

**EFFECTO INHIBIDOR DEL SEMEN DE BUFO BLOMBERGI
EN EL DESARROLLO DE LOS HUEVOS DE OTRAS ESPECIES DE BUFO**

Por: Fabio Heredia Cano (1)

RESUMEN

Desde hace más de 50 años, estudios morfológicos han demostrado que ciertas especies de sapos del género Bufo poseen testículos hipertrofiados. Sin embargo el significado biológico de este hecho ha permanecido oscuro. A través de intensos experimentos de hibridación en el laboratorio, con especies de Bufo de todo el mundo, se demostró que el semen de varias especies de las dos líneas evolutivas: las de cráneo estrecho y cráneo ancho respectivamente, que tenían testículos hipertrofiados, inhibían el desarrollo de los huevos de otras especies de Bufo. Una de las especies con testículos hipertrofiados es el Bufo blombergi, el sapo gigante de la selva pluvial tropical montañosa de Colombia.

Surgen entonces dos interrogantes: 1. ¿Esta inhibición ocurre también en la naturaleza? 2. Si ocurre, ¿cuál es su significado biológico?

Esta investigación se realizó tanto en el laboratorio como en el hábitat natural de la especie. En este último, el poder inhibitor del semen de B. blombergi fue probado contra otro sapo del mismo hábitat, Bufo marinus. Los resultados parecen demostrar: 1. el semen de Bufo blombergi inhibe el desarrollo de los huevos de otras especies de Bufo. 2. El Bufo blombergi ha desarrollado un mecanismo biológico altamente refinado para competir ventajosamente con otras especies de Bufo que tienen requerimientos ecológicos similares. En el presente trabajo sólo se tratará de comprobar el primero de estos dos interrogantes dejando para un artículo posterior el significado ecológico de tal efecto inhibitor.

INTRODUCCION

Investigaciones recientes realizadas sobre hibridación de especies de sapos del género *Bufo* alrededor del mundo han demostrado que el semen de algunas especies con testículos hipertrofiados inhiben el desarrollo de los huevos de otros *Bufo* (Blair, 1972; Heredia, 1973). Una de esas especies es el sapo gigante *Bufo blombergi* de la selva pluvial tropical del litoral pacífico colombiano. La Tabla I muestra la relación entre la longitud de los testículos (promedio de ambos testículos) y la longitud del cuerpo (punta del hocico—ano). El promedio de los tres sapos es del 55o/o de la longitud corporal. Esta hipertrofia ha sido conocida por décadas (Noble, 1924) pero su significado biológico todavía está por determinar.

Los experimentos realizados por Heredia (Tabla II), han dado mayores evidencias sobre el poder inhibitor del semen de *B. blombergi*. El máximo estado del desarrollo embrionario alcanzado por los huevos de otras especies inhibidas fue gástrula con exogástrulas muy anormales en ocho de los 13 cruces, o sea en el 61.5o/o de los casos.

El poder inhibitor del semen de *B. blombergi* sólo había sido demostrado en el laboratorio por Blair y Heredia (op. cit.). Se planeó entonces una investigación en el hábitat natural de la especie, cuyos resultados se presentan en este trabajo.

(1) Profesor, Departamento de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, S.A.

TABLA I.

Dimensiones de los testículos de tres *Bufo blombergi* recientemente sacrificados: porcentaje anchura/longitud y porcentaje longitud de los testículos/longitud del cuerpo (hocico-ano).

Sapo No.	Longitud corporal	Testículos	Longitud en cm	\bar{X} Long. en cm	Anchura en cm	Anch./Long. (o/o)	\bar{X} Long. test. Long. corp. (o/o)
1	19.8	Derecho	10.3	10.6	1.5	14.5	53,5
		Izquierdo	10.9		1.7	15.6	
2	19.9	Derecho	14.5	12.8	2.0	13.7	64.0
		Izquierdo	11.0		1.5	13.6	
3	19.2	Derecho	9.7	9.1	1.6	16.5	47.4
		Izquierdo	8.5		1.5	17.6	

TABLA II.

Resultados de la hibridación artificial entre sapos machos de la especie Neotropical *Bufo blombergi* que posee cráneo ancho, y hembras de otras cuatro especies de *Bufo*.

Número del cruce		Fertilizados	Eclosionados	Estado alcanzado
FH-C5	<i>B. blombergi</i> X <i>B. paracnemis</i>	25.6	—	EG
FH-C6	<i>B. blombergi</i> X <i>B. paracnemis</i>	31.6	—	B
FH-C7	<i>B. blombergi</i> X <i>B. marinus</i>	9.9	—	EG
FH-C8	<i>B. blombergi</i> X <i>B. regularis</i>	19.4	—	G
FH-C9	<i>B. blombergi</i> X <i>B. marinus</i>	2.0	—	EG
FH-C10	<i>B. blombergi</i> X <i>B. marinus</i>	6.2	—	EG
FH-C11	<i>B. blombergi</i> X <i>B. regularis</i>	15.8	—	G
FH-C12	<i>B. blombergi</i> X <i>B. paracnemis</i>	26.0	—	EG
FH-C13	<i>B. blombergi</i> X <i>B. boreas</i>	27.0	—	EG
FH-C14	<i>B. blombergi</i> X <i>B. boreas</i>	31.4	—	EG
FH-C17	<i>B. blombergi</i> X <i>B. blombergi</i>	82.5	26.0	M
FH-C45	<i>B. blombergi</i> X <i>B. marinus</i>	17.2	—	B
FH-C46	<i>B. blombergi</i> X <i>B. marinus</i>	14.7	—	B
FH-C47	<i>B. blombergi</i> X <i>B. marinus</i>	21.4	—	EG

B = blástula

G = gástrula

EG = exogástrula

M = metamorfosis

MATERIALES Y METODOS

Experimentos de reproducción en el laboratorio

Los cruces FH-C5 al FH-C17 fueron hechos en la Universidad de Texas, Austin, y los cruces FH-C45 a FH-C47, fueron hechos en la Universidad de Antioquia. Ambos grupos de experimentos aparecen en la Tabla 1.

Los métodos utilizados en los cruces fueron los mismos empleados por otros investigadores (Blair, 1959; Rugh, 1962). Los testículos de *B. blombergi* fueron extirpados y cortados en pequeños trozos los cuales fueron macerados en 10 ml de agua dulce natural en un mortero y luego pasados a una caja de petri para hacer una suspensión de esperma.

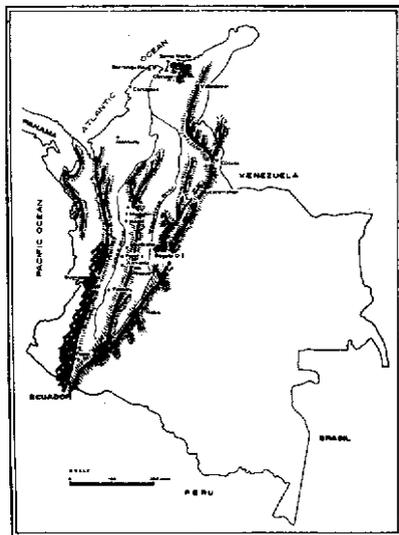
Los huevos fueron obtenidos de hembras inyectadas con pituitarias provenientes de varias especies de ranas (especialmente *Rana pipiens* y sapos (especialmente *Bufo valliceps*) horas antes del cruce planeado. Presionando suavemente los lados y el abdomen de las hembras en la dirección de la cloaca, los huevos eran expulsados y depositados directamente en la suspensión de esperma haciendo que todos los huevos se cubrieran con ella. Los huevos se dejaron en reposo por espacio de 10 minutos. Luego fueron lavados con

agua natural. Alrededor de 100 huevos fertilizados fueron dejados en la caja de petri y el resto se colocó en una bandeja de porcelana, en agua natural si se deseaba era posible preparar más de un petri con 100 huevos de la misma hembra. El número total de huevos, el número de huevos fertilizados y las etapas Shunway más avanzadas (Shunway, 1940) fueron cuidadosamente anotadas. La temperatura del aire en Austin se controló entre 23 y 25°C. En Medellín, osciló entre 20 y 25°C.

Experimentos de reproducción en el campo

El hábitat natural del B. Blombergi. El área natural escogida fue Piedrademoler, (Heredia, 1968), localizada en la jurisdicción del pueblo de Queremal, Valle del Cauca, Colombia, a 66 kilómetros al Oeste de Cali siguiendo la antigua carretera Cali-Buenaventura. Piedrademoler está radicada sobre la vertiente oeste de la cordillera occidental, esto es, en la vertiente pacífica, a 3°32' de latitud norte, 76°43' de longitud occidental (Fig. 1, círculo), dentro de un bosque tropical muy húmedo (bmh-T, Holdridge, 1953) con un promedio de lluvia anual de 5000-8000 mm, temperatura promedio de 25,12°C, humedad relativa promedio de 90,39% y 649 m de altura sobre el nivel del mar (Fig. 2)

Itaguf 120 5,150 68
Source: Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE)



5

FIGURA 1.

Distribución geográfica del *Bufo blombergi* en Colombia (área cruzada) y localización del área de investigación en Piedrademoler.

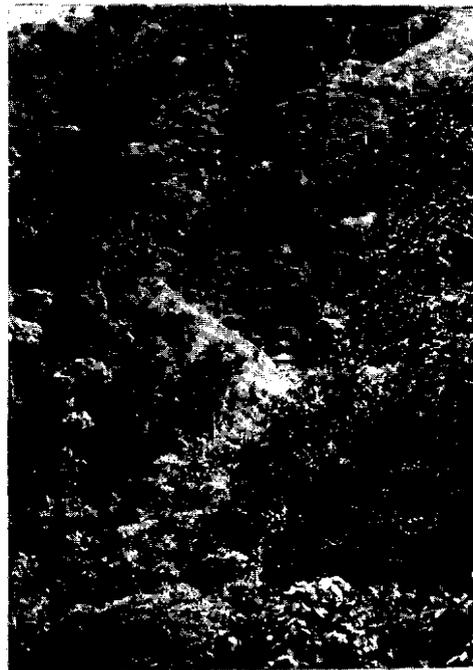


FIGURA 2.

El cañón de la quebrada Piedrademoler, visto desde la carretera. La casa en el centro de la foto está 50 metros arriba de los corrales de investigación.

El Corral. Con el fin de realizar los experimentos de reproducción en el hábitat natural, se construyó un corral de anejo (portada, Fig. 3,4) sobre la quebrada Piedrademoler con las siguientes dimensiones: 4x2x1.2m de altura, con una trampa para impedir la fuga de los excelentes trepadores *B. blombergi* y *B. marinus*. El corral se dividió en dos corrales iguales de 2 x 2 m y se construyeron dentro de ellos cuatro pozos de aproximadamente 50 cm de diámetro para el apareamiento, la oviposición y la metamorfosis. La condición especial que se buscó y se obtuvo en la construcción del corral y de los pozos, fue la de que el flujo fuera lentísimo y que el agua corriente no se devolviera de un pozo al anterior sino que siguiera una sola dirección, lo cual era indispensable para los experimentos. La alimentación de los sapos fue complementada con "casas" de comején puestas cada día en los corrales.

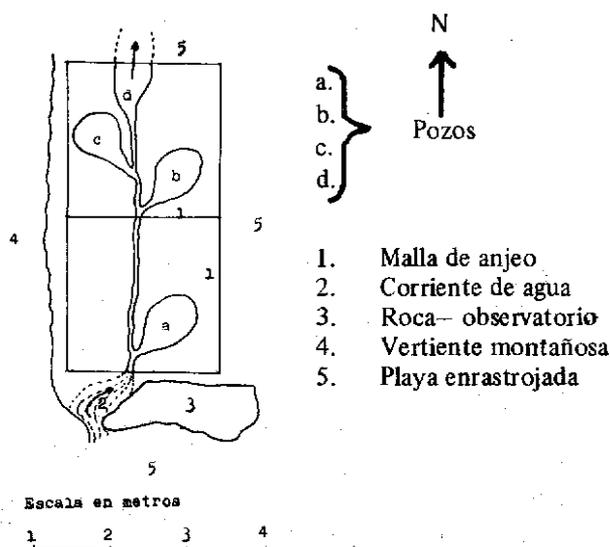


FIGURA 3.

Corrales experimentales sobre la quebrada Piedrademoler.

Experimentos de Reproducción

Buscando obtener oviposiciones simultáneas de *B. blombergi* y *B. marinus*, se colocaron grupos de machos y hembras (estas últimas muy bien seleccionadas por sus aparentes masas de huevos en el abdomen) en los corrales y se vigilaron día y noche. Después de 15 días, una *B. blombergi* de 27.0 cm de longitud, abrazada por tres machos (portada) empezó a expulsar sus huevos a las 4:30 a.m. en el pozo a y terminó a las 6:10 p.m. es decir, la oviposición total duró 13 horas y 40 minutos.

Actualidades Biológicas. Vol.3, No.8



FIGURA 4.

Corrales de anejo construidos sobre la quebrada Piedrademoler para los experimentos de reproducción en el hábitat natural del *Bufo blombergi* y del *B. marinus*.

Tan pronto como se inició la oviposición de la *B. blombergi*, todos los demás sapos fueron sacados del corral excepto los tres machos que la abrazaban. Cuatro hembras de *B. marinus* fueron inyectadas con pituitarias y puestas junto con cinco machos en el corral sobrante. Los machos abrazaron a las hembras y dos de ellas depositaron sus masas de huevos en sendos pozos, (Fig. 2, b y c) pozos que recibían el agua que había pasado por el pozo que ocupaba la *B. blombergi* en el corral superior. Se preparó suspensión de semen de un *B. blombergi* y se adicionó a la masa de huevos de *B. marinus* del pozo c. Luego se retiraron todos los animales de ambos corrales y se siguió el desarrollo de los huevos y las larvas, cuatro veces por día, durante 22 días. Se hicieron cálculos del número promedio de huevos puestos por las hembras de *B. blombergi* y de *B. marinus* contando y pesando cierto número de huevos y luego pesando la masa total.

También se contó el número de larvas de seis días de edad de *B. blombergi* en el pozo a, usando una malla con cuadrados de 5x5 cm (Fig. 5) y se hicieron cálculos del éxito

reproductivo (número de huevos puestos vs número de larvas de cierta edad después de la oviposición).

40 cm							
20	20	20	20	50	100	100	50
20	20	50	50	100	150	150	100
20	20	50	100	150	150	150	100
20	50	50	100	200	200	200	150
50	50	100	150	200	200	200	200
100	100	150	150	200	200	200	200
100	100		150	150	150	50	50

35 cm

FIGURA 5.

Contaje de las larvas de *Bufo blombergi* de 6 días de edad en el pozo *a* de los corrales sobre la quebrada Piedrademoler. Los números representan el número de larvas en cada cuadrado de 5 x 5 cm, entre 350 y 400 larvas fueron contadas fuera de la cuadrícula.

RESULTADOS

En el Laboratorio

En búsqueda de un mayor número de evidencias del efecto inhibitor del semen de *B. blombergi* sobre el desarrollo de los huevos de otros *Bufo* (Blair, 1972), se hicieron nueve fertilizaciones artificiales heteroespecíficas y una homoespecífica entre Agosto 23 y Septiembre 14, de 1972, usando suspensión espermática y hembras de cinco especies, incluyendo *B. blombergi* (Tabla 1). Los resultados de los nueve cruces heteroespecíficos concuerdan muy bien con los resultados de Blair (1972) puesto que los embriones nunca se desarrollaron más allá de la gástrula. En la fertilización homoespecífica de *B. blombergi*, 260/o de los huevos eclosionaron y 25 larvas completaron su metamorfosis, sobreviviendo hasta los tres meses cuando murieron por falta de una dieta y hábitat adecuados. Este último es siempre un obstáculo serio en la cría de anfibios anuros en el laboratorio.

En el Campo

Los experimentos de reproducción efectuados en los corrales dieron los siguientes resultados: 6.380 larvas de *B. blombergi* de la masa de huevos puesta en el pozo *a*, contadas seis días después de la fertilización por medio de la malla; 15 larvas de *B. marinus* de la masa de huevos puesta en el pozo *b* y 10 larvas de *B. marinus* de la masa de huevos puesta en el pozo *c*, todas de seis días de edad. La importancia de estas cifras será discutida más tarde. El promedio del conteo de dos masas de huevos de *B. blombergi* fué de 34.500 huevos (Fig.6). Si se contaron 6.380, de la edad de seis días, el éxito reproductivo del *B. blombergi* a esa edad es de 18.30/o. La masa promedio de *B. marinus* fué calculada en 17.000 huevos.



FIGURA 6.

Masa de huevos de *Bufo blombergi* encontrada en una depresión rocosa en las orillas de la quebrada Piedrademoler. El machete tiene 55 cm. de longitud.

DISCUSION

Cruces en el Laboratorio

Los cruces presentados en la Tabla 1 confirman los resultados de Blair (1972) en relación con la acción inhibitoria del contenido seminal del *B. blombergi* sobre el desarrollo de los huevos de otras especies de sapos. En todos estos cruces, la envoltura gelatinosa de los huevos se volvía blanquecina entre pocos segundos y 10 minutos después de la fertilización. El clivaje fue siempre anormal. El cruce homoespecífico FH-C17 dió 82.50/o de fertilización, 26.00/o de eclosión y un producto final de 25 sapos juveniles. El contraste con los otros cruces es evidente puesto que las mismas suspensiones de semen que evitaron el desarrollo de los huevos de las otras cuatro especies en idénticas condiciones ambientales, tuvieron éxito en producir 25 sapos juveniles de 120 huevos homoespecíficos.

Finalmente, es posible ver en el trabajo de Blair (1972, Apéndice H) que cuando las hembras utilizadas en este trabajo (Heredia, 1973) (Tabla 1) eran cruzadas con machos de testículos hipertrofiados, el desarrollo larvario alcanzaba la metamorfosis en mayor o menor grado mientras que nunca llegaba a la metamorfosis en estos cruces. Ahora bien no se hicieron controles de *B. marinus* x *B. marinus* en esta parte del trabajo porque ya estos habían sido hechos por Blair (op.cit. Apéndice H) con resultados de 47.50/o y 77.80/o de huevos eclosionados respectivamente.

Cruces en el Campo

Es conveniente recordar aquí que de 34.500 huevos de *B. blombergi* se produjeron 6.400 larvas en el pozo *a* contadas a los seis días de edad, mientras que de dos masas de huevos de *B. marinus* (17.000 huevos en cada una) solo se obtuvieron 15 larvas de seis días en el pozo *b* y 10 en el pozo *c*. También debe recordarse que al pozo *c* se le agregó suspensión de semen de *B. blombergi*, lo que no representó una diferencia significativa del éxito reproductivo en el pozo *b*. Dadas estas circunstancias, parece posible concluir que el semen eyaculado por los *B. blombergi* en el pozo *a*, traído por la lentísima corriente al pozo *b* y luego al *c*, inhibió los huevos de *B. marinus* en ambos pozos ya que la fecundación homoespecífica fué obvia puesto que se produjeron 15 y 10 larvas respectivamente. Además, las masas de huevos de *B. marinus* se volvieron blanquecinas, tal como sucedió en el laboratorio y a las 48 horas estaban totalmente descompuestas, cuando las de *B. blombergi* aparecían intactas y en pleno desarrollo.

Otro hecho importante que permite corroborar la conclusión anterior, es que en el sitio "La Elsa", dentro de la misma área de investigación, se encontraron en los mismos días masas de huevos de *B. marinus* en plena metamorfosis,

con miles de larvas en actividad. En ese sitio no hay *B. blombergi*. Las palabras textuales de un informante del sitio son: "Los "sapos roñosos" (*B. marinus*) son tan abundantes aquí, que su ruido (canto) no deja dormir; invaden casas y sembrados". Por el contrario, la experiencia personal de ocho años en el sitio de experimentación en Piedrademoler me permite afirmar que allá no se encuentran *B. marinus*.

En resumen, existen evidencias provenientes de experimentos de reproducción en el laboratorio y en el hábitat natural del *B. blombergi* y del *B. marinus*, donde las dos especies son simpátricas, y evidencias circunstanciales de éxito reproductivo del *B. marinus* donde el *B. blombergi* no se reproduce, que permiten demostrar la existencia de un factor inhibitorio en el semen del *B. blombergi* sobre el desarrollo de los huevos del *B. marinus* en el hábitat natural. El significado ecológico y las bases científicas de esta inhibición serán discutidas en publicaciones futuras, así como lo serán la historia natural de las especies comprendidas en este trabajo y la ecología de la región base del estudio.

EPILOGO

Este artículo representa solo el comienzo de una investigación mucho más extensa e intensa sobre el efecto inhibitorio del semen de las especies de *Bufo* con testículos hipertrofiados sobre los huevos de otras especies de *Bufo*. Se conocen por lo menos siete especies de sapos con testículos hipertrofiados: *B. garipeensis*, *B. inyangae*, *B. rosei* y *B. superciliaris* del Africa; *B. blombergi*, *B. haematiticus* y tancia biológica investigar las características de la reproducción de este grupo de sapos en sus hábitats naturales y su influencia sobre otras especies de *Bufo* en los dos continentes. No es difícil predecir el significado evolutivo, fisiológico, bioquímico, etc. de la investigación que se dirija a este nuevo campo de la biología.

Si este estudio despierta el interés de los científicos colombianos hacia la investigación en el tópico cubierto, el principal objetivo de este trabajo habrá sido cumplido.

RECONOCIMIENTOS

La realización del total de esta investigación, del cual el presente artículo es una parte, fue posible gracias a la valiosa y desinteresada cooperación de muchas personas y entidades. Pero estoy especialmente agradecido con la Universidad de Antioquia y la Fundación Ford que me proporcionaron los medios académicos y económicos para realizarla como tesis de grado de Ph.D.; y con el doctor W. Frank Blair, mi director de investigación en la Universidad de Texas, Austin.

BIBLIOGRAFIA

Blair, W.F. 1972. Evolution in the toad genus *Bufo*. University of Texas Press, Austin, VIII, 459 pp.

Heredia, F. Estudios Preliminares sobre el sapo gigante *Bufo blombergi*. Bol.Dep.Biol. Universidad del Valle, Colombia, I (1):31-36, 1968.

Heredia, F. Biological significance of the inhibitory effect of *Bufo blombergi* semen on the development of eggs of other *Bufo* species. Ph.D. Thesis The University of Texas, Austin, 1973.

Noble, G.K. Amphibia. In Bulletin of the American Museum of Natural History Vol. XIIX, 1923-1924: 147, 1924.

Rugh, R. 1962. Experimental Embriology. Burgess Publishing Company, IX, 1962, 501 pp.

Shumaway, W. Stages in the normal development of *Rana pipiens*. Anat. Rev. 78: 139, 1940.