituto de Herpetología de la Fundación Miguel Lillo, bajo el n° FML 04949. Los distintos estadios larvales fueron fijados en formol al 8% luego de haber practicado una incisión en la pared ventral de la larva; en el laboratorio las gónadas con los respectivos riñones se refijaron en el líquido de Bouin por 3 h. Esta técnica impuesta por las condiciones de la campaña científica, resultó suficientemente adecuada como para obtener cortes histológicos cuyas imágenes se presentaron bastante claras como para ser estudiadas e interpretadas.

El complejo gónada-riñón luego de haber sido procesado para la deshidratación con la meto-

dología más usada, se incluyó en parafina-cera; los cortes histológicos de 5-6  $\mu$  de espesor fueron teñidos con hematoxilina-eosina o bien, en algunos casos, con la mezcla tricrómica de Mallory.

Considerando que no existe una tabla específica del desarrollo de *Phyllomedusa boliviana* y que la de *Phyllomedusa hypochondrialis* descrita por Budgett (1907) es un tanto inadecuada, se clasificaron los distintos estadios larvales de *P. boliviana* según la Tabla propuesta por Gosner (1960).

Las gónadas han sido analizadas tanto macro como microscópicamente desde los estadios larvales más juveniles hasta los correspondientes a los estadios metamórficos.

Cabe señalar que desde la ovoposición hasta los estadios larvales, existen fehacientes datos como para diferenciar *Phyllomedusa boliviana* de otras especies de *Phyllomedusa*.

#### Resultados

La gónada de estadios larvales juveniles que presentaban brotes de patas posteriores más o menos evidentes (est. 26-27) macroscópicamente no acusan todavía signos de diferenciación.

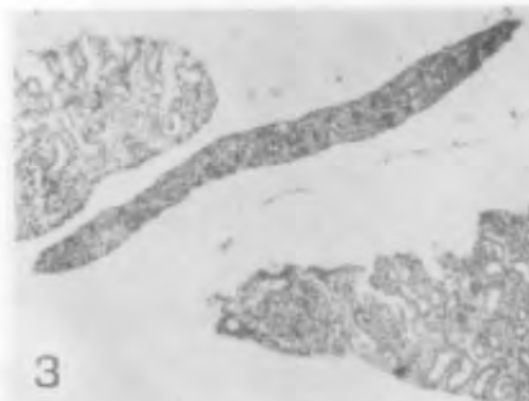


Figura 3. Aspecto histológico de la gónada masculina correspondiente a la Fig. 1 (x 22,5).

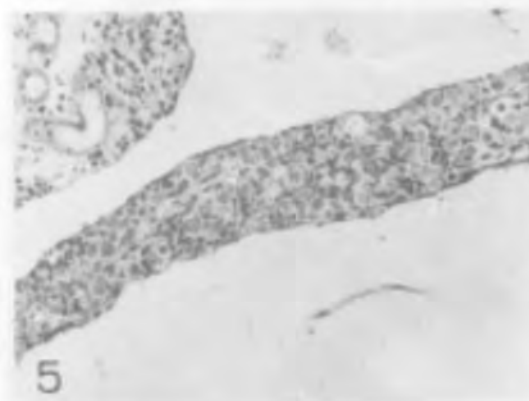


Figura 5. Aumento de la Fig. 3. Nótese los espermatogonios (x 56,25)

En efecto, realizando un análisis comparativo entre las varias larvas de un mismo estadio aparecen filiformes, delgadas y se proyectan sobre la cara interna del riñón extendiéndose desde la parte proximal hasta aproximadamente su mitad o poco más. Por lo general la gónada izquierda es de menor volumen que la derecha, cuando la observación se realiza en ejemplares fijados se destaca claramente del riñón por poseer una coloración marfilada.

El estudio histológico confirma que las gónadas de los estadios larvales mencionados, son todavía primitivas, en efecto se encuentran constituidas por una gran cantidad de células estromales y gonios, algunos en división.

En los estadios sucesivos (est. 31-33) en los que en las patas posteriores se presenta el inicio de la formación del pie y por lo tanto están más

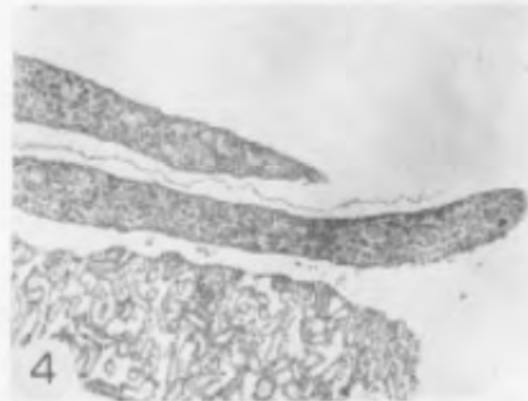


Figura 4. Aspecto histológico de la gónada femenina de la Fig. 2 (x 22,5).



Figura 6. Aumento de la Fig. 4. Nótese los ovogonios y ovocitos (x 56,25)

desarrolladas, macroscópicamente es posible observar que las gónadas han sufrido un alargamiento y un engrosamiento, prolongándose todavía más sobre la superficie interna del riñón. Entre un ejemplar y otro se manifiestan a partir de estos estadios diferencias notables: en algunos casos la gónada continúa manteniendo su aspecto filiforme, mientras que otras se presentan caracterizadas por un aumento de volumen y a veces por una serie de leves estrangulaciones (figs 1-2).

El análisis microscópico revela la causa de esta evidente diferencia, en el caso del aspecto filiforme y liso, el corte seriado histológico demuestra la formación de gonios y espermatogonios que ocupan en su mayor parte las áreas más centrales de la gónada (figs 3 - 5). Muchos gonios en división tapizan las paredes mezclándose



Figura 7. Gónada masculina de estadio larval 42 (x 22,5).



Figura 8. Aumento de la fig. 7. Nótese la estructura histológica (x 56,25).

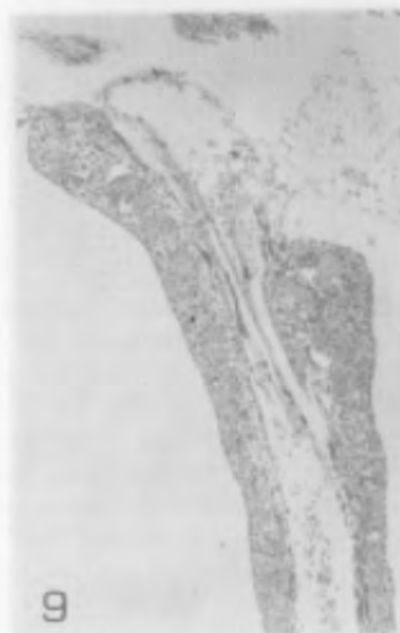


Figura 9. Gónada femenina de estadio 42 (x 22,5).

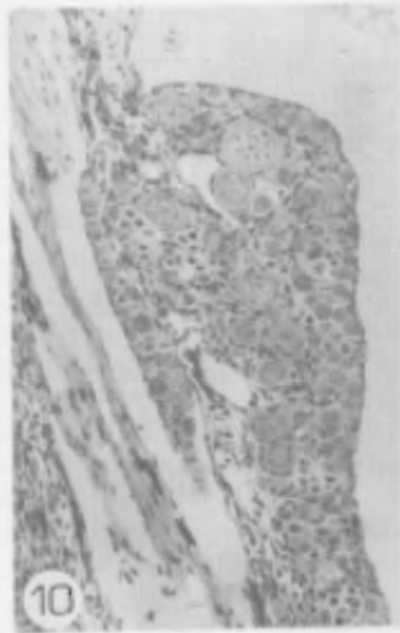


Figura 10. Aumento de la fig. 9. Nótese los ovocitos y los ovogonios (x 56,25).

con abundantes células estromales. La observación histológica de la gónada que se presenta más voluminosa o con estrangulaciones destaca, en cambio, un cúmulo de gonios dispuestos de

manera periférica y un conjunto de ovogonios que se proyectan hacia la cavidad ovárica con la peculiaridad de que en el área más proximal de la gónada se acumulan masivamente (figs. 4-6).

Cabe señalar que en los estadios larvales sucesivos (est. 36-41) hasta la metamorfosis se mantienen los patrones de diferenciación testicular y ovárica respectivamente, comunes a toda especie anfibia. Naturalmente con el avanzar del estadio larval y aproximándose la metamorfosis los cuadros tanto macro como microscópicos adquieren una típica fisonomía característica del sexo genético del ejemplar (figs. 7,8,9 y 10).

Estos cuadros son demasiados conocidos como para describirlos con detalles. Lo que se puede señalar es que el recién metamorfoseado de sexo femenino de *P. boliviana* posee un ovario típico de las especies de *Phyllomedusa* conocidas (*Phyllomedusa hypochondrialis*, Budgett, 1907; *Phyllomedusa sauvagii*, Rengel y Pisanó, 1981), es decir presenta una cantidad relativamente abundante de ovocitos. Por otra parte el metamorfoseado de sexo genético masculino evidencia gónada de típico aspecto testicular con la estructura en ampollas que poseen espermatogonios.

### Discusión

El análisis de los datos obtenidos permite afirmar que la diferenciación del sexo de *P. boliviana* se manifiesta con modalidades distintas de las que presenta *P. sauvagii* caracterizada por representar una "raza indiferenciada masculina" (Rengel y Pisanó, 1981). El cuadro gonadal de las larvas de *P. boliviana* resume las características demostradas por una "raza sexual diferenciada". En estadios larvales primitivos manifiesta una abierta tendencia para que la gónada se presente con un aspecto típicamente masculino o femenino por sus características macro y microscópicas.

En la batracología argentina representa junto con *Telmatobius hauthali* (Rengel 1962) y con *Pleurodema borellii* (Rengel et al., 1991) una raza sexual diferenciada en la que la gónada manifiesta signos de cuadros masculinos o femeninos en estadios larvales relativamente primitivos.

Es característica de *P. boliviana* la intensa proliferación de los gonios en época temprana del desarrollo larval. En efecto cuando se evidencia con claridad el esbozo del pie, la gónada se presenta ya diferenciada en un futuro testículo o en un futuro ovario: en el primer caso gonios y espermatogonios ocupan la mayor parte del área

central de la gónada, mientras que en el caso de la gónada femenina, junto con las células estromales se evidencian ovocitos primitivos que se proyectan hacia la cavidad ovárica incipiente.

No sabemos a ciencia cierta los motivos de esta diversidad de la diferenciación del sexo entre *P. boliviana* y *P. sauvagii*; probablemente las condiciones ecológicas distintas gravitarían vía hormonal sobre la diferenciación del sexo entre las dos especies.

Según Wistchi (1930) los Anfibios que, por lo menos en Europa, se distribuyen en llanura demostrarían ejemplos de "razas indiferenciadas"; en Argentina este presupuesto se cumple muy parcialmente por lo menos en función de las especies estudiadas.

La población analizada de *Phyllomedusa boliviana* localizada en cotas algo más elevadas que las de su co-genérica *P. sauvagii* y en un ambiente completamente diferente al de esta última, representa una "raza diferenciada" y por lo tanto no escaparía del esquema clásico propuesto.

### Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado utilizando aportes financieros parciales del CONICET (PID 3378900/92).

Agradecemos la asistencia técnica de la Lic. Diana Alonso, del Sr. H. Dinapoli y de la Srta. P. Roig.

### Literatura citada

- BUDGETT, E. J. 1907. Notes on the Batrachians of Paraguayan Chaco. *The Budgett Memorial Volume, Cambridge Un. Press.*, 59-77.
- CANNATELLA, D. C. 1983. Synonymy and distribution of *Phyllomedusa boliviana* Boulenger (Anura, Hylidae). *Proc. Biol. Soc. Wash.* 96 (1): 59-66.
- CHENG, T. H. 1932. The germ cell history of *Rana cantabrigensis* I. Germ cell origin and gonad formation. II. Sex differentiation and development. *Z. Zellforsch.* 16: 407-428.
- DAS, R. & P. MOHANTY-HEJMADI. 1982. Preliminary observations on differentiation of gonad in *Rana tigrina* (Daud). *Praniker.* 3:78-82.

- GOSNER, K. L. 1960. A simplified table for staging Anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetológica*, 16: 183-190.
- MORESCALCHI, A. & A. MARINUCCI. 1966. Il differenziamento del sesso nella *Hyla arborea arborea* (L) dei dintorni di Napoli. *Rend. Accad. Sc. Fis. e Mat., Serie 4* (33): 3-10.
- PFLÜGER, E. 1882. Versuche der Befruchtung überreifer Eier. *Arch. ges Phys.*, 29: 76-81.
- PISANO A. & N. PIZARRO. 1962. Caratteristiche morfologiche della gonade di *Bufo arenarum* durante lo sviluppo. *Arch. Zool. italiano*, 47: 167-176.
- RENGEL, D. 1962. Características de las gónadas larvales en las formas normal y enana de *Telmatobius hauthali schreiteri*. *Arch. Bioq. Quim. y Farm. Tucumán*, 10: 49-60.
- RENGEL, D. & A. PISANO. 1980. Modalidades desconocidas en la diferenciación de la gonada de un Anfibio. *Rev. Museo de Hist. Nat. de San Rafael*, Mendoza, 8 (1): 15-19.
- RENGEL, D. & A. PISANO. 1981. Il differenziamento sessuale della gonade di *Phyllomedusa sauvagii*. Rendiconto dell'Accademia delle Scienze fisiche e matematiche. *Soc. Naz. Scienze Napoli.*, 48: 329-335.
- RENGEL, D., A. PISANO & R. MONTERO. 1991. La posición de *Pleurodema borellii* en las razas sexuales (Anura: Leptodactylidae). *Cuad. Herp.*, 6(1): 1-6.
- SHIRANE, T. 1982. Gonadal differentiation in frogs *Rana japonica* y *R. brevipoda* raised from U.V. irradiated eggs. *J. Exp. Zool.*, 223: 165-175.
- SHIRANE, T. 1986. A new early morphological indication of sex differentiation in Anura, *Rana japonica* and *R. nigromaculata*. *J. Exper. Zool.*, 240: 113-118.
- WITSCHI, E. 1924. Die Beweise für die Umwandlung weiblicher Jungfroesche in männliche nach uteriner Ueberreife der Eier. *Arch. Entw. Mech. Org.*, 102: 168-174.
- WITSCHI, E. 1927. Sex reversal in parabiotic twins of the American Woodfrog, *Rana sylvatica*. *Biol. Bull.*, 52: 137-141.
- WITSCHI, E. 1930. The geographical distribution of the sex races of the European grass frog (*Rana temporaria*). A contribution to the problem of the evolution of sex. *J. Exp. Zool.*, 56: 149-153.
- WITSCHI, E. 1956. Development of Vertebrates. *Phil y Lonches Saunders Co.*