

UCH-FC
MAG-B
I 91
C.2

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS Y FARMACEUTICAS

IDENTIFICACION DE UN SISTEMA CROMOSOMICO DE
DETERMINACION DEL SEXO XY/XX EN ANUROS
(AMPHIBIA-LEPTODACTYLIDAE)

PATRICIA ITURRA CONSTANT

- 1983 -

IDENTIFICACION DE UN SISTEMA CROMOSOMICO DE
DETERMINACION DEL SEXO XY/XX EN ANUROS
(AMPHIBIA-LEPTODACTYLIDAE)

Tesis

entregada a la

Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Magister en Ciencias Biológicas

con mención en Genética

por

PATRICIA ITURRA CONSTANT

Patrocinante de Tesis: Dr. Alberto Veloso Martínez

1983

FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS Y FARMACEUTICAS
UNIVERSIDAD DE CHILE


INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Post-Grado de la Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magister presentada por la candidata


IRIS PATRICIA ITURRA CONSTANT

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para el Grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Genética

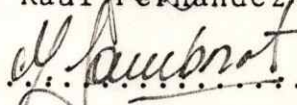
Patrocinante de Tesis


.....
Dr. Alberto Veloso M.

Comisión Informante de Tesis


.....
Dra. Liliana Cardemil O.


.....
Dr. Raúl Fernández-Donoso


.....
Prof. Madeleine Lamborot Ch.

.....

A mis padres

A G R A D E C I M I E N T O S

Al Dr. Alberto Veloso M., por su generosidad, permanente estímulo y valiosa crítica en la realización de esta tesis.

A mis amigos y colegas de la Unidad de Biología de Vertebrados. En especial a José Navarro por su paciencia y apoyo en todo momento.

Al Dr. Hugo Campos y Lic. R. Formas por las facilidades para la realización del trabajo de terreno.

A los colegas del Departamento de Biología Celular y Genética, en especial a Carlos Valenzuela y Julieta González.

A Víctor Leyton por sus valiosos comentarios en algunos aspectos de esta tesis.

Al Sr. Héctor Muñoz por su ayuda técnica en el trabajo fotográfico y a la Srta. Julia Palma por la transcripción de este manuscrito.

Esta tesis ha sido parcialmente financiada por el Proyecto N-922-8345 del Departamento de Desarrollo de la Investigación, Universidad de Chile del Dr. A. Veloso M.

I N D I C E D E M A T E R I A S

	PAG.
A. PAGINAS PRELIMINARES	
Página de título	i
Informe de aprobación	
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Índice de Materias	iv
Lista de tablas	vi
Lista de figuras	vii
Resumen	x
B. PAGINAS DE TEXTO	
INTRODUCCION	1
MATERIALES Y METODOS	
Antecedentes y colectas de las especies en estudio	11
1. Determinaciones cromosómicas	12
2. Estudio de la meiosis	15
3. Cariotipos de larvas y análisis histo- lógico de la gónada en diferenciación	18

INDICE DE MATERIAS (CONT.)

	PAG.
RESULTADOS	
Cariotipos	20
Meiosis	38
Cariotipos de las larvas y diferen- ciación de la gónada	55
DISCUSION	66
Apareamiento meiótico del par sexual	68
Diferenciación del par sexual	73
Sistemas de determinación del sexo en los anuros	77
Sexo cromosómico y sexo gonadal	79
CONCLUSIONES	82
BIBLIOGRAFIA	84

L I S T A D E T A B L A S

	PAG.
1. Resumen de las medidas cromosómicas de <i>E. migueli</i> .	23
2. Resumen de las medidas cromosómicas de <i>E. roseus</i> .	24

L I S T A D E F I G U R A S

	PAG.
1. Placas metafásicas y cariotipos de hembra y macho de <i>E. migueli</i> . Identificación del par sexual con tinción de Giemsa.	25
2. Placas metafásicas y cariotipos de hembra y macho de <i>E. roseus</i> con tinción de Giemsa.	27
3. Identificación del cromosoma Y por el método de bandas C en el cariotipo de <i>E. migueli</i> .	31
4. Identificación del cromosoma Y por el método de bandas C en el cariotipo de <i>E. roseus</i> .	33
5. Placas metafásicas de ejemplares machos con tinción de mostaza de quinacrina (bandas Q).	36
6. Microfotografías de cortes histológicos de testículo de <i>E. roseus</i> y de <i>E. migueli</i> . Etapas de la espermatogénesis reconocidas por morfología del núcleo.	42

7. Identificación del par XY en *E. roseus* en núcleos en profase meiótica. Tinción con Giemsa. 44
8. Identificación del par XY de *E. roseus* por el método de bandas C en núcleos en paquitenos. 46
9. Núcleos de *E. migueli* en profase meiótica. Identificación del par XY por el método de bandas C. 48
10. Estructura cromatínica en forma de "pinza" en núcleos meióticos de *E. migueli*. 50
11. Identificación del NOR y nucléolo en núcleos en profase meiótica de *E. migueli*. Tinción de Ag. 52
12. Diaquinesis y metafases II de ejemplares de *E. roseus* y *E. migueli*. 53

13. Placas metafásicas correspondientes a larvas hembras y machos de *E. migueli*. Tinción con Orceína acética. 58
14. Microfotografía de cortes histológicos de gónadas indiferenciadas de larvas en estado 34/35 de Gosner de *E. migueli*. Tinción hematoxilina-eosina. 60
15. Microfotografía de cortes histológicos de la gónada de renacuajos de *E. roseus* en estado 41. Tinción hematoxilina-eosina. 62
16. Microfotografías de cortes histológicos de gónadas diferenciadas de ejemplares recién metamorfoseados de *E. migueli*. Tinción hematoxilina-eosina. 64
17. Esquema del apareamiento del par sexual (XY) en la meiosis. 71
18. Diferenciación del par sexual en *Eupsophus*. 75

RESUMEN

El problema central de esta tesis es la identificación de un sistema cromosómico de determinación del sexo en *E. migueli* y en *E. roseus*, anfibios anuros de la familia Leptodactylidae.

La descripción del cariotipo, que incluye número y morfología cromosómica de ejemplares adultos y preadultos y el análisis del complemento cromosómico mediante las técnicas de bandeo cromosómico permitió identificar un sistema XY/XX en ambas especies.

En *E. roseus* los cromosomas X e Y se caracterizan por presentar diferencias en la cantidad de heterocromatina constitutiva pericentromérica, en tanto que, en *E. migueli* son, además, heteromórficos.

El mecanismo responsable de la diferenciación de los heterocromosomas en *Eupsophus* sería un cambio en la cantidad de heterocromatina constitutiva pericentromérica. Conjuntamente con este mecanismo, también ocurren reordenamientos cromosómicos que dan como resultado cambios es

estructurales que contribuyen a la diferenciación de este par sexual.

El análisis de la meiosis en los machos, realizado con microscopio de luz, proporciona evidencias de que el tipo de apareamiento de los cromosomas sexuales es completo en ambas especies. No hay formación de vesícula sexual y tampoco es claramente evidente que presenten un ciclo de condensación diferente de los autosomas. Los heterocromosomas en *Eupsophus* estarían en un estado inicial de diferenciación.

Al establecer la correspondencia entre sexo cromosómico y sexo gonadal en etapas tempranas del desarrollo larval se determinó que la diferenciación de la gónada en *Eupsophus* es un proceso que ocurre en etapas tardías del desarrollo con respecto a otras especies de anuros. En *E. roseus* la diferenciación de la gónada correspondiente al sexo heterogamético precede a la del sexo homogamético.

I N T R O D U C C I O N

Los cromosomas sexuales o heterocromosomas en un cariotipo tienen características especiales que los distinguen de los autosomas. El par sexual es generalmente heteromórfico en uno de los sexos, como se observa en la mayoría de los mamíferos y aves estudiados. Los sistemas cromosómicos de determinación del sexo corresponden a dos categorías básicas según si es el macho o la hembra el sexo heterogamético. De acuerdo con la nomenclatura convencional, el primer caso corresponde a un sistema XY/XX y el segundo a un sistema ZZ/ZW.

Cuando se distinguen cromosomas sexuales en el cariotipo de las especies de un determinado taxon, es posible distinguir desde la condición de isomorfismo hasta un marcado heteromorfismo en este par cromosómico en uno de los sexos.

En los Vertebrados, el establecimiento de un par de cromosomas sexuales sería el resultado de la acumulación gradual de genes o grupos de genes determinantes del sexo heterogamético en uno de los componentes de un par isomórfico de autosomas (1). La diferenciación del par sexual requieu

re que durante la meiosis se restrinja la recombinación genética entre los dos homólogos del sexo heterogamético (1).

En peces y anfibios existe control genotípico de la determinación del sexo como ha sido demostrado en *Oryzias latipes* y *Xenopus laevis*, mediante cruzamientos experimentales con ejemplares de sexo revertido por acción de hormonas (2,3). En estas especies todos los pares homólogos del cariotipo son isomórficos lo que ha permitido señalar que en estas taxa los cromosomas sexuales se encontrarían en un estado primitivo de diferenciación.

En los reptiles, hay un paralelismo entre la posición taxonómica de los distintos grupos de culebras y el grado de diferenciación morfológica de los cromosomas sexuales. Las especies de la familia Boidae, de acuerdo a caracteres osteológicos son primitivas y al mismo tiempo, no presentan cromosomas sexuales reconocibles citológicamente (4). Las formas más avanzadas de culebras como Elapidae y Viperidae tienen cromosomas sexuales bien diferenciados tanto en tamaño como en morfología. Una posición intermedia la ocupan los Colubridae, que a su vez, presentan la mayor variación interespecífica en la morfología del par sexual. Todas las especies de culebras con determinación cromosómica del

sexo presentan un sistema ZZ/ZW cuyo par sexual corresponde generalmente al par 4 ó 5 del cariotipo, ordenados los cromosomas según tamaño.

Los mecanismos propuestos que explicarían la diferenciación del par sexual en los Vertebrados, se basan principalmente en los estudios comparados del cariotipo de culebras.

En Colubridae hay especies en las cuales las hembras presentan un par heteromórfico formado por cromosomas de igual tamaño, pero que difieren en la posición del centrómero. Esto se explicaría como resultado de una inversión pericéntrica en uno de los miembros del par, dando origen al cromosoma W (4). Los cambios en la morfología cromosómica debidos principalmente a inversiones pericéntricas podrían restringir la recombinación genética entre ambos homólogos, favoreciendo una posterior diferenciación estructural del cromosoma que define el sexo heterogamético (1).

Un segundo mecanismo propuesto es la heterocromatinización del cromosoma W. El establecimiento de alo-ciclia de uno de los cromosomas del par sexual podría reducir la recombinación entre ambos (5).

En esta tesis, el término "heterocromatinización" se utiliza según White (6) pp. 777: "cambios evolutivos graduales de segmentos cromosómicos eucromáticos en heterocromáticos, como ha ocurrido, por ejemplo, en el cromosoma Y de muchos sistemas neo X-Y". En esta tesis, la heterocromatina que se reconoce en los cromosomas como resultado de este proceso, corresponde a heterocromatina constitutiva, revelada por el método de tinción cromosómica de bandas C. La base molecular de la diferenciación del cromosoma W por heterocromatinización sería la existencia de un ADN satélite que ha sido determinado en el cromosoma W de diversas especies de culebras y en otros vertebrados, el que originaría asincronía en la replicación del cromosoma W, reduciendo la recombinación entre los miembros del par ZW. Los cambios morfológicos de este cromosoma serían posteriores a este proceso (7).

En lagartos se han identificado cromosomas sexuales en 7 de las 15 familias en que estos se agrupan. A diferencia de las culebras, en los lagartos están representados los sistemas cromosómicos XY/XX y ZZ/ZW. Los heterocromosomas corresponden a distintos pares en las diferentes especies. El mecanismo que ocurriría con más frecuencia en la diferenciación de los cromosomas sexuales en estas especies también sería la heterocromatinización (8).

Los anuros son un grupo en el cual la existen

cia de heterocromosomas ha sido muy discutida. En la búsqueda de sus cromosomas sexuales se ha utilizado principalmente la identificación de un par heteromórfico en uno de los sexos, lo que ha permitido señalar la existencia de heterocromosomas en alrededor de 15 especies. Sin embargo, las evidencias presentadas son, en algunos casos, insuficientes y en otros, los estudios posteriores no han confirmado los hallazgos (9,10,11,12,13,14). Sólo en *Pyxicephalus adspersus* de la familia Ranidae se han identificado recientemente cromosomas sexuales bien diferenciados, correspondiendo a un sistema ZZ/ZW. En la hembra el cromosoma W es submetacéntrico y aproximadamente de la mitad del tamaño del cromosoma Z que es metacéntrico (15).

La determinación de asincronía de la replicación de algún par cromosómico mediante autorradiografía y los estudios de la meiosis en machos de varias especies de Bufonidae, Hylidae y Leptodactylidae tampoco han permitido identificar cromosomas sexuales en este grupo (14,16,17,18).

Entre los anfibios anuros que se distribuyen en Chile, el mayor número de especies representadas pertenecen a la familia Leptodactylidae, en especial a la subfamilia Telmatobiinae. Esta consta aproximadamente de 25 espe-

cies agrupadas en 8 géneros (19). El conjunto de estas especies son representantes actuales de una fauna de leptodactílicos ya diversificados en el Terciario Inferior de la Patagonia (20). En la radiación de los telmatobinos están representadas, entre otras, las especies del género *Eupsophus* (20).

En este género, escasamente diversificado, se reconocen 4 especies: *E. roseus* (Duméril y Bibron, 1841), *E. migueli* Formas, 1978, *E. vittatus* (Philippi, 1902), y *E. calcaratus* (Gunther, 1881) (21), todas ellas son endémicas y restringidas en su distribución al Bosque Temperado Austral del Sur de Chile. La antigüedad de este género está avalada por la existencia de fósiles semejantes a las formas actuales (22). En estas especies es posible reconocer, además, caracteres bioquímicos primitivos en la filogenia del Orden (19) y una fórmula cromosómica indicadora de su primitividad en la subfamilia Telmatobiinae (23).

E. roseus y *E. migueli* se caracterizan por ser morfológicamente muy similares entre si aunque pueden distinguirse por el color del iris y el patrón de coloración ventral (24). El cariotipo de *E. roseus* tiene un número diploide ($2n$) de 30 cromosomas, formado por 8 pares de cromosomas.

somas bibraquiados y 7 pares telocéntricos, con un Número Fundamental de Brazos (NF) de 46 (25,26). *E. migueli* también presenta un $2n = 30$, pero con 7 pares bibraquiados y 8 telocéntricos, con un NF = 44 (24). Conjuntamente con la similitud cromosómica, el análisis electroforético indica un alto Índice de Similitud Genética entre ambas especies (27). El cariotipo de *E. calcaratus* es similar al de *E. roseus* (21). *E. vittatus* presenta un cariotipo diferente con 28 cromosomas principalmente bibraquiados con un NF = 52 (Iturra, obs. pers.).

En la descripción del cariotipo de estas especies no se ha señalado la presencia de cromosomas sexuales (24,25,26).

Al analizar los cromosomas de un número pequeño de ejemplares de *E. migueli* encontramos que los machos presentan un cariotipo con un NF = 45. La diferencia con el previamente descrito (24) consiste en la presencia de un cromosoma metacéntrico pequeño, que no está presente en el cariotipo de las hembras estudiadas y que sólo puede ser apareado con un cromosoma telocéntrico.

La presencia de un par heteromórfico sólo en los machos de *E. migueli* sugiere fuertemente la existencia

de heterocromosomas y de un posible sistema de determinación del sexo XY/XX en esta especie.

La identificación del par cromosómico heteromórfico presente en los machos de *E. migueli* como par sexual y la determinación de características del comportamiento de este par en la meiosis que correspondan a un par de heterocromosomas constituyen el objetivo principal de esta tesis.

La ausencia de un par heteromórfico en el cariotipo de las restantes especies de *Eupsophus* no descarta que en éstas posiblemente existan heterocromosomas. Un segundo objetivo de esta tesis será intentar determinar en *E. roseus* la presencia de un par cromosómico con características correspondientes a un par de heterocromosomas. Elegimos esta especie por que presenta un cariotipo morfológicamente similar a *E. migueli*, pero sin diferencias cromosómicas entre los sexos. De esta forma, se busca extender a esta especie genéticamente relacionada con *E. migueli* la identificación del sexo heterogamético y de los mecanismos cromosómicos de determinación del sexo.

Dadas las escasas y a veces contradictorias evidencias sobre la existencia de cromosomas sexuales en anu

ros, esta tesis puede ser una contribución al conocimiento de los mecanismos cromosómicos de determinación del sexo en este taxon.

En la identificación de heterocromosomas en el cariotipo de una especie se acepta generalmente como identificación de un par sexual el reconocimiento, en placas metafásicas mitóticas, de un par cromosómico heteromórfico sólo en uno de los sexos (28). En esta tesis se utilizarán además, técnicas de bandeo cromosómico que proporcionan un mayor número de elementos de la estructura cromosómica para la comparación y reconocimiento de homología cromosómica. En estas especies también es posible realizar el estudio cromosómico en ejemplares en desarrollo. Un apoyo a la evidencia de cromosomas sexuales en estas especies, sería el establecimiento de la correspondencia entre el cariotipo de las larvas, determinado en etapas iniciales del desarrollo, y el sexo de la gónada, identificado en estos mismos ejemplares desarrollados en el laboratorio.

El análisis de la meiosis también podría evidenciar los heterocromosomas en el cariotipo de estas especies (28). En general, los cromosomas sexuales presentan algunas características particulares de condensación de la cro

matina y de su apareamiento durante la meiosis que los diferencian de los autosomas. En esta tesis, el estudio de la meiosis de los machos de *E. migueli* permitiría determinar si el par heteromórfico, reconocible por morfología y tamaño en algunas etapas de este proceso, presenta alguna de las características señaladas para los heterocromosomas.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O SANTECEDENTES Y COLECTA DE LAS ESPECIES EN ESTUDIO

E. roseus y *E. migueli* son sapos de pequeño tamaño (40 a 60 mm) y de hábitos nocturnos. Durante el día se les puede encontrar entre la hojarasca bajo troncos en descomposición. *E. roseus* está ampliamente distribuido en el Bosque Temperado, en tanto que, de *E. migueli* sólo se conocen ejemplares de Mehuin (39°26' S; 73°10' O), que es la localidad tipo.

Para su colecta se realizaron excursiones a Valdivia (Parque La Saval) y a Mehuin durante los meses de Julio y Septiembre que corresponden aproximadamente al período reproductor de ambas especies. De esta manera, se facilitó la captura de ejemplares en distintas etapas del desarrollo. En Valdivia se recolectaron ejemplares adultos y 6 renacuajos de *E. roseus* y en Mehuin, adultos y recién metamorfoseados de *E. migueli*.

En dos excursiones distintas en Mehuin se encontraron 2 puestas de alrededor de 45 embriones cada una, bajo una piedra y en suelo muy húmedo. La observación de un ejemplar macho de *E. migueli* junto a cada una de las puestas

permitió suponer que se trataba de puestas de esta especie. En el laboratorio se logró el desarrollo de larvas de sólo una de estas puestas, una vez que se acondicionaron en la oscuridad, a temperatura ambiente y se utilizó agua proveniente del mismo lugar de colecta. El estado del desarrollo larval fue determinado según la tabla de Gosner (29).

Todos los ejemplares adultos estudiados están depositados en la Colección de Anfibios de la Unidad de Biología de Vertebrados del Departamento de Biología Celular y Genética de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile (DBGUCH).

1. DETERMINACIONES CROMOSOMICAS

En todos los ejemplares de *E. migueli* y de *E. roseus* estudiados cromosómicamente se determinó el sexo de la gónada por disección bajo la lupa.

1.1. Cromosomas metafásicos mitóticos

La obtención de cromosomas de los ejemplares adultos se realizó del epitelio del intestino y bazo en animales inyectados previamente con colchici-

na (Sigma), al 0,5% durante 12 a 18 horas. La dosis utilizada fue de 0.5 mg de colchicina por gr. de peso.

Procedimiento: a) los trozos pequeños de intestino, fueron lavados y posteriormente se colocaron en agua destilada fría (hipotonía) durante 15 min. Al utilizar bazo, el tiempo de hipotonía fue de 45 min.; b) la fijación se realizó en ácido acético al 50% durante 15 min.; c) el epitelio del intestino se raspó sobre un portaobjetos limpio colocándose un cubreobjetos sobre la muestra; d) una vez eliminadas las burbujas se afirmó el preparado con papel absorbente y se hizo presión con el pulgar; e) el preparado se colocó en un baño de alcohol con hielo seco por 10 min. y el cubreobjetos se desprendió con una hoja de afeitar.

1.2. Tinciones

Las tinciones utilizadas fueron los métodos de Giemsa y de bandeo cromosómico. La utilización de un conjunto de métodos de bandeo cromosómico permite reconocer en los cromosomas diferentes características de la cromatina que forma parte de su es-

estructura, además de proporcionar un mayor número de elementos para las comparaciones cromosómicas (30).

- 1.2.1. Método de Giemsa: a) las preparaciones se tiñeron durante 10 min. en solución Giemsa (Merck) al 4% y pH 7.2 (94 ml. de H₂O destilada, 2 ml. de tampón fosfato: Na₂HPO₄ y KHPO₄ 0.06 M); b) se deshidrataron en acetona y xilol; c) se cubrieron con Histoclad.
- 1.2.2. Método de bandas C: este método permite identificar la heterocromatina constitutiva (HC) en los cromosomas (31). Se utilizó el método BSG (32) sin incubar la preparación en HCl 0.2 M. Los tiempos de la incubación en Ba (OH)₂ fueron variables, aumentando desde los 12 min. a medida que el tiempo de envejecimiento de la preparación era mayor.
- 1.2.3. Método de bandas Q: este método identifica la composición de bases nitrogenadas del ADN que subyace a la estructura cromosómica. Las preparaciones se colocaron en solución de mostaza de quinaquina (Sigma) 0.05 mg/ml en tampón Mc Ilvaine pH 5.5 durante 10 a 20 min.; b) se lavaron dos veces

en agua corriente; c) se cubrió en tampón Mc Ilvaine pH 5.5. Las observaciones y microfotografías se hicieron en un microscopio Zeiss con el siguiente juego de filtros: excitador BP 436/8, seleccionador cromático FT 460 y de barrera LP 475.

1.2.4. Métodos de la plata amoniacal: se utilizó el método de Quack y Noel (33) con una modificación que consistió en incubar en cámara húmeda y en estufa a 60°C durante 10 min. la preparación con AgNO_3 al 33%. Este método es un procedimiento que identifica la zona organizadora del nucléolo (NOR) en los cromosomas y además, tiñe los cromosomas sexuales en la vesícula sexual en núcleos de espermatoцитos humanos. También se utilizó el método de Rufas y cols. (34) que identifica el NOR y el nucléolo.

2. ESTUDIO DE LA MEIOSIS

El reconocimiento del par sexual en *E. migueli* y *E. roseus* en la meiosis requiere de la identificación de las principales etapas de este último proceso.

Para ello, se realizaron cortes histológicos de testículo para microscopía de luz.

Los núcleos y los cromosomas meióticos se obtuvieron por suspensión celular y aplastado de testículo que luego fueron sometidos a diferentes tinciones.

2.1. Cortes histológicos: los testículos de *E. migueli* se fijaron en Dubosq-Brasil por 12 horas. Los ejemplares utilizados fueron DBGUCH N° 0521, 0523, 0525, 1208 y de *E. roseus* N° 1202, 1207 y 1210. Se utilizó el método corriente de inclusión en parafina (Paraplast) en estufa al vacío. Antes de la inclusión se dejaron las muestras en solución de Pterfi (Parlodiól 4%-benzoato de Metilo) por 48 horas. Los cortes de 5 μ m se obtuvieron en micrótomó Leitz.

2.2. Suspensiones celulares de testículo: se realizaron dos procedimientos para obtener núcleos y cromosomas meióticos.

2.2.1. a) el testículo se cortó con tijeras finas y se disgregó con bisturí y pipeta Pasteur en solución de T.C. Hanks (Difco) a temperatura ambien-

te; b) se centrifugó a 800 r.p.m. durante 5 min.; c) se eliminó el sobrenadante y se agregó KCl 0.075 de M durante 20 min. (hipotonía); d) se centrifugó y luego se fijó en metanol ácido acético (3:1) durante 20 min.; e) se hicieron dos o tres lavados en fijador; f) sobre portaobjetos limpios se confeccionaron las preparaciones por goteo y se dejaron secar al aire.

2.2.2. a) el testículo se disgregó directamente en solución hipotónica (KCl 0.075 M con dos gotas de formalina al 1%); b) se dejó reposar en un tubo centrífuga durante 30 min.; c) los pasos siguientes se realizaron igual que en 2.2.1.

2.3. Aplastado de testículo: el procedimiento es el descrito para obtener cromosomas mitóticos de intestino (1.1.).

2.4. Tinciones: se utilizaron los métodos de tinción con Giemsa, bandas C, bandas Q, Ag-ASNOR, Feulgen y tinción con Ag. Los procedimientos de tinción con Giemsa y bandeos cromosómicos son los descritos en 1.2.1.; 1.2.2.; 1.2.3. y 1.2.4.

- 2.4.1. Tinción de Feulgen: la hidrólisis se realizó con HCl 4N a 20°C durante 60 min. La tinción con reactivo de Schiff se realizó durante 1 hora.
- 2.4.2. Tinción con Ag: se utilizó el método de Pathak y Elder que permite identificar al microscopio de luz, el complejo sinaptonémico en citos I como también el par sexual. Este método fue descrito para mamíferos (35).
- 2.4.3. Mediciones de los cromosomas meióticos: estas mediciones se realizaron sobre los cromosomas que fueron dibujados en cámara clara a partir de ampliaciones fotográficas.

3. CARIOTIPOS DE LARVAS Y ANALISIS HISTOLOGICO DE LA GONADA EN DIFERENCIACION

- 3.1. a) las placas metafásicas se obtuvieron cortando el extremo de la cola de cada larva; b) la muestra se dejó en solución de colchicina al 0.5% durante 2 horas; c) se dejó en hipotonía en H₂O destilada durante 30 min.; d) la muestra se colocó en un portaobjetos y se fijó con dos gotas de ácido acético al 75% y se tiñó con orceina acética al 1,25% durante 6

min.; e) se realizó el aplastado; f) se observó y fotografió en un microscopio de contraste de fases Leitz Orthoplan.

3.2. El análisis histológico de la gónada se realizó en las larvas cuyos cariotipos habían sido determinados previamente; en 6 ejemplares de *E. roseus* en el estado 41 y en 2 ejemplares recién metamorfoseados de *E. migueli*, colectados en la naturaleza, sin diferenciación macroscópica del sexo gonadal. Las larvas y los renacuajos de *E. roseus* se fijaron completos en Dubosq-Brasil durante 12 horas. A los recién metamorfoseados de *E. migueli* se les extrajo la gónada junto con el mesonefros y fue utilizado el mismo procedimiento de fijación ya señalado. La inclusión se realizó según el procedimiento descrito en 2.1. En este material se realizaron cortes seriados longitudinales y transversales de 6 a 7 um. La tinción utilizada fue hematoxilina-eosina.

RESULTADOS

CARIOTIPOS

El número de ejemplares adultos estudiados fue de 22 hembras y 22 machos de *E. migueli* y de 22 hembras y 8 machos de *E. roseus*. En cada caso se observaron por lo menos 10 placas metafásicas, teñidas con el método de Giemsa, en las cuales se determinó el número diploide y se contó el número de cromosomas metacéntricos. De cada ejemplar se fotografiaron 2 placas metafásicas. Para determinar su morfología y tamaño relativo en el cariotipo, las mediciones de los cromosomas se realizaron sobre ampliaciones fotográficas de dos placas metafásicas por ejemplar de 3 machos y 3 hembras de cada especie.

E. migueli tiene un número diploide de 30 cromosomas, los que ordenados según tamaño decreciente presentan la siguiente morfología: pares 1,7,8,9 y 12 son metacéntricos (m), par 2 submetacéntrico (sm), par 3 subtelocéntrico (st) y pares 4,5,6,10,11,13 y 15 telocéntricos (t) (Tabla 1).

La constricción secundaria (CS) está presente en el brazo corto, próxima al centrómero del par 2. La longitud de la CS puede ser diferente entre ambos homólogos tanto en machos como en hembras (Fig. 1,a).

El par 14 es diferente entre machos y hembras. En los machos es heteromórfico y está formado por un cromosoma metacéntrico y uno telocéntrico del mismo tamaño. En las hembras, el par 14 es en tanto telocéntrico. Hay diferencia entre los sexos con respecto al Número Fundamental de Brazos (NF). Los machos tienen un NF = 45 y las hembras un NF = 44. Los resultados indicarían que el macho es el sexo heterogamético en esta especie (Fig. 1).

E. roseus tiene un número diploide de 30 cromosomas y NF = 46. En este cariotipo no se observaron diferencias con el previamente descrito para la especie (24,25). Los cromosomas ordenados según tamaño decreciente presentan la siguiente morfología: pares 1,7,8,9,12 y 14 son m, par 2 sm, par 3 st y pares 4,5,6,10,11,13 y 15 son t (Tabla 2). La CS se localiza en el par 2 y está próxima al centrómero. Al igual que en *E. migueli*, la longitud de esta CS puede ser diferente al comparar ambos cromosomas del par (Fig. 2,b).

El par 14 está formado por cromosomas metacéntricos pequeños sin diferencias morfológicas evidentes tanto en machos como en hembras (Fig. 2).

T A B L A 1

RESUMEN DE LAS MEDIDAS CROMOSOMICAS DE *E. migueli*

Par Cromosómico	Tamaño %	r ± ES	Tipo Cromosómico
1	20.05	1.19 ± 0.01	m
2	14.36	2.22 ± 0.12	sm
3	10.24	4.25 ± 0.13	st
4	7.57	∞	t
5	6.27	∞	t
6	5.74	∞	t
7	5.61	1.32 ± 0.03	m
8	5.09	1.37 ± 0.05	m
9	4.64	1.31 ± 0.04	m
10	4.47	∞	t
11	4.14	∞	t
12	3.66	1.16 ± 0.02	m
13	3.23	∞	t
14	2.69	∞	t
		1.22 ± 0.05	m
15	2.25	∞	t

r ± ES = índice centromérico; ± = error estandar

m = metacéntrico; sm = submetacéntrico; st = subtelocéntrico;
t = telocéntrico

El tamaño de cada par cromosómico está expresado como porcentaje (%) del set haploide.

T A B L A 2

RESUMEN DE MEDIDAS CROMOSOMICAS DE *E. roseus*

Par Cromosómico	Tamaño %	r ± ES	Tipo Cromosómico
1	20.42	1.11 ± 0.03	m
2	12.61	2.39 ± 0.26	sm
3	12.17	4.44 ± 0.27	st
4	7.51	∞	t
5	6.03	∞	t
6	5.76	∞	t
7	5.72	1.26 ± 0.06	m
8	5.23	1.37 ± 0.08	m
9	4.51	1.42 ± 0.04	m
10	4.31	∞	t
11	3.95	∞	t
12	3.56	1.19 ± 0.04	m
13	3.17	∞	t
14	2.74	1.28 ± 0.08	m
15	2.37	∞	t

r ± ES = índice centromérico; ± = error estandar

m = metacéntrico; sm = submetacéntrico; st = subtelocéntrico;

t = telocéntrico

El tamaño de cada par cromosómico está expresado como porcentaje (%) del set haploide.

Figura 1: Placas metafásicas y cariotipos de hembra y macho de *E. migueli*. Identificación del par sexual con tinción de Giemsa.

a y b hembras DBGUCH 0520 y 1219

c y d machos DBGUCH 0537 y 1194

Las flechas señalan el par 14; * constrictión secundaria. La barra corresponde a 10 um.

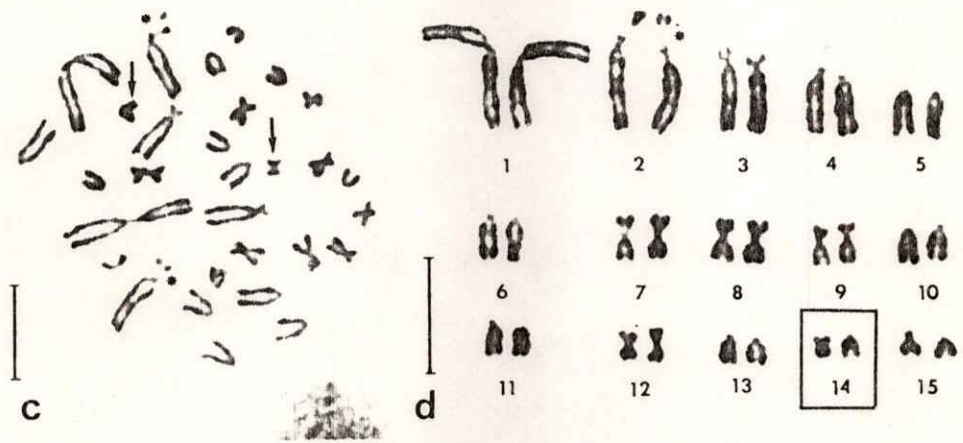
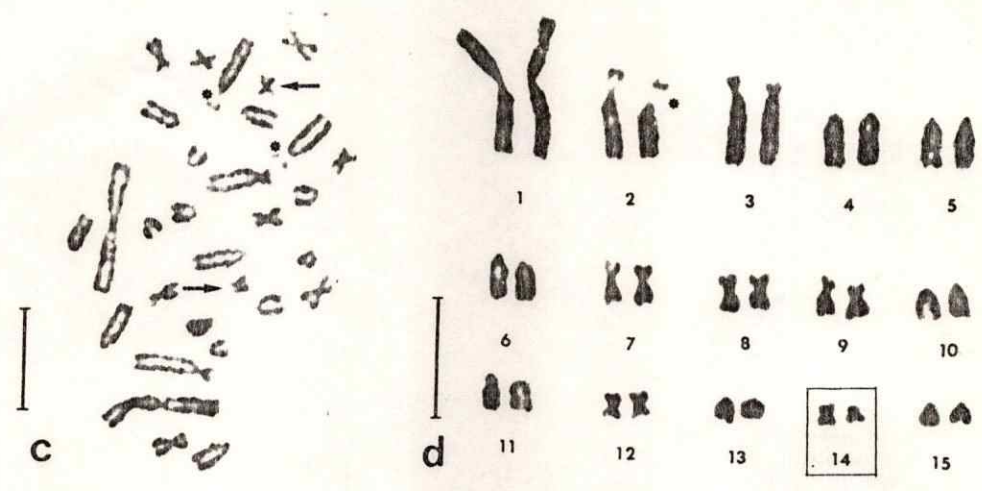
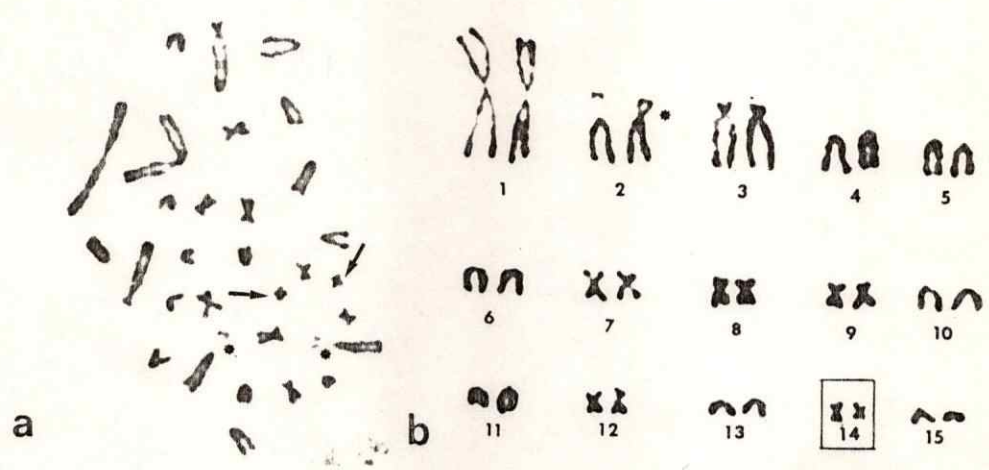


Figura 2: Placas metafásicas y cariotipos de hembra y macho de *E. roseus*, con tinción de Giemsa.
a y b hembras DBGUCH 0552 y 0544
c y d machos DBGUCH 1210 y 1231
Las flechas señalan el par 14; * constricción secundaria. La barra corresponde a 10 um.



DISTRIBUCION DE LA HETEROCROMATINA CONSTITUTIVA (HC)

Se examinaron, por lo menos, 6 placas metafásicas teñidas con el método de bandas C de 6 ejemplares de cada sexo en *E. migueli* y *E. roseus*.

Las hembras de *E. migueli* muestran en todos sus cromosomas una banda C pericentromérica. En el brazo largo de los cromosomas que forman los pares 1,2,3 y 4 hay una banda C telomérica, teñida menos intensamente que la pericentromérica respectiva. En algunos ejemplares, tanto machos como hembras, el par 1 puede presentar diferencias entre los homólogos con respecto a la intensidad de la banda C pericentromérica (Fig. 3,a).

En los machos, la distribución de la HC en el cariotipo es similar a la de las hembras, a excepción del cromosoma metacéntrico que forma el par 14. Este cromosoma, propio del macho, es el único que no presenta una banda C pericentromérica, lo que permite distinguirlo del conjunto de los restantes cromosomas metacéntricos pequeños del cariotipo (Fig. 3,b).

En *E. roseus* la distribución de HC en los cromosomas es similar a la descrita en *E. migueli*. En los ma-

chos, el par 14 muestra uno de sus cromosomas metacéntricos sin HC pericentromérica. Esta característica lo hace similar al cromosoma propio del macho de *E. migueli*. Las hembras, en cambio, presentan el par 14 con ambos cromosomas meta^céntricos y con HC pericentromérica (Fig. 4). En *E. roseus* sería también el macho el sexo heterogamético.

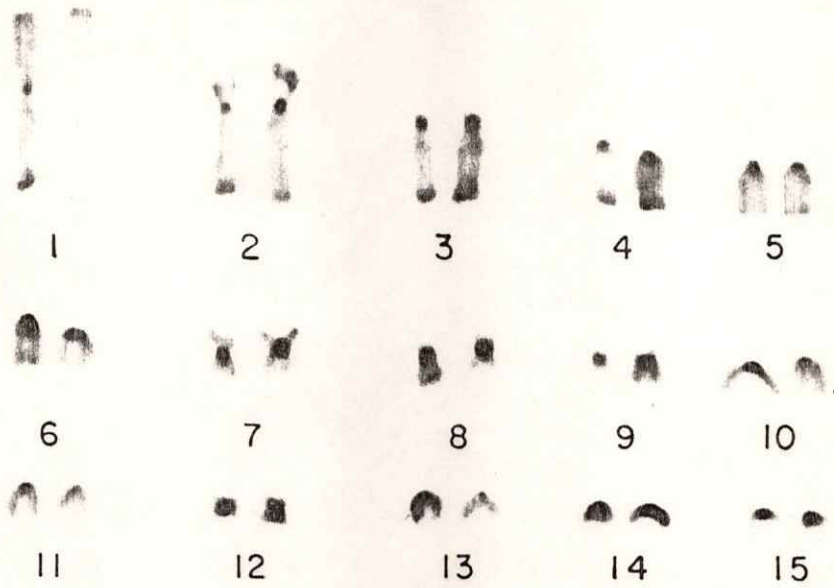
Figura 3: Identificación del cromosoma Y por el método de bandas C en el cariotipo de *E. migueli*.

a) hembra DBGUCH 1188

b) macho DBGUCH 0538

La flecha señala el cromosoma Y. La barra corresponde a 10 μm .

a



b

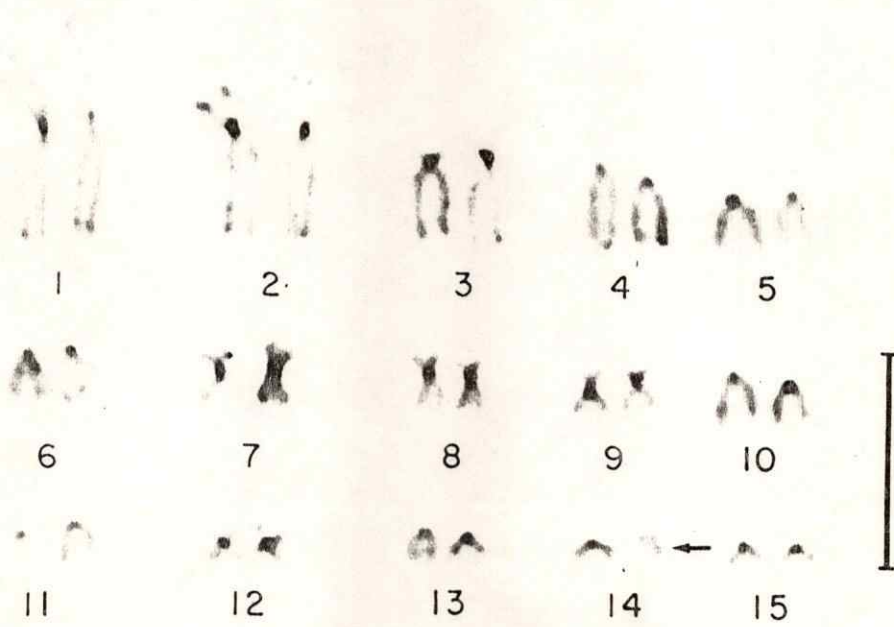


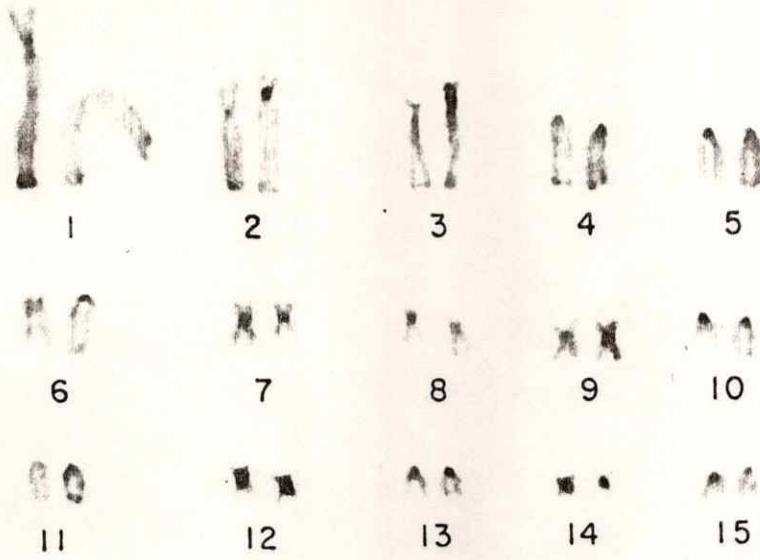
Figura 4: Identificación del cromosoma Y por el método de bandas C en el cariotipo de *E. roseus*.

a) hembra DBGUCH 1197

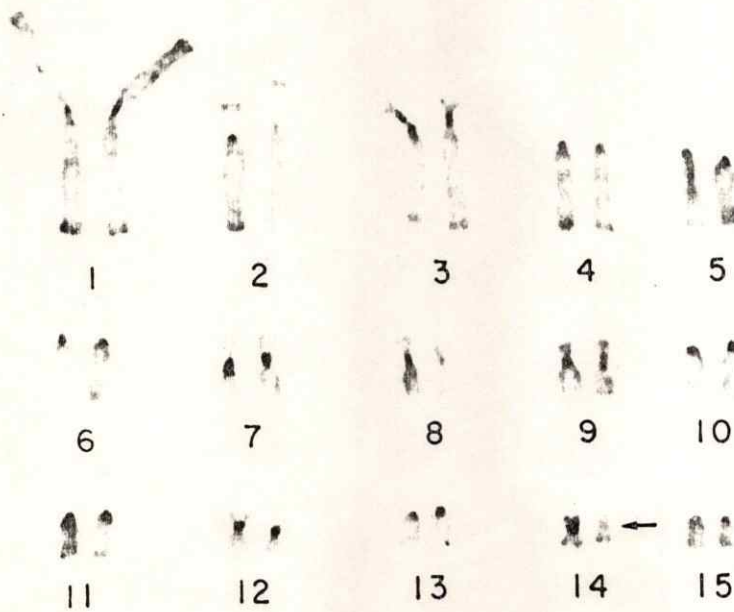
b) macho DBGUCH 1202

La flecha señala el cromosoma Y. La barra corresponde a 10 um.

a



b



BANDEO Q

Con el fluorocromo mostaza de quinacrina se obtiene fluorescencia brillante en los sectores cromosómicos cuyo ADN es rico en bases nitrogenadas AT, en tanto que hay atenuación de la fluorescencia cuando hay predominio de bases CG (36).

El par heteromórfico de *E. migueli* y el par 14 de *E. roseus*, tanto en machos como en hembras, muestran fluorescencia uniforme con mostaza de quinacrina, al igual que el resto del cariotipo. Sólo la CS del par 2 de ambas especies, muestra atenuación de esta fluorescencia, lo que es característico de la zona organizadora del nucléolo (NOR) de los anuros (37). Los núcleos interfásicos presentan cromocentros con fluorescencia homogénea. Este resultado está de acuerdo con la ausencia de sectores cromosómicos diferenciados por la tinción del fluorocromo (Fig. 5).

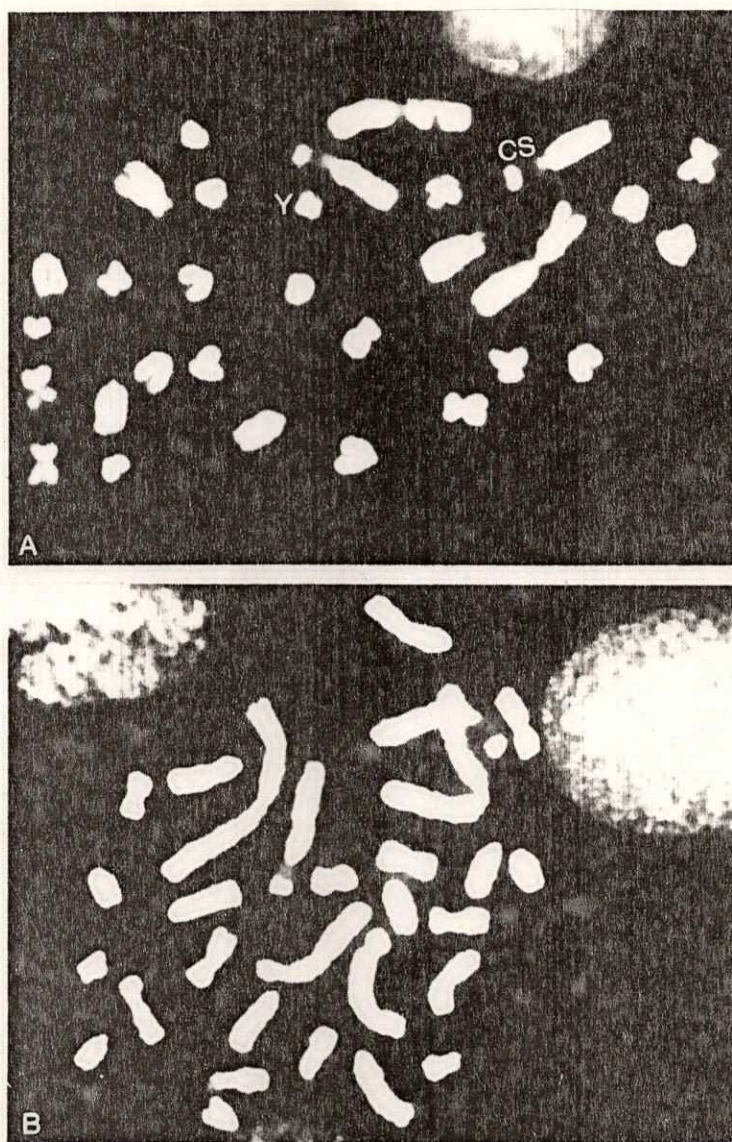


Figura 5: Placas metafásicas de ejemplares machos con tinción de mostaza de quinacrina (bandas Q).

a) *E. migueli* DBGUCH 1233

b) *E. roseus* DBGUCH 1210

Y = cromosoma Y de *E. migueli*; CS = constricción secundaria o NOR.

AG-ASNOR

La utilización de las técnicas de Ag permite identificar el NOR en cromosomas mitóticos y meióticos además de identificar también el nucléolo (34). En *E. roseus* y *E. migueli* el NOR corresponde a la CS del par 2.

El par heteromórfico de *E. migueli* y el par 14 de machos y hembras de *E. roseus* no presentan tinción con Ag y, por lo tanto, no serían portadores de NOR.

MEIOSIS

En el corte histológico del testículo de ejemplares adultos de *E. miguéli* y en el de *E. roseus* se observa la línea germinal organizada en espermatocitos, que es lo característico en los anuros.

En la Fig. 6 se muestran algunos tipos celulares de la espermatogénesis de estas especies. Los estados celulares del proceso fueron identificados por la morfología del núcleo y las características de la cromatina. En ambas especies, los tipos celulares mostraron características morfológicas muy similares.

En la Fig. 7 se muestran núcleos en distintos estados de la profase I de la meiosis de *E. roseus*, obtenidos por aplastado. Sólo en paquiteno avanzado se observan los cromosomas totalmente apareados formando 15 bivalentes con cromómeros gruesos y finos. El par 14 es el más pequeño de los metacéntricos del cariotipo de esta especie, lo que permitió identificarlo mediante mediciones de los cromosomas meióticos.

En la Fig. 8 se muestran núcleos de *E. roseus* en paquiteno avanzado teñidos con el método de bandas C. La

localización pericentromérica de la HC permitió identificar en forma más precisa a los diferentes bivalentes. En *E. roseus* reconocemos que el apareamiento del par 14 sería completo a lo largo del bivalente. En núcleos con cromosomas menos condensados, en el par 14 se reconoce una banda C pericentromérica que no compromete todo el grosor del bivalente (Fig. 8,c y d). El tipo de apareamiento que presenta este par indicaría que la homología entre ambos cromosomas del par 14 se conserva.

En la Fig. 9 se muestran núcleos en profase I de la meiosis de *E. migueli*, obtenidos por aplastado y teñidos con Giemsa (a,b,c,d,e). En ninguno de estos tipos de núcleos es posible distinguir el par cromosómico 14. Con el método de bandas C (Fig. 9,f) se reconocieron los distintos bivalentes. Los pares 4 al 15 se representan en un esquema (Fig. 9,g). Se identificó el par 14 y los pares metacéntricos 7,8,9 y 12 y los restantes 7 pares telocéntricos del cariotipo. En *E. migueli* las características de la morfología y del bandeo C indicarían que, también en este caso, el apareamiento del bivalente sería completo.

En *E. migueli*, algunos núcleos en zigoteno, observados en cortes histológicos, muestran un cromocentro

Feulgen positivo que se ubica generalmente hacia la periferia del núcleo y que no se observa en los núcleos de *E. roseus* (Fig. 6,3). En *E. migueli*, los núcleos meióticos en profase I, obtenidos por suspensión celular y teñidos con Giemsa, presentan una estructura cromatínica en forma de "pinza" (Fig. 10) que podría sugerir el apareamiento del par sexual. Sólo en algunos núcleos meióticos obtenidos por aplastado y teñidos con Feulgen se observó esta estructura, en tanto que, en los núcleos de *E. roseus* no se observa.

La tinción de Ag realizada en los núcleos meióticos de ambas especies, con el objeto de identificar por una posible tinción diferencial el par sexual, sólo permitió identificar el NOR. No se observó alguna estructura que pudiera corresponder al par sexual (Fig. 11).

En ambas especies se observaron diaquinesis y metafases I con 15 bivalentes que presentaban quiasmas terminales (Fig. 12). Las metafases II fueron muy escasas, pero, se muestran algunas en esta misma Fig. 12. La identificación tentativa en diaquinesis del par XY de *E. roseus* fue posible con el método de bandas C. La morfología del bivalente, el tamaño y la HC presente en la región centromérica de sólo uno de los componentes del par, permitió reconocer el

par sexual. En *E. migueli*, en tanto, el bivalente XY podría corresponder a un par de pequeño tamaño con HC en sólo una región del bivalente. En metafase II sólo en *E. migueli* reconocemos un cromosoma de pequeño tamaño que podría corresponder al cromosoma Y. La meiosis en estas especies sería reduccional en la primera división y ecuacional en la segunda.

Figura 6: Microfotografías de cortes histológicos de testículo de *E. roseus* y de *E. miguéli*. Etapas de la espermatogénesis reconocidas por morfología del núcleo.

a,b,c,d,f,g,h : tinción con hematoxilina-eosina.

e : tinción de Feulgen.

E. roseus : a) espermatocitos; g) meiocitos en zigoteno; h) meiocitos en paquiteno.

E. miguéli : b) espermatogonia 1^{aria} ; c) espermatocito de espermatogonias 2^{arias} ; d) meiocitos en profase temprana; e) meiocitos en zigoteno con tinción de Feulgen; las flechas señalan un cromocentro Feulgen positivo; f) meiocitos en paquiteno.

La barra corresponde a 10 μ m, para todas las fotografías de la figura.

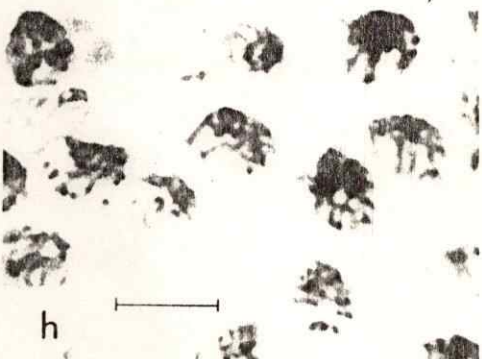
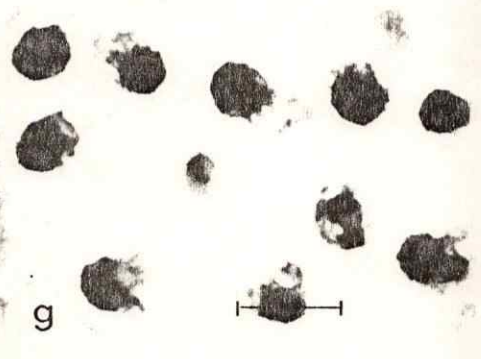
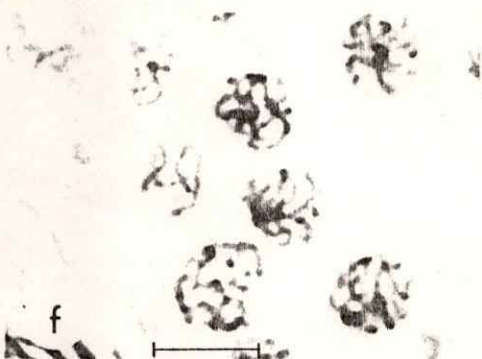
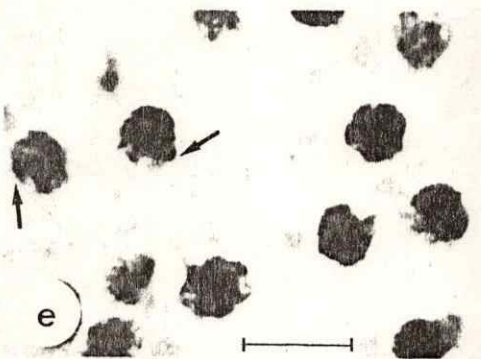
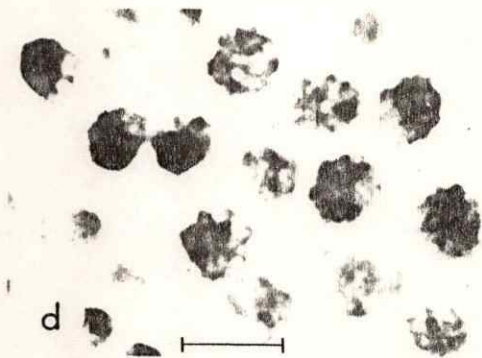
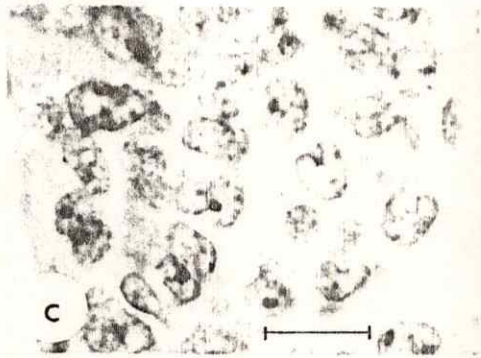
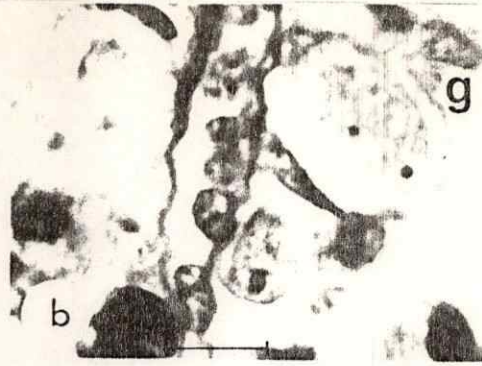
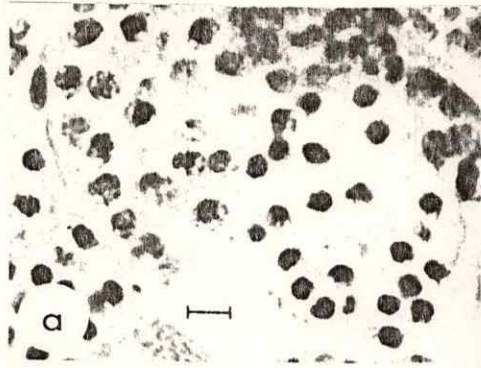


Figura 7: Identificación del par XY de *E. roseus* en núcleos en profase meiótica. Tinción de Giemsa. Núcleos obtenidos por el método de aplastado.

En a,b y c el apareamiento de los homólogos no se ha completado.

En d,e y f los núcleos corresponden a paquitenos tardíos.

Las flechas señalan el bivalente sexual identificado por tamaño. La barra corresponde a 10 μ m, para todas las fotografías de la figura.

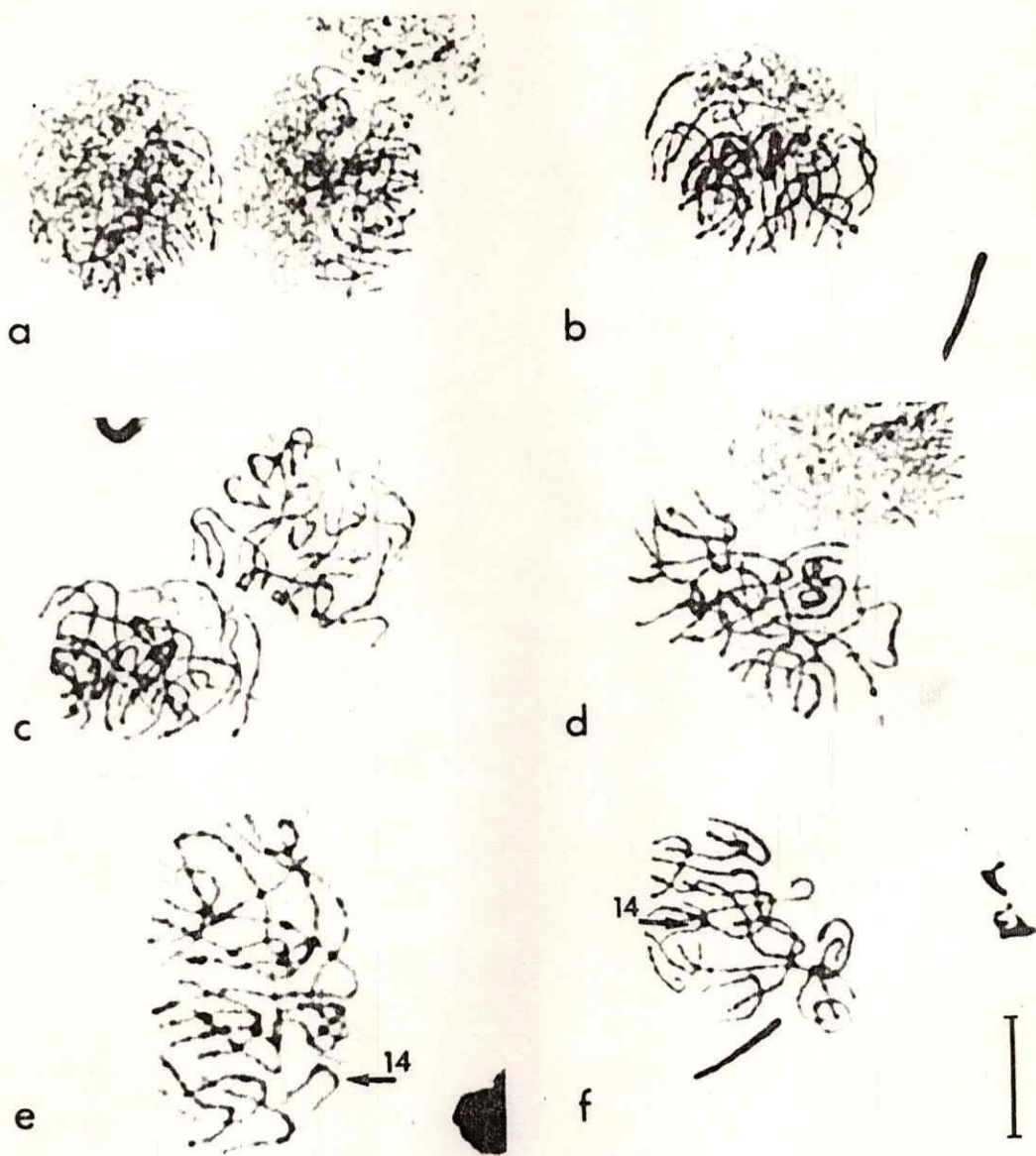


Figura 8: Identificación del par XY en *E. roseus* por el método de bandas C en núcleos en paquiteno.

En a y b el bivalente sexual se identificó por tamaño y morfología. Las flechas señalan el par 14.

En c y d los bivalentes están menos condensados.

El bivalente sexual se identificó por el tamaño y características de la HC pericentromérica que no abarca todo el grosor del bivalente.

Las flechas señalan el par 14. En el recuadro el bivalente sexual con mayor aumento.

La barra corresponde a 10 μ m, para todas las fotografías de la figura.

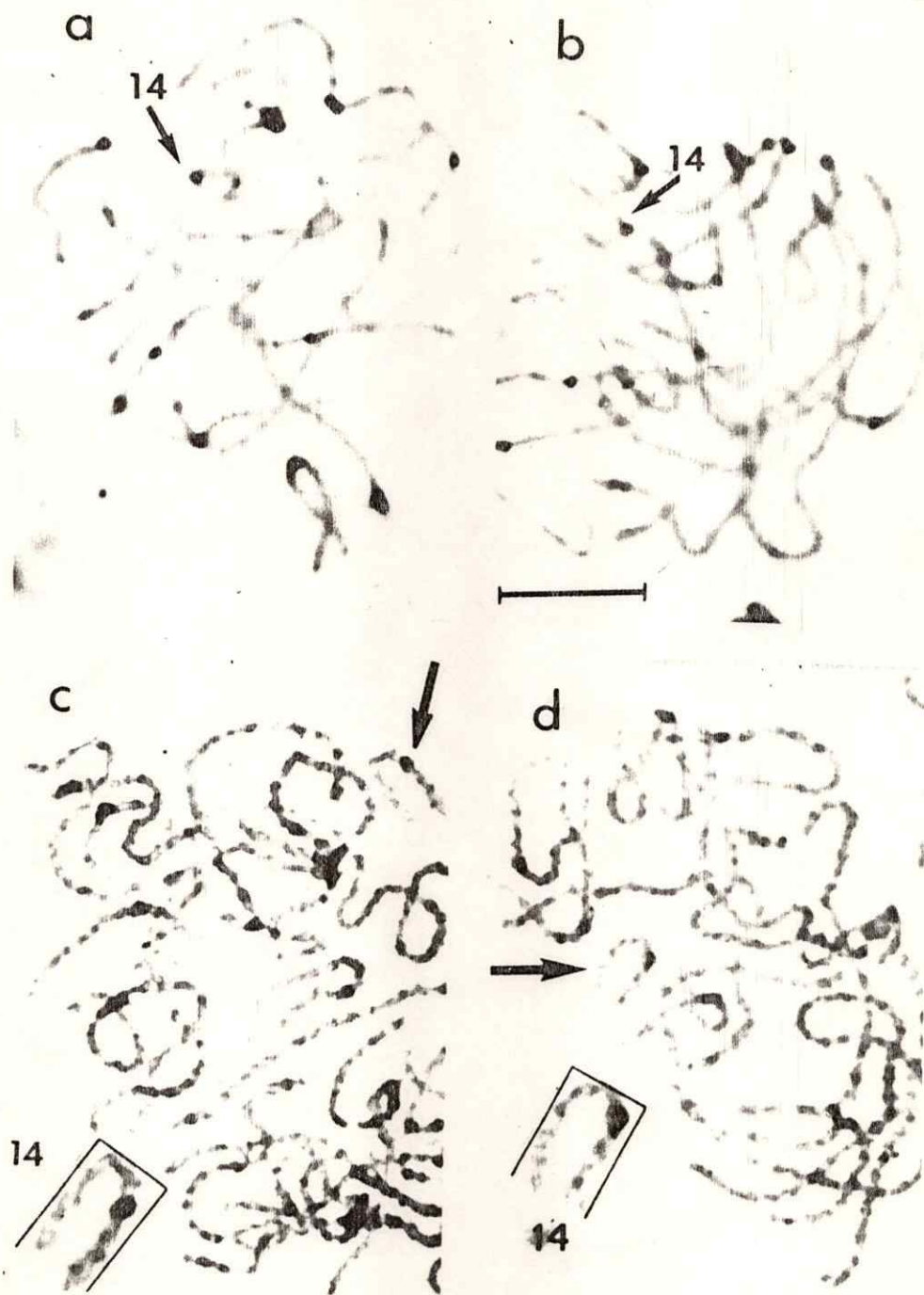


Figura 9: Núcleos de *E. migueli* en profase meiótica. Identificación del par XY por el método de bandas C.

a,b,c,d,e : núcleos con tinción de Giemsa. No es posible identificar el bivalente sexual.

f) tinción con el método de bandas C. La flecha señala el bivalente sexual.

g) esquema a partir de f, de los bivalentes 4,5, 6,7,8,9,10,11,12,13,14 y 15 que permiten identificar tentativamente al bivalente sexual según tamaño y bandas C.

La barra corresponde a 10 μ m, para todas las fotografías de la figura.

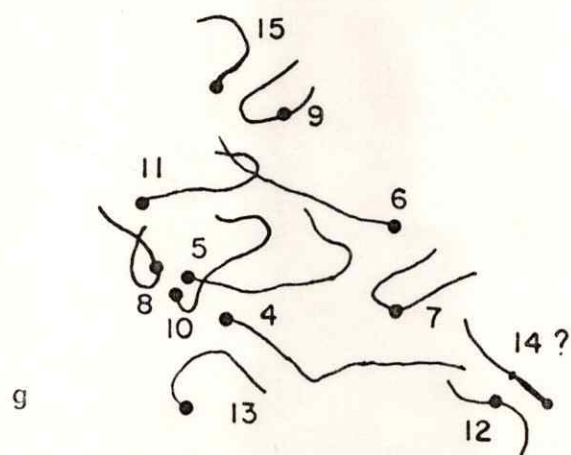
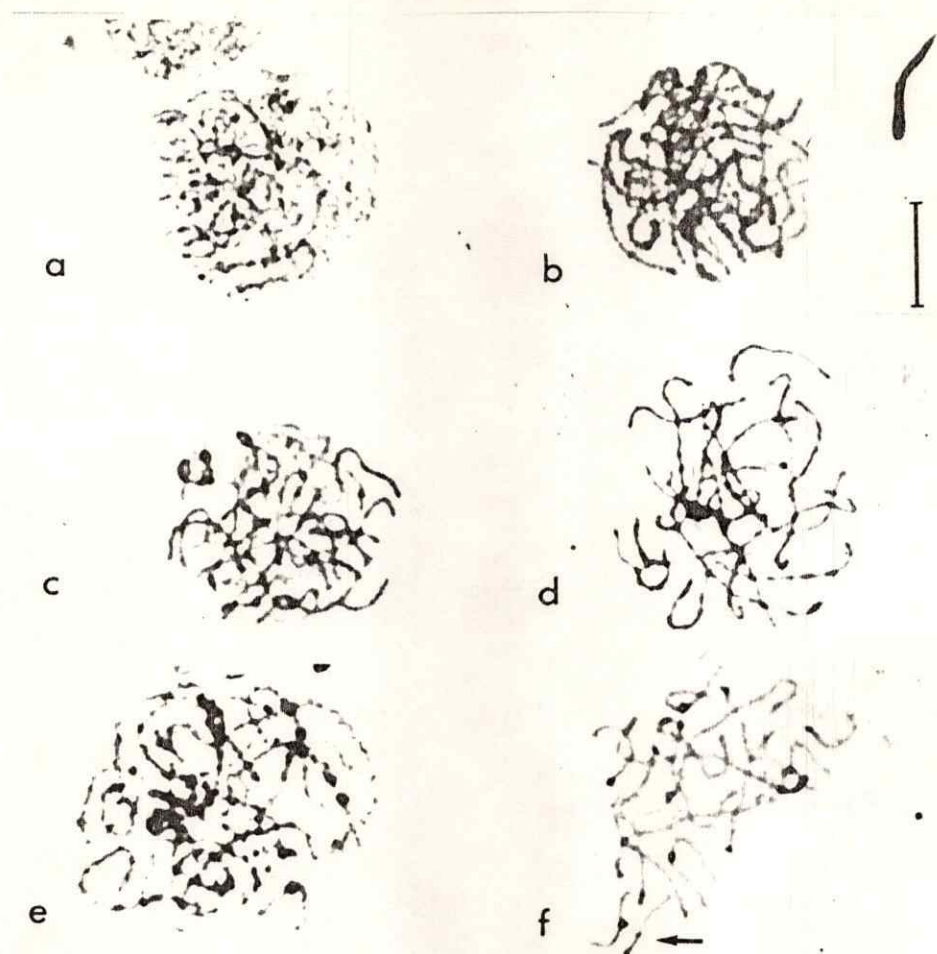


Figura 10: Estructura cromatínica en forma de "pinza" en núcleos meióticos de *E. migueli*.

En a, b, c, d y e son núcleos obtenidos por suspensión celular y teñidos con el método de Giemsa.

En f núcleo obtenido por aplastado con tinción de Feulgen.

Las flechas señalan la estructura en forma de "pinza".

La barra corresponde a 10 μ m, para todas las fotografías de la figura.



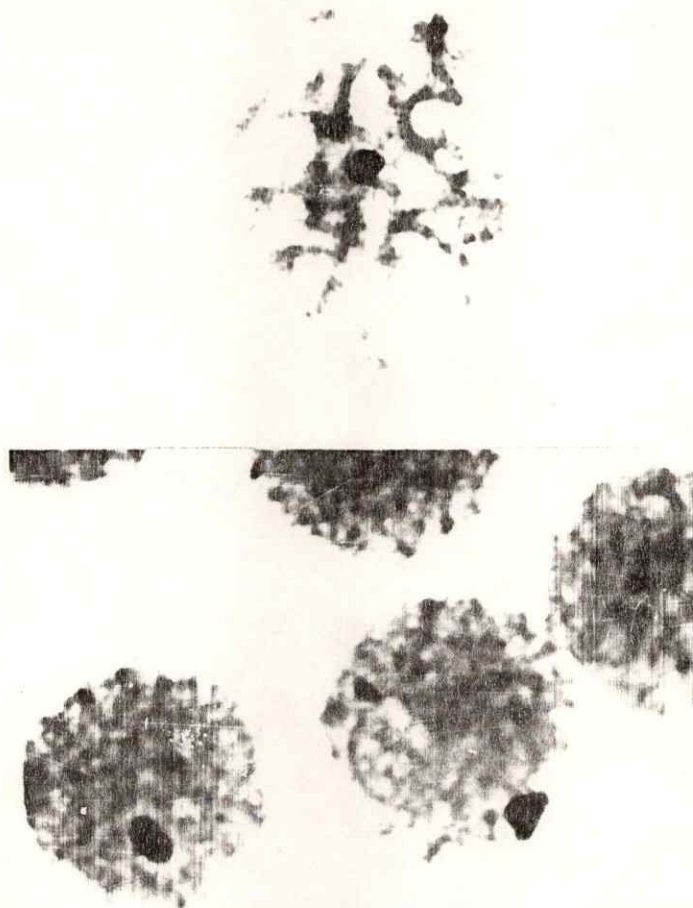


Figura 11: Identificación del NOR y nucléolo en núcleos en profase meiótica de *E. migueli*. Tinción de Ag.

Figura 12: Diaquinesis y metafases II de ejemplares de *E. roseus* y *E. migueli*.

Diaquinesis de *E. roseus*: a) con el método de Giemsa, b) con el método de bandas C. Identificación del bivalente sexual por morfología y bandeo C.

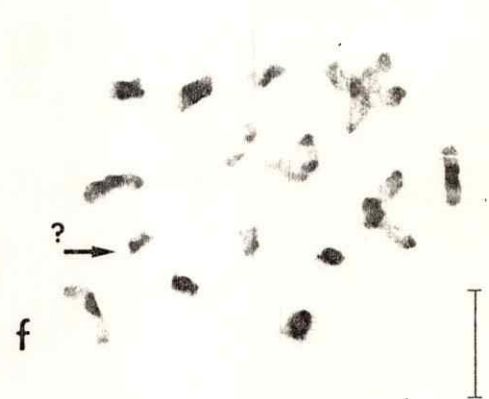
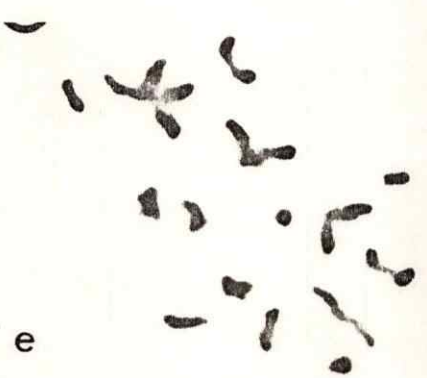
Diaquinesis de *E. migueli*: c) con el método de Giemsa, d) con el método de bandas C. Identificación del bivalente sexual por morfología y bandeo C.

e) Metafase II de *E. roseus* con el método de Giemsa.

f) Metafase II de *E. migueli* con el método de bandas C.

Las barras corresponden a 10 μ m, para las fotografías a, b, c y d.

La barra corresponde a 10 μ m, para las fotografías e y f.



CARIOTIPOS DE LAS LARVAS Y DIFERENCIACION DE LA GONADA

El cariotipo de las larvas estudiadas correspondió al descrito en esta tesis para machos y hembras de *E. migueli*, determinándose 13 cariotipos de hembras y 11 de machos en una misma puesta analizada (Fig. 13).

En *E. migueli* no fue posible identificar el sexo de la gónada en estados tempranos del desarrollo larval. A continuación se describen, brevemente, las principales características citológicas de la gónada en los ejemplares analizados.

En la Fig. 14 se muestran cortes histológicos de larvas de *E. migueli* en los cuales se observa la gónada. Estas larvas estaban en el estado 34/35 de Gosner y corresponden cromosómicamente a machos y hembras. La gónada está constituida por células somáticas y germinales distribuidas sin una organización aparente. Las células germinales primordiales (CGP) son ovoides o poligonales y en su citoplasma se destacan inclusiones de vitelo, su núcleo es polilobulado y eucromático y con un nucléolo notorio. Las células somáticas son de tamaño variable, carentes de vitelo y con núcleos ovoides con la cromatina poco condensada. Por las caracte-

rísticas descritas definimos a esta gónada en un estado de gónada colonizada por CGP pero indiferenciada.

En *E. roseus* los renacuajos en estado 41 del desarrollo presentaban la gónada en diferenciación, lo que permitió identificar el sexo respectivo.

En la Fig. 15 se muestran cortes histológicos de ejemplares macho y hembra de *E. roseus*. En la Fig. 15,a, se muestra un corte transversal de la gónada correspondiente a testículo, localizada en posición media ventral en relación con el mesonefros. Se observan células germinales o gonocitos en un sector que podría corresponder a la zona medular de la gónada (Fig. 15,b) y con células somáticas dispuestas alrededor de ellas (Fig. 15,c). Estas células corresponderían a células prefoliculares las que formarían la pared del espermatoquiste. Las células germinales han perdido el vitelo y en el núcleo se observan numerosos nucléolos. El epitelio superficial de la gónada se observa aplanado. El conducto de Wolff se localiza en la región dorsolateral del mesonefros (Fig. 15,a).

En la Fig. 15,d se muestra un corte longitudinal de la gónada en diferenciación que correspondería a un

ovario. Las células germinales o gonocitos se localizan en la periferia de la gónada en un sector que correspondería a la zona cortical de ésta. Se observan entremezcladas con las células somáticas del epitelio superficial de la gónada el cual está constituido por células cilíndricas altas (Fig. 15,e y f). El núcleo de las células germinales es en general lobulado, eucromático y con uno o dos nucléolos.

Los ejemplares analizados están en un mismo estado del desarrollo, sin embargo, la diferenciación de la gónada masculina se observa más evidente que la femenina. Esto sugiere que la gónada del sexo heterogamético se diferenciaría más temprano en el desarrollo.

En la Fig. 16 se muestran cortes histológicos de la gónada de dos ejemplares de *E. migueli* recién metamorfoseados. Estos corresponden a un macho y a una hembra determinados cromosómicamente. En el primero, observamos un testículo en etapa de proliferación gonial, en el cual no se distinguieron meiocitos (Fig. 16,a y b), y en la hembra se observaron ovocitos con vesícula germinativa (Fig. 16,c).

Figura 13: Placas metafásicas correspondientes a larvas hembras y machos de *E. migueli*. Tinción con orceína acética.

- a) Larva N° 27, hembra; b) larva N° 28, hembra
c) Larva N° 16, macho; d) larva N° 21, macho

Las flechas señalan el cromosoma Y. La barra corresponde a 10 μ m, para todas las fotografías de la figura.



Figura 14: Microfotografía de cortes histológicos de gónadas indiferenciadas de larvas en estado 34/35 de *E. miqueli*. Tinción hematoxilina-eosina.

a,b y c : Larva 27, hembra. Corte longitudinal.

d,e : Larva 21, macho. Corte longitudinal.

f) Larva 25, macho. Corte transversal.

G = gónada indiferenciada

CGP = célula germinal primordial

CS = células somáticas

V = plaquetas vitelinas

n = nucléolos

ms = mesonefros

La barra corresponde a 20 um, para las fotografías a,d y f.

La barra corresponde a 10 um, para las fotografías b,c y e.

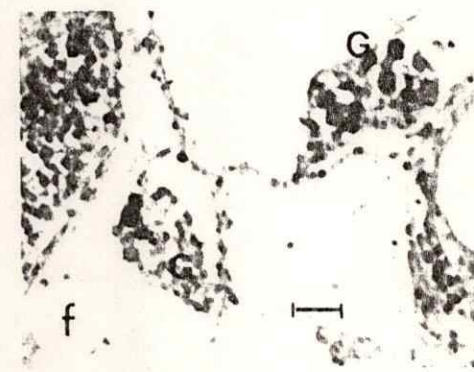
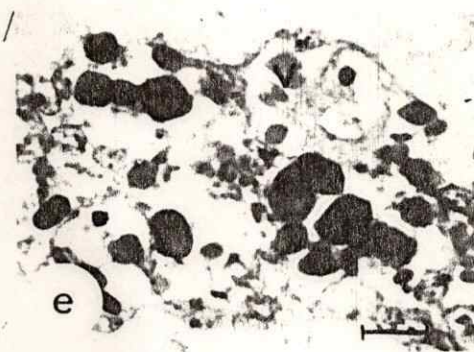
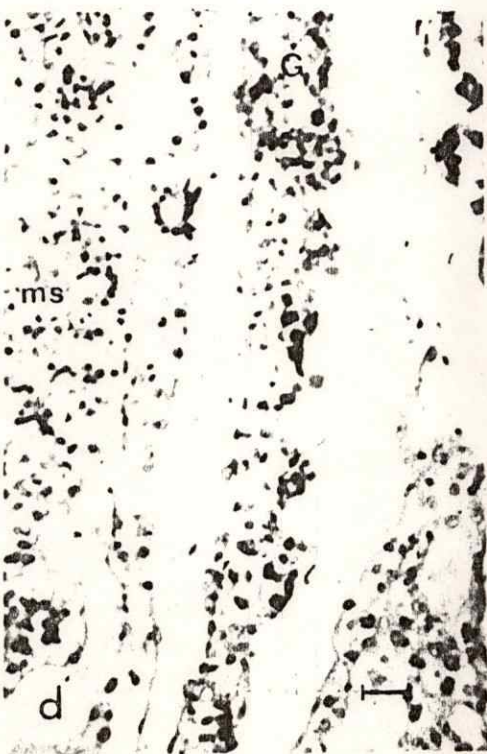
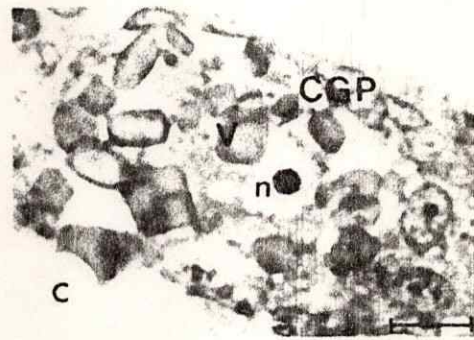
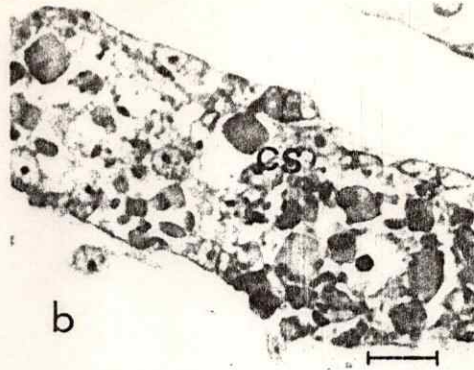


Figura 15: Microfotografía de cortes histológicos de gónada de renacuajos de *E. roseus* en estado 41. Tinción con hematoxilina-eosina.

- a) *E. roseus* N° 1, macho. Corte transversal.
- b) Células germinales o gonocitos.
- c) Célula germinal o gonocito rodeada de células somáticas.
- d) *E. roseus* N° 2, hembra. Corte longitudinal.
- e) Células germinales o gonocitos.
- f) Células germinales entremezcladas con células somáticas del epitelio superficial.

Las flechas señalan el epitelio superficial de la gónada.

G = gónada

CS = células somáticas

GO = células germinales o gonocitos

W = conducto de Wolff

ms = mesonefros

La barra corresponde a 20 um, para las fotografías a y d.

La barra corresponde a 10 um, para las fotografías b, c, e y f.

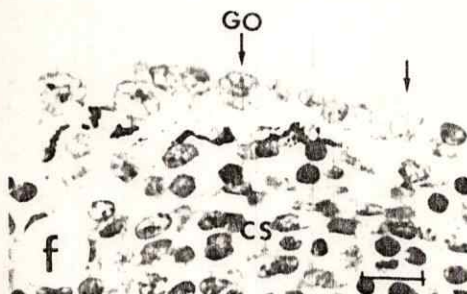
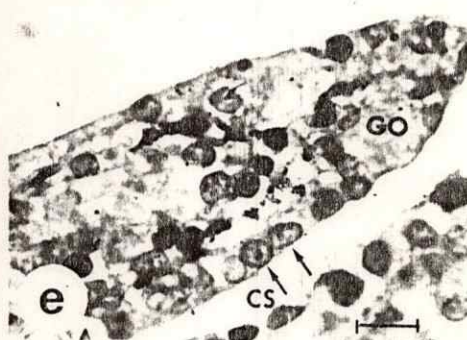
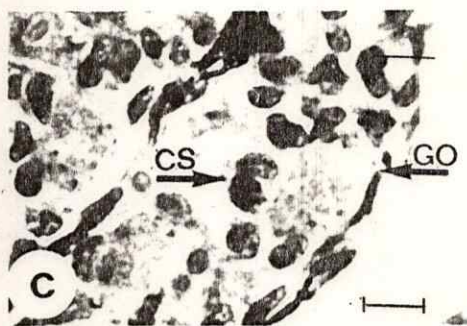


Figura 16: Microfotografías de cortes histológicos de gónadas diferenciadas de ejemplares recién metamorfoseados de *E. migueli*. Tinción con hematoxilina-eosina.

a) Macho DBGUCH 1194. Testículo

b) Ampolla seminífera.

c) Hembra DBGUCH 1270. Ovocitos.

T = testículo

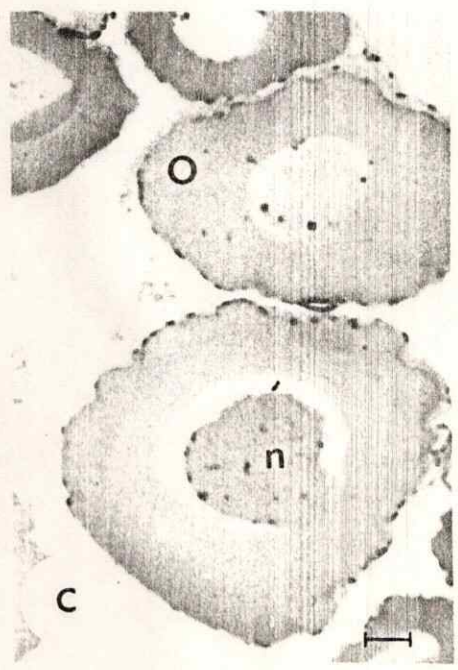
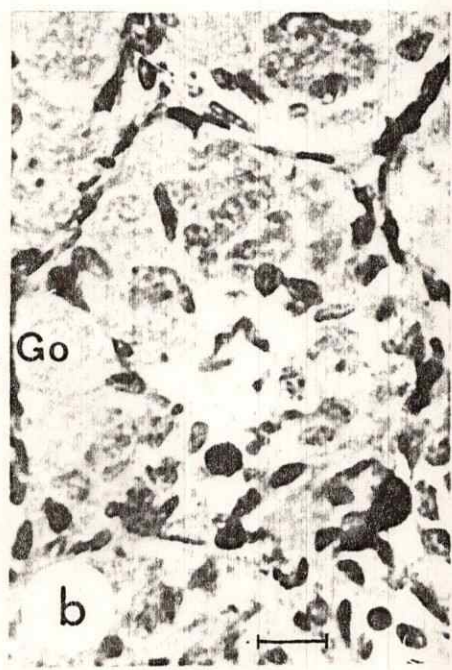
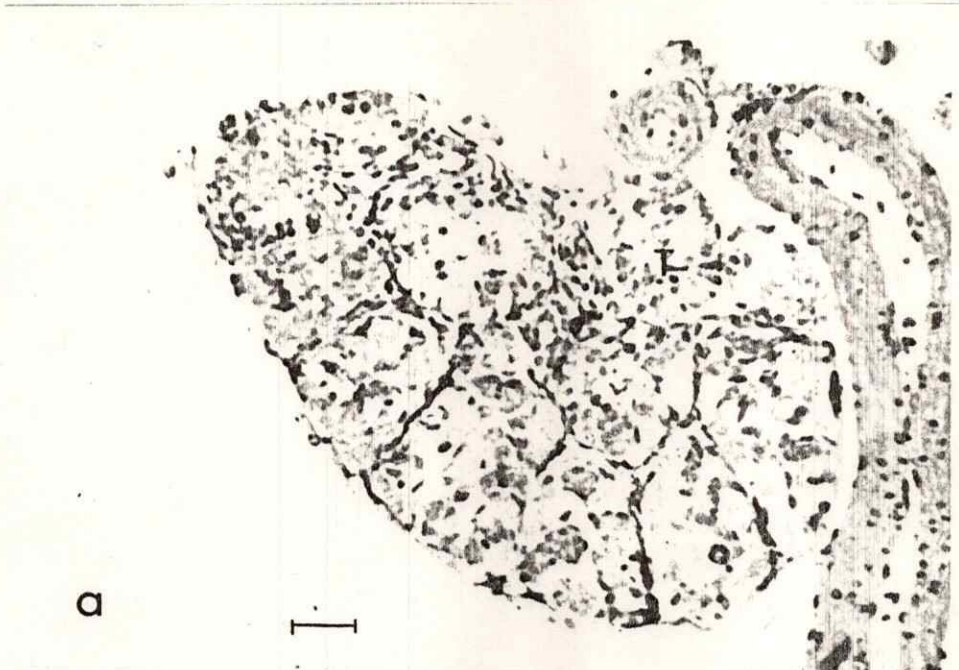
O = ovocitos

Go = gonocitos

n = núcleo (vesícula germinativa)

La barra corresponde a 20 um, para las fotografías a y c.

La barra corresponde a 10 um, para la fotografía b.



D I S C U S I O N

La comparación de los cariotipos de ejemplares machos y hembras de *E. migueli*, permite señalar que estos difieren en la morfología del par 14. En efecto, en los 22 machos examinados sin excepción, el par 14 es heteromórfico y está formado por un cromosoma telocéntrico y otro metacéntrico del mismo tamaño. En las 22 hembras en tanto, el par 14 está formado por cromosomas telocéntricos. Estas observaciones apoyan fuertemente la hipótesis de que existe un mecanismo cromosómico de determinación del sexo del tipo XY/XX, en el cual el sexo heterogamético es el macho. El cromosoma identificado como Y, se caracteriza por no presentar una banda C pericentromérica, en tanto que, el cromosoma identificado como X es telocéntrico y con HC pericentromérica.

Con el objeto de corroborar este planteamiento y excluir la posibilidad de un polimorfismo cromosómico no relacionado con el sexo, recurrimos a otro tipo de análisis. Este consistió en verificar si en la población de *E. migueli* la frecuencia observada de formas alternativas del

par 14 se ajusta a una distribución binomial (p^2 ; $2pq$; q^2). Al aplicar la prueba de χ^2 (ji cuadrado) el valor que se obtiene no es significativo al 5%. Sin embargo, al considerar en este análisis la variable sexo y aplicar la prueba de χ^2 sólo al conjunto de los machos, se obtiene un valor altamente significativo ($\chi^2 = 22$). Por otra parte, la probabilidad de que, en nuestra muestra, la asociación entre un determinado cariotipo y sexo sea por azar, fue de $p = 4.752^{-13}$ (38), lo que excluye esta posibilidad.

Por otra parte, la determinación en las larvas de una misma puesta, de sólo dos cariotipos semejantes al que presentan machos y hembras adultas de *E. migueli*, en una proporción que se acerca a 1, también apoya la existencia de un mecanismo cromosómico de determinación del sexo. Al incrementar la muestra de los cariotipos observados en la población adulta, con las observaciones cariotípicas de las larvas, se obtiene ahora un $\chi^2 = 6.985$ que es significativo al 5%, lo que permite descartar la posibilidad de un polimorfismo cromosómico no relacionado con el sexo.

De acuerdo con las evidencias presentadas, las descripciones previas del cariotipo de *E. migueli* (24, 39), corresponderían a hembras de esta especie.

Con la técnica de tinción con Giemsa no es posible identificar de manera inequívoca el par sexual en *E. roseus*. Con el método de bandas C, en cambio, se individualiza un cromosoma metacéntrico pequeño, correspondiente al par 14, el cual carece de una banda C pericentromérica, siendo similar al cromosoma Y de *E. migueli*. De esta manera es posible reconocer también un par heteromórfico para bandas C, pero de similar morfología en los machos de *E. roseus* e identificar así en esta especie la existencia de heterocromosomas.

Estas especies de *Eupsophus* son las únicas entre los anuros en las cuales se ha identificado, hasta ahora, la existencia de un sistema de determinación del sexo en que los machos representan el sexo heterogamético.

APAREAMIENTO MEIOTICO DEL PAR SEXUAL

El apareamiento completo del par sexual de *E. roseus* se puede reconocer con la observación microscópica, ya que este par corresponde a los cromosomas metacéntricos de menor tamaño identificables en el cariotipo. La diferencia morfológica entre los cromosomas X e Y de *E. migueli* per

mitiría, por su parte, suponer la existencia de sectores no apareantes del bivalente sexual, determinados por un grado mayor de diferenciación estructural de los cromosomas sexuales. Sin embargo, las observaciones microscópicas muestran que el apareamiento del par 14 en esta especie también sería completo.

Diversos estudios realizados en mamíferos han permitido demostrar que la posición de los bivalentes en el núcleo meiótico está determinada, entre otros factores, por la inserción de los extremos del bivalente en la envoltura nuclear (40). Los centrómeros del bivalente se ubican en el núcleo del meiocito de acuerdo con la longitud de los brazos cromosómicos. Así, los bivalentes metacéntricos y telocéntricos pequeños se sitúan en regiones subperiféricas del núcleo meiótico (40). Si esta hipótesis tuviere validez general, podríamos esquematizar el apareamiento del par sexual de *E. roseus* y *E. migueli* como se muestra en la Fig. 17.

En ambas especies, debido al pequeño tamaño del par XY, este se encontraría ubicado en la región subperiférica del núcleo. En *E. migueli*, se agregan además, las características del apareamiento completo de dos cromosomas de diferente morfología, lo que determinaría un mayor acer-

camiento del bivalente sexual a la envoltura nuclear (Fig. 17,b). Este mayor acercamiento y apareamiento permitiría explicar la presencia del cromocentro Feulgen positivo periférico que se observa en los núcleos meióticos de *E. migueli*. Dicho cromocentro no está presente en *E. roseus* (Fig. 6,3).

Estas interpretaciones permiten postular que la estructura cromatínica en forma de "pinza" presente en los núcleos de *E. migueli* (Fig. 10) corresponde al par sexual. La imagen que se observa al microscopio óptico sería el resultado del tipo de apareamiento de estos cromosomas heteromórficos, como se esquematiza en la Fig. 17,c. En trabajos posteriores será muy importante poner a prueba estas interpretaciones a través de estudios de los núcleos meióticos con microscopía electrónica de transmisión.

El apareamiento completo durante la meiosis de los heterocromosomas en *Eupsophus* puede ser interpretado como una conservación de la homología de los cromosomas X e Y, los cuales se encontrarían en una etapa inicial de diferenciación. La HC pericentromérica posiblemente no tendría una función importante en el apareamiento de los cromosomas homólogos, como ha sido propuesto (41).

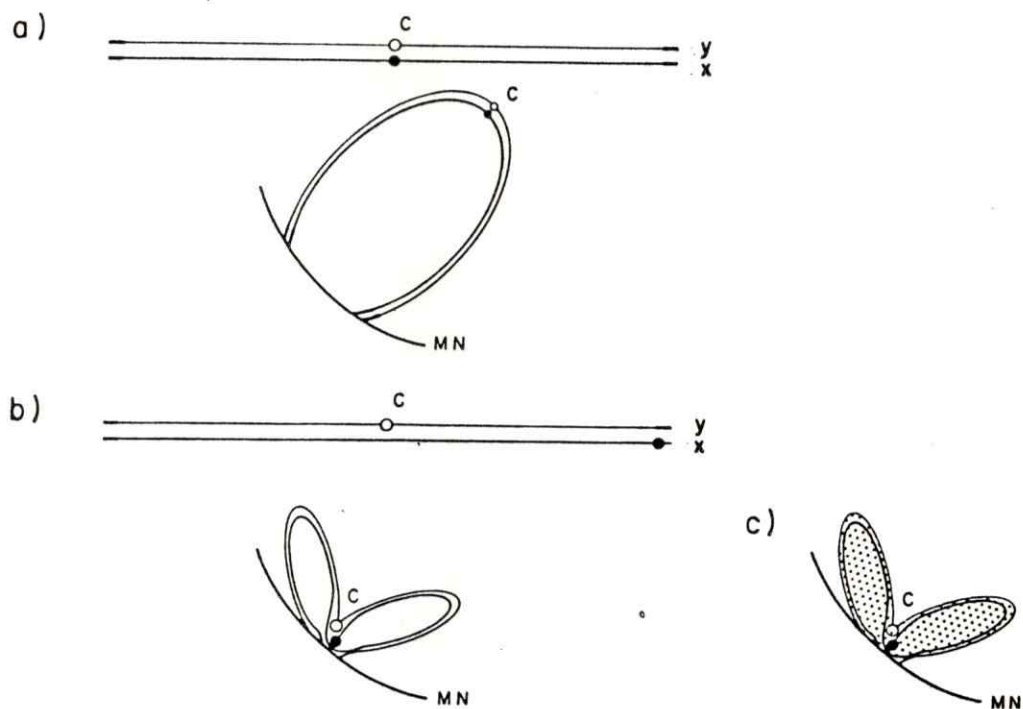


Figura 17: Esquema del apareamiento del par sexual (XY) en la meiosis.

a) *E. roseus*.

b y c) *E. migueli*.

c = centrómero

MN = membrana nuclear

En otros vertebrados poiquilotermos, se ha sugerido que la diferencia de HC entre los componentes del par sexual (XY) determinaría la no formación de quiasmas con la consiguiente disminución de la recombinación genética entre ambos cromosomas (42,43). En las especies de *Eupsophus*, la diferencia de HC pericentromérica entre los cromosomas X e Y sólo correspondería a diferencias estructurales, posiblemente sin incidencia en la regulación de la recombinación. La existencia de sólo quiasmas terminales en la diaquinesis de ambas especies, que es característica de la meiosis de los anuros representantes de las familias modernas (23), favorecería la mantención de sectores heterocromáticos centroméricos diferenciados entre los cromosomas X e Y de estas especies.

Una de las posibles funciones que se le atribuye a la HC es la de proteger las regiones genéticamente activas (41). Esto permitiría suponer que la disminución de HC en el cromosoma Y lo haría más susceptible a cambios por efecto de mutación, lo que facilitaría una progresiva diferenciación del par sexual.

En *Eupsophus* no se observa la formación de una vesícula sexual durante la meiosis, como ocurre con los

bivalentes XY en los mamíferos (44). En *Triturus* y en el lagarto *Cnemidophorus tigris* ambos con bivalente XY, así como en las especies estudiadas con cromosomas ZW, tampoco se ha señalado la formación de vesícula sexual (42,43,45). Sin embargo, no podemos descartar que en las especies estudiadas de *Eupsophus* el bivalente sexual forme una estructura particular en la meiosis que lo diferencie de los autosomas, como lo sugiere, por ejemplo, la figura en pinza que se observa en los núcleos de *E. migueli*. Por esto, un estudio de los núcleos de los meiocitos de ambas especies con métodos de mayor resolución, como la microscopía electrónica de transmisión u otros, permitiría aclarar este problema.

DIFERENCIACION DEL PAR SEXUAL

Son escasos los estudios comparativos de los cromosomas sexuales en estados iniciales de diferenciación morfológica en especies relacionadas filogenéticamente. En todos los casos reportados en poiquiloterms, en que se ha utilizado bandeo cromosómico, se ha interpretado, ya sea, al

cromosoma Y o al W como derivados. Se ha basado esta afirmación en que los cromosomas X o Z, de las especies que se comparan, presentan una morfología similar. Las características morfológicas de los heterocromosomas en el sexo homogamético representarían, por lo tanto, la condición ancestral (46).

La excepción con respecto a que la diferenciación del par sexual en vertebrados ocurre por modificaciones del cromosoma propio del sexo heterogamético (Y o W) ha sido señalada en un estudio cromosómico reciente en quelónidos. En especies del género *Staurotypus*, con un sistema cromosómico XY/XX, el heteromorfismo del par sexual se ha establecido por cambios en la morfología del cromosoma X como producto de una translocación. En este caso, la morfología del cromosoma Y representaría la condición ancestral (46).

En la diferenciación del par sexual en las especies de *Eupsophus*, es posible considerar tanto al cromosoma Y o al X como derivados. La diferente morfología de este par en estas especies hace necesario recurrir a un esquema filogenético para explicar los posibles cambios cromosómicos que han conducido a la diferenciación de los heterocromosomas. En el esquema que se ilustra en la Fig. 18,a; al consi

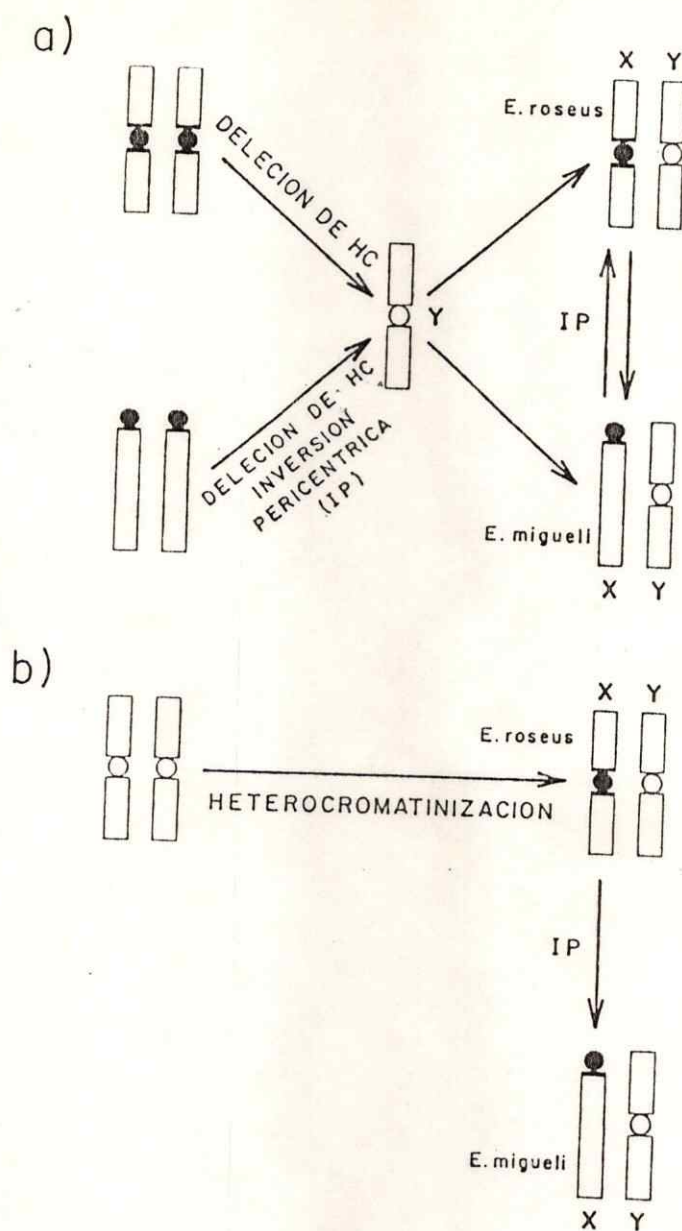


Figura 18: Diferenciación del par sexual en *Eupsophus*.

a) Cromosoma Y derivado

b) Cromosoma X derivado

derar al cromosoma Y como derivado, el par isomórfico ancestral podría ser de morfología metacéntrica o telocéntrica, con HC pericentromérica. El cromosoma Y se diferenciaría por una delección de esta HC. Si el par del cual deriva este cromosoma Y es telocéntrico, la delección de la HC podría ocurrir por una inversión pericéntrica. La diferente morfología del cromosoma X en ambas especies se explicaría, a su vez, por una inversión pericéntrica.

Tomando en consideración las dos posibilidades que se sugieren en el citado esquema (Fig. 18,a), para explicar la morfología del par sexual en *E. roseus* se requiere postular la ocurrencia de una inversión pericéntrica en cada uno de los cromosomas de este par, si se parte de un ancestral telocéntrico. Resulta, sin embargo, más simple postular que el par sexual en los *Eupsophus* se habría originado a partir de un par metacéntrico ancestral. El par sexual de *E. migueli* representaría una condición evolutiva más avanzada en relación a su especie congénérica.

Si consideramos ahora al cromosoma X como derivado (Fig. 18,b), la explicación más simple sería postular que este cromosoma se originaría por aumento o adición de HC pericentromérica a partir de un par isomórfico metacéntrico

sin HC. El cromosoma X de *E. migueli* podría originarse, a su vez, por una inversión pericéntrica.

En resumen, las evidencias encontradas en *Eupsophus* sugieren que en estas especies el par sexual se originaría por el establecimiento de una diferencia en HC en tre los miembros del par, la que puede o no estar acompañada de cambios importantes de la morfología cromosómica.

SISTEMAS DE DETERMINACION DEL SEXO EN LOS ANUROS

La existencia de un sistema XY/XX en *Eupsophus* es una evidencia que se contrapone con la información disponible en los anuros, en los cuales se ha determinado, hasta ahora, un heterogametismo cromosómico restringido a las hembras (15).

Al comparar el par sexual XY de *Eupsophus* con el correspondiente ZW de *P. adspersus* se revelan diferencias en la morfología y estructura cromosómica puesta de manifiesto por el bandeo cromosómico. En esta última especie, ambos cromosomas del par son sm, de diferente tamaño y con HC pericentromérica. El cromosoma W presenta, además, HC en to

da la longitud del brazo corto. Con fluorocromos como mitramicina se reconoció que esta HC es rica en bases CG (15). En *Eupsophus*, en cambio, los cromosomas sexuales son del mismo tamaño. El cromosoma Y es m y sin HC. El cromosoma X es t en *E. miqueli* y m en *E. roseus*, con HC pericentromérica en ambos casos. Ninguno de los componentes del par presenta una respuesta al bandeo Q que indique predominio de una determinada composición de bases en el ADN cromosómico. El cromosoma W de *P. adspersus* es de tamaño similar al cromosoma Y de *Eupsophus*. El X, en tanto, es aproximadamente la mitad del tamaño del cromosoma Z. A diferencia de lo observado en *Eupsophus*, las características del par sexual en *P. adspersus* indican que la diferenciación de éste ocurriría principalmente por heterocromatinización del cromosoma W (15). La diferencia entre los sistemas de determinación sexual de *Eupsophus* y *P. adspersus*, a lo que se agrega las características particulares de los heterocromosomas de estas especies, sugieren fuertemente la hipótesis de un origen polifilético en el establecimiento de los mecanismos cromosómicos de determinación del sexo en los anuros.

Las características de *Eupsophus* como género primitivo en Telmatobiinae hacen que sea de importancia el

descubrimiento de cromosomas sexuales en este género. Un estudio detallado de los cariotipos de las restantes especies de telmatobinos, utilizando bandeo cromosómico, permitiría determinar si la presencia de cromosomas sexuales corresponde a un evento evolutivo único en *Eupsophus* o caracteriza a otros representantes de este grupo primitivo de Leptodactylidae.

SEXO CROMOSOMICO Y SEXO GONADAL

En las especies de *Eupsophus* estudiadas la diferenciación de la gónada es tardía en el desarrollo, a diferencia de lo descrito en *Xenopus laevis*, *Rana pipiens* (47, 48) y *Bufo chilensis* (Iturra, obs. pers.).

Esta diferenciación tardía de la gónada junto con la gran mortalidad de los ejemplares en desarrollo de *E. migueli* no permitieron establecer la correspondencia entre cariotipo y sexo gonadal. Sin embargo, en *E. roseus* se contó con ejemplares en estado 41 de Gosner en los cuales se observó el comienzo de la diferenciación de la gónada. Al comparar estos ejemplares con larvas de *X. laevis* en un estado del desarrollo equivalente, se encuentra que en esta última

especie ya existen núcleos meióticos en el testículo y ovocitos en crecimiento en la gónada femenina.

La existencia de un sistema cromosómico de determinación del sexo, acompañado de un proceso de diferenciación tardía de la gónada, tal como ocurre en *Eupsophus* abre un interesante campo de investigación en relación al problema de la independencia relativa que posiblemente adquiere el proceso de diferenciación gonadal al existir cromosomas sexuales en una especie. Con la información disponible en la actualidad, restringida sólo a las especies de *Eupsophus* y, por lo tanto, al no contar con elementos de comparación con lo que existe en otras especies relacionadas, una posible relación causal entre ambos procesos es sólo especulación.

El heterogametismo del macho de *E. roseus* estaría asociado con una diferenciación más temprana de la gónada masculina. En *X. laevis* esta diferenciación más temprana ocurriría también en correspondencia con el sexo heterogamético, en este caso representado por las hembras, en las cuales el proceso de mitosis de las CGP precede al de la gónada masculina (49).

Las especies de *Eupsophus*, por presentar cro-

mosomas sexuales identificables citológicamente se presentan como un material de excepción para estudiar el problema de la diferenciación de la gónada en anuros el cual permanece controversial.

C O N C L U S I O N E S

1. En *Eupsophus migueli* y *E. roseus* demostramos la existencia de un sistema cromosómico de determinación del sexo, mediante la identificación de un par de cromosomas sexuales. El sexo heterogamético en ambas especies es el macho y, por lo tanto, corresponde a un sistema XY/XX.
2. Al identificar un sistema XY/XX en *Eupsophus*, aportamos la evidencia que permite establecer la naturaleza polifilética de los sistemas cromosómicos de determinación del sexo en los anuros.
3. Los cromosomas sexuales en *Eupsophus* están en estado inicial de diferenciación como lo demuestran la similitud morfológica del par XY y el comportamiento de los heterocromosomas durante la meiosis de ambas especies.

4. La diferenciación del par sexual en *Eupsophus* es el resultado de diferencias en la cantidad de heterocromatina constitutiva pericentromérica entre ambos componentes de este par. Estas diferencias pueden estar asociadas a reordenamientos que determinan cambios en la morfología cromosómica.

5. La diferenciación de la gónada en ambas especies de *Eupsophus* es tardía en el desarrollo. Al poder determinar precozmente en las larvas el sexo cromosómico, se dispone de un material biológico apropiado donde poder precisar los cambios morfogenéticos que conducen a establecer el sexo gonadal en los anuros.

B I B L I O G R A F I A

- (1). Ohno, S., (1967). Sex chromosomes and sex-linked genes. Ed. Springer Verlag. Berlín. 192 págs.
- (2). Yamamoto, T., (1961). Progenies of sex-reversal males in the medaka, *Oryzias latipes*. J. Exp. Zool. 146: 163 - 180.
- (3). Gallien, L., (1953). Inversion totale du sexe chez *Xenopus laevis* Daud. á la suite d'un traitement gynogene par le benzoate d' oestradiol administré pendant la vie larvaire. C.R. Acad. Sci. 237: 1565 - 1566.
- (4). Becak, W.; Becak, M.L. y Nazareth, H.R., (1962). Karyotypic studies of two species of South American snakes (*Boa constrictor* and *Bothrops jararaca*). Cytogenetics. 1: 305 - 313.

- (5). Ray-Chaudhuri, S.P.; Singh, L. y Sharma, T., (1971). Evolution of sex-chromosomes and formation of W-chromatin in Snakes. *Chromosoma*. 33: 239 - 251.
- (6). White, M.D.J., (1973). Animal cytology and evolution. Ed. Cambridge University Press. 961 págs.
- (7). Singh, L.; Purdom, I.J. y Jones, K.W., (1976). Satellite DNA and evolution of sex chromosomes. *Chromosoma*. 59: 43 - 62.
- (8). King, M., (1977). The evolution of sex chromosomes in lizards. En: "Evolution and reproduction". Ed. J. Calaby and H. Tyndale-Biscoe. Aust. Acad. of Science. Pág. 55 - 60.
- (9). Weiler, C. y Ohno, S., (1962). Cytological confirmation of female heterogamety in the African water frog (*Xenopus laevis*). *Cytogenetics*. 1: 217 - 223.

- (10). Mikamo, K. y Witschi, E., (1966). The mitotic chromosomes in *Xenopus laevis* (Daudin): normal, sex reversed and female WW. *Cytogenetics*. 5: 1 - 19.
- (11). Tymowska, J. y Kobel, H.R., (1972). Karyotype analysis of *Xenopus muelleri* (Peters) and *Xenopus laevis* (Daudin) Pipidae. *Cytogenetics*. 11: 270 - 278.
- (12). Manna, G.K. y Bhunya, S.P., (1966). A study of somatic chromosomes of both sexes of the common indian toad, *Bufo melanostictus* Schneid by a new spleen technique. *Caryologia*. 19: 403 - 411.
- (13). Yadav, J.S. y Pillai, R.K., (1976). Female heterogamety in two species of *Rana* (Ranidae-Anura). *Chrom. Inf. Serv.* 20: 9 - 11.
- (14). Singh, L., (1974). Present status of sex chromosomes in amphibians. *The Nucleus*. 17: 17 - 27.

- (15). Schmid, M. y Bachmann, K., (1981). A frog with evolved sex chromosomes. *Experientia*. 37: 243 - 244.
- (16). Becak, M.L., (1968). Chromosomal analysis of eighteen species of Anura. *Caryologia*. 21: 191 - 208.
- (17). Brum-Zorrilla, N. y Sáez, F.A., (1971). Chromosomes of South American Bufonidae. *Experientia*. 27: 470 - 471.
- (18). Bianchi, N.O. y Molina, J.O., (1967). DNA replication patterns in somatic chromosomes of *Leptodactylus ocellatus* (Amphibia-Anura). *Chromosoma*. 22: 391 - 400.
- (19). Díaz, N.F. y Veloso, A., (1979). Sistemática y evolución de los anfibios de Chile. *Arch. Biol. Med. Exp.* 12: 59 - 70.

- (20). Lynch, J.D., (1978). A re-assessment of the telmatobiine leptodactylid frogs of Patagonia. Occ. Papers Mus. Nat. Hist. Univ. of Kansas. 72: 1 - 57.
- (21). Formas, J.R., (1980). The chromosomes of *E. calcarius* and karyological evolution of the genus *Eupsophus* (Anura-Leptodactylidae). *Experientia*. 36: 1163 - 1164.
- (22). Schaeffer, B., (1949). Anuran from the early Tertiary of Patagonia. *Bull. Amer. Nat. Hist.* 93: 47 - 68.
- (23). Morescalchi, A., (1973). Amphibia. En: A.B. Chiarelli y E. Capanna, Eds. *Cytotaxonomics and Vertebrate Evolution*. Academic Press N.Y. Págs. 233 - 348.
- (24). Formas, J.R., (1978). A new species of leptodactylid frog (*Eupsophus*) from the coastal range of Southern Chile. *Studies Neotrop. Fauna and Env.* 13: 1 - 9.

- (25). Veloso, A.; Galleguillos, R. y Díaz, N., (1974). Anfibios (Anura-Leptodactylidae) del Parque Nacional Vicente Pérez Rosales. Consideraciones citotaxonomías. An. Mus. Hist. Nat. Valpso. 7: 297 - 310.
- (26). Formas, R.J., (1978). Systematic problems in the frog species *Eupsophus roseus* (Anura-Leptodactylidae) detected by karyological analysis. Experimentia. 34: 446.
- (27). Díaz, N.F.; Navarro, J. y Guíñez, R., (1980). Polimorfismo bioquímico en poblaciones de *Eupsophus* del Sur de Chile. Arch. Biol. Med. Exp. 13: 139 (Resumen).
- (28). Voronstov, N.N., (1973). The evolution of the sex chromosomes. En: A.B. Chiarelli y E. Capanna, Eds. Cytotaxonomics and Vertebrate Evolution. Academic Press N.Y. Págs. 619 - 657.
- (29). Gosner, K.L., (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. Herpetológica. 16: 183 - 190.

- (30). Veloso, A., (1977). Cytogenetic and cytotaxonomic evidences of chilean amphibians. En M.E. Drets, N. Brum-Zorrilla y G.A. Folle Eds. Aspectos de la función y organización cromosómica. UNESCO, Montevideo. Págs. 188 - 197.
- (31). Arrighi, F.E. y Hsu, T.C., (1971). Localization of heterochromatin in human chromosomes. Cytogenet. 10: 81 - 86.
- (32). Summer, A.T., (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp. Cell Res. 75: 304 - 306.
- (33). Quack, B. y Noel, B., (1977). The XY chromosome pair in man and human spermatocytes visualized by silver staining. Nature (Lond). 267: 431 - 433.
- (34). Rufas, J.S.; Iturra, P.; De Souza, W. y Esponda, P., (1982). Simple silver staining procedures for the location of nucleololus and the nucleolar organizer under light and electron microscopy. Arch. Biol. (Bruxelles). 93: 267 - 274.

- (35). Pathak, S. y Elder, F.F.B., (1980). Silver stained accesory structures on human sex chromosomes. Hum. Genet. 54: 171 - 175.
- (36). Weisblum, B., (1973). Fluorescent probes of chromosomal DNA structure three classes of acridines. Cold. Spring Harb. Symp. Biol. Quant. 38: 441-449.
- (37). Iturra, P. y Veloso, A., (1979). Localización de la zona organizadora del nucléolo (NOR) en cromosomas metafásicos de anfibios. Rev. Micr. Electr. Biol. Cel. 6: 53 - 60.
- (38). Parzen, E., (1960). Modern probability theory and its applications. Ed. John Wiley and Sons, Inc. N.Y. Págs. 464.
- (39). Bogart, J.P., (1970). Systematic problems in the amphibian family Leptodactylidae (Anura) as indicated by karyotypic analysis. Cytogenetics. 9: 369 - 383.

- (40). Fernández-Donoso, R., (1982). Asociaciones cromosómicas en el núcleo de los meiocitos y reordenamientos cromosómicos. Actas V Congr. Latinoam. Genética. Págs. 105 - 114.
- (41). Bianchi, N.O., (1978). Duplicación cromosómica y heterocromatina a nivel molecular y citológico. Ed. Depto. de Asuntos Científicos de la Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos (OEA). 93 págs.
- (42). Bull, J., (1978). Sex chromosome differentiation: an intermediate stage in a lizard. Can. J. Genet. Cytol. 20: 205 - 209.
- (43). Schmid, M.; Olert, J. y Klett, C., (1979). Chromosome banding in Amphibia. III. Sex chromosomes in *Triturus*. Chromosoma. 71: 29 - 55.
- (44). Solari, A.J., (1970). El par cromosómico X-Y de los mamíferos. Ciencia e Investigación. 26: 23 - 32.

- (45). Becak, M.L. y Becak, W., (1981). Behaviour of the ZW bivalent in the snake *Bothrops jararaca*. *Chromosoma*. 83: 289 - 293.
- (46). Sites, J.W.; Bickham, J.W. y Haiduk, M.W., (1979). Derived X chromosome in the turtle genus *Staurotyphlus*. *Science*. 206: 1410 - 1412.
- (47). Nieuwkoop, P.D. y Faber, J., (1956). Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). A systematic and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis. North Holland Publishing Co. Amsterdam.
- (48). Mercant-Larios, H. y Villalpando Irma, (1981). Ultrastructural events during early gonadal development in *Rana pipiens* and *Xenopus laevis*. *Anat. Rec.* 199: 349 - 360.
- (49). Kalt, M.R. y Gall, J.G., (1974). Observations on early germ cell development and premeiotic ribosomal DNA amplification in *Xenopus laevis*. *J. Cell Biol.* 62: 460 - 472.