BOL SOC. BIOL. DE CONCEPCION, TOMO XLII, pp. 355-379 — 1969-1970

DESARROLLO EMBRIONARIO Y METAMORFOSIS DE *PLEURODEMA BRACHYOPS* (COPE) (SALIENTIA-LEPTODACTYLIDAE)

POR

J. LEON-OCHOA * Y R. DONOSO-BARROS **

INTRODUCCION

La presente comunicación refiere nuestras observaciones realizadas en 1964 en Cumaná, Venezuela, acerca de la embriogénesis de *Pleurodema brachyops* (Cope).

Estudios ontogénicos sobre leptodactylidos del género *Pleurodema* han sido realizados con anterioridad por F. ALAY (1959) como Tesis de Veterinario, no difundida como publicación especial pero muy resumida por CEI. Géneros muy próximos a *Pleurodema,* tales como *Pseudopaludicola, Physalemus,* han sido estudiados por FERNANDEZ (1927) y por BARRIO (1957).

Investigaciones venezolanas acerca de la embriogénesis de especies autóctonas no han sido registradas, según VELEZ BOZA (1961). Parte de esta investigación ha sido utilizada por uno de nosotros (LEON-OCHOA) como Tesis de Licenciatura en la Facultad de Ciencias, Universidad de Oriente, Venezuela.

* Escuela de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.
** Instituto Central de Biología, Universidad de Concepción, Chile.

MATERIAL Y METODO

MATERIAL.

En esta investigación se ha utilizado *Pleurodema brachyops,* anfibio característico de las partes bajas del Sistema de la Costa, muy común en Cumaná y alrededores, el que ha sido coleccionado en las inmediaciones del Cerro Colorado (Cumaná, Edo. Sucre).

Esta especie se caracteriza por su tamaño mediano; su color general verdoso-amarillento con manchas grandes negruzcas; la presencia de un par de glándulas lumbares y el color rojo brillante en el dorso de los muslos y la región inguinal (Fig. 1).

El dimorfismo sexual es poco notable. La hembra carece de sacos vocales, color oscuro-gular y callosidades. Frecuentemente es de mayor tamaño y por lo general entra en el agua en el momento del amplexo. Sus actitudes aposemáticas no son acentuadas (Fig. 2).

La llamada sexual del macho se caracteriza por un fuerte boo . . . boo . . . boo espaciado. Esta llamada grave y sonora contrasta con su pequeñez morfológica. Los machos no cantan en coro.

El amplexo logrado en la naturaleza no se mantiene en el laboratorio. La actividad sexual de *Pleurodema brachyops* parece ser permanente al igual que en otras especies del género, abarcando la mayor parte del año. Las observaciones han sido realizadas desde marzo a octubre y en este lapso lo hemos encontrado sexualmente activo. Durante la época de sequía se oculta entre la hierba, bajo piedras, en grietas y otros lugares adecuados que los proteja de la desecación.

Con las primeras lluvias se reúnen por centenares en las charcas recién formadas; bajo este estímulos, los machos inician su canto que atrae a las hembras. Llama mucho la atención verlos flotando sobre el agua con una exagerada distensión de los sacos vocales.

La actividad genésica sólo se verifica en la noche, apreciándose desproporción en el número de individuos de cada sexo; los machos son más numerosos que las hembras.

La distribución geográfica de esta especie en Venezuela es muy amplia, se la encuentra desde Perijá a la Península de Paria y en todo el Llano, como igualmente en el pie de monte de la cordillera de la Costa, zona comprendida bajo la denominación "Coastal Range" (Rivero).

Para este trabajo se han seleccionado ejemplares sexualmente maduros. Cuando son adultos la hembra mide aproximadamente 36 a 42 mm. y el macho 34 a 38 mm. (distancia ano-hocico). Conviene utilizar animales reción colectados, siendo mejores los obtenidos en la noche que precede a su utilización. Esto se debe a que el material está bien alimentado, poco lesionado por el cautiverio y en las mejores condiciones biológicas para el trabajo.

METODO.

a) *Ovulación.*— La ovulación de las hembras se indujo implantando hipófisis según los métodos de WOLF-HOUSSAY (1929) y SHUMWAY (1940), estandarizados por RUGH (1934-41), que en esencia consisten en la inyección del lóbulo anterior de hipófisis por vía intraperitoneal. Los animales fueron decapitados y las cabezas fueron disectadas para extraer las hipófisis de acuerdo a indicaciones clásicas.

b) *Suspensión hipofisiaria.*— Las glándulas así obtenidas se colocan en un vidrio de reloj que contiene 4 cc. de solución Holtfreter al 0,6%. La suspensión hipofisiaria se inyecta por vía intraperitoneal en la región lumbar. Habitualmente se han empleado cuatro hipófisis por ejemplar, resultando esta dosis suficiente para obtener la ovulación. Sólo muy pocas veces ha sido necesario repetir las inyecciones con mayor cantidad de extractos.

El tiempo de ovulación muestra diversas fluctuaciones, oscilando entre 6 a 20 horas (promedio 8 horas).

c) *Suspensión espermática.*— Para su obtención se emplean los testículos de machos no menores de 34 mm. de longitud. Las gónadas se extraen y depositan en una cápsula de Petri con 10 cc. de solución Holtfreter al 20%; se maceran con suavidad, controlando al microscopio la movilidad y el número de elementos maduros. Posteriormente, la suspensión se hace pasar por un tamiz de 45 micras a fin de retener los elementos celulares grandes y dejar los espermios libres de cuerpos extraños.

Características de las Células Germinales.— Los espermios son elementos grandes (33,27 micrones de longitud); la cabeza es de contorno falciforme y mide 10,15 micrones de longitud promedio. En la parte anterior, el acrosoma es poco visible y solamente en el vértice se encuentra una zona tintorialmente distinta que corresponde a esa formación. El cuello es muy corto y apenas diferenciado por un gránulo oscuro. La cola mide 23,12 micrones de longitud y todo su contorno está recorrido por una membranita ondulante que se extiende hasta las proximidades del cuello.

Los movimientos del espermio se deben a la acción de la cola y la membranita ondulante. Este se desplaza en sentido lineal y a través de movimientos serpentiformes de la cola. Sin embargo, la kinesis general tiene un sentido espiral por la disposición y movimientos de la membranita ondulante.

La actividad espermática no sobrepasa un tiempo mayor de seis horas.

El óvulo es esférico y mide por término medio 1 mm. de diámetro. El vitelo es relativamente abundante y presenta cierta regu-

laridad en su distribución, aunque es algo mayor en la zona vegetativa. Los óvulos son blancos, solamente hay ligeros tintes marrones en el polo animal (Fig. 3-a, Lám. I-2).

El óvulo de *Pleurodema brachyops* está envuelto por una membrana gelatinosa y transparente. Las ovisposturas son de 3.000 a 5.000 huevos en conjunto sobre un lecho de espuma. En condiciones naturales la ovipostura coincide con el amplexo, pero éste no es determinante absoluto, ya que en hembras aisladas puede producirse espontáneamente como en las inyectadas con extracto hipofisiario. Estos hechos confirman la naturaleza automática de la ovipostura, condicionada a estímulos humorales.

Los conjuntos posturales obtenidos en el laboratorio muestran menos cantidad de espuma que los efectuados en la naturaleza.

Fertilización artificial.— Los huevos obtenidos en el laboratorio se depositan en cápsulas de Petri de 20 cc. con agua corriente a razón de 100 a 200 óvulos por placa; o bien, en recipientes cilíndricos de 1.000 cc. de capacidad, los que se llenan con agua hasta 1/3 su altura.

Para fecundar los óvulos, se deja caer lentamente la solución espermática, realizando simultáneamente una lenta agitación. La temperatura a que se realizó la impregnación fue de 24° C, con oscilaciones de 24 a 27° C.

El porcentaje de óvulos fecundados en las cápsulas de Petri alcanza a un 60%; mientras que en los recipientes de tamaño grande hay un mayor número de óvulos fertilizados (70%). Es de interés destacar que en las masas posturales obtenidas de las charcas, el índice de fertilización es muy elevado, alcanzando a más de un 90%, lo que contrasta con los resultados obtenidos en el laboratorio. Es posible que estas diferencias puedan deberse entre otras causas: 1) a que los espermios utilizados en el laboratorio provenientes de macerado testicular, contienen elementos en distintos grados de maduración; 2) a la acción mecánica que sin duda destruye también muchos espermios viables; y 3) a la intervención del macho que durante la eyaculación bate el agua, ampliando así las posibilidades de establecer contacto entre espermios y óvulos.

El éxito de una fertilización se reconoce precozmente por modificaciones que aparecen en la superficie del huevo (Fig. 3-b, Lám. I-2). Al comienzo se observa una superficie arrugada en el polo animal que se deprime apreciablemente y se acompaña de escotaduras, que según RUGH (1951), serían motivadas por cambios de naturaleza físico-química que traccionarían la región cortical del huevo hacia el centro. Posteriormente, la superficie arrugada desaparece a medida que avanza el primer surco de segmentación. Debemos indicar que no siempre los signos que señalan la fecundación son iguales, tanto en su posición como en su simetría y además son frecuentemente anómalos.

ETAPAS DEL DESARROLLO EMBRIOLOGICO DE PLEURODEMA BRACHYOPS

A. *Segmentación.*

Primera surcación: El primer surco de segmentación aparece 45 minutos después de la fecundación artificial. Este surco determina el primer plano de segmentación y su orientación es vertical o meridiana, dividiendo el huevo en dos blastómeros iguales. El clivaje es más acentuado en el polo animal, desde donde avanza lentamente, para completarse en el polo vegetativo antes de la iniciación del segundo surco. La causa de esta desarmonía en la surcación se debe a la distribución de la yema (Ley de Balfour) (Fig. 3-c, Lám. I-3).

Segunda surcación: Ocurre 20 minutos después de completada la primera. El segundo plano es también vertical o meridiano y divide al huevo en cuatro blastómeros sub-iguales alargados longitudinalmente, con escasa pigmentación marrón clara en el polo animal; el polo vegetativo es blanco. Al igual que el primer clivaje éste se profundiza más en el polo animal y progresa con velocidad semejante hacia el polo vegetativo (Fig. 3-d, Lám. I-4).

Tercera surcación: Se inicia a los 25 minutos de terminada la segunda (1 hora 30 minutos después de la fecundación). El plano de segmentación es horizontal y se sitúa ligeramente por encima del ecuador. Este plano supraecuatorial, divide, a partir de este momento, al huevo en dos tipos fundamentales de células: a) Las supraecuatoriales o micrómeros de menor tamaño, menos ricas en vitelo y pigmentadas de marrón claro, las que ocupan el polo animal que aparece como más sombreado; b) las células situadas bajo el ecuador o macrómeros, de tamaño mayor y blancas, las que ocupan el polo vegetativo y se insinúan en pequeña parte en el polo animal. La aparición del surco horizontal delimita una etapa del desarrollo caracterizada por ocho células o blastómeros (4 micrómeros y 4 macrómeros) (Fig. 3-e, Lám. I-5).

Cuarta surcación: (Mórula de dieciséis células). La primera etapa aparece 20 minutos después del estadio anterior de ocho células, y en este caso los planos de segmentación son dobles. La distribución de los surcos es meridiana, iniciándose ambos simultáneamente desde el polo animal hacia el vegetativo. Las células originadas son de tamaño considerablemente menor. La primera mórula se caracteriza por 16 blastómeros (Fig. 3-f, Lám. I-6).

Quinta surcación: (Mórula de treintaidós células). La quinta división es también doble y se efectúa en un tiempo relativamente corto, pues ocurre 10 minutos después de la etapa anterior, originándose un embrión de 32 blastómeros. Los dos surcos que aparecen son supra e infra-ecuatorial. El supra-ecuatorial se completa primero que el infra-ecuatorial (Fig. 3-g, Lám. I-7).

Blastulación: Después de esta última división, el ritmo del Después de esta última división, el ritmo del clivaje se pierde y las células continúan dividiéndose sin que se advierta una sincronía especial en las divisiones que permiten caracterizaciones susceptibles de definir embriológicamente. La blástula se completa a las 2,20 horas después de la fecundación; en este estado, el tamaño continúa siendo el mismo que el del huevo sin segmentar (1 mm. de diámetro) (Lám. I-8).

B. *Gastrulación.*

Una vez constituída la blástula, se observa el crecimiento de los micrómeros sobre los macrómeros tratando de englobarlos (Fig. 4, Lám. I-9). Como consecuencia de ello empieza a formarse el labio dorsal del blastoporo (Edad 3 horas), el que se manifiesta 30 minutos más tarde como una leve hendidura que comienza a engrosarse para formar un anillo que progresa sobre el polo vegetativo encerrando los macrómeros (Fig. 5, Lám. I-10). Esta etapa constituye la migración del anillo blastopórico (Edad 3,30 horas), que al completarse en el polo macromérico termina por reducirse y formar el blastoporo. Este estadio se completa a los 65 minutos de la iniciación del labio dorsal. Simultáneamente con estas modificaciones, el huevo experimenta un cambio en su diámetro aumentando en un quinto. En etapas sucesivas él se hace cada vez más evidente.

Como en todos los huevos de anfibios el tapón vitelino (Fig. 6, Lám. I-11) es visible después que el anillo blastopórico ha iniciado su migración (Edad 7,35 horas). La masa formada por el vitelo aparece rodeada de células depigmentadas con núcleos ligeramente oscuros. La hendidura formada por el labio dorsal tiende a desaparecer cuando el tapón vitelino empieza a reducirse e incluírse en los macrómeros (Fig. 7, Lám. I-12). Al cabo de 1 hora 40 minutos queda cenvertido en un punto blanco que finalmente también se hundirá. Esta etapa se completa en 9,15 horas de efectuada la fertilización. La gástrula mide entonces 1,25 mm.

Neurulación.— Una vez ofrmada la gástrula y alrededor de dos horas 15 minutos de haber alcanzado este estado embrionario, comienzan a observarse los espesamientos neurales (Fig. 8, Lám. I-13). Estos se sitúan anteriormente apareciendo externamente como una impresión en forma de Y poco marcada. En esta época el embrión, cuya edad es 11,30 horas mide entre 1,3 y 1,4 mm. de longitud por 1 mm. de ancho.

Iniciado el espesamiento neural, su progreso continúa en la delimitación de las placas neurales, las que son muy evidentes 30 minutos después de iniciados los espesamientos. El desarrollo ulterior de estos últimos se completa 30 minutos más tarde con la aparición de las crestas neurales (Fig. 9, Lám. I-14).

A las 12,30 horas de la evolución embrionaria el hundimiento neural inicial ha hecho que las crestas neurales aparezcan claramente diseñadas como dos prominencias situadas a ambos lados del surco neural (Fig. 10, Lám. I-15). En este momento, el embrión mide 1,5 mm. Transcurrida 1 hora 30 minutos más, las crestas neurales se fusionan en la línea media, encima del surco, el cual se convierte en tubo neural (Fig. 11, Lám. I-16). La parte anterior queda, sin embargo, libre de esta fusión, mostrando un pequeño orificio: el neuroporo.

C. *Desarrollo de los Esbozos Primarios.*

La parte anterior del embrión muestra una serie de pequeñas yemas que corresponden a la insinuación de los esbozos branquiales, oculares y nasales. Simultáneamente la región posterior se ha prolongado para formar el pequeño botón caudal (Fig. 12, Lám. II-17).

El abdomen se hace prominente y el vitelo, que en los estados anteriores no era muy visible, transluce a través de la pared ventral.

En la porción anteriotr del embrión se advierte una depresión, la que dará origen posteriormente al estomodeo. Lateralmente a ella y en la región ventral, se encuentran dos pequeñas prominencias que corresponden a los esbozos de las ventosas orales. A partir de este momento se comienzan a apreciar leves movimientos que serán evidentes 55 minutos después. En este período el tamaño del embrión es de 1,65 mm.

Rotación del embrión.— Los movimientos de rotación aparecen cuando el embrión alcanza una longitud de 2 mm.; esto sucede 18 horas después de la fecundación. Se evidencia ya el primordio caudal; las ventosas orales están ligeramente alargadas; la invaginación estomodeal se hace más prominente y con abundante vitelo. En este estadio se inicia la diferenciación de cabeza y cuerpo, aunque no muy marcada. El embrión continúa su rotación por más de 45 minutos, que es cuando aparece la respuesta muscular (Fig. 13, Lám. II-18).

Respuesta muscular.— La respuesta muscular aparece cuando el primordio caudal tiene 1 mm. de longitud y se ha curvado; entonces se presentan sacudidas bruscas, típicas de la respuesta muscular. En este período del desarrollo, el embrión aparece ligeramente curvado en el interior de la cápsula gelatinosa. Las ventosas orales son más prominentes, oscuras y fuertes; en la parte anterior de la cabeza embrionaria se encuentran puntos negros que corresponden a las futuras narinas. Ligeramente por detrás se hallan las manchas oculares. La metamería muscular se reconoce desde la región anterior dorsal, algo por detrás de la cabeza, hasta la región caudal. Los miómeros se disponen con sus típicas figuras en V. En esta etapa de 18,45 horas, su tamaño es 2,8 mm. de longitud y algo más ancho (1,2 mm.) (Fig. 14, Lám. II-19). La actividad muscular del embrión contribuye a facilitar el desprendimiento de la cápsula gelatinosa, lo que se alcanza 3 horas después. Al cabo de este tiempo, se ven los pequeños renacuajos nadando descontroladamente en cualquier sentido.

La velocidad de desove es variable, ya que algunos lo hacen con mayor rapidez que otros. Las protuberancias pronéfricas aparecen por detrás de los brotes branquiales y luego se desplazan hacia la región media dorsal (Lám. II-20).

Caracterizan también a esta etapa los movimientos cardíacos, los primeros movimientos del corazón aparecen en el embrión, cuya edad es de 21,45 horas y su longitud 3,7 mm.

El corazón se ve por transparencia por detrás de los brotes branquiales y por delante del abdomen.

Los brotes branquiales se muestran como prominencias festoneadas, separadas entre sí por pequeños surcos. Las manchas oculares se evidencian como puntitos oscuros. La boca y el año no están perforados.

La lámina caudal es transparente, salvo en la región central, en la què se puede ver la metamería muscular.

El cuerpo embrionario es deprimido lateralmente. Las larvas en el acuario se disponen en poseición vertical y otras veces descansan en el fondo.

D. *Diferenciación de los órganos larvales.*

A las 29 horas el embrión mide 4,1 mm. y las branquias externas son ramificadas (Lám. II-21). En ellas puede verse claramente la circulación branquial. Las ventosas orales son prominentes; los brotes oculares aparecen como zonas opacas; el ano y la boca no están perforados. El estomodeo aparece deprimido y el proctodeo se aprecia en medio de una protuberancia.

El crecimiento del embrión determina un alargamiento general de la figura, y el saco vitelino acompaña este prolongamiento. El conjunto vitelar cambia su apariencia globosa por un contorno más fusiforme. Los miómeros se aprecian en la región dorsal y caudal.

En el embrión de 34 horas y media aparecen diferenciados los labios, a la vez que se ha producido la perforación de la boca; en esta etapa no hay odontoides córneos.

Las branquias están dispuestas en tres troncos principales, de los cuales, dos son robustos en su extremo proximal y el otro es delgado, pero todos en su extremo se dicotomizan en ramillete. El esbozo del opérculo empieza a insinuarse y las vesículas ópticas se oscurecen (Lám. II-22).

En el transcurso del crecimiento embrionario, las branquias tienden a hacerse internas. El opérculo va progresando con el desarrollo y cuando el embrión alcanza 5 mm. de longitud total, las branquias son apenas visibles en sus extremos, debido a la inclusión de ellas por acción opercular (Lám. II-23).

En este momento, el ojo es claramente visible, aunque no se percibe muy bien el cristalino.

Las ventosas orales alcanzan su tamaño máximo y las asas intestinales aparecen dispuestas concéntricamente.

En la boca se producen importantes cambios como la aparición de surcos labiales bien definidos y la presencia de un pico córneo.

Cuando el embrión llega a las 44 horas, el ano se perfora.

A las 48 horas de la ontogénesis las branquias son internas, comunicándose con el exterior a través del espiráculo. Este es poco visible y está ubicado al lado izquierdo del abdomen. Los ojos revelan la presencia del cristalino y están dotados de movilidad (Lám. II-24).

La larva de tres días (72 horas) muestra los primeros odontoides córneos distribuídos según la siguiente fórmula $\frac{1}{1-1}$, que no será su fórmula definitiva, pues esta se alcanza al quinto día (Figs. 16 y 17).

Al tercer día la larva mide 5,8 mm. (3,8 mm. corresponden a la cola). En el cuerpo se ve el corazón con sus típicos movimientos. A los lados de la boca aún persisten restos de ventosas orales.

Al quinto día su longitud es 8,5 mm. continuando sucesivamente su desarrollo lineal y ponderal. Es indudable que en esta época del desarrollo se ha completado morfogenéticamente la larva.

A partir de este período, se alimenta activamente incluyendo en su dieta restos orgánicos y vegetales. A través de la pared abdominal se observa el intestino espiralado con sus asas dispuestas concéntricamente e incluso los movimientos peristálticos (Fig. 18).

En el momento de la aparición de las extremidades posteriores las larvas tienen 20 días. Las extremidades anteriores emergen a los 28-30 días, siendo entonces el tamaño de 35 mm.

La metamorfosis ulterior no se lleva a cabo aceleradamente.

DESCRIPCION DE LA LARVA PLEURODEMA BRACHYOPS

La larva de *P. brachyops* antes del nacimiento de las extremidades posteriores mide 35 mm. de longitud, de los cuales 13-15 mm. corresponden al cuerpo y el resto a la cola. La forma general es subovoídea, aplanada ventralmente y más ancha que alta. La región opercular es abultada y en ellas se observan las arcadas branquiales internas. La región ventral es muy característica por la presencia de un círculo dorado limitado por su periferia más oscura. En su porción central se trasluce el intestino y por delante de esta zona se observa la actividad cardíaca. El espiráculo se encuentra a la izquierda, más cerca del ojo que del ano, y es muy corto y poco evidente. El ano se abre en un pequeño pliegue por debajo de la lámina caudal (Figs. 17 y 19).

La lámina caudal talgo transparente, muestra ligera pigmentación, siendo más alta que el cuerpo y terminando obtusamente.

El espacio interorbital es mayor que el espacio entre las narinas y la distancia nariz-hocico es igual a la distancia nariz-ojo. El hocico es corto y subovoideo.

La boca no es terminal; está situada algo ventralmente, siendo tan ancha como el espacio interorbital. Las papilas orales se disponen en una línea en el borde del labio inferior, sobrepasando el ángulo de la boca, de manera que en el labio superior ocupan un tercio de su extensión. El pico córneo es fuerte y finamente dentado en ambas piezas. La fórmula de los odontoides córneos es $\frac{1}{1-1}$ / $\frac{1-1}{2}$, pudiendo presentarse algunas veces como $\frac{1}{1-1}$ / 3.

La emergencia de las extremidades opsteriores ocurre a los 20 días.

Las extremidades anteriores aparecen entre 28-30 días de edad. Después de esta última emergencia la cola se reduce progresivamente en seis días (Fig. 20).

Antes de la reducción de la cola aparecen los brotes de las glándulas lumbares típicas del género *Pleurodema,* e incluso se pueden observar en renacuajos sin extremidades anteriores.

Cuando se completa el pequeño anuro, mide de 13-15 mm. de longitud. Las glándulas lumbares son más prominentes, las manchas rosadas tibiales e inguinales son bastante visibles, el color dorsal es verde amarillento con manchas oscuras y el vientre es blanco (Fig. 21).

DISCUSION

Con respecto a los caracteres más relevantes del desarrollo embriológico de *Pleurodema brachyops* debemos señalar que es una especie adaptada a medios áridos, constituyendo una forma típica de ambientes xerófilos.

Las formas xerófilas en los anfibios poseen adaptaciones que necesariamente deben orientarse en dos sentidos: 1) las referentes al individuo que debe ser capaz de tolerar temperaturas relativamente altas y 2) el lograr autorregulaciones que permitan asegurar la reproducción de la especie y con ello su continuidad en un medio sujeto a cambios ambientales violentos.

El efecto de la temperatura en los anfibios muestra variadas respuestas. Numerosos trabajos como los de BRATTSTROM (1963); BOWERS, SEGALOFF y BROWN (1959), han estudiado el comportamiento de los anfibios a la temperatura.

Las investigaciones de BRATTSTROM, han demostrado que en los anuros tropicales de ecología similar a *Pleurodema brachyops,* existe una tendencia a desarrollar sus actividades a temperaturas más elevadas, no sólo en su conducta vegetativa normal, sino también en una persistencia de la actividad sexual. Algunos anfibios tropicales como *Bufo marinus* aparecen inactivos a temperaturas inferiores a 15° C. En líneas generales, los anfibios tropicales aparecen más limitados a los desniveles térmicos en relación con los de clima templado.

Algunas especies como *Bufo b. asiaticus* necesitan la existencia de bajas temperaturas (2 y 3° C) durante el mes de Diciembre como carácter ecológico favorable para la dehiscencia y maduración de los huevos; en cambio si las hembras son mantenidas entre 9 y 10° C, en esa misma época del año son incapaces de reproducirse.

Según las observaciones de SU y WANG (1963) en el área de Shangai esto sería debido al efecto estimulante del frío sobre la pituitaria.

En cambio, el comportamiento de *Bufo melanostichus* de las áreas subtropicales de Kwangtung, Kwangsi y Yunan es completamente diferente, hechos estos que revelan por sí el valor limitante de la temperatura.

En relación al género *Pleurodema,* la especie aquí estudiada, constituye una de las formas más típicas de las regiones áridas y quizás sólo sea comparable con *Pleurodema tucumana* y con algunas poblaciones de *Pleurodema cinerea*; sin embargo no tenemos de ellas antecedentes embriológicos.

En formas de clima templado como *Pleurodema thaul,* pero de gran versatilidad ecológica, se ha demostrado un ciclo sexual persistente durante todo el año, como también una elevada resistencia a las pérdidas de agua ante estímulos neurohipofisiarios (VARGAS y ESPINA, 1959). Estos hechos demuestran que la especie se encontraba capacitada para invadir zonas de mayor aridez que las habitadas, como ocurre en algunas biocenosis.

Pleurodema brachyops es indudablemente un paso más avanzado en cuanto a la adaptación a ambientes muy xerófilos, lo que motiva que con muchísima frecuencia se la encuentra en sitios secos e incluso hasta en las cercanías de las costas, refugiándose en lugares con escasa humedad, lo que naturalmente sólo es posible si existe una resistencia a pérdidas exageradas de agua, como igualmente una permeabilidad de la piel en sentido contrario, para facilitar el ingreso de líquidos, estos movimientos hídricos según KIRK y HOGBEN (1946) juegan un papel de termorregulación.

Establecidas algunas premisas que permiten comprender ecológicamente la supervivencia de *Pleurodema brachyops* en las biocenosis áridas, lo que se demuestra al observar las adaptaciones del género a las distintas regiones de América del Sur, corresponde interpretar su comportamiento sexual.

El conocimiento de la sexualidad del género *Pleurodema* no es completo, pero sí debemos señalar que las formas de las regiones templadas se muestran sexualmente activas durante todo el año y lo mismo ocurre con la especie en consideración.

Las formas australes como *Pleurodema bufonina* poseen un ciclo típicamente estacional, comparable con *Rana esculenta* del hemisferio norte; sin embargo, estos ciclos estacionales de los anuros citados, nada tienen que ver con las limitaciones madurativas determinadas por la acción de la temperatura, como ocurre con las especies mencionadas de China; aquí se trata de una sexualidad cuyos períodos de reposo son independientes de la temperatura ambiente.

En *Pleurodema brachyops* la temperatura no influye sobre el ciclo sexual ya que las variaciones térmicas anuales no afectan su aptitud y actividad genésica.

La reproducción de los animales que dependen del agua en las regiones áridas ofrece aspectos interesantes y dignos de estudiar. Se sabe que las lluvias crean un ambiente húmedo que estimula a la reproducción de numerosos animales entre los que cabe mencionar a los anfibios. Sin embargo, en las regiones áridas los cambios tér-

micos son violentos y la actividad solar puede secar rápidamente las charcas pequeñas que contienen los huevos y las formas en desarrollo. Cabe suponer que deben haberse desarrollado ciertos mecanismos adaptativos capaces de salvar estas contingencias.

Del desarrollo de las formas existentes en las regiones áridas de América del Sur existe escasa información; solamente se conoce el de *Hyla crepitans,* observado en nuestro laboratorio y que en la iniciación de sus fases embriológicas ha mostrado una velocidad ontogenética comparable a *Pleurodema brachyops.* A pesar de ello no debemos establecer una relación entre ambas especies, ya que sólo obtendríamos una opinión muy general sujeta a controversias; por ello hay que compararlo con *Pleurodema thaul* que pertenece al mismo género y cuyos procesos ontogenéticos son conocidos.

Los huevos blancos de *Pleurodema brachyops* difieren completamente de los óvulos pigmentados de *Pleurodema thaul;* pero las causas de que el ciclo tirosina-melanina no se efectúe en los huevos de muchos leptodactilidos no está aclarado y probablemente se deba a la inferencia de genes de acción más retardada. No es fácil comprender las razones adaptativas de los huevos despigmentados; pero sí, son bastante crípticos en relación con la masa de espuma que los envuelve. Es digno también señalar como elemento adaptativo, el mayor número de huevos depositados por *P. brachyops* en relación con la especie de clima templado. La postura de *brachyops* llega normalmente a 3.000 huevos y en casos excepcionales a más de 5.000 (Fig. 22); esto es realmente notable si lo comparamos con *thaul* cuyas masas posturales no sobrepasan los 500 huevos como máximo. Parece incuestionable que el mayor número de huevos en este caso significaría aumentar la probabilidad de sobrevida a la descendencia preservándola de predadores y de las injurias climáticas.

La segmentación de *P. brachyops* no se aparta en cuanto a la forma, de las líneas clásicas de los anfibios, siendo la sucesión y evolución de los blastómeros muy similar; pero las diferencias en cuanto a la velocidad de segmentación a temperaturas similares en comparación con *P. thaul,* de clima templado, son realmente asombrosas. Es así como el primer surco de segmentación en *thaul* tiene lugar 1,50 horas después de la fecundación, en ese mismo tiempo *brachyops* ha alcanzado el cuarto surco; cuando *brachyops* llega a la gastrula con labios blastopóricos diferenciados, *thaul* va en la cuarta surcación y cuando *brachyops* se ha convertido en una larva desovada *thaul* es apenas una neurula, lo que revela claramente que los procesos ontogenéticos son de una celeridad extraordinaria en *brachyops* y difícilmente comparables con los otros anuros conocidos.

Esta taquigénesis notable de *Pleurodema brachyops* es sin duda una condición adaptativa muy ajustada a las condiciones ambientales en que vive y es por ello que la gran rapidez del desarrollo embriológico representa una adaptación necesaria para la supervivencia de esta especie en el medio xerófilo.

CONCLUSIONES

De los estudios realizados se concluye que:

1.— La actividad sexual en *Pleurodema brachyops* es permanente en el curso del año, tomando en cuenta sus condiciones de ovulación y espermiogénesis.

2.— Los huevos de esta especie difieren de las demás especies del género *Pleurodema* por carecer de pigmento, lo que recuerda a las especies del género *Leptodactylus*.

3.— Los procesos embriológicos inducidos en forma experimental no son diferentes morfológicamente a los observados en las demás especies de este género.

4.— Existe una notable aceleración temporal de los procesos ontogenéticos en el curso de su desarrollo embriológico en relación con otras especies del género.

5.— Los problemas de la sexualidad y ontogénesis son una adaptación a hábitats de gran inestabilidad higrométrica.

TABLA DE DESARROLLO EN *PLEURODEMA BRACHYOPS* (COPE)

Estadio	Edad	Características
1	0 h.	Huevo no fecundado. Esférico, 1 mm. de diámetro. Despigmentado.
2	0- 30 min.	Huevo fecundado. Superficie rugosa en el polo animal.
3	-30- 45 min	Primera surcación. Es meridiana y se inicia en la región distal del polo animal.
4	45- 1,05 hrs.	Segunda surcación. Es también meridiana, se inicia antes de completarse la primera.
5	1,05- 1,30 hrs.	Tercera surcación. Es ligeramente supraecuatorial y divide al huevo en micrómeros y macrómeros.
6	1,30- 1,50 hrs.	Cuarta surcación. Surcos meridianos dobles. Se originan 16 blastómeros voluminosos.
7	1,50- 2 hrs.	Mórula de 32 células.
8	2 - 2,20 hrs.	Blástula por multiplicación sucesiva blastomérica.
9	2,20- 3 hrs.	Hendidura blastopórica y comienzo del labio dorsal del blastoporo.
10	3 - 3,30 hrs.	Migración del anillo blastopórico desde el ecuador hacia el polo vitelino.

Estadio	Edad	Características
11	3,30- 4,05 hrs.	Anillo blastopórico en el polo vegetativo y tapón vitelino visible.
12	4,05- 9,15 hrs.	Gástrula con reducción del tapón vitelino e inclusión del mismo.
13	9,15-11,30 hrs.	Placa neural caracterizada por espesamientos.
14	11,30-12,30 hrs.	Crestas neurales visibles.
15	12,30-13,30 hrs.	Convergencia e iniciación de la fusión de las crestas neurales.
16	13,30-15 hrs.	Tubo neural.
17	15 -16,30 hrs.	Desarrollo de los esbozos anteriores y botón caudal.
18	16,30- 18 hrs.	Rotación del embrión. Inicio de la diferenciación cabeza y cuerpo. Epitelio ciliado para los movimientos de rotación del embrión dentro de la cápsula gelatinosa.
19	18 -18,45 hrs.	Respuesta muscular. Violentas contracciones musculares se inician. Las ventosas orales están bien desarrolladas. Manchas oculares narinas y botones branquiales presentes. La metamería es evidente.
20	18,45-21,45 hrs.	Desove. Embriones libres de la cápsula gelatinosa se mueven desordenadamente. Se inician los latidos cardíacos. Los pronefros se hacen presentes.
21	21,45-29 hrs.	Desarrollo y circulación branquial.
22	29 -34,30 hrs.	Branquias en tres ramas principales. Perforación de la boca.
23	34,30-44 hrs.	El pliegue opercular se hace presente. Se porfora el ano.
24	44 -48 hrs.	Cierre opercular e inicio del espiráculo. Inclusión de las branquias. Ojos móviles.
25	48 -72 hrs.	Opérculo completo. Desarrollo de los odontoides córneos. Diferenciación larvaria completa.

SUMMARY

The venezuelan frog *Pleurodema brachyops* has a continuous sexual activity during all the year. The eggs are inmaculate white and the presence of melanines is only observed after the emergence of the branchial buds. Other species of *Pleurodema* show the eggs commonly black pigmented. Under laboratory conditions the embrio-

logical development in enough similar with the ontogenetic process studied in other species of the same genus. An important fact observed during the embrionary development was the short time needed to reach blastula, gastrula, neurula and larvae stages.

Comparisons between the development time's spend by *P. brachyops* and *P. thaul* show tremendous differences. When *P. brachyops* is larva, *P. thaul* is only reaching the neurular stage. Probably the completation of the larvae stages pretty soon represent an adaptation to changing habitats. The obtention in short time of body structures capable to survive when the environmental conditions are modified like the desication of the puddles by sin action, certainly represent an advantage over the prolonged embriological development of several species of *Pleurodema*.

BIBLIOGRAFIA

ALAY H., F.
1959 Embriogénesis de *Pleurodema bibroni* Tschudi. Amphibia-Salientia. Tesis Fac. Med. Vet. Univ. de Chile.

BOWERS, C. Y., A. SEGALOFF y B. BROWN
1959 Factors affecting the thyroid gland uptake of I131 of *Rana catesbiana* tadpoles. Endocrinology 65 : 882-888.

CEI, J. M.
1962 Batracios de Chile. Ed. Univ. Chile, Santiago. 1-128 - i-cvii.

CEI, J. M. y CAPURRO, L. F.
1958 Biología y desarrollo de *Eusophus taeniatus* (Girard). Inv. Zool. Chil. 5 : 150-82.

FERNANDEZ, K.
1927 Sobre la biología y reproducción de Batracios argentinos II. Bol. Ac. Nac. Cienc. Córdoba. 29 : 271-328.

HAMBURGER, V.
1950 A Manual of Experimental Embriology. The Univ. Chicago Press. 1-213.

KIRK, P. L. y HOGBEN, L.
1946 Studies on temperature regulation II. Amphibians and Reptiles. Journ. Exp. Biol. 22 : 213-220.

NOBLE, G. K.
1954 The Biology of the Amphibia. Dover. Publ. Inc., New York 10. 1-577.

RIVERO, J.

1961 Salientia of Venezuela. Bull. Mus. Comp. Zool. 126 (1) : 1-207.

RUGH, R.

1948 Experimental Embriology. Minneapolis Burgess Publs. Comp. 1-127.
1951 The frog, its reproduction and development. Mc Graw Hill Book Comp. In N. Y. 1-336.

SU, TCHOU Y WANG, YULAN

1963 L'hibernation facteur determinant de la maturation ovulaire chez le crapaud. Sc. Sinica 12 (8) : 1161-1164.
1963 La succession d'ovogenese et l'impossibilité de maduration ovulaire chez le crapaud femelle elevée dans le milien a haute temperature pendant toute une année. Sc. Sinica 12 (8) : 1165-1168.

VALENCIA, D. J.

1960 Inducción de la evolución y tabla de desarrollo normal de *Bufo spinulosus* Wiegman. Tesis Fc. Filos. Educ. Univ. Chile.

VARGAS, F. Y ESPINA, S.

1959 Efecto de las hormonas neurohipofisiarias sobre el metabolismo hídrico en batracios. Com. XII. Congr. Intern. Fisiol. B. Aires, 283.

VELEZ, B. F.

1961 Bibliografía Venezolana de Histología, Embriología y Genética. U. C. V. Impr. Univ. Caracas. p. 1-222.

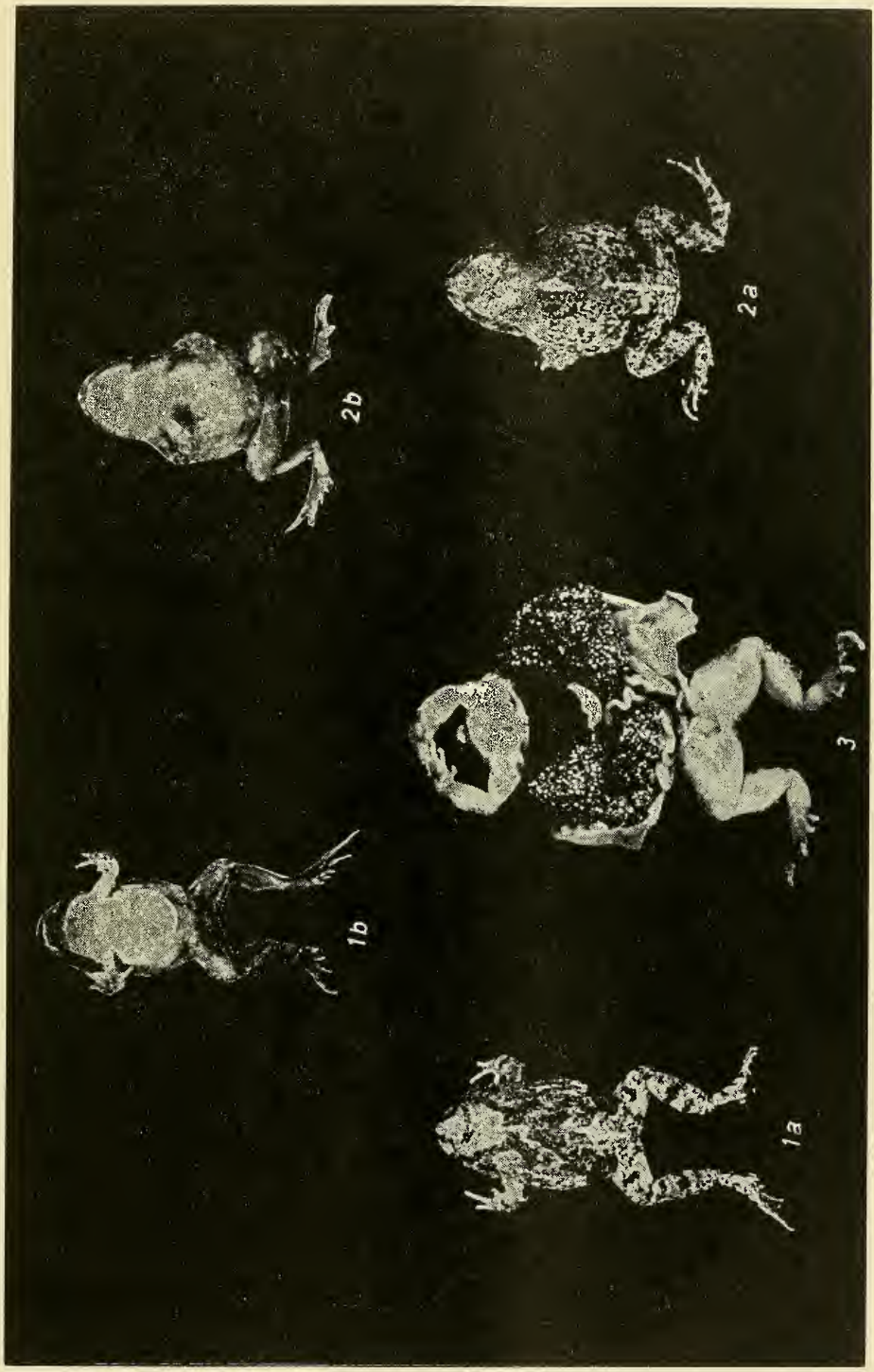
LAMINA I

Morfología de *Pleurodema brachyops.*

Figs. 1 a – 1 b.– Vista dorsal y ventral del macho.

Figs. 2 a – 2 b.– Vista dorsal y ventral de la hembra.

Fig. 3.– Hembra con gran cantidad de huevos.


2b
2a
1b
3
1a

LAMINA II

Metamorfosis de *Pleurodema brachyops.*

1 - 2.— Larva de 72 horas; vista dorsal y ventral.

3.— Larva de 12 días.

4.— Renacuajo bípedo.

5.— Renacuajo tetrapodo con involución de la cola.

6.— Reducción caudal.

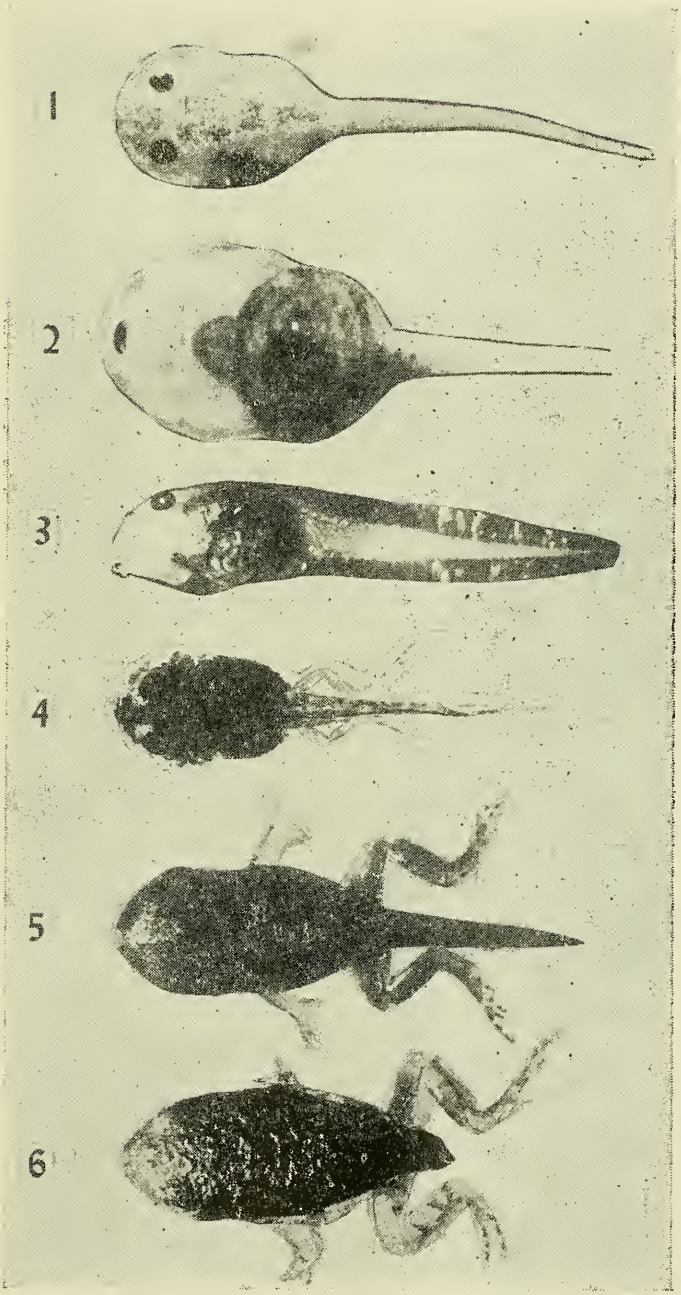
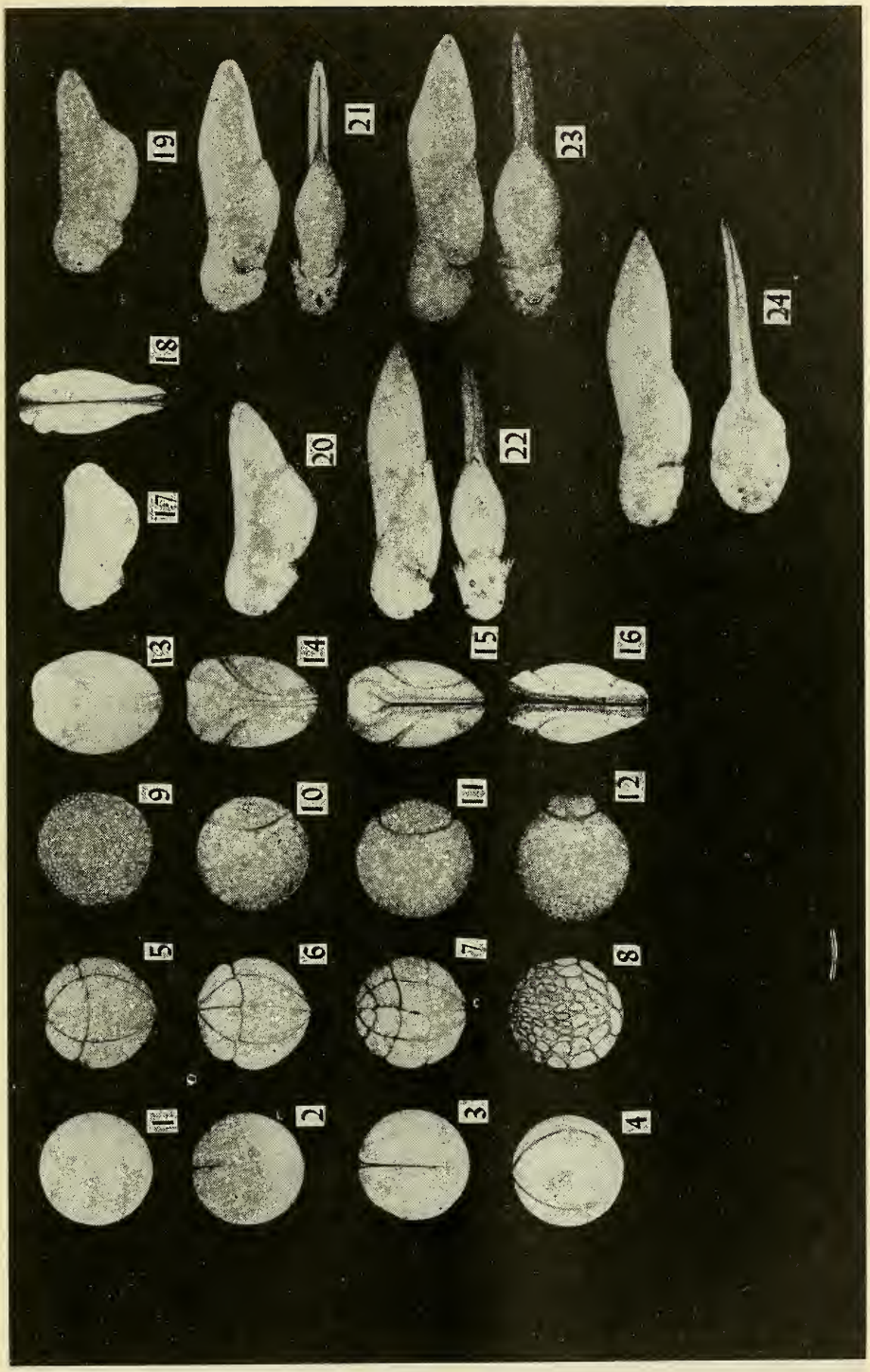

1
2
3
4
5
6

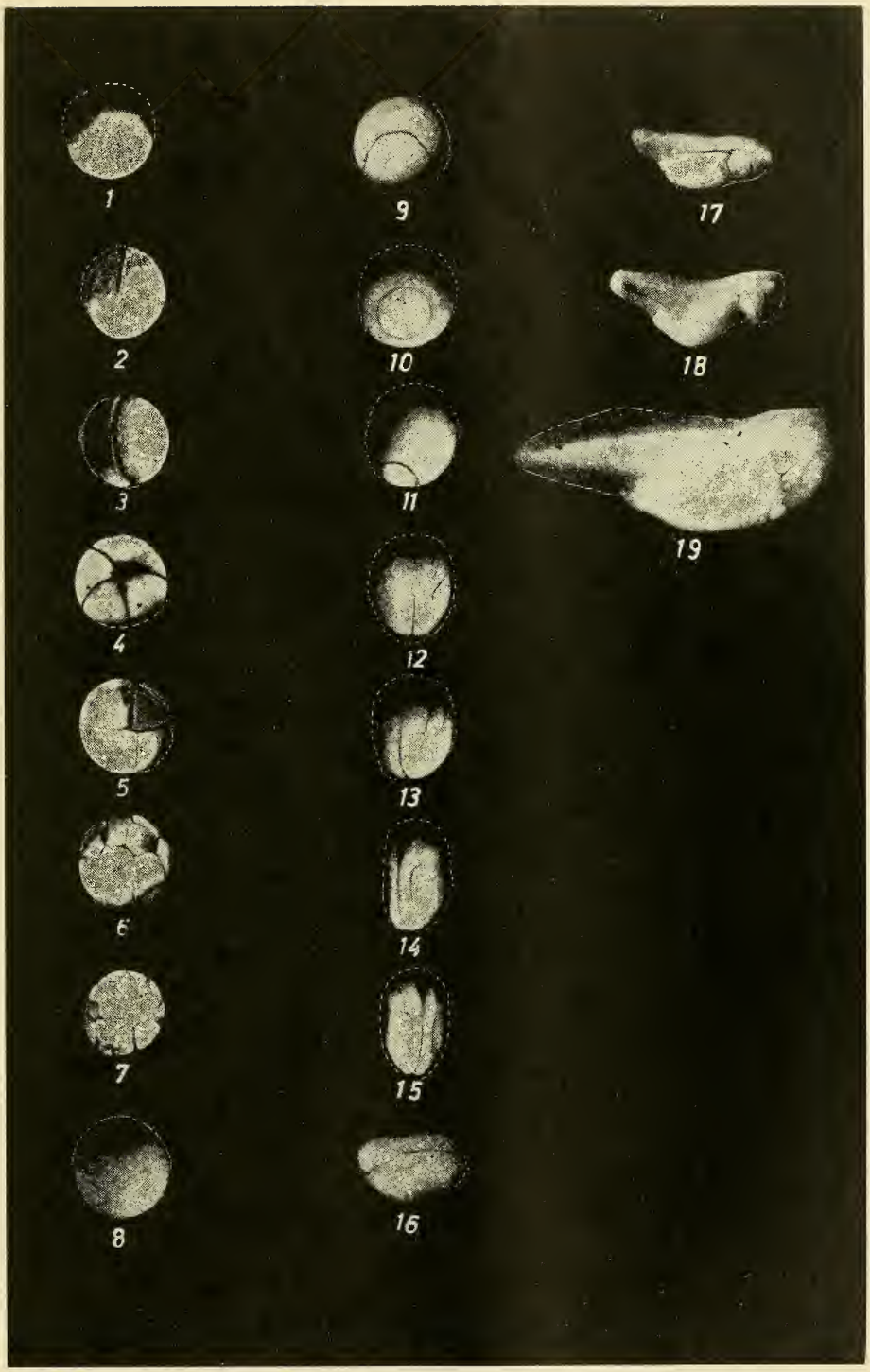
Tabla de desarrollo de *Pleurodema brachyops* (esquemática).

1.— Huevo no fecundado; 2.— 30-45 minutos huevo fecundado, iniciación del surco meridiano; 3.— Surco progresando divide el huevo en 2 blastómeros; 4.— 45-1,05 hrs. Segundo surco meridiano. 5.— Tercer surco (supra ecuatorial); 6.— Cuarto surco (meridiano); 7.— Mórula de 32 células; 8.— Blástula por multiplicación sucesiva; 9.— Hendidura blastopórica y comienzo del labio dorsal; 10.— Migración del anillo blastopórico; 11.— Anillo blastopórico en el polo vegetativo y tapón vitelino visible; 12.— Gástrula con reducción del tapón vitelino; 13.— Placa neural (espesamiento); 14.— Crestas neurales; 15.— Convergencia e iniciación de la fusión de las crestas neurales; 16.— Tubo neural; 17.— Desarrollo de los esbozos anteriores y botón caudal; 18.— Rotación del embrión (comienzo de la diferenciación cabeza tronco, epitelio ciliado que facilita el movimiento); 19.— Respuesta muscular; 20.— Desove (liberación del embrión); 21.— Desarrollo y circulación branquial; 22.— Branquias en tres ramas. Perforación de la boca; 23.— Pliegue opercular y perforación del ano; 24.— Cierre opercular y comienzo del espiráculo. Inclusión de las branquias. Ojos móviles. 25.— Opérculo completo.


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

Etapas Embriogénicas de *Pleurodema brachyops.*

1.— Huevo virgen; 2.— Huevo fecundado; 3.— Primer surco meridiano; 4.— Segundo surco meridiano; 5.— Surco supraecuatorial; 6.— Cuarta surcación; 7.— Morula; 8.— Blastula avanzada; 9.— Inicio dorsal del blastoporo; 10.— Labio blastopórico bien desarrollado; 11.— Reducción del tapón vitelino; 12.— Espesamientos neurales; 13.— Inicio de crestas neurales; 14.— Fusión de crestas neurales; 15.— Tubo neural; 16.— Esbozos anteriores y caudales; 17.— Rotación; 18.— Respuesta muscular; 19.— Inicio de botones branquiales.


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19