

# CUADERNOS DE HERPETOLOGIA

VOLUMEN 6 - NUMERO 1 - 1991

La posición de *Pleurodema borellii* en las razas sexuales (Anura: Leptodactylidae)

Dora RENGEL, Armando PISANO y Ricardo MONTERO

ASOCIACION HERPETOLOGICA ARGENTINA

EDITORES: DINORAH D. ECHEVERRIA y JORGE D. WILLIAMS

Mayo 1991

## La posición de *Pleurodema borellii* en las razas sexuales (Anura: Leptodactylidae).

Dora RENGEL,\* Armando PISANO,\* y Ricardo MONTERO

Trabajo realizado utilizando el subsidio Pi/D 3129600/88 otorgado por el CONICET, Argentina.

\* Miembro de la Carrera del Investigador Científico del CONICET, Argentina  
Laboratorio de Investigaciones Embriológicas (CONICET) Montevideo 126  
4º piso, (1019) Buenos Aires, Argentina.

Becario del CONICET, Instituto de Herpetología, Fundación Miguel Lillo,  
Miguel Lillo 251, (4000) Tucumán, Argentina.

### ABSTRACT:

#### The place of *Pleurodema borellii* in the sexual races (Anura : Leptodactylidae)

Sex differentiation was studied in tadpoles of *Pleurodema borellii* which lives in different geographic area of Argentina, fixed at various stages of metamorphosis. Gonads are sexually undifferentiated till the larva reach at about 20 mm. body length stage. Nevertheless sex differentiations occurs before metamorphosis take place, at about 30 mm. body length stage; gonads show macroscopic and microscopic difference at this time. therefore *P. borellii* seems to belong to a "differentiated race".

*Palabras Claves:* *Pleurodema borellii*. Razas sexuales. Diferenciación sexual.

### INTRODUCCION:

Los mecanismos fenogénéticos de la diferenciación sexual en anfibios, representan un capítulo relativamente autónomo de la problemática inherente a los procesos de desarrollo embrionario y larval. Este complicado problema tuvo inicio con los estudios de Pfüger (1882) quien examinando numerosos ejemplares de *Rana esculenta* recién metamorfoseados, señaló que en los machos genéticos de esta especie la gónada se diferencia inicialmente en ovario y pierde esta característica fenotípica al transformarse en testículo, aproximadamente en la segunda mitad del primer año. No obstante, según pudo constatarse (Reverberi, 1967) larvas de una misma especie, ubicadas en distintas localidades geográficas pueden presentar notables diferencias en los porcentajes de la *sex ratio* la que, en cambio, en los adultos ubicados en esas mismas localidades resulta constituida siempre por un 50% de hembras y un 50% de machos.

En base al análisis genético de los ejemplares y por las diferentes características que manifiestan las gónadas de las larvas de los anfibios anuros, Witschi (1924, 1927, 1930) propuso clasificarlos en tres "razas sexuales".

Tomando como parámetro los procesos de metamorfosis, en todas las larvas de la "raza indiferenciada" se encuentran ovarios hasta sobrepasar el clímax metamórfico: el valor genotípico del ejemplar aparecerá en lo sucesivo, al transformarse la gónada en el 50% de los casos en testículo y quedando en el otro 50% de los casos como ovario. Si es que a lo largo de los estadios larvales se presentará un 50% de machos y un 50% de hembras, la raza se denominará "diferenciada". En la tercera, la "semidiferenciada", todas las

larvas presentan gónada femenina y recién durante la metamorfosis se realizará la diferenciación en machos y hembras. Según Witschi (1930) las razas indiferenciadas se distribuirían en llanura, mientras que las diferenciadas se ubicarían en cotas elevadas.

En lo que respecta a los Anfibios anuros, en algunas especies, la diferenciación del sexo ha sido objeto de observaciones que han proporcionado resultados fehacientes (Ponze, 1949; Beatty, 1964; Foote, 1964) como en *Bombina* (Vannini, 1946), en *Xenopus* (Chang y Witschi, 1956; Gallien, 1956), en *Hyla arborea* (Morescalchi y Marinucci, 1966), en *Rana tigrina* (Das y Mojanty-Hejmadi, 1982), en *Rana japonica* y en *R. brevipoda* (Shirane, 1982, 1986), etc.

Estos tipos de observaciones en Argentina han sido limitadas a *Bufo arenarum*, que es una raza indiferenciada (Pisanó y Pizarro, 1958, 1962), a *Telmatobius*, que resultó ser una raza diferenciada (Rengel, 1962), y a *Phyllomedusa sauvagii*, que si bien es una raza indiferenciada se destaca de lo conocido en cuanto presenta en los estadios larvales como característica, por primera vez señalada, gónada masculina en el 100% de los casos; es luego de la metamorfosis que la gónada sufrirá en el 50% de los ejemplares, una serie de procesos que la diferenciarán en ovario (Rengel y Pisanó, 1980, 1981 a, b).

En función de lo expuesto hemos considerado oportuno realizar una serie de observaciones usando *Pleurodema borellii* (Peracca, 1895) de distintas localidades geográficas de Argentina, con el objeto de analizar no sólo la diferenciación de la gónada, sino también reconocer eventuales diferencias gonadales entre grupos de

larvas recolectadas respectivamente en cada una de las tres áreas geográficas indicadas.

Cabe señalar que esta especie se adapta a los lugares no sólo de llanura que se caracterizan por las elevadas temperaturas de verano, precipitaciones atmosféricas considerables a lo largo del año y períodos invernales de temperaturas relativamente bajas, sino también se ubica en regiones montañosas con condiciones climáticas completamente diferentes de las descriptas.

#### MATERIALES Y METODOS:

Los ejemplares adultos y las larvas de *Pleurodema borellii* (Peracca, 1895) se recolectaron en los alrededores de la Ciudad de San Miguel de Tucumán (400 m.), de Taff del Valle (Tucumán, 2.300 m.) y Arroyo de los Negros (Salta, 600 m.).

Han sido utilizadas larvas que se han desarrollado de oviposiciones obtenidas en laboratorio, luego de haber inducido las hembras con hipófisis suspendida en solución fisiológica, y larvas recolectadas en su respectivo habitat.

Los embriones y las larvas se mantuvieron en solución de Holtfreter standard, en condiciones adecuadas para un normal desarrollo; estas últimas fueron alimentadas, día por medio, con lechuga hervida.

La solución de Holtfreter, y en lo sucesivo el agua, se cambia en las peceras tres veces por semana respetando un ciclo circadiano de 10 horas de luz y 14 de oscuridad, con temperatura de cerca 20° C. (+ 2° C.).

Se fijaron a intervalos regulares tanto embriones, como así también estadios larvales desde la formación de botón caudal hasta el climax de la metamorfosis, comparándose los cuadros histológicos de las larvas obtenidas en el laboratorio, con los de las larvas, de igual estadio, recolectadas en la naturaleza. Se usaron 30 larvas de estadios distintos de cada desove recolectado en la naturaleza o bien obtenido en el laboratorio.

Como fijador se usó para los embriones todavía con vitelo, el líquido de Ansel y Vintemberger (1948) y para las larvas, Bouin o Stieve. Los cortes seriados de 5 µm. fueron coloreados con hematoxilina-eosina y en algunos casos con la mezcla tricrómica de Mallory.

#### RESULTADOS:

Considerando que los cuadros gonadales de las larvas juveniles no aportan datos significativos, serán relatadas las imágenes macro y microscópicas a partir de las larvas que median aproximadamente 20 mm. de largo, hasta ejemplares próximos al climax de la metamorfosis.

Además dado que no existe una tabla de desarrollo para *P. borellii*, antes de describir algunas de las características gonadales, se describirá el aspecto externo de la larva.

El análisis histológico puso en evidencia que no existen diferencias entre el cuadro presentado por la gónada de las larvas de un determinado estadio recolectadas en la naturaleza y el que muestran las larvas de ese mismo estadio obtenidas en el laboratorio. No han sido relevadas diferencias, además, en las gónadas de larvas ubicadas en las distintas áreas geográficas; por lo tanto en la descripción no se

discriminarán las larvas por su procedencia, sino más bien las imágenes histológicas serán descriptas en función de las etapas de mayor significado que se verifican durante la diferenciación de la gónada.

#### GRUPO A:

Las larvas miden desde el hocico hasta la punta extrema de la cola, 20 mm. El intestino funciona; sin embargo no han aparecido todavía los brotes de las patas posteriores.

a) Las dos gónadas se presentan macroscópicamente como dos delgados cordoncitos de color marfil, que corren a lo largo de la cara interna del mesonefros, sin alcanzar su punta distal. Aún con aumento adecuado no se destacan diferencias significativas entre las gónadas de ejemplares distintos; tanto de una misma como de diferentes áreas geográficas; no obstante entre las dos gónadas de un mismo ejemplar, la ubicada sobre el mesonefros izquierdo en la mayoría de los casos resulta más corta y menos voluminosa. El cuerpo graso se evidencia en la zona proximal de la gónada izquierda y apenas se esboza o falta en el otro lado; de todos modos es muy reducido y constituido por cortas y delgadas digitaciones.

b) El análisis histológico pone en evidencia que la gónada está poco desarrollada, formada esencialmente por gonios que se distribuyen a lo largo de una masa estromal. (Fig.1).

#### GRUPO B:

Reúne larvas de 30 mm. de largo, muy activas, con intestino que funciona y con esbozos de patas posteriores de aproximadamente 2 mm.

a) Macroscópicamente, la morfología de la gónada permite identificar el sexo de la larva: en efecto, la que puede interpretarse como masculina, es de forma casi cilíndrica y presenta a lo largo de su recorrido de 5 a 7 leves estrangulaciones que le hacen adquirir una fisonomía del todo particular. En cambio, la que hemos considerado como femenina, es festoneada y más voluminosa que la anterior.

El cuerpo graso, con respecto al de la larva del grupo precedente, ha aumentado de volumen, presenta digitaciones y se ubica en el área proximal de cada una de las gónadas.

b) La gónada femenina histológicamente se presenta enriquecida de oocitos en estadios distintos que en ocasiones se proyectan hacia la cavidad ovárica. En el área cortical se ubican, mezcladas con oogonias, células en picnosis (Fig.2).

Histológicamente, en la gónada masculina se visualizan gonios, algunos de ellos en mitosis, espermatogonios y cistos espermatogoniales, el todo dispuesto sin una ubicación específica. En algunas larvas el área medular de la gónada, si bien está colonizada por células germinales, muestra una relevante acumulación de células estromales (Fig.3).

## GRUPO C:

La larva ha alcanzado un promedio de 35 mm. de largo; los miembros posteriores están bien formados y los anteriores todavía son internos.

a) La gónada es más voluminosa que en el grupo anterior y su aspecto peculiar evidencia el dimorfismo sexual. En efecto, la gónada masculina conserva la forma cilíndrica, pero ha perdido las estrangulaciones: el volumen difiere entre una y otra gónada de un mismo ejemplar. Observada a poco de haber disecado la larva, aparece, en fresco, transparente y por lo tanto permite visualizar en su interior pequeñas granulaciones amarillentas que se destacan con mayor claridad sometidas a la acción del fijador Stieve. (Fig. 6).

La gónada femenina ha acentuado más su aspecto festoneado, que en determinadas áreas forma lobulaciones más o menos amplias y voluminosas, proporcionando al conjunto la fisonomía de un ovario joven.

Relativamente transparente muestra en su interior granulaciones, que el corte histológico señala como oocitos, y que en presencia del fijador Stieve se vuelven opacas y sobresalen levemente, lo que hace perder a la gónada el aspecto liso que presenta cuando está fresca. (Fig. 7).

b) Microscópicamente en el testículo se destaca una considerable cantidad de cistos espermatogoniales, espermatocitos en división o en distintos estadios de maduración. Una adecuada comparación ha permitido establecer que el conjunto de los cistos espermatogoniales corresponden a las granulaciones observadas en la gónada en fresco. (Fig. 4).

En el incipiente ovario predominan los oocitos de tamaño mediano de aproximadamente 65  $\mu$ m. y se ha formado la cavidad ovárica que se insinúa en los lóbulos. (Fig. 5).

## GRUPO D:

En las larvas próximas al climax de la metamorfosis, es decir que todavía no han reducido la cola, la gónada aún macroscópicamente muestra el típico aspecto de testículo u ovario. (Fig. 6,7).

En el primero, el análisis histológico destaca gonios, muchos espermatogonios en división y espermatocitos.

En el ovario la mayoría de los oocitos alcanzan un diámetro de alrededor de 100  $\mu$ m y muchos se proyectan hacia la cavidad ovárica.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES:

Las observaciones realizadas utilizando estadios larvales distintos de *Pleurodema borellii*, evidencian la evolución de la gónada que, inicialmente constituida en todos los ejemplares por dos

filamentos blanquecinos, diversifica su morfología diferenciándose en testículo u ovario, respectivamente, cuando la larva logra alcanzar los 30 mm. de largo.

El análisis histológico comprueba que en la larva de 20 mm., sin brotes de patas posteriores, la gónada resulta formada por estroma y gonios y por lo tanto no es posible todavía reconocer el sexo de los ejemplares. Salvo por una mayor cantidad de gonios, el aspecto de la gónada desde el punto de vista histológico no varía hasta alcanzar la larva los 30 mm. de largo con esbozos de patas posteriores alrededor de 2 mm.; en efecto, a partir de este estado comienza a manifestarse la distinta y propia fisonomía de la gónada según se trate de un testículo o de un ovario cuya diferenciación se verifica en períodos larvales distantes del inicio de los procesos de metamorfosis.

Se pudo constatar además que a partir de larvas de 35 mm. de largo (Grupo C) la *sex ratio* se cumple en la proporción del 50% para la línea masculina y del 50% para la femenina.

El conjunto de los datos obtenidos permite consignar que *Pleurodema borellii* pertenece a una raza sexual "diferenciada" según el concepto clásico de Witschi (1930); resultado que se suma al proporcionado por *Telmatobius hauthali schreiteri* (= *T. laticeps?*), especie que vive en alta montaña y que diferencia su sexo precozmente (Rengel, (1962).

Cabe señalar que las modificaciones que sufre la gónada de *P. borellii* a lo largo de los procesos de diferenciación mantuvieron el mismo ritmo, salvo algunas diferencias individuales no relevantes, tanto en las larvas recolectadas en llanura (San Miguel de Tucumán, y Arroyo de los Negros), como así también en las de alta montaña (Tafi del Valle).

Según ha sido señalado por Witschi (1930) los anfibios que se distribuyen en llanura diferenciarían la gónada atravesando previamente una típica etapa femenina (raza indiferenciada); en el caso de *P. borellii* tanto las larvas provenientes de Tafi del Valle (2300 m) como las de cotas mucho menos elevadas, evolucionan y diferencian sus gónadas siguiendo las modalidades de las razas sexuales diferenciadas.

Nuestras observaciones demostrarían que lo encontrado y descripto para los anfibios europeos con respecto a la diferenciación de la gónada en función de la cota en la que viven, se cumple sólo parcialmente en Argentina, por lo menos considerando las especies hasta ahora estudiadas.

## BIBLIOGRAFIA:

- ANCEL, P. y VINTEMBERGER, P., 1948. Recherches sur le déterminisme de la simétrie bilatérale dans l'oeuf des Amphibiens. Bull. Biol. Fr. Belg., Suppl. 31 : 1-173.
- BEATTY, R.A., 1964. Chromosome deviations and sex in Vertebrates. En : Intersexuality including Man. Acad. Press, N.Y., 17-143.
- CHANG, C. y WITSCHI, E., 1956. Genic control and hormonal reversal of sex-differentiation in *Xenopus*. Proc. soc. exp. Biol. and Med., 93 : 140-144.
- DAS, R. y MOJANTY-HEJMADI, P. 1982. Preliminary observations on differentiation of gonad in *Rana tigrina* (Daud.). Praniker 3 : 78-82.
- FOOTE, C.L., 1964. Intersexuality in Amphibians. En : Intersexuality in Vertebrates including Man. Acad. Press, N.Y., 232-272.
- GALLIEN, L., 1956. Inversion expérimental du sexe chez un Anur inférieur *Xenopus laevis*. Bull. Biol. Fr. Belgique, 90 : 163-183.
- NORESCALCHI, A. y MARINUCCI, A., 1966. Il differenziamento del sesso nella *Hyla arborea arborea* (L.) dei dintorni di Napoli. Red. Acc. scienze Fisiche e Matematiche, Napoli, Serie 4, (33) : 1-11.
- PFLÜGER, E. 1882. Versuche der Befruchtung überreifer Eier. Arch. ges. Phys., 29 : 76-81.
- PISANO, A. y PIZARRO, N., 1958. Observaciones sobre el desarrollo de la gónada de *Bufo arenarum*. Rev. Soc. argent., Biol., 34 : 175-184.
- PISANO, A. y PIZARRO, N., 1962. Caratteristiche morfologiche della gónade di *Bufo arenarum* durante lo sviluppo. Arch. Zool. Italiano 47 : 167-176.
- PONSE, K. 1949. La différenciation du sexe et l'intersexualité chez les Vertébrés. F. Rouge, Lausanne.
- 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. y PISANO, A., 1980. Modalidades desconocidas en la diferenciación de la gónada de un Anfibio. Rev. Museo de Historia Nat. de San Rafael, Mendoza. 8 (1) : 15-19.
- RENGEL, D. y PISANO, A., 1981, a. Peculiaridades en la diferenciación de la gónada de *Phyllomedusa sauvagii*. Rev. Soc. Arg. Biol. 57 : 82-84.
- RENGEL, D. y PISANO, A., 1981, b. Il differenziamento sessuale della gónade di *Phyllomedusa sauvagii*. Rendiconto dell' Accademia delle Scienze fisiche e matematiche. Società Nazionale di Scienze. Napoli. 48 : 329-335.
- REVERBERI, G., 1967. Introduzione all'embriologia sperimentale. Feltrinelli Editore Milano. 1-407.
- 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.
- VANININI, E. 1946. Sviluppo e differenziamento delle gonadi nei girini de *Bombina pachypus*. Arch. Zool. Ital. 36 : 173-188.
- 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.

#### LEYENDA DE LAS FIGURAS:

Fig. 1.: Grupo A: gónada primitiva (\*) con gonios distribuidos en una masa estromal. Escala: 80  $\mu$ m.

Fig. 2.: Grupo B: gónadas femeninas (\*) ovocitos en "pequeño crecimiento". Escala : 160  $\mu$ m.

Fig. 3.: Grupo B: gónada masculina. Nótese las mitosis (—>). Escala: 160  $\mu$ m.

Fig. 4.: Grupo C: testículo: cistos espermatogoniales: Escala: 160  $\mu$ m.

Fig. 5.: Grupo C: ovario: ovocitos en distintas etapas de crecimiento. Escala: 160  $\mu$ m.

Fig. 6.: Grupo D: Imágen macroscópica de un testículo primordial (—>). ubicado en la pared lateral interna del mesonefros. Escala: 0,90  $\mu$ m.

#### RESUMEN:

Ha sido estudiada la diferenciación de la gónada de larvas de *Pleurodema borellii*, que se ubica en diferentes áreas geográficas de Argentina, y que han sido fijadas en distintos estadios premetamórficos. Hasta que la larva alcance 20 mm. de largo, las gónadas se presentan indiferenciadas, sin embargo a partir de los 30 mm. de largo, es decir en etapas larvales anteriores al clímax de la metamorfosis, se diferencian en testículos o bien en ovarios. Por lo tanto esta especie pertenece a una raza sexual "diferenciada".

---

SEDE de la ASOCIACION HERPETOLOGICA ARGENTINA  
MUSEO DE LA PLATA  
Casilla de Correo 745 (1900) La Plata ARGENTINA

