

DESCRIPCION DE CARACTERES MORFOLOGICOS EN LARVAS  
PROMETAMORFICAS DE *PHYSALAEUMUS BILIGONIGERUS* (ANURA,  
LEPTODACTYLIDAE)

Víctor H. ZARACHO<sup>(1)</sup>; Jorge A. CÉSPEDez<sup>(1)</sup> y Blanca B. ALVAREZ<sup>(1)</sup>

**ABSTRACT:** Using scanning electron micrographs the principal changes produced in the oral disc, external gills, adhesive organ and opercular development are described, in larvae of *P. biligonigerus* during stages 19-25 of Gosner. It is offered a detailed description of these structures in the studied stages and the results are compared with those of *Leptodactylus chaquensis*, *Bufo arenarum*, *B. americanus* and *Scaphiopus intermontanus*.

**RESUMEN:** Utilizando microscopía electrónica de barrido se describen los principales cambios producidos en el disco oral, branquias externas, órgano adhesivo y desarrollo del opérculo, en larvas de *P. biligonigerus* durante los estadios 19-25 de Gosner. Se brinda una descripción detallada de estas estructuras en los estadios estudiados y los resultados son comparados con los de *Leptodactylus chaquensis*, *Bufo arenarum*, *B. americanus* y *Scaphiopus intermontanus*.

**Palabras claves:** *Physalaemus biligonigerus*, larva, disco oral, branquia externa, órgano adhesivo, desarrollo del opérculo.

**Key words:** *Physalaemus biligonigerus*, larvae, oral disc, external gill, adhesive organ, opercular development.

#### INTRODUCCIÓN

Los patrones de desarrollo de larvas de anuros proveen una base apropiada para comprender la compleja interacción de la ecología y la morfología (Tubbs *et al.*, 1993). En forma general las descripciones larvales abarcan un período de desarrollo comprendido entre los estadios 31 al 35 de la tabla de Gosner, siendo los caracteres morfológicos usualmente utilizados en dichas descripciones, los referidos al disco oral, espiráculo, forma del cuerpo, tubo proctodeal, forma de la cola, etc. Sin embargo, otros caracteres, como las branquias externas y las papilas adhesivas habitualmente no se tienen en cuenta, por tratarse de estructuras transitorias presentes en los estadios prometamórficos, es decir, estadios que abarcan desde la eclosión hasta el estadio 25 de Gosner (Lavilla y Rougés, 1992). Un resumen sobre la diversidad morfológica de estas últimas estructuras lo presentan Duellman y Trueb (1994) para algunos géneros de Hylidae, Centrolenidae y otras familias de anuros sin incluir a Leptodactylidae.

En cuanto al disco oral, aunque sus descripciones son frecuentes, la información sobre la ontogenia es escasa. Los pocos trabajos que pueden citarse al respecto pertenecen a Marinelli *et al.* (1985) en *Bufo bufo*; Tubbs *et al.* (1993) en *B. americanus*; Thibaudeau and Altig (1988) en *Hyla chrysoscelis*; Takahama *et al.* (1987) en *Rana catesbeiana*; Hall *et al.* (1997) en *Scaphiopus intermontanus* y Fiorito de López y Echeverría (1989) en *Bufo arenarum*.

- 
- (1) Anatomía Comparada de los Cordados, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, Universidad Nacional del Nordeste, Av. Libertad 5470, (3400) Corrientes, Argentina. E-mail: vhzaracho@hotmail.com

#### MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron puestas de *Physalaemus biligonigerus* en cuerpos de agua temporarios, luego de abundantes precipitaciones, en el Campus Universitario de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE) en la ciudad de Corrientes, Argentina. Las puestas se acondicionaron en el laboratorio en recipientes plásticos y se utilizó agua proveniente de los mismos ambientes mantenida a temperatura ambiente, la cual varió entre 23,5°C y 25,7°C durante la etapa prometa-mórfica. Los embriones y las larvas se fijaron en formol al 10 %. Los estadios se determinaron según Gosner (1960) utilizando una lupa binocular Leica Zoom 2000. Las observaciones del disco oral, branquias externas, órganos adhesivos y desarrollo del opérculo se efectuaron con microscopio electrónico de barrido (MEB) Joel 5800 LV del Servicio de Microscopía Electrónica de la SGCyT-UNNE.

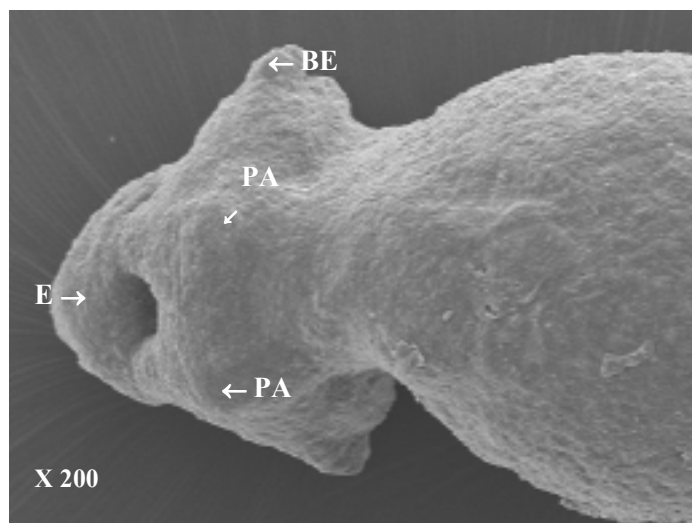
El material utilizado para las observaciones con MEB se trató con una solución buffer-fosfato 0,1 M, deshidratado con una batería creciente de acetona, secado a punto crítico y la metalización se realizó con oro paladio.

La terminología empleada para la descripción del disco oral se basó en la propuesta por Altig & McDiarmid (1999). La designación de las crestas dentarias se realizó teniendo en cuenta la fórmula dentaria 1, 1-1 / 2 brindada por Cei (1980).

#### RESULTADOS

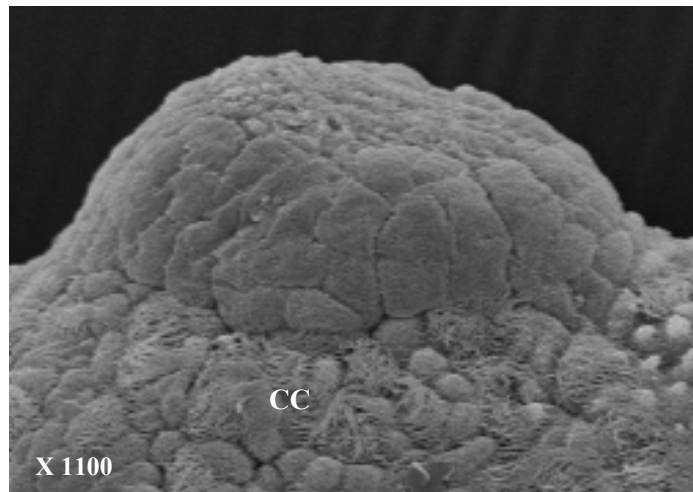
**Estadio 19:** en este estadio eclosionan las primeras larvas. La cabeza es claramente discernible del tronco. El estomodeo está presente como una cavidad ciega abierta en

la región ánteroventral de la cabeza y su abertura es transversalmente ovalada. Las papilas adhesivas pueden observarse como dos pequeñas elevaciones, separadas por un intervalo correspondiente al ancho del estomodeo, e inmediatamente posterior al mismo. A ambos lados de la cabeza, comienzan a esbozarse las branquias externas, probablemente a partir del segundo y tercer arco branquial (Fig. 1).



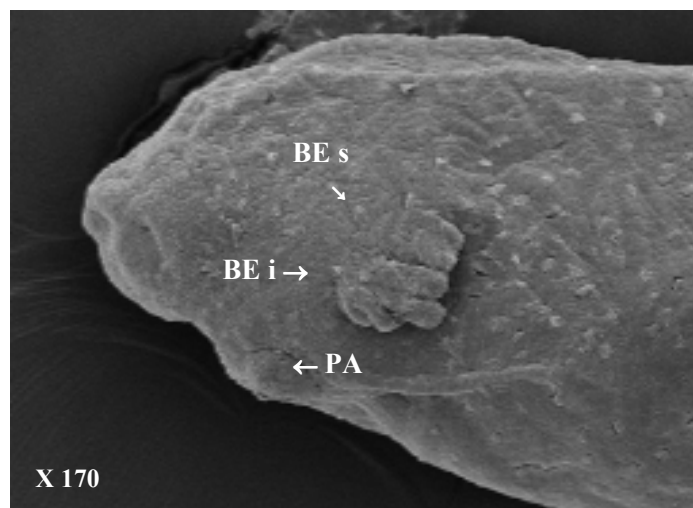
**Fig. 1:** Morfología externa de *Physalaemus biligonigerus* en estadio larval 19 (vista ventral). **BE:** esbozos de branquias externas, **PA:** esbozo de la papila adhesiva, **E:** estomodeo.

**Estadio 20:** el estomodeo, aún sin abrirse, continúa ensanchándose lateralmente, en tanto el piso y el techo están atravesados por un surco longitudinal. Las papilas adhesivas son más evidentes y tienen forma de domos con una parte anterior más elevada, ocupando una altura de aproximadamente 4 ó 5 células, mientras que su parte posterior alcanza aproximadamente 2 células. Están formadas por células no ciliadas y presentan en sus extremos libres una zona central "esponjosa", secretora del mucus utilizado en la adhesión de la larva al sustrato (Fig. 2).



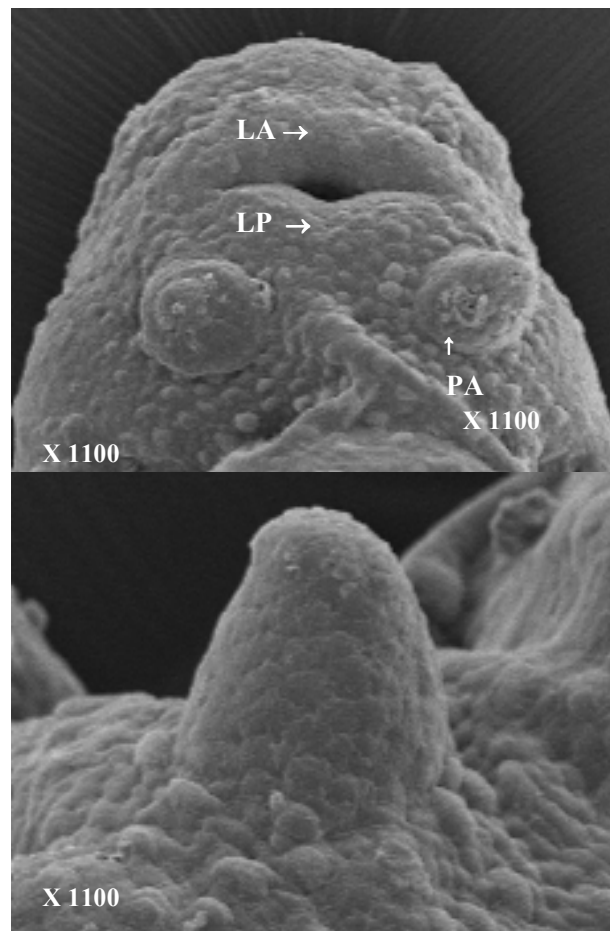
**Fig. 2:** Papila adhesiva izquierda en *Physalaemus biligonigerus* en estadio larval 20 (vista lateral interna). **RG:** región glandular, **CC:** células ciliadas.

Se diferencian claramente dos pares de branquias externas, uno superior más pequeño y otro inferior más grande con filamentos branquiales más evidentes y de aproximadamente 125  $\mu\text{m}$  de longitud (Fig. 3).



**Fig. 3:** Esbozo de branquias externas en *Physalaemus biligonigerus* en estadio larval 20 (vista lateral izquierda). **BEs:** esbozo branquia externa superior, **BEi:** esbozo branquia externa inferior **PA:** esbozo de la papila adhesiva.

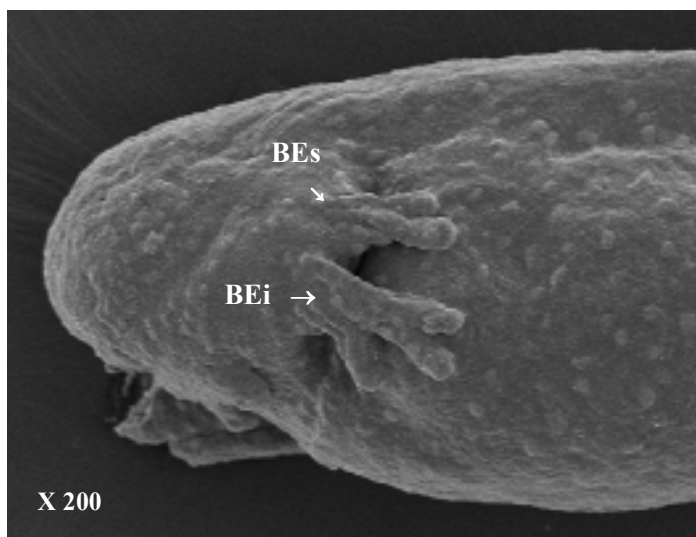
**Estadio 21:** el borde del estomodeo está definido claramente por un labio anterior y uno posterior que confluyen lateralmente delimitando entre ambos, en su parte media, una pequeña hendidura. En el labio posterior se observa una zona media levemente cóncava (Fig. 4). Las papilas adhesivas en este estadio tienen forma cónica, midiendo aproximadamente 61  $\mu\text{m}$  de alto (Fig. 5).



**Fig. 4:** Morfología oral en *Physalaemus biligonigerus* en estadio larval 21. LA: labio anterior, LP: labio posterior, PA: papila adhesiva.

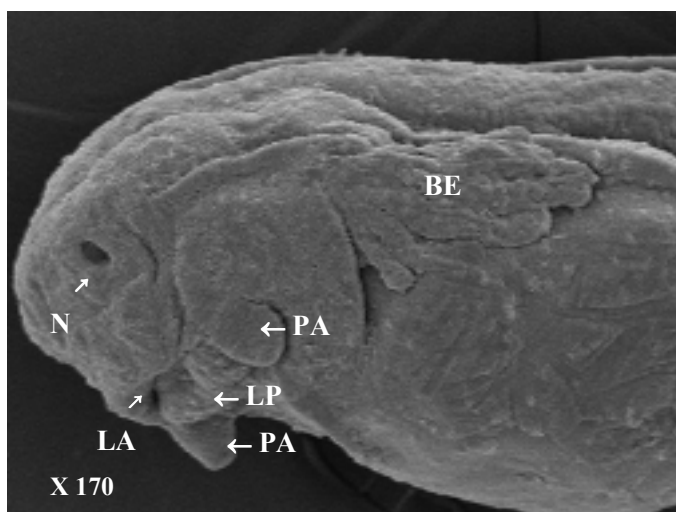
**Fig. 5:** Papila adhesiva izquierda en *Physalaemus biligonigerus* en estadio larval 21 (vista lateral externa).

La Fig. 6 muestra el alcance de las branquias externas y sus ramificaciones (la rama inferior de aproximadamente 170  $\mu\text{m}$  de largo).



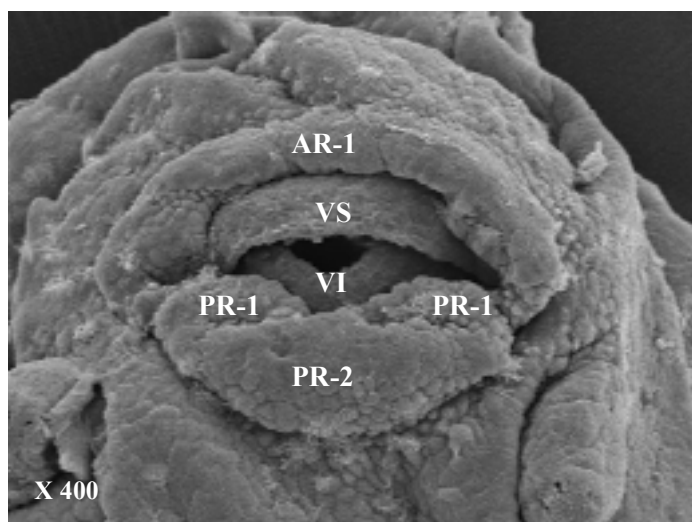
**Fig. 6:** Morfología externa en *Physalaemus biligonigerus* en estadio larval 21 (vista lateral izquierda). **BEs:** rama branquial superior. **BEi:** rama branquial inferior.

**Estadio 22:** los labios anterior y posterior son más prominentes y la hendidura bucal está alargada lateralmente. No se observan cambios importantes en las papilas adhesivas y los filamentos branquiales continúan alargándose (Fig. 7).



**Fig. 7:** Morfología externa en *Physalaemus biligonigerus* en estadio larval 22 (vista lateral izquierda). **BE:** branquias externas, **N:** narina, **PA:** papila adhesiva, **LA:** labio anterior, **LP:** labio posterior.

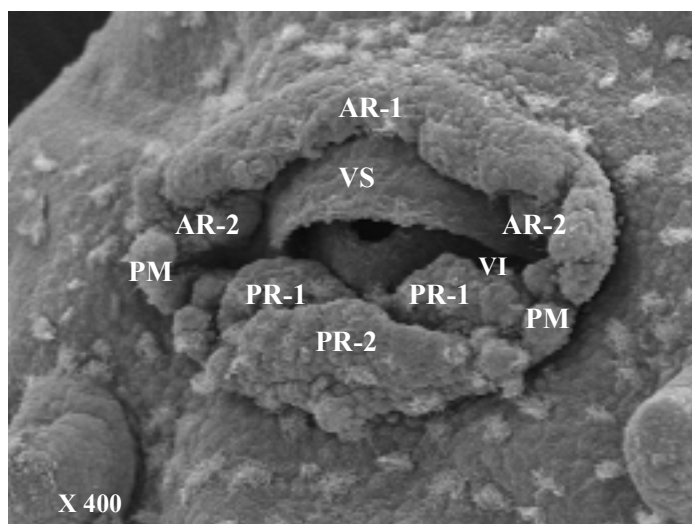
**Estadio 23:** las vainas mandibulares están presentes pero aún no están queratinizadas y el margen libre de ambas es liso. Las crestas dentarias AR-1, PR-1 y PR-2 están bien definidas y una pequeña muesca separa las crestas correspondientes a PR-1 (Fig. 8).



**Fig. 8:** Morfología oral en *Physalaemus biligonigerus* en estadio larval 23. **VS:** vaina mandibular superior, **VI:** vaina mandibular inferior, **AR-1:** primera cresta dentaria anterior, **PR-1:** primera cresta dentaria posterior, **PR-2:** segunda cresta dentaria posterior.

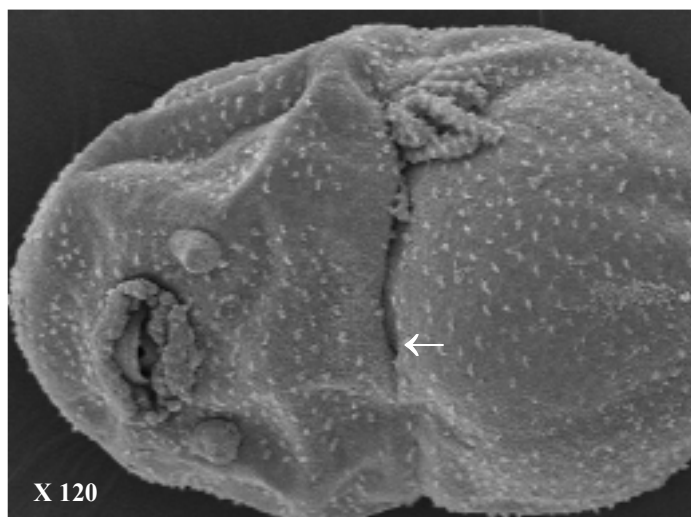
El opérculo en desarrollo se observa como dos repliegues tegumentarios, uno anterior y otro posterior, que se extienden entre una branquia externa y otra, rodeándolas externamente. Los repliegues tegumentarios comienzan a cerrarse de derecha a izquierda cubriendo parte de las branquias externas derechas.

**Estadio 24:** en el disco oral, las crestas dentarias continúan desarrollándose y las vainas mandibulares comienzan a queratinizarse. Una hilera de papilas marginales con un claro rostral comienza a esbozarse y cada papila tiene forma cónica con su extremo distal liso y romo. En ambas regiones suprangulares se insinúan las crestas dentarias correspondientes a AR-2 como dos protuberancias papiliformes (Fig. 9).



**Fig. 9:** Morfología oral en *Physalaemus biligonigerus* en estadio larval 24. **VS:** vaina mandibular superior, **VI:** vaina mandibular inferior, **AR-1:** primera cresta dentaria anterior, **AR-2:** esbozos de la segunda cresta dentaria anterior, **PR-1:** primera cresta dentaria posterior, **PR-2:** segunda cresta dentaria posterior, **PM:** papilas marginales.

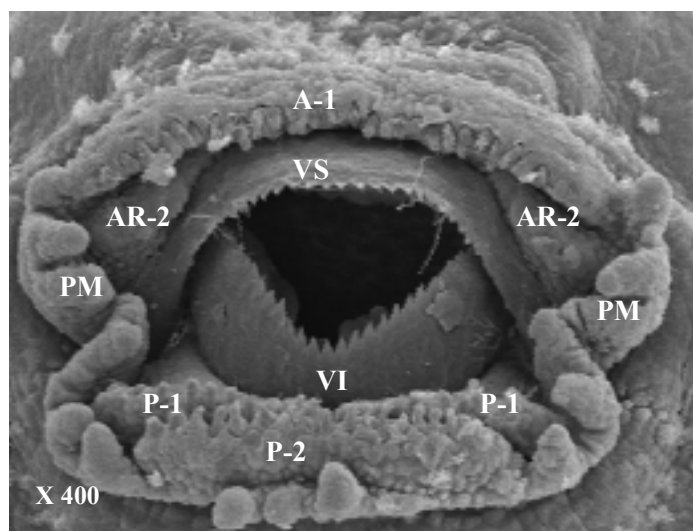
El cierre de los repliegues tegumentarios ventrales avanza hasta la región ventromedial cubriendo totalmente las branquias externas derechas. En el lado izquierdo el cierre apenas se insinúa solapando únicamente la base de los dos grupos de filamentos branquiales (Fig. 10).



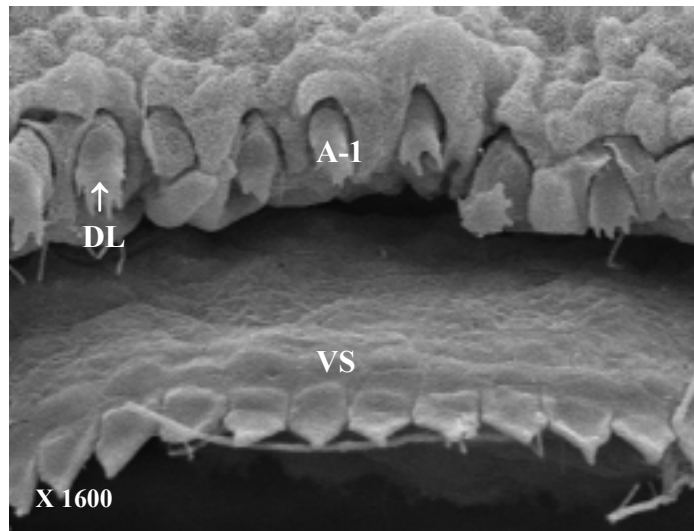


**Fig. 10:** Estado intermedio en la formación del opérculo en *Physalaemus biligonigerus* en estadio larval 24 (vista ventral). (Nótese el cierre parcial de los repliegues tegumentarios operculares).

**Estadio 25:** las vainas mandibulares presentan el borde labial aserrado. La superior tiene forma de arco abierto y la inferior de "V". En las crestas dentarias AR-1, PR-1 y PR-2 comienzan a emerger los dientes labiales, los cuales poseen cúspides alargadas. Las crestas dentarias correspondientes a AR-2 continúan esbozándose entre la primera hilera anterior de dientes (A-1) y la vaina mandibular superior, acortando la distancia que separa a ambas crestas (Fig. 11 y 12) Las papilas adhesivas aún están presentes y el cierre del opérculo ha finalizado formándose el espiráculo en el lado izquierdo del cuerpo.



**Fig. 11:** Morfología oral en *Physalaemus biligonigerus* en estadio larval 25. VS: vaina mandibular superior, VI: vaina mandibular inferior, A-1: primera hilera anterior de dientes, AR-2: segunda cresta dentaria anterior, P-1: primera hilera posterior de dientes, P-2: segunda hilera posterior de dientes, PM: papilas marginales.



**Fig. 12:** Emergencia de dientes labiales en *Physalaemus biligonigerus* en estadio larval 25. **VS:** vaina mandibular superior, **A-1:** primera hilera anterior de dientes, **DL:** dientes labiales.

#### DISCUSIÓN

**Branquias externas:** respecto al origen, al número y a la forma de éstas, existe una gran variación interespecífica y cuando están presentes, generalmente consisten en dos pares (Duellman y Trueb, 1994). Hall *et al.* (1997) describieron para *Scaphiopus intermontanus* tres pares de branquias. En *Leptodactylus chaquensis* (obs. pers.) existe solamente un par de branquias externas que se origina a partir del segundo arco branquial, mientras que las larvas de *Physalaemus biligonigerus* presentan dos pares, uno superior y otro inferior, originados aparentemente a partir del segundo y tercer arco branquial. En estas tres especies comienzan a esbozarse en el estadio 19.

En *S. intermontanus* cada arco branquial origina una hilera de filamentos crecientes en longitud de arriba hacia abajo, algunos apenas ramificado; en *L. chaquensis* consisten en un sólo grupo de 12 a 15 filamentos de igual longitud, unidos en su base y no ramificados, originados a partir de un lóbulo común, y en *P. biligonigerus* se observan dos grupos de filamentos, el inferior de mayor tamaño y más ramificado. En los tres casos mencionados el cierre del opérculo ocurre de derecha a izquierda, cubriendo inicialmente la branquia externa derecha y luego la izquier-

da, formándose finalmente el espiráculo en el lado izquierdo.

**Organo adhesivo:** en *S. intermontanus*, Hall et al. (1997) observaron que el órgano adhesivo comienza a esbozarse en el estadio 18 y tiene forma de U bien definida con los extremos libres bulbosos. En *P. biligonigerus* está presente como dos estructuras cónicas que comienzan a esbozarse en el estadio 19 y alcanzan su forma definitiva en el estadio 21, en tanto, en *L. chaquensis* se trata de una almohadilla adhesiva, triangular, de vértice posterior y con un surco en forma de V (obs. pers.).

En *P. biligonigerus*, hasta el estadio 25, no hay indicios de su regresión. En este sentido Duellman y Trueb (1994) afirman que la regresión de este órgano comienza cuando la larva puede coordinar los movimientos musculares de su cola y alimentarse libremente, para lo cual se necesita que el disco oral se haya desarrollado completamente, lo que no se observa aún en el estadio 25 en las larvas de *P. biligonigerus*. En larvas de *S. intermontanus* y de *L. chaquensis*, la regresión de esta estructura se inicia en el estadio 22 y 24 respectivamente, estadios en los que el disco oral de estas larvas ya está completamente formado.

**Disco Oral:** según Gosner (1960), el disco oral comienza a diferenciarse aproximadamente en el estadio 23, alcanzando su forma definitiva por el estadio 26. La Tabla 1 resume en forma comparativa los principales acontecimientos por estadios de la formación del disco oral en *P. biligonigerus* y en las otras especies consideradas en este trabajo.

**Tabla 1:** Principales acontecimientos por estadios de la formación del disco oral en *P. biligonigerus* y en otras especies consideradas en este trabajo (Fiorito de López y Echeverría, 1989; Tubbs et al., 1993; Hall et al., 1997). \*Observaciones personales.

	<i>Physalaemus biligonigerus</i>	<i>Leptodactylus chaquensis</i> *	<i>Bufo arena-rum</i>	<i>Bufo ameri-canus</i>	<i>Scaphiopus intermontanus</i>
Esbozo del disco oral	21	21	20	20	20
Crestas dentarias bien definidas	23 (excepto el correspondiente a AR-2)	22	22	20	24
Vainas mandibulares bien definidas pero lisas	23	22	22	21	22
Vainas mandibulares aserradas	25	24	24	24	25
Emergencia de los	25	24	25	24	26

---

**dientes labiales**

---

Por otra parte, hasta el estadio 25 de *P. biligonigerus* la cresta dentaria PR-1 permanece como dos crestas separadas, coincidiendo con la fórmula dentaria de *P. santafecinus* dada por Perotti y Céspedes (1999). Sin embargo, observaciones personales de estadios posteriores al 25 de *P. biligonigerus* la fórmula dentaria se ajusta a la brindada por Cei (1980) para la misma especie, 1,1-1/2. De acuerdo a esto, ambas crestas pertenecientes a PR-1 se fusionarían en estadios posteriores al 25, originando un pliegue entero con una muesca media a nivel de la interrupción observada en los estadios prometamórficos.

**BIBLIOGRAFÍA**

- ALTIG, R. and R.W. Mc DIARMID, 1999. Body Plan. Development and Morphology. Pp. 24-51. In: Mc Diarmid and Altig (eds.): *Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae*. The University of Chicago Press. Chicago and London. 348 p.
- CEI, J.M., 1980. Amphibians of Argentina. *Monit. Zool. Ital.* (N.S.) Monogr., 2: 609 p.
- DUELLMAN, W.E. and L. TRUEB, 1994. *Biology of Amphibians*. The Johns University Press: 670 p.
- FIORITO de LÓPEZ, L.E. y D.D. ECHEVERRÍA, 1989. Microanatomía e histogénesis del aparato bucal en las larvas de *Bufo arenarum* (Anura, Bufonidae). *Cuad. Herpetol.*, 4 (2): 4-10.
- GOSNER, K.L., 1960. A simplified Table for stating anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetológica*, 16: 183-190.
- HALL, J.A.; J.H. LARSEN, JR. and R.E. FITZNER, 1997. Postembryonic ontogeny of the spadefoot toad, *Scaphiopus intermontanus* (Anura: Pelobatidae): External morphology. *Herpetological Monographs*, 11: 124-178.
- LAVILLA, E.O. y M. ROUGÉS, 1992. Reproducción y desarrollo de anuros argentinos. Serie Divulgación N° 5, A.H.A., 5: 1-66.
- MARINELLI, M.; S. TEI; D. VAGNETTI and M.P. SENSI, 1985. SEM observation on the development and the regression of the oral disc of *Bufo vulgaris* larva. *Acta Embryol. Morphol. Exp.*, 6: 31-39.
- PEROTTI, M.G. and J.A. CÉSPEDez, 1999. The tadpole of *Physalaemus santafecinus*, with Comments on Buccopharyngeal Morphology. *J. Herpetol.*, 33 (2): 312-315.

- TAKAHAMA, H.; F. SASAKI; T. TACHIBANA; H. ISEKI; T. KINOSHITA and K. WATANABE, 1987. Fine structure and degeneration of the horny teeth and the epidermis of the labial ridge of the anuran tadpole. *Tsurumi Univ. Dental J.*, 13: 49-63.
- THIBAudeau, D.G. and R. ALTIG, 1988. Sequence of ontogenetic development and atrophy of the oral apparatus of six anuran tadpoles. *J. Morphol.*, 197: 63-69.
- TUBBS, O.E.; R. STEVENS; M. WELLS and R. ALTIG, 1993. Ontogeny of the oral apparatus of the tadpole of *Bufo americanus*. *Amphibia-Reptilia*, 14: 333-340.

*Recibido/Received/: 08-Oct-03*  
*Aceptado/Accepted/: 26-Nov-03*