

PROCEDIMIENTO DE DESARROLLO EN DOS ESPECIES DEL GENERO RHINODERMA

B. Jorquera, E. Pugin, O. Garrido, O. Goicoechea, R. Formas

Instituto de Embriología, Facultad de Ciencias,
Universidad Austral de Chile, Valdivia

"Creo que los hechos, deducciones y conjeturas expuestos, aunque de mala manera y como á mi se me alcanza, responden a la importancia que atribuyo a la singular reproducción del *R. darwini*; pero aquellos, ni á mi me satisfacen, ni satisfarán á nadie que vislumbre el interés que ha de tener al lado de éste, un estudio vivo, en que el animal por sí mismo evidencie lo supuesto, desmienta lo asegurado y descubra lo imprevisto".

Espada (1872).

Durante la recalada del Beagle en las costas de Valdivia (1835), Darwin encuentra un pequeño anuro, el cual fue luego descrito brevemente por Duméril y Bibron (1841) y por Bell (1843) y denominado *Rhinoderma darwini*. El ejemplar se registró en el Museo de Historia Natural de París con el N° 4911.

En 1848, Gay lo describe para Fauna Chilena, y al observar que algunos especímenes portaban crías en su interior, pensó que se trataba de hembras vivíparas. Algunos años más tarde Jiménez de la Espada (1872), en base a 10 ejemplares remitidos por Philippi, determina que es el macho quien porta las crías en un gran "saco bucal aéreo", el cual correspondería a la bolsa del canto. Luego de disecar las bolsas de 5 machos portadores, Espada describió las larvas en ellas contenidas, como carentes de formación bucales córneas y de branquias externas, cola poco desarrollada. Las observaciones sobre este material fijado le llevaron a plantearse las siguientes preguntas: ¿En qué estado entran y cómo? ¿permanecen en la bolsa hasta el fin de la metamorfosis? ¿cómo y de qué se nutren? A tales interrogantes intenta responder con una serie de conjeturas, correctas o equívocas, pero que atraen el interés de otros investigadores por el estudio de esta especie.

Otto Burger (1905), da como límite de distribución desde el río Maule hasta la isla de Quehui (Chiloé) y trabaja con animales provenientes de Contulmo. Según este autor, el animal sería monógamo y los huevos luego de ser puestos fraccionadamente por la hembra, serían después de su fecundación incorporados de inmediato a la bol-

sa gular del macho. La bolsa gular pre funcional, muy pequeña y atrófica, presentaría epitelio estratificado, pero luego de la distensión provocada por la presencia de las crías, el epitelio se reduciría a un estrato de células planas, especialmente muy delgadas frente a los capilares sanguíneos. El contenido de vitelo de los voluminosos huevos aseguraría la nutrición durante la primera parte del desarrollo, pero en los últimos estados de metamorfosis se verificaría un mecanismo trófico y a la vez excretor a través de la piel de las larvas, a lo cual no serían ajenos la disposición laminar del epitelio frente a los vasos sanguíneos de la bolsa gular y el aspecto fino y glandular de la piel de las larvas. Las crías sólo abandonarían la bolsa una vez completada la metamorfosis.

Casi dos decenios más tarde, Krieg (1924) describe la eliminación de crías juveniles en diferentes estados, previos al término de la metamorfosis. Las diferencias de desarrollo podrían obedecer a diferentes posiciones en la bolsa, lo cual crearía distintas condiciones de alimentación y respiración. Adhiere por lo tanto a lo propuesto por Burger referente a un mecanismo trófico a través de la piel, pero además agrega la posibilidad de una relación respiratoria.

Ottmar Wilhelm (1927), observando material recolectado en las provincias de Valdivia y Concepción, indica un período reproductivo anual, aunque más intenso en verano, pero señala su desconocimiento sobre la forma de postura, cópula e incorporación de los huevos. Refiriéndose a la estructura y función de la bolsa gular, insiste en que a través de ella se realizaría un proceso

trófico por osmosis y en el cual la principal superficie de absorción sería la lámina caudal de las larvas. Nuevas observaciones de Wilhelm (1932) describen la oviposura de "clusters" en terrarios y ulterior desarrollo embrionario sobre un medio húmedo. Una vez que los embriones alcanzaron el estado de respuesta muscular, fueron naturalmente incorporados a la bolsa paterna.

Cei, en su libro Batracios de Chile (1962), se refiere a algunos estados larvarios observados en Concepción. En ellos señala la presencia de armadura córnea bucal y espiráculo izquierdo. Además comunica el hallazgo de larvas expulsadas por el macho, con esbozo de extremidades posteriores.

De acuerdo a la revisión bibliográfica, la idea de una relación trófica o respiratoria paterno-embrionaria aparece sustentada sobre la base de incompletas y contradictorias características del desarrollo e insuficientes observaciones histológicas de la bolsa gutural. Esta hipótesis requiere por lo tanto ser considerada sobre un mejor conocimiento del desarrollo embrionario y larvario de *Rhinoderma* y un análisis más detallado de las estructuras epiteliales que interactuarían.

Con posterioridad a nuestro estudio del desarrollo de *Rhinoderma darwini* y de la ultraestructura de la bolsa gutural, inesperadamente llegamos a la identificación de una segunda especie para el género *Rhinoderma*, a la cual se denominó *Rhinoderma rufum*. Ambas especies presentan diferencias ectosomáticas y del canto entre los individuos adultos y difieren en aspectos estructurales del desarrollo, que representan respuestas adaptativas de naturaleza trófica y respiratoria a diferentes condiciones del medio.

Las observaciones sobre estos diferentes procedimientos de desarrollo, y recientes estudios de la ultraestructura de la bolsa gutural en ambas especies, aportan algunos nuevos antecedentes que permiten replantear la posibilidad de una relación trófica y/o respiratoria paterno-embrionaria.

La tabla de desarrollo normal de *Rhinoderma darwini* (Jorquera et al, 1972) se realizó con animales recolectados en los alrededores de Valdivia y Mehuín, durante todo el año, pero de preferencia en primavera y verano. Para el estudio del período embrionario se esperó ovulación espontánea y pseudocópula natural en terrarios. Luego, diferentes grupos de huevos fecundados fueron cultivados a 18° C sobre un lecho de musgo húmedo o en solución Holtfreter al 10%. Para el estudio del período de la metamorfosis, los embriones fueron obtenidos en distintas etapas del desarrollo de la bolsa

gutural del macho y cultivados a 18° C en solución Holtfreter al 10%.

El período embrionario es aquel durante el cual el embrión permanece encapsulado. Consta de 11 estados y dura 23 días. El período de metamorfosis es aquel comprendido desde la aparición del esbozo de los miembros posteriores, hasta la desaparición de la cola. Se subdivide en 15 estados y dura 52 días (Lám. 1). La eclosión se produce durante los estados 1 y 2 de metamorfosis y por lo tanto resulta una ligera superposición entre los períodos de embriogénesis y metamorfosis.

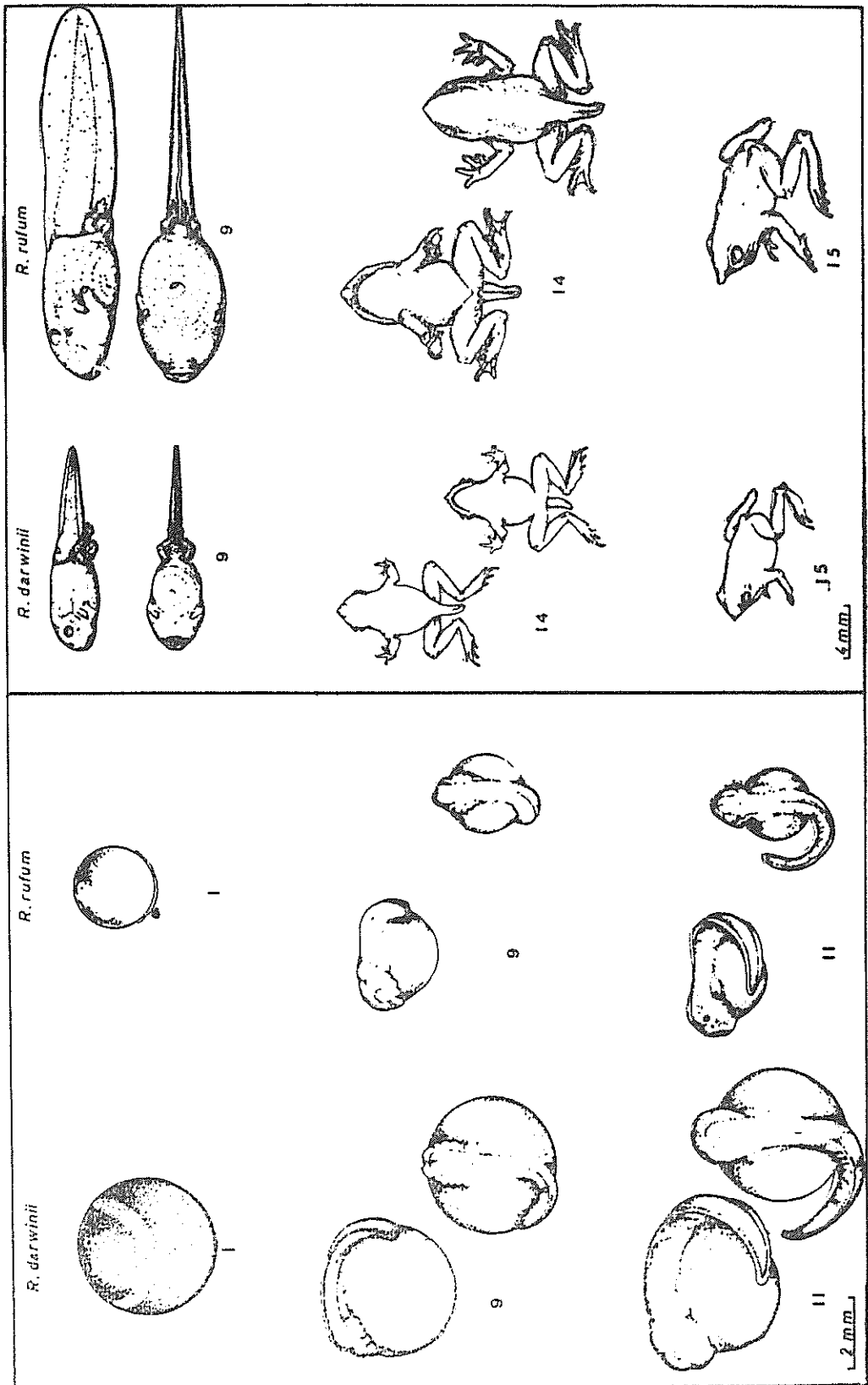
La primera parte del período embrionario transcurre en el medio externo sobre terreno húmedo (Cei, 1962) y sólo cuando alcanzan el estado de respuesta muscular los embriones son incorporados a la bolsa gutural del macho, donde permanecen hasta completar la metamorfosis.

Durante el período embrionario, el desarrollo del grupo cultivado sobre lecho de musgo húmedo fue similar a aquel del grupo mantenido en solución Holtfreter. Durante el período de metamorfosis, los embriones mantenidos en la solución Holtfreter ocasionalmente presentaron ruptura de la dilatación sinfonal y siempre su desarrollo fue más lento y anómalo que en el interior de la bolsa gutural del macho, con sobrevida limitada a uno o dos estados.

Las observaciones sobre el desarrollo embrionario y la metamorfosis revelan ciertas particularidades que pueden considerarse como adaptativas a la normal condición de dependencia paterna en medio no acuático:

- Oocitos grandes (4 mm).
- Ausencia de branquias externas
- Ausencia de pliegues operculares
- Ausencia de sifón
- Ausencia de pico y dientecillos córneos
- Aleta caudal poco desarrollada
- Ausencia de membrana interdigital
- Ausencia de tubérculos digitales
- Presencia de una dilatación cloacal intensamente vascularizada.
- Piel fina y muy vascularizada.

No hay desarrollo de branquias externas, aunque si se observan branquias internas al producirse la ruptura de las cámaras branquiales, durante la salida de los miembros anteriores. Ventralmente aparece una hendidura branquial superficial a cada lado, a nivel de las cuales hay leve pulsación branquial, pero sin exteriorización de yemas branquiales. La desaparición de la hendidura derecha e izquierda se produce sin la formación de pliegues operculares, durante el



LAMINA 1

METAMORFOSIS

EMBRIOGENESIS

primero y segundo estado de la metamorfosis respectivamente. Llama la atención que el cierre de la hendidura, en la mayoría de los casos, es completo y no da lugar a la persistencia de una abertura sifonal. Esta característica la consideramos como normal, puesto que siempre se presentó en todas las larvas extraídas de la bolsa gular del macho desde el estado 3 de metamorfosis, y en la mayoría de las larvas cultivadas en Holtfreter a partir del estado 1 de metamorfosis. Sin embargo algunas larvas cultivadas en Holtfreter a partir del estado 1 de metamorfosis, rompieron una abertura sifonal al exterior. Interpretamos este último hecho como adaptación a un medio líquido, que no es el medio normal, con el objeto de favorecer la respiración a nivel de las branquias internas.

La ausencia de: branquias externas, sifón, boca larvaria y ventosa, está desde luego en relación con el desarrollo directo no acuático. En este sentido existe una clara graduación en el desarrollo de estas estructuras entre las especies de anfibios con desarrollo acuático total o indirecto y aquellas que hacen desarrollo directo y en ausencia total del medio acuático.

Desde el estado 6 de la metamorfosis se desarrolla una dilatación cloacal intensamente vascularizada y que, luego de alcanzar su diámetro máximo durante el estado 9, decrece para desaparecer en el estado 12. Es posible que la notable red vascular de esta dilatación pueda participar en la función respiratoria, además de aquella atribuida a la vascularización caudal (Wilhelm, 1927). Cabe también a este respecto destacar el hecho ya demostrado por Burger (1905) y observado por nosotros, que la epidermis de las larvas de *Rhinoderma darwini* es tenue, rica en formaciones glandulares y muy vascularizada.

Junto con la elaboración de esta tabla, se realizó el estudio de la ultraestructura de la bolsa gular del macho y la piel de las larvas (Garrido et al, 1975).

Con este objeto se utilizaron machos adultos recolectados en la provincia de Valdivia, unos con larvas en el interior de la bolsa y otros sin larvas. Se obtuvieron muestras de la bolsa gular de machos sin larvas, y de la bolsa gular y piel de larvas en machos portadores. Estas larvas correspondían a diversos estados de metamorfosis y la muestra se obtuvo de la aleta caudal.

Secciones de 0,5 a 2 μm . de espesor, teñidas con azul de toluidina-bórax, fueron utilizadas para los estudios preliminares en microscopía de luz. Para la microscopía

electrónica se utilizaron secciones de 800 a 1000 μm A montadas sobre grillas de cobre descubiertas, y teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo.

La pared de la bolsa gular vacía tiene un espesor que varía entre 500 a 1000 μm . y presenta la siguiente estructura: a) epitelio interno cilíndrico pseudoestratificado, b) tejido conectivo subepitelial con abundantes vasos sanguíneos, c) capa muscular, d) tejido conectivo submuscular, y e) epitelio externo plano (Fig. 1).

El epitelio interno forma criptas al interior del tejido conectivo subyacente y presenta 4 tipos de células: a) células superficiales, b) células basales, c) células ciliadas, y d) células mucosas.

Las células superficiales, cilíndricas, contactan con la membrana basal mediante delgadas prolongaciones citoplasmáticas que penetran entre las células basales, y en su superficie libre presentan numerosas vellosidades digitiformes. Su citoplasma contiene gránulos supranucleares, mitocondrias, aparato reticular de Golgi muy desarrollado, retículo endoplásmico y algunos cuerpos multilaminares relacionados con el Golgi. Los gránulos, de diámetro y densidad variable, están rodeados por unidad membrana y contienen sub unidades de aproximadamente 50 A $^{\circ}$ (Fig. 2).

Las células basales, redondeadas, se sitúan entre la lámina basal y la célula superficial. Son relativamente pobres en organelos y carecen de cuerpos multilaminares y gránulos. Las células mucosas son semejantes a las células caliciformes del aparato digestivo (Fig. 3). Las células ciliadas se observan en el fondo de las criptas (Figs. 3 y 4).

La pared de la bolsa distendida por la presencia de las larvas, presenta los mismos elementos estructurales previamente mencionados, pero su espesor varía entre 30 a 100 μm . El epitelio interno decrece en un tercio de su altura y presenta fundamentalmente células superficiales y basales (Fig. 5). Las células superficiales presentan los mismos organelos que en la bolsa vacía, pero hay mayor cantidad de cuerpos multilaminares y los gránulos de secreción se concentran en la región apical, donde las microvellosidades suelen formar una trama reticular. A nivel de los capilares sanguíneos, tanto las células basales como las superficiales se transforman en células planas.

En cuanto a la estructura de la piel de las larvas, su epidermis está formada por un epitelio biestratificado con dos tipos celulares: a) células superficiales aplanadas, y b) células basales redondeadas (Fig. 6). El

R. darwinii

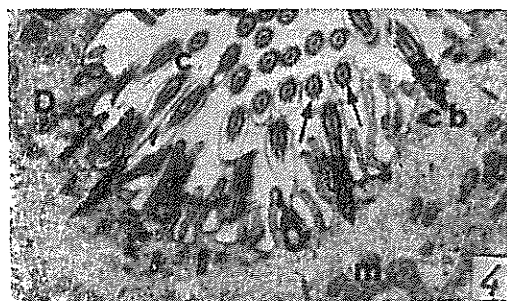
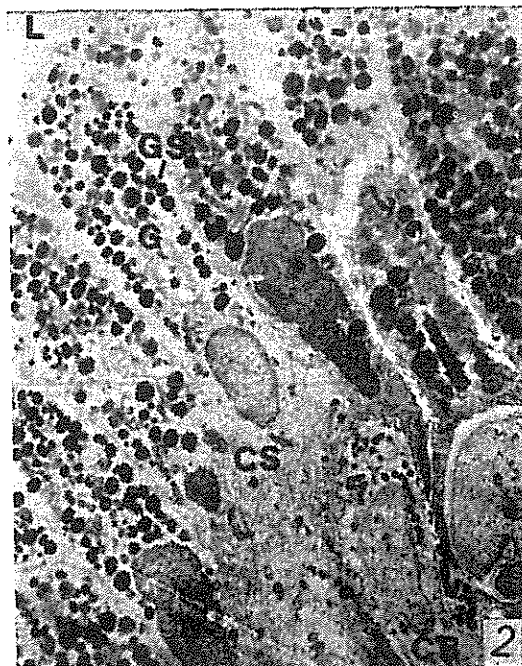
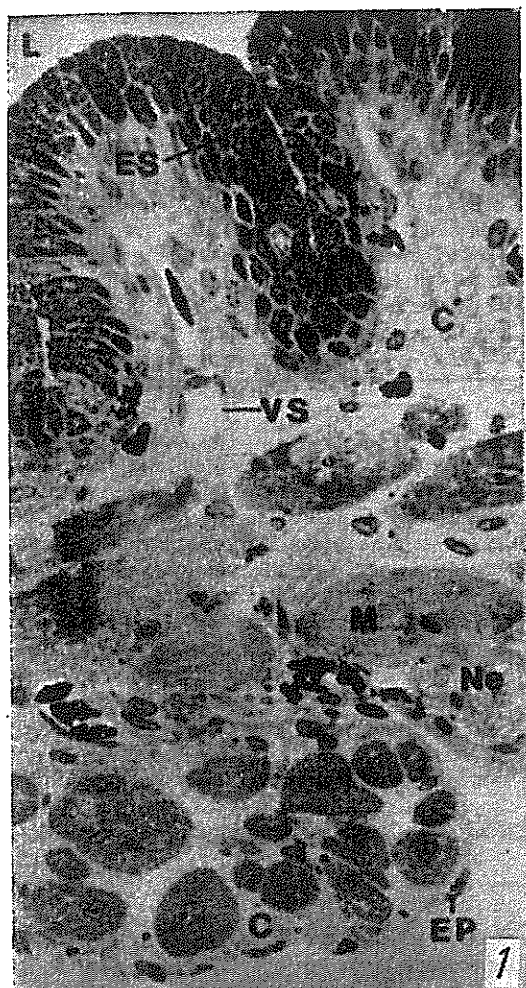


Fig. 1.—Corte transversal de bolsa gutural sin larvas. (*R. darwinii*). Microscopía de luz. ES, epitelio secretor; C, conectivo; M, músculo estriado; VS, vaso sanguíneo; Ne, nervio; EP, epitelio plano; L, lumen. (2.000X).

Fig. 2.—Corte transversal de bolsa gutural sin larvas. (*R. darwinii*). Micrografía electrónica, epitelio secretor pseudoestratificado. CB, célula basal; CS, célula superficial (secretora); G, aparato de Golgi; GS, gránulo de secreción; L, lumen (4.600X).

Fig. 3.—En el epitelio de la bolsa gutural sin larvas (*R. darwinii*), aparecen los siguientes tipos celulares: (CM) célula mucosa, (CC) célula ciliada, (CB) célula basal, (CS) célula superficial (secretora). Recuadro con mayor aumento en figura 4 (5.800X).

Fig. 4.—Recuadro de figura 3: D, desmosoma; m, mitocondrias; c, cilios; cb, corpúsculo basal; flechas, complejo axial (14.500X).

conectivo subyacente es rico en capilares sanguíneos.

La superficie libre de las células superficiales emite prolongaciones citoplasmáticas, bajo las cuales se disponen dos tipos de vacuolas: vacuolas voluminosas con contenido de aspecto reticular, que representan elementos de secreción mucosa presentes habitualmente en la piel de las larvas en anfibios anuros, y vacuolas pequeñas de aspecto homogéneo (lúcido o denso), algunas de las cuales se observan en comunicación con la superficie celular, con signos de exo o endocitosis y también suelen comunicar con el retículo endoplásmico. Además, en el interior del citoplasma celular se observan vacuolas densas de diferente tamaño (figura 7b).

El espacio intercelular entre las células superficiales es de diámetro regular y posee complejos de unión. En cambio entre las células superficiales y las células basales existen numerosos ensanchamientos con interposición de desmosomas. En el interior de estos espacios frecuentemente se encuentran grandes vacuolas de contenido denso, similares a las vacuolas intracitoplasmáticas, de igual densidad pero de menor tamaño (Fig. 7b).

El aspecto morfofuncional del epitelio de la bolsa sin larvas corresponde a un estado prefuncional en machos recolectados en un período de gran actividad reproductora: células superficiales con abundantes gránulos de secreción y células caliciformes repletas de mucus. Las células ciliadas tendrían por función remover este material de secreción desde el fondo de las criptas y las células basales mantendrían su capacidad de multiplicación para repoblar el epitelio.

En la bolsa gular con larvas, una serie de modificaciones indicarían un estado funcional distinto: el decrecimiento de las células superficiales, el aumento de los cuerpos multilaminares, la concentración apical y la disminución de los gránulos significaría un pasaje importante de material de secreción hacia el lumen de la bolsa, por medio de un mecanismo merocrino correspondiente al tipo IV de Kurosumi (1961). La naturaleza de esta secreción es desconocida, pero el aumento de los cuerpos multilaminares y su proximidad al aparato de Golgi sugiere una composición de mucopolisacáridos (Schulz y Paola, 1958; Whaley et al, 1972). Las células mucosas por otra parte realizan secreción apocrina correspondiente al tipo II de Kurosumi (1961).

La alternativa de si estos productos son simples elementos de lubricación epitelial y

preservación a la desecación de las larvas, o bien si al menos uno de ellos, cumple además una función trófica específica, preferimos discutirlo más adelante en base a las nuevas observaciones realizadas en *Rhinoderma rufum* y a los antecedentes que proporcionan otros casos de desarrollo intraparenteral en anfibios.

El aplanamiento del epitelio en la vecindad de los vasos sanguíneos, además de favorecer la función secretora de las células, puede ser considerado como una adaptación que condiciona a la bolsa gular como órgano de intercambio gaseoso. Esta función respiratoria sería similar a la propuesta para la bolsa marsupial de *Gastrotheca riobambae* y *Gastrotheca marsupiata* (Noble, 1925; Spannhof y Spannhof, 1972; Del Pino et al, 1975). Estas especies desarrollan branquias laminares en forma de campana que se aplastan contra la superficie interna de la cápsula de gelatina, la cual a su vez se relaciona íntimamente con la superficie epitelial de una bolsa ricamente vascularizada. En el caso de *Rhinoderma darwini*, que carece de estructuras branquiales, esta función se realizaría a través de la piel de las larvas, que es fina y muy vascular.

La dificultad para encontrar especímenes en nuestros lugares habituales de recolección en la provincia de Valdivia, nos llevó a las de nuestra tabla original. Posteriormente. Los ejemplares adultos provenientes de esta región, aún cuando eran actosomáticamente parecidos, presentaban durante su desarrollo formas larvarias libres y algunas características estructurales diferentes a la de nuestra tabla original. Posteriormente se determinó que estos ejemplares pertenecían a una nueva especie que denominamos *Rhinoderma rufum*.

La identificación de *Rhinoderma rufum* como una segunda especie para el género *Rhinoderma*, tuvo como punto de partida una descripción hecha por Philippi (1902) de un ejemplar proveniente de Vichuquén (provincia de Curicó), al que denominó *Heminectes rufus*; desde esa fecha se habían hecho escasos comentarios acerca de la validez taxonómica de este batracio. Ceí (1958), aduciendo la pérdida del tipo y la descripción confusa dada por Philippi, indica que es difícil aceptarlo como forma válida o sinónima de alguna otra especie de anuro chileno. Posteriormente el mismo Ceí (1962), comenta que *Heminectes rufus* podría ser una forma local de *Rhinoderma*. Donoso-Barros (1970) considera esta enigmática especie como sinónima de *Rhinoderma darwini* Duméril y Bibron.

Utilizando la descripción y las láminas

originales de Philippi (1902), publicadas y comentadas por Cei (1958), pudimos establecer que la forma de *Rhinoderma* colectada en Concepción indudablemente corresponde a *Heminectes rufus* Philippi. Esta identidad fue más tarde confirmada al comparar directamente los ejemplares de Concepción con material proveniente de Vichuquén y Barranca Alta (provincia de Colchagua). No fue posible hacer una comparación con el ejemplar tipo de *Heminectes rufus* Philippi depositado en el Museo Nacional de Historia Natural (Santiago de Chile), ya que está definitivamente perdido (Codoceo, 1974). Establecida esta identidad nos propusimos demostrar que *Heminectes* es un sinónimo de *Rhinoderma*, por cuanto ambos géneros tienen desarrollo neomélico.

Philippi (1902) diferenció a *Rhinoderma* de *Heminectes*, por la presencia en este último "de tímpano distinto, dedos obtusos y provistos por debajo de un cojinete", sin considerar la presencia de la bolsa gutural en el macho. Además de esta omisión, los criterios utilizados por Philippi para separar a estas dos entidades como géneros diferentes, no nos parecen del todo satisfactorio y comparativo de los huesos del cráneo. La notable similitud del patrón craneano entre y por lo tanto decidimos utilizar el análisis ambas especies nos permitió finalmente concluir que *Heminectes* es un sinónimo de *Rhinoderma* y se propuso (Formas et al, 1975) para *Heminectes rufus* la denominación de *Rhinoderma rufum* (Philippi) nueva combinación.

La descripción dada por Duméril y Bibron (1841) y Bell (1843), identifica plenamente a los ejemplares de la provincia de Valdivia con la especie tenida hasta ahora como *Rhi-*

noderma darwini Duméril y Bibron, que se distribuye especialmente en los bosques fríos del sur de Chile, posee membrana reducida entre los orfijos y presenta desarrollo neomélico y directo. Nuestra conclusión fue confirmada por Guibé (1974), quien comparó el tipo de *Rhinoderma darwini* depositado en el Museo de Historia Natural de París, con la descripción hecha originalmente por Duméril y Bibron.

Una vez confirmada la existencia de dos entidades distintas para el género *Rhinoderma*, ectosomáticamente muy parecidas, pero con diferencias en su desarrollo, realizamos un estudio comparativo entre la especie descrita por Duméril y Bibron (1841) y la descrita por Philippi (1902). Dicho estudio incluyó características ectosomáticas y canto de los adultos y diferencias del desarrollo.

Las principales diferencias entre individuos adultos, se refieren fundamentalmente a la morfología de la pata y el canto: *Rhinoderma darwini* posee una gruesa membrana entre los orfijos, la cual tiene desarrollo moderado y está ausente entre el cuarto y quinto orfijo. Los extremos de los orfijos son gruesos y terminan en una leve expansión. El tubérculo metatarsal externo es de tamaño reducido. *Rhinoderma rufum* posee membrana bien desarrollada entre los orfijos, disminuida brevemente entre el cuarto y quinto orfijo. Los orfijos terminan en forma puntiaguda y en su parte superior presentan una pequeña papila redondeada. El tubérculo metatarsal externo tiene un desarrollo más prominente que en *Rhinoderma darwini*.

El canto es diferente y fácil de identificar entre sí.

Las diferencias de desarrollo entre *Rhi-*

Lectura de Foto pág. 65

Fig. 5.—Recuadro, corte transversal de bolsa gutural con larvas (*R. darwini*). Microscopía de luz. L, lumen; ES, epitelio secretor; G, gránulos de secreción; M, músculo estriado; EP, epitelio plano. (2.000X). Micrografía electrónica. las células superficiales (CS) se hacen cúbicas. L, lumen; MV, microvellosidades; G, aparato de Golgi; CL, cuerpos multilaminares; N, núcleo; REG, retículo endoplásmico granular; LB, lámina basal; CB; célula basal; flecha espacio intercelular tortuoso; C, conectivo (6.500X).

Fig. 6.—Corte transversal de aleta caudal de larva (*R. darwini*) estado 4 de metamorfosis. Microscopía de luz. CS, células superficiales; CB, células basales; Nu, nucléolo; MB, membrana basal; C, conectivo (2.000X).

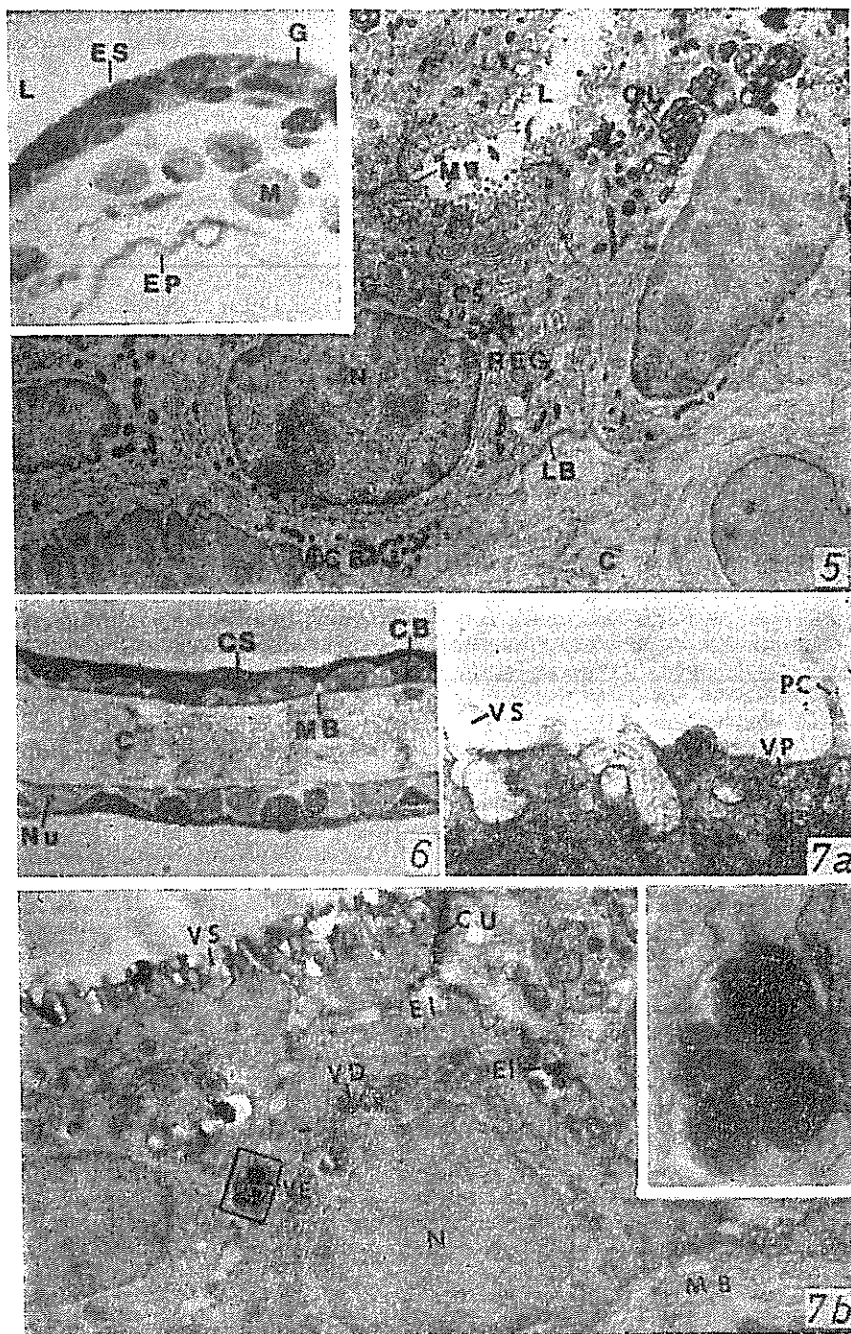
Fig. 7.—Ultraestructura de epidermis de larva estado 4 de metamorfosis (*R. darwini*).

7a. PC, prolongación citoplasmática; VS, vacuola de secreción; VP, vacuolas pequeñas (lúcidas) (16.000X).

7b. N, núcleo; VS, vacuolas de secreción; VD, vacuolas densas; EI, ensanchamiento intercelular; VE, vacuolas extracitoplasmáticas; CU, complejo de unión; MB, membrana basal (6.000X). Recuadro: vacuolas extracitoplasmáticas en ensanchamiento intercelular (16.000X).

Texto de Foto en la pág 64

R. darwinii



Rhinoderma darwini y *Rhinoderma rufum* se establecieron mediante la elaboración de una tabla de desarrollo para este último.

Para el estudio del período embrionario se esperó ovulación espontánea y fecundación en terrarios. Los huevos fueron cultivados a 18° C sobre un lecho de algodón empapado en solución Holtfreter al 10%. Para el estudio de la metamorfosis, los primeros estados fueron encontrados en la bolsa gular del macho y los estados siguientes fueron recolectados al estado libre en su habitat natural.

El período embrionario consta de 12 estados, con una duración total de 13,5 días y el período de metamorfosis consta de 15 estados, en los cuales no se determinó su duración (Lám. 1).

Como los criterios utilizados para subdividir los estados fueron similares a aquellos utilizados en nuestra primera tabla, se facilitó el reconocimiento de los aspectos diferenciales más importantes entre ambos esquemas de desarrollo. En la presente tabla, al igual que en la anterior, resulta una superposición del período embrionario con el período de metamorfosis, ya que la eclosión también se produce durante los estados 1 y 2 de la metamorfosis.

La primera parte del período embrionario transcurre en el medio externo y cuando se produce la respuesta muscular, los embriones son incorporados a la bolsa gular, donde permanecen hasta alcanzar los estados 3 y 4 de metamorfosis. En este momento las larvas son expulsadas al exterior y completan la metamorfosis en medio acuático.

El período embrionario es notablemente más rápido que en *Rhinoderma darwini*. Esta diferencia de velocidad es especialmente acentuada en la segmentación y gastrulación, estados durante los cuales la mayor cantidad de vitelo de los voluminosos huevos de *Rhinoderma darwini*, retarda el ritmo de las mitosis y dificulta los movimientos morfogénicos. No fue posible controlar la duración del período de metamorfosis en larvas mantenidas en cultivo, ya que a partir de los estados 4 y 5 se producía la casi detención de desarrollo por falta de alimentación.

Durante los períodos embrionario y de metamorfosis se observan numerosas características morfológicas diferente a aquellas descritas para *Rhinoderma darwini*:

- Oocitos pequeños (2,4 mm).
- Presencia de branquias externas, con circulación branquial.
- Presencia de pliegues operculares.

- Presencia de sifón.
- Presencia de boca larvaria con pico y dientecillos córneos.
- Aleta caudal bien desarrollada.
- Presencia de membrana interdigital en los miembros posteriores.
- Presencia de tubérculos digitales en los miembros posteriores.

Las branquias externas, a pesar de presentar circulación, parecen no tener función respiratoria ya que no están en contacto con el medio acuático; pero luego del cierre del opérculo, persiste al costado izquierdo un sifón que permite la respiración en medio acuático durante la metamorfosis. En este último aspecto existe similitud con *Batrachyla leptopus* Bell; *Batrachyla antartandica* Barrio y *Batrachyla taeniata* (Girard), que poseen desarrollo con vida embrionaria intracapsular terrestre y metamorfosis en medio acuático (Busse, 1971; Formas y Pugin, 1971; Cej y Capurro, 1958).

Durante el estado 3 de la metamorfosis se diferencia la boca larvaria (con pico y dientecillos córneos) que permite iniciar la alimentación por vía oral. La armadura bucal larvaria involuciona entre los estados 11 y 13 y la boca adquiere rápidamente característica adulta durante los estados 14 y 15.

La existencia de un aparato bucal larvario bien desarrollado, que permite la alimentación durante la vida acuática, determina un aumento considerable de la longitud de las larvas, que en el estado 10 llega a ser igual al doble de la alcanzada por las larvas de *Rhinoderma darwini* en el mismo estado.

La actividad natatoria de los miembros posteriores se inicia en el estado 10, coincidiendo con la formación de la membrana interdigital. A partir del estado 13 se produce el apoyo de las extremidades y aparecen los tubérculos digitales en los miembros posteriores.

El análisis comparativo de las características morfológicas entre *Rhinoderma darwini* Duméril y Bibron y *Rhinoderma rufum*, pone en evidencia particularidades adaptativas a la normal condición de desarrollo directo y total dependencia paterna durante la metamorfosis en el primer caso; y de un tipo de desarrollo que podríamos denominar intermedio, con dependencia paterna inicial durante la metamorfosis y término de ésta en medio acuático, en el segundo caso.

Como ambas modalidades de desarrollo difieren fundamentalmente en sus procedimientos trófico y respiratorio, pensamos que deberían existir diferencias morfológicas

cas en relación con estas funciones y por lo tanto se efectuó un estudio comparado del desarrollo del tracto digestivo (Jorquera et al, 1978) y de la bolsa gástrica y piel de las larvas entre ambas especies.

A continuación se resumen las principales diferencias entre la anatomía del desarrollo del tracto digestivo e histogénesis del duodeno:

En *Rhinoderma darwini*, durante los 5 primeros estados de la metamorfosis se establece el asa gastroduodenal y se inicia la progresiva espiralización del intestino medio, hasta completar una doble espiral de 3 vueltas y media en el estado 10. A partir del estado 11 se produce una rápida reducción de la espira del intestino medio, la cual desaparece a comienzos del estado 13, cuando se diferencia la dilatación gástrica. En el curso de los estados 14 y 15 se produce un notable crecimiento y descenso del estómago por el costado izquierdo. Durante los 12 primeros estados se mantiene aparentemente el volumen de la masa intestinal, pero ésta decrece ligeramente durante los 3 últimos estados de la metamorfosis.

El estudio histológico del duodeno revela que en los estados 2 y 3 de la metamorfosis, aún no aparece lumen y hay grandes células llenas de inclusiones citoplasmáticas, entre las que se destacan densas plaquetas vitelinas y grandes vacuolas lipídicas de contenido homogéneo (Figs. 8 y 9). El lumen aparece definido al estado 9, revestido por células que aún poseen inclusiones, pero en cuya parte apical se empiezan a diferenciar microvellosidades filamentosas. Solamente en el estado 13 existe una completa diferenciación del epitelio, con células peque-

ñas que carecen de inclusiones citoplasmáticas y poseen organelos (Fig. 10).

En *Rhinoderma rufum*, el desarrollo del tracto digestivo se establece precozmente en los 2 primeros estados de la metamorfosis, junto a una rápida espiralización del intestino medio, el cual alcanza su máxima longitud en el estado 10 con una espiral de 4 vueltas. Esta espiral se reduce progresivamente a partir del estado 11, persistiendo al costado izquierdo hasta el estado 11, persistiendo al costado izquierdo hasta el estado 14. Al igual que en *Rhinoderma darwini*, la dilatación gástrica aparece a comienzos del estado 13 y luego se produce un notable crecimiento y descenso del estómago por el costado izquierdo durante los estados 14 y 15. El volumen del intestino aumenta abruptamente a partir del estado 3, con la iniciación de la alimentación en el medio externo, hasta alcanzar su máxima expresión en el estado 10, para luego decrecer progresivamente hasta el término de la metamorfosis.

La histogénesis del duodeno revela una precoz diferenciación con respecto a *Rhinoderma darwini*, puesto que al estado 2 de la metamorfosis ya está presente el lumen, revestido por células que si bien aún presentan plaquetas vitelinas y vacuolas lipídicas, poseen desarrollo organelar y abundantes microvellosidades (Fig. 11). En el estado 3 desaparecen las inclusiones y la diferenciación celular es completa, puesto que se mantiene similar en los siguientes estados de la metamorfosis (Figs. 12 y 13).

Estas diferencias morfofuncionales a nivel del tracto digestivo, ponen de manifiesto la incapacidad de *Rhinoderma darwini* para realizar procesos de absorción intestinal du-

Lectura de la Foto pág. 68

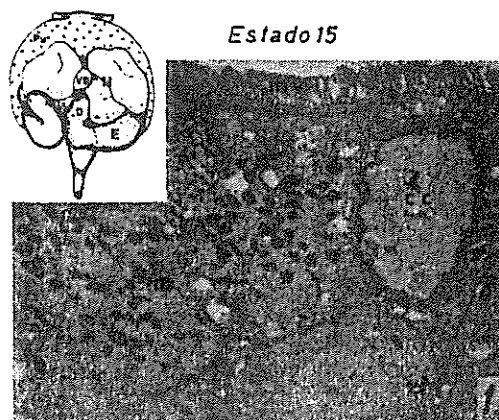
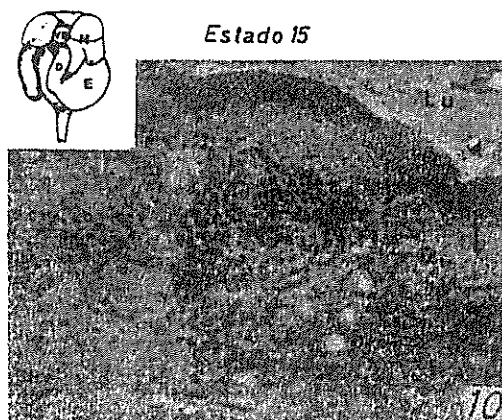
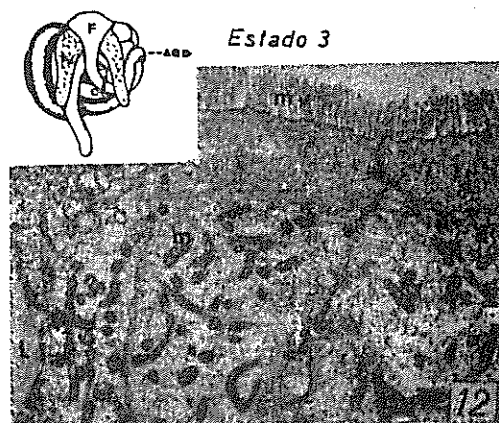
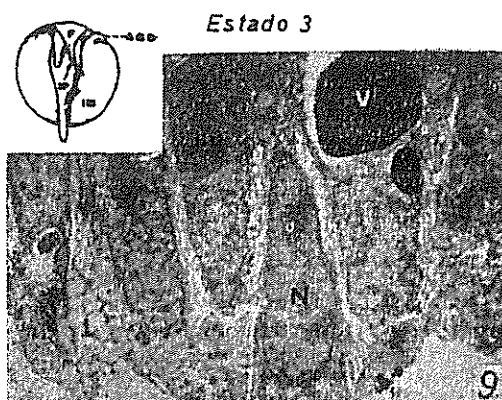
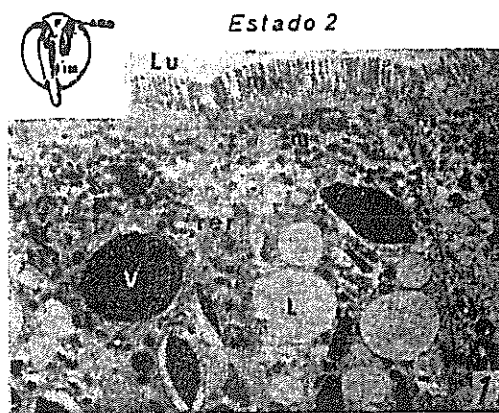
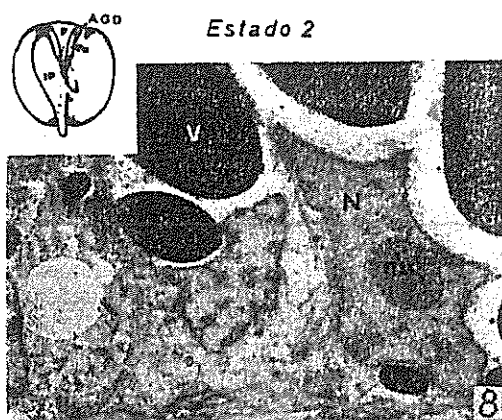
Figs. 8, 9 y 10.— Corresponden a cortes transversales del epitelio duodenal, en larvas de *Rhinoderma darwini*. (Fig. 8.—) Recuadro, esquema del destino. AGD, asa gastro duodenal de donde se extrajo la muestra. Micrografía electrónica de epitelio duodenal, larva estado 2 de metamorfosis (13.000X). (Fig. 9.—) Recuadro, esquema del intestino. AGD, asa gastro duodenal de donde se extrajo la muestra. Micrografía electrónica de epitelio duodenal, larva estado 3 de metamorfosis (10.000X). (Fig. 10.—) Recuadro, esquema del intestino. D, duodeno de donde se extrajo la muestra. Micrografía electrónica de epitelio duodenal, larva estado 15 de metamorfosis (13.000X).

Figs. 11, 12 y 13.— Corresponden a cortes transversales del epitelio duodenal en larvas de *Rhinoderma rufum*. (Fig. 11.—) Recuadro, esquema del intestino. AGD, asa gastro duodenal de donde se extrajo la muestra. Micrografía electrónica de epitelio duodenal, larva estado 2 de metamorfosis (9.000X). (Fig. 12.—) Recuadro, esquema del intestino. AGD, asa gastro duodenal de donde se extrajo la muestra. Micrografía electrónica de epitelio duodenal, larva estado 3 de metamorfosis (10.000X). (Fig. 13.—) Recuadro, esquema del intestino. D, duodeno de donde se extrajo la muestra. Micrografía electrónica de epitelio duodenal, larva estado 15 de metamorfosis (11.000X).

Texto de la Foto en pág. 67

R. darwinii

R. rufum



rante la mayor parte de su permanencia en la bolsa gutural y por consiguiente se descarta una posible ingestión por la boca de material nutritivo, como ocurre en el caso de *Nectophrinoides occidentalis*, batracio víparo, cuyas larvas se nutren a nivel del extremo terminal del oviducto (útero) con un mucus secretado por su epitelio, que es glandular y ricamente vascularizado (Angel Lamotte, 1948; Lamotte et al, 1964; Xavier, 1971, 1973).

De este modo parece confirmarse para *Rhinoderma darwinii* un desarrollo endógeno que como en otras especies de desarrollo directo y provenientes de huevos voluminosos, depende de la abundante reserva de vitelo. *Rhinoderma rufum* en cambio, tal como lo hacia presumir el menor tamaño de sus huevos, depende escasamente del material vitelino, el cual es precozmente reemplazado por la alimentación exógena.

Sin embargo, un insoslayable estudio de la bolsa gutural y la piel de las larvas en *Rhinoderma rufum*, realizado con la misma metodología que en *Rhinoderma darwinii*, nos proporcionó antecedentes morfológicos que nos permiten reconsiderar la hipótesis de una función trófica transcutánea (no publicado).

El examen de la bolsa gutural reveló identidad histológica y funcional entre ambas especies, puesto que en *Rhinoderma rufum* se observaron los dos tipos de células secretoras en similar proporción y productividad en relación a *Rhinoderma darwinii*, y también aparece la disposición laminar sobre los capilares sanguíneos. Sin embargo en la piel de las larvas se observó un hecho importante de destacar: hasta el estado 5 de metamorfosis en *Rhinoderma rufum*, aparecen en el interior de los ensanchamientos intercelulares, vacuolas de contenido denso que no se detectan en los estados posteriores de metamorfosis en medio externo (aún cuando en ellos persisten las dilataciones intercelulares). Estas vacuolas son similares a aquellas observadas en el tegumento de *Rhinoderma darwinii* en casi todos los estados de metamorfosis (Fig. 7b).

Esta última observación, que es sugerente de algún tipo de absorción y transporte transepitelial a nivel del tegumento de las larvas durante su permanencia en el interior de la bolsa, merece ser considerada en relación con algunos hechos observados en otras especies.

En los embriones de *Characodon eiseni* (Teleosteo vivíparo), existen procesos perianales que cumplen función de absorción (Mendoza, 1972). Estos procesos están revestidos por células que poseen microvellosi-

dades superficiales, diferentes tipos de vesículas, y complejo cisterno-tubular. Entre las células se producen amplias dilataciones del espacio intercelular, similares a las descritas en *Rhinoderma*, y que facilitarían la función de absorción del epitelio.

En *Gastrotheca riobambae*, la bolsa dorsal que alberga las crías, además de las funciones protectoras contra la predación y desecación de los embriones, posibilitaría el intercambio respiratorio a través de las branquias de éstos. Se excluye la posibilidad de una función trófica (Del Pino et al, 1975). En este caso parece clara una función protectora y lubricante de la bolsa dorsal, por cuanto tratándose de una adaptación de la piel, su epitelio presenta los mismos elementos glandulares del tegumento externo. Además, los embriones extraídos prematuramente de la bolsa, pueden continuar su desarrollo durante un tiempo prolongado en Ringer oxigenado. Esta última condición no se logra en el caso de *Rhinoderma darwinii*, puesto que el desarrollo se hace lento y anómalo y las larvas generalmente no sobreviven más allá del estado siguiente al que fueron extraídas, aún cuando ellas ocasionalmente presentan abertura sifonal.

Estos antecedentes permiten manejar la idea de un aporte de productos nutritivos adicionales por parte del epitelio secretor de la bolsa gutural, el cual, además de poseer células caliciformes mucosas que tienen una función de lubricación mecánica (complementada por la secreción de la piel de las larvas), posee células secretoras notablemente activas, cuyo producto es probablemente de naturaleza mucopolisacárido. Una secreción de naturaleza similar es producida por el epitelio uterino de *Nectophrinoides occidentalis* (Xavier, 1973) y el epitelio uterino de *Salamandra atra* (Greven, 1977).

Esta función trófica adicional que proponemos para *Rhinoderma* es distinta a la primitiva idea sustentada por Burger (1905), Krieg (1924) y Wilhelm (1927), quienes en atención a la disposición del epitelio sobre los capilares sanguíneos, suponían la realización de una función hemotrófica. Los antecedentes actuales ponen en evidencia de que esta disposición histológica más bien favorece la respiración transcutánea.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

1.—Se determinan dos especies para el género *Rhinoderma*:

Rhinoderma darwinii Duméril y Bibron, posee desarrollo neomélico y directo. La última parte del periodo embrionario y toda la metamorfosis transcurren en el interior

de la bolsa gular del macho. En ambos períodos se destacan una serie de características morfológicas que pueden considerarse adaptativas a la total condición de dependencia paterna durante la metamorfosis. Los individuos adultos poseen membrana poco desarrollada entre los ortijos.

Rhinoderma rufum (Philippi), posee también desarrollo neomélico, pero parcial, puesto que luego de transcurrir la última parte del período embrionario y los primeros estados de la metamorfosis en el interior de la bolsa gular, las larvas son expulsadas al exterior, donde completan la metamorfosis en medio acuático. En ambos períodos se destacan características morfológicas propias de los anuros que realizan la metamorfosis en este medio. Los individuos adultos poseen membrana bien desarrollada entre los ortijos.

2.—El desarrollo anatómico del tracto digestivo en *Rhinoderma darwinii*, tiende a ser directo, abreviando las modificaciones típicas que se producen durante la metamorfosis en los anuros de vida larvaria libre; y por el contrario, el tracto digestivo en *Rhinoderma rufum* se desarrolla con la típica adaptación intermedia de la metamorfosis, existente en los anuros de vida larvaria libre.

La histogénesis del epitelio duodenal progresa lentamente en *Rhinoderma darwinii*, hasta alcanzar su mayor grado de diferenciación en el estado 13 de metamorfosis; en tanto que *Rhinoderma rufum*, ya presenta precozmente este mismo grado de organi-

zación en el estado 3 de metamorfosis. Estos hechos, que indudablemente demuestran en *Rhinoderma rufum* una escasa dependencia inicial con el material vitelino —el cual es precozmente sustituido por la alimentación exógena—, parecen confirmar para *Rhinoderma darwinii* un desarrollo endógeno vitelino-dependiente.

3.—La ultraestructura de la bolsa gular pone de manifiesto en ambas especies una disposición histológica que favorecería el intercambio gaseoso, y además revela la presencia de células elaboradoras de un producto probablemente de naturaleza mucopolisacárido. Esta última observación, sumada al hallazgo de vacuolas extracitoplasmáticas en la epidermis de las larvas en casi todos los estados de metamorfosis en *Rhinoderma darwinii* y solamente en los primeros estados en *Rhinoderma rufum*, permite suponer la existencia de un mecanismo trófico complementario paterno-embrionario; con un epitelio activamente secretor por una parte y un epitelio con capacidad de absorción por otra parte.

4.—Durante la metamorfosis en *Rhinoderma darwinii*, el procedimiento trófico sería mixto: por una parte dependiendo fundamentalmente de la abundante reserva de vitelo, y por otra parte, de la absorción vía parenteral de principios nutritivos indispensables secretados por la bolsa gular del macho. En *Rhinoderma rufum*, existiría un procedimiento trófico similar durante los estados de permanencia en la bolsa gular, pero posteriormente es totalmente reemplazado por la alimentación exógena.

Abreviaturas.— V, vitelo; N, núcleo; Nu nucléolo; L, lípidos; Lu, lumen; mv, microvellosidades; m, mitocondrias; rer, retículo endoplasmático rugoso y cc, célula caliciforme.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ANGEL, F. et LAMOTTE, M. 1948. Nouvelles observations sur *Nectophrynoides occidentalis* Angel. Remarques sur le genre *Nectophrynoides*. Ann. Sci. Natur. Zool. Biol. Anim., 10:115-147.
- BELL, T. 1843. Reptiles. Zool., Voyage of the H.M.S. Beagle. Part. 5.
- BURGER, O. 1905. La neomelia de la *Rhinoderma darwinii*. D&B. Santiago Chile. Imp. Cervantes.
- BUSSE, K. 1971. Desarrollo de *Batrachyla leptopus* Bell, con observaciones sobre su ecología y comportamiento. Inv. Zool. Chil., 15:5-64.
- CEI, J.M. 1958. Las láminas originales del Suplemento de los Batraquios chilenos de Philippi: primera impresión y comentario. Inv.Zool.Chil., 4:265-288.
- CEI, J.M. 1962. Batracios de Chile. Ed. Univ. de Chile. Santiago de Chile.
- CEI, J.M. y CAPURRO, L. 1958. Biología y desarrollo de *Eupsophus taeniatus* (Girard) Inv.Zool.Chil., 4:159-182.
- CODOCEO, M. 1974. Comunicación personal.
- DEL PINO, M.E., GALARZA, M.L., ALBUJA, C.M. and HUMPHRIES, A.A. (Jr). 1975. The maternal pouch and development in the marsupial frog *Gastrotheca riobambae* (Fowler). Biol. Bull., 149:480-491.

- DONOSO-BARROS, R. 1970. Catálogo herpetológico chileno. Bol. Mus. Nac. Hist. Nat. Chile, 31:73.
- DUMERIL, A.M. et BIBRON, G. 1941. Herpétologie générale. Paris.
- ESPADA, de la J.M. 1872. Sobre la reproducción de *Rhinoderma darwini*. Anales de Hist. Nat. Madrid, pág. 139.
- FORMAS, R. y PUGIN, E. 1971. Reproducción y desarrollo de: *Batrachyla antartandica* (Barrio). Bol. Mus. Nac. Hist. Nat. Chile, 32:201-213.
- FORMAS, R., PUGIN, E. y JORQUERA, B. 1975. La identidad del batracio chileno *Hemineustes rufus* Philippi 1902. Physis, Secc. C, 89:147-157.
- GAY, C. 1848. Historia Física y Política de Chile. Santiago de Chile.
- GARRIDO, O., PUGIN, E. et JORQUERA, B. 1975. Correspondance ultrastructurale entre la bourse gutturale du *Rhinoderma darwini* et le tegument des larves. Boll. Zool., 42:133-144.
- GUIBE, J. 1974. Comunicación personal.
- GREVEN, H. 1977. Comparative ultrastructural investigations of the uterine epithelium in the viviparous *Salamandra atra* Laur and the ovoviviparous *Salamandra atra* (L.) (Amphibia, Urodela). Cell Tiss. Res. 181:215-237.
- JORQUERA, B., PUGIN, E. y GOICOECHEA, O. 1972. Tabla de desarrollo normal de *Rhinoderma darwini*. Arch. Med. Vet., 4:1-15.
- JORQUERA, B., PUGIN, E. y GOICOECHEA, O. 1974. Tabla de desarrollo normal de *Rhinoderma darwini* (Concepción) Bol. Soc. Biol. de Concepción, 48:127-146.
- JORQUERA, B., PUGIN, E. y GARRIDO, O. 1978. Estudio comparado de las características morfofuncionales del tracto digestivo, entre *Rhinoderma darwini* y *Rhinoderma rufum*. Arch. Biol. Med. Exper., 11:R 24.
- KUROSUMI, K. 1961. Electron microscopic analysis of the secretion mechanism. Int. Rev. Cytol., 11:1-124.
- KRIEG, H. 1924. Biologische reise Studien in Südamerika. II *Rhinoderma* und *Calyptocephalus* Z.f. Morphol. u. Ökol. d. Tiere Bd., 3:150-168.
- LAMOTTE, M. REY, P. et VOGELI, M. 1964. Recherches sur l'ovaire de *Nectophrynoides occidentalis*, Batracien Anoure vivipare. Arch. Anat. Microsc. Morphol., Exp., 53, 179-224.
- MENDOZA, G. 1972. The fine structure of an absorptive epithelium in a viviparous Teleost. J. Morph., 136: 109-130.
- NOBLE, G.K. 1925. The integumentary, pulmonary and cardiac modifications correlated with increased cutaneous respiration in the amphibia: a solution of the "hairy frog" problem. J. Morphol., 40:341-416.
- PHILIPPI, R.A. 1902. Suplemento de los Batraquios chilenos descritos en la Historia Física y Política de Chile de don Claudio Gay. Santiago de Chile.
- SCHULZ, H. and PAOLA, D.D. 1958 (citados por Kurosumi, 1961).
- SPANNHOF, I. and SPANNHOF, L. 1972. Beobachtungen zur Brutbiologie und Larvenentwicklung von *Gastrotheca marsupiata*. Wiss.Z.Univ. Rostock Math.-Naturwiss. Reihe, 20:97-104.
- WHALEY, W., DAUWALDER, M. KEPHART, J. 1972. Golgi apparatus, influence on cell surface. Science 175:596-599.
- WILHELM, O. 1927. La *Rhinoderma darwini* D&B. Bol. Soc. Biol. de Concepción, 1:11-39.
- WILHELM, O. 1932. Nuevas observaciones acerca de la neomelia de la *Rhinoderma darwini*. Rev.Chil. Hist.Nat., 36:166-170.
- XAVIER, F. 1971. Recherches sur l'endocrinologie sexuelle de la femelle de *Nectophrynoides occidentalis* Angel (Amphibien Anoure vivipare). Thèse de Doctorat es Sciences CNRS, N° A.O. 6385, 223 pages.
- XAVIER, F. 1973. Le cycle des voies génitales femelles de *Nectophrynoides occidentalis* Angel, Amphibien Anoure vivipare. Z.Zellforsch., 140:509-534.