

**3. TÉCNICAS DE RELEVAMIENTO DE LA
DIVERSIDAD DE ANUROS**

3.1 RELEVAMIENTO DE OVIPOSTURAS Y EMBRIONES

Jimena Grosso¹, María José Salica² & Florencia Vera Candiotti³

¹ Instituto de Ciencias Marinas y Limnológicas, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

² Instituto de Ecorregiones Andinas (INECOA), CONICET — Universidad Nacional de Jujuy, CCT Salta-Jujuy, San Salvador de Jujuy, Jujuy, Argentina.

³ Unidad Ejecutora Lillo (CONICET-FML). San Miguel de Tucumán. Tucumán, Argentina.

Colecta de Oviposturas

Los anuros son conocidos por presentar una gran diversidad de modos reproductivos con variaciones en los sitios de oviposición, la estructura de la puesta y en el desarrollo embrionario y larval. Duellman y Trueb⁽¹⁾ categorizaron 29 modos reproductivos y más tarde Haddad y Prado⁽²⁾ añadieron siete nuevos modos que, junto a algunas modificaciones de la clasificación original, ascendieron el número total a 39. Wells⁽³⁾ discute este esquema de clasificación y revisa la diversidad de modos reproductivos. Por su parte, el esquema de Altig y McDiarmid⁽⁴⁾ resume la diversidad morfológica y evolución de huevos y puestas en anfibios en general. Para Argentina, Lavilla y Rougés⁽⁵⁾ realizaron una primera síntesis de los tipos de reproducción y desarrollo, reportando un total de 16 modos reproductivos. Esta diversidad es una fuente de información comparativamente poco explorada, y de ahí la importancia de estandarizar conceptos y métodos para la preservación de las oviposturas.

A grandes rasgos es posible hallar oviposturas de ranas en el agua (flotando, sumergidas, sujetas a vegetación o rocas, etc.) o fuera de ella, ya sea en la tierra (entre la hojarasca, en cuevas, en grietas entre rocas) o en hojas y troncos de la vegetación. La capacidad de localización de las puestas está estrechamente relacionada al conocimiento previo de la especie y la experiencia del colector, ya que a diferencia de los exuberantes nidos de espuma en charcos de leptodactylidos, algunas especies oviponen en sitios muy particulares, como los pequeños cuerpos de agua en las axilas de bromelias que utilizan algunos bufónidos, o bien sus oviposiciones son muy crípticas, como los huevos pigmentados que liberan los ceratophryidos en el fondo de charcas lodosas.

Las salidas de campo deben realizarse idealmente luego de precipitaciones abundantes, ya que éstas disparan la actividad reproductiva para la mayor parte de las especies y, por ende, incrementan la probabilidad de encontrar amplexos u oviposiciones recientes. La colecta de puestas dependerá de las características de éstas pero en general resulta simple: en bolsas capturando el agua circundante en oviposiciones acuáticas, con herramientas como palas para puestas terrestres o tijeras para puestas suspendidas en la vegetación. Por el contrario, la identificación en campo de la puesta es complicada—cuando no fue posible observar la oviposición— y en general sólo se puede realizar hasta cierto nivel. Por ejemplo, muchas especies de *Rhinella* depositan ristras de huevos pigmentados o especies de *Phyllomedusa* construyen “cucuruchos” en hojas. La asignación inequívoca requiere de datos de distribución geográfica, identificación de adultos presentes o cantando y preservación de huevos o embriones en alcohol 90% para posterior secuenciación

de ADN. Adicionalmente es recomendable registrar datos sobre el ambiente circundante, como temperatura, características del sustrato, altura si se trata de vegetación o presencia de depredadores, entre otros.

Otra posibilidad para la obtención de oviposturas es disponer de adultos sexualmente activos, inducidos hormonalmente en el laboratorio o bien amplexados al momento de la colecta. Los procedimientos para la inducción hormonal exceden los objetivos de esta sección, pero se encuentran detallados en guías prácticas para *Xenopus* que pueden adaptarse a otras especies^(6,7). Al encontrar un amplexo en campo la colecta manual delicada de los ejemplares puede realizarse sin que se desarme el abrazo nupcial. Idealmente se aparta la pareja en un recinto oscuro con agua del lugar durante toda la noche. La duración del amplexo puede variar pero en general durante la mañana siguiente ya es posible observar la ovipostura, la cual debe ser separada de los adultos lo más pronto posible.

Mantenimiento de las oviposturas

Si bien las oviposturas de algunas especies requieren cuidados especiales, en general el mantenimiento en laboratorio puede hacerse sin demasiados inconvenientes. Se recomienda colocar las puestas en recipientes individuales y etiquetados: para oviposturas acuáticas se aconseja la utilización de peceras u otros contenedores con agua del lugar o de clorinada que debe ser renovada frecuentemente (**Figura 3.1.1A**); para oviposturas terrestres la utilización de terrarios que se mantengan húmedos (para muchas especies es eventualmente necesario inundar las puestas para inducir la eclosión); y para nidos que se suspenden en la vegetación el armado de trípodes con varillas de madera en donde se cuelguen sobre bandejas con agua⁽⁸⁾, o la utilización de recipientes altos con agua en el fondo en cuyas paredes se adhieran las hojas que envuelven a estas puestas (**Figura 3.1.1B**).

En este sentido, se debe intentar emular las condiciones de temperatura, humedad y fotoperíodo en que se encontraban las oviposturas. La temperatura de cría tiene influencia en la velocidad de desarrollo, por lo que dependiendo del tipo de estudio se podría necesitar mantenerla constante y dentro del rango vital de la especie. La humedad es un factor clave, por lo que se recomienda la aspersión suave y frecuente de agua con atomizadores manuales y la no exposición directa al sol, para evitar la desecación de la puesta. Por último, dado que durante el periodo intracapsular los embriones se desarrollan a expensas del vitelo, no es necesario el aditamento de fuentes externas de alimentación.

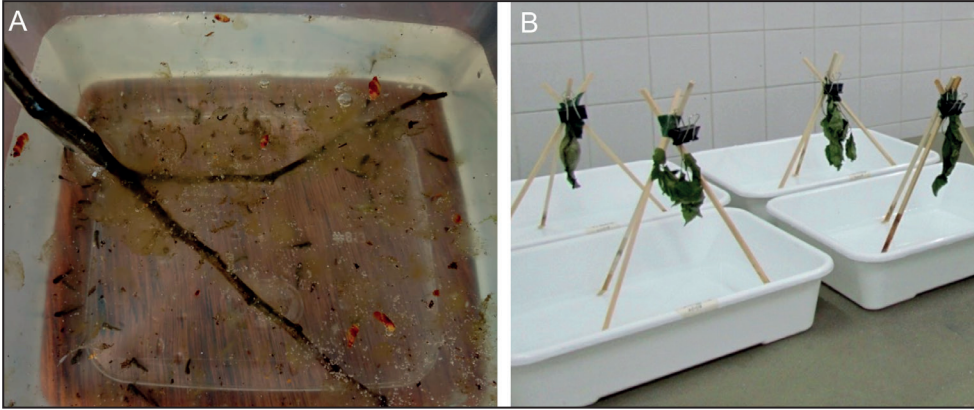


Figura 3.1.1. Mantenimiento de oviposturas. (A) Detalle de puesta acuática de *Atelognathus nitoi*. (B) Detalle de nidos de *Phyllomedusa sauvagii* dispuestos en trípodes en el interior de bandejas con agua. Fotos: D. A. Barrasso y M. J. Salica.

Series de desarrollo para embriones

Los anuros han sido históricamente elegidos por los embriólogos dadas sus considerables ventajas para llevar a cabo estudios de desarrollo, fundamentalmente desde una aproximación experimental, bioquímica y molecular en particular en el género *Xenopus*. Sin embargo, el estudio de otras especies (excluyendo las especies modelo) y a gran escala taxonómica, implica un desafío principalmente por su escasez en colecciones herpetológicas.

Esta etapa temprana se caracteriza por presentar grandes cambios morfológicos en un corto periodo de tiempo, por lo que la metodología más utilizada para estudios embriológicos incluye la obtención de series de desarrollo. Una serie de desarrollo es un tipo de muestreo que requiere fijar periódicamente embriones de una misma puesta, lo que implica que muchas veces deba realizarse *in situ*, en el campo y entre viajes de campaña.

Para la obtención de series de desarrollo se extraen los huevos o embriones con pipetas Pasteur y si es necesario ayudándose con pinzas o tijeras, cuando la gelatina es muy densa. Los embriones se sobreenestesian con benzocaína diluida o alternativamente colocando los embriones libres directamente sobre hielo (ver **Sección 5**) y deben preservarse cada vez en recipientes individuales en general con formol 4—10%. La frecuencia de extracción y el número de embriones varían dependiendo de la duración del desarrollo de la especie, del tamaño de la puesta y por supuesto del tipo de estudio proyectado. Cuanto más rápido se desarrollen los embriones, más frecuentemente habrá que realizar fijaciones, para asegurarse especímenes que cambien gradualmente, sin dejar de considerar la cantidad de huevos disponibles para evitar truncar tempranamente las series. Para estudios de secuencia de desarrollo de caracteres embrionarios, en general resulta adecuada la fijación cada 6—8 hs, pero para estudios de la variación de forma (que ocurre muy

rápida en especial durante el inicio del desarrollo) o que enfatizan estadios muy tempranos, el intervalo debe acortarse a 4 hs. Para estudios más puntuales (e.g., explorar el desarrollo de un carácter individual) es recomendable realizar series piloto donde primero se establezca el rango de tiempo en que ocurre el cambio de interés. Los intervalos pueden ir modificándose a medida que el desarrollo avanza, y ya en estadios larvales las fijaciones pueden ser diarias. Estudios propios en diversos clados y sus detalles particulares para cada uno, pueden consultarse en los trabajos correspondientes⁽⁹⁻²²⁾.

Un punto interesante es que si bien los huevos y embriones no eclosionados suelen fijarse completos, es decir con las capas de gelatina que los envuelven, una alternativa es primero liberarlos de ellas. Esta práctica es frecuente para estudios moleculares, pero también es recomendable en el caso de embriones con desarrollos intracapsulares largos, en los cuales el aumento de tamaño del espécimen dentro del huevo redundaría en que se enrolle típicamente y una vez fijado esta característica obstaculiza la observación. La eliminación de las membranas se efectúa químicamente con cisteína 2%^(6,7) o mecánicamente mediante el uso de pinzas finas, teniendo especial cuidado en no dañar al embrión.

La elección del fijador está en directa relación con el tipo de análisis proyectado y se recomienda prever esto con antelación a la colecta para evitar el desperdicio de material. El formol preserva muy bien los tejidos por lo que es el elegido para análisis morfológicos clásicos e incluso funciona muy bien para observación con microscopía electrónica de barrido. Para estudios de histología y ultraestructura (microscopía electrónica de transmisión) se recomienda fijar en glutaraldehído o solución Bouin⁽²³⁾, mientras que para estudios de marcadores génicos se sugiere el fijador MEMFA⁽⁶⁾.

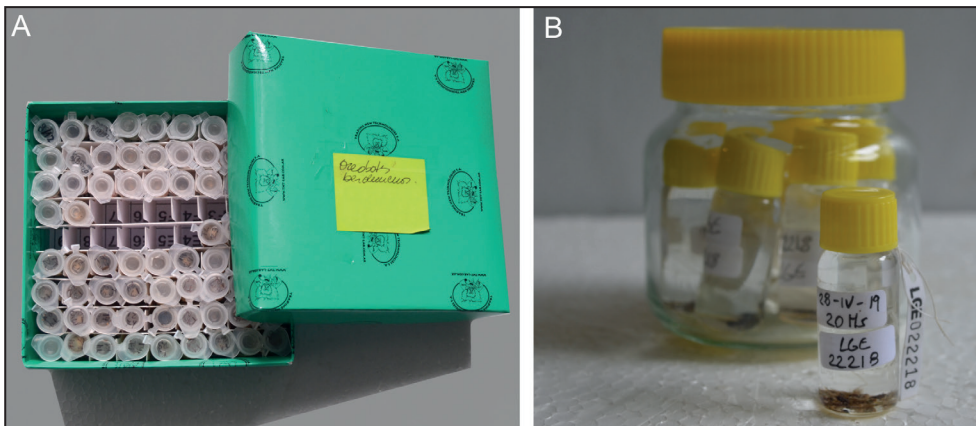


Figura 3.1.2. Etiquetado y preservación de series de desarrollo. (A) Caja grillada con eppendorf rotulados individualmente. (B) Tubo individual con datos asociados y frasco con serie completa. Foto: J. Grosso.

En cuanto a la preservación de los embriones, aunque es posible confeccionar series de desarrollo ordenando los embriones según su morfología, es decir colocando todos los embriones fijados periódicamente en un único recipiente, es mucho más informativo registrar el dato de tiempo en que cada lote fue fijado (**Figura 3.1.2**). Para esto, la mejor opción son los microtubos de polipropileno de 1,5 ml o recipientes similares ubicados en cajas grilladas o frascos donde se asegure que permanezcan verticales. Cada tubo debe estar completamente rotulado, incluyendo especie, día y horario de fijación y fijador utilizado, en etiquetas de papel adheridas externamente al tubo y escritas con lápiz o estilógrafo indeleble. Es recomendable no rotular directamente los tubos, porque su uso en grandes cantidades suele implicar la reutilización y en tal caso la información anterior puede provocar confusiones.

Para identificar el momento del desarrollo embrionario son útiles como referencia las tablas de desarrollo normal que delimitan estadios a partir de eventos estructurales o fisiológicos. Para especies con desarrollo exotrófico, es decir especies cuyas larvas se alimentan de manera activa, la más utilizada es la tabla de Gosner⁽²⁴⁾ y para especies con desarrollo endotrófico, es decir, que se desarrollan a expensas del vitelo (y que en general presentan una morfología modificada, con reducción o ausencia de caracteres embrionarios y larvales típicos de las especies exotróficas), la más difundida es la de Townsend y Stewart⁽²⁵⁾. Existen tablas específicas más adecuadas para ciertos casos (e.g., una revisión en Fabrezi et al.²⁶), y el propósito del estudio de series embrionarias implica registrar las variaciones particulares de los grupos analizados, construyendo nuevas tablas por especie. Para la caracterización morfológica de los embriones hay disponibles numerosos trabajos donde se describen comparativamente las estructuras exclusivas de esta etapa (e.g., branquias externas, glándulas adhesivas y de eclosión y ciliación epidérmica), y de las estructuras larvales que comienzan a desarrollarse en este periodo (e.g., líneas laterales y disco oral). Los trabajos de Nokhbatol-foghahai y colaboradores⁽²⁷⁻³³⁾ son pioneros en sintetizar las variaciones en varios caracteres y en numerosos clados de anuros. Para fauna neotropical, aportes propios añaden la utilización de estos caracteres en análisis filogenéticos^(14,15, 21).

Bibliografía

1. Duellman, W.E. & Trueb, L. 1986. *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill. New York.
2. Haddad, C.F.B. & Prado, C.P.A. 2005. Reproductive modes in frogs and their unexpected diversity in the Atlantic Forest of Brazil. *BioScience* 55: 207-217.
3. Wells, K.D. 2010. *The Ecology and Behavior of Amphibians*. University of Chicago Press.
4. Altig, R. & McDiarmid R.W. 2007. Morphological diversity and evolution of egg and clutch structure in amphibians. *Herpetological Monographs* 21: 1-32.

5. Lavilla, E.O. & Rougés, M. 1992. Reproducción y Desarrollo de Anuros Argentinos. Asociación Herpetológica Argentina. Serie Divulgación 5. La Plata, Argentina.
6. Sive, H.; Grainger, R.M. & Harland, R.M. 2000. Early Development of *Xenopus laevis*: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
7. Wlizla, M.; McNamara, S. & Horb, M.E. 2018. Generation and care of *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis* embryos: 19-32. *En*: Vleminckx, K. (ed.). *Xenopus*. Methods in Molecular Biology. Humana Press, New York, NY.
8. Downie, J.R.; Nokhbatolfighahai, M.; Bruce, D.; Smith, J.M.; Orthmann-Brask, N. & MacDonald-Allan, I. 2013. Nest structure, incubation and hatching in the Trinidadian leaf-frog *Phyllomedusa trinitatis* (Anura: Hylidae). *Phyllomedusa: Journal of Herpetology* 12: 13-32.
9. Catalano, S.; Segura, V. & Vera Candioti, M.F. 2019. PASOS: a method for the phylogenetic analysis of shape ontogenies. *Cladistics*: 1-17.
10. Goldberg, J. & Vera Candioti, M.F. 2015. A tale of a tail: variation during the early ontogeny of *Haddadus binotatus* (Brachycephaloidea: Craugastoridae) as compared to other direct-developers. *Journal of Herpetology* 49: 479-484.
11. Goldberg, J.; Vera Candioti, M.F. & Akmentins, M.S. 2012. Direct-developing frogs: ontogeny of *Oreobates barituensis* (Anura: Terrarana) and the development of a novel trait. *Amphibia-Reptilia* 33: 239-250.
12. Goldberg, J.; Taucce Pedro, P.P.G.; Quinzio, S.I.; Haddad C.F.B. & Vera Candioti, M.F. 2020. Increasing our knowledge on direct-developing frogs: the ontogeny of *Ischnocnema henselii* (Anura: Brachycephalidae). *Zoologischer Anzeiger* 284: 78-87.
13. Grosso, J.; Baldo, D. & Vera Candioti, M.F. 2017. Heterochronic changes during embryonic development of neotropical foam nesting frogs (genus *Leptodactylus*). *Zoologischer Anzeiger* 266: 35-49.
14. Grosso, J.; Baldo, D.; Cardozo, D.; Kolenc, F.; Borteiro, C.; Rodrigues de Oliveira, M.I.; Bonino, M.F.; Barrasso, D.A. & Vera Candioti M.F. 2019. Early ontogeny and sequence heterochronies in Leiuperinae frogs (Anura: Leptodactylidae). *PLoS ONE* 14: e0218733. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218733>.
15. Grosso, J.; Baldo, D.; Salgado Costa, C.; Natale, G.S. & Vera Candioti, M.F. 2019. Embryonic ontogeny of three species of Horned Frogs, with a review of early development in Ceratophryidae. *Journal of Morphology* 281: 17-32.
16. Navarro Acosta, G. & Vera Candioti, M.F. 2017. Alometría y heterocronías durante el desarrollo temprano de cinco especies de *Hypsiboas* (Anura: Hylidae). *Cuadernos de Herpetología* 31: 11-22.
17. Navarro Acosta, G.; Baldo, D.; Kolenc, F.; Borteiro, C. & Vera Candioti, M.F. 2017. Embryonic morphology in five species of *Hypsiboas* (Anura: Hylidae). *Herpetological Journal* 26: 121-132.
18. Salica, M.J.; Haad, M.B.; Vera Candioti, M.F. & Faivovich, J. 2011. Early development of two species of *Phyllomedusa* (Anura: Phyllomedusinae). *Salamandra* 47: 144-154.
19. Vera Candioti, M.F.; Haad, B.; Baldo, D.; Kolenc, F.; Borteiro, C. & Altig, R. 2011a. Different pathways are involved in the early development of the transient oral apparatus in anuran tadpoles (Anura: Leiuperidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 104: 330-345.
20. Vera Candioti, M.F.; Nuñez, J.J. & Ubeda, C. 2011b. Development of the nidicolous tadpoles of *Eupsophus emiliopugini* (Anura: Cycloramphidae) until metamorphosis, with comments on systematic relationships of the species and its endotrophic developmental mode. *Acta Zoologica* 92: 27-45.
21. Vera Candioti M.F.; Grosso, J.; Haad, B.; Pereyra, M.O.; Bornschein, M.R.; Borteiro, C.; Costa, P.; Kolenc, F.; Pie, M.R.; Proaño, B.; Ron, S.; Stanesco, F. & Baldo, D. 2016. Structural and heterochronic variations during the early ontogeny in toads (Anura: Bufonidae). *Herpetological Monographs* 30: 79-118.
22. Vera Candioti M.F.; Taboada, C.; Salica, M.J.; Baldo, D.; Faivovich, J. & Baêta, D. 2017. The adhesive glands during embryogenesis in some species of Phyllomedusinae (Anura: Hylidae). *Journal of Herpetology* 51: 119-129.
23. Kiernan, J.A. 2008. *Histological and Histochemical Methods, Theory and Practice*. 4th edition. Butterworth-Heinemann, Oxford.
24. Gosner, K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16: 183-190.
25. Townsend, D.S. & Stewart, M.M. 1985. Direct development in *Eleutherodactylus coqui*

- (Anura: Leptodactylidae): a staging table. *Copeia* 1985: 423-436.
26. Fabrezi, M., Quinzio, S.I., Cruz, J.C., Chuliver Pereyra, M., Manzano, A.S., Abdala, V.S.L., Ponssa, M.L., Prieto, Y. & Goldberg, F.J. 2017. Forma, tamaño y tiempo en la ontogenia de anfibios y reptiles. *Cuadernos de Herpetologia* 31: 103-126.
 27. Nokhbatolfoghahai, M. & Downie, J.R. 2005. Larval cement gland of frogs: comparative development and morphology. *Journal of Morphology* 263: 270-283.
 28. Nokhbatolfoghahai, M. & Downie, J.R. 2007. Amphibian hatching gland cells: Pattern and distribution in anurans. *Tissue and Cell* 39: 225-240.
 29. Nokhbatolfoghahai, M. & Downie, J.R. 2008. The external gills of anuran amphibians: comparative morphology and ultrastructure. *Journal of Morphology* 269: 1197-1213.
 30. Nokhbatolfoghahai, M.; Downie, J.R. & Atherton, L. 2013. External gill motility and striated muscle presence in the embryos of anuran amphibians. *Tissue and Cell* 45: 61-67.
 31. Nokhbatolfoghahai, M.; Downie, J.R. & Ogilvy, V. 2006. Surface ciliation on anuran amphibian larvae: persistence to late stages in some species but not others. *Journal of Morphology* 267: 1248-1256.
 32. Nokhbatolfoghahai, M.; Downie, J.R.; Clelland, A.K. & Rennison, K. 2005. The surface ciliation of anuran amphibian embryos and early larvae: patterns, timing differences and functions. *Journal of Natural History* 39: 887-929.
 33. Nokhbatolfoghahai, M.; Pollock, C.J. & Downie, J.R. 2015. Oviposition and development in the glass frog *Hyalinobatrachium orientale* (Anura: Centrolenidae). *Phyllomedusa* 14: 3-17.