

TABLA DE DESARROLLO EMBRIONARIO DE LA RANA SABANERA
Dendropsophus labialis: Hylidae EN CAUTIVERIO (LABORATORIO BIOLOGÍA DE
DESARROLLO PUJ)

Presentado por
Fabián Andrés Sarria Rendón

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD CIENCIAS
CARRERA BIOLOGÍA
BOGOTA D.C
NOVIEMBRE
2010

TABLA DE DESARROLLO EMBRIONARIO DE LA RANA SABANERA
***Dendropsophus labialis*: Hylidae EN CAUTIVERIO (LABORATORIO BIOLOGÍA DE**
DESARROLLO PUJ)

Presentado por
Fabián Andrés Sarria Rendón

INGRID SCHULER

Decana Académica

ANDREA FORERO

Directora Carrera de Biología

TABLA DE DESARROLLO EMBRIONARIO DE LA RANA SABANERA
***Dendropsophus labialis*: Hylidae EN CAUTIVERIO (LABORATORIO BIOLOGÍA DE**
DESARROLLO PUJ)

Presentado por
Fabián Andrés Sarria Rendón

EDILMA GUEVARA ROZO MSc

Directora

NUBIA PERDOMO DE PARRA MSc

Jurado

Nota de advertencia

Artículo 23 de la Resolución No13 de julio de 1946: "La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus tesis de grado".

Agradecimientos

A Dios, por darme la salud, paz, sabiduría y tranquilidad para poder terminar con éxito este trabajo de grado.

A mis padres Soffi Rendón y Jesús Sarria, por el apoyo brindado en todas las cosas que emprendí en mi vida y especialmente en mi pre-grado.

A la Doctora Edilma Guevara por compartir sus conocimientos, por su paciencia, e interés durante el proceso de realización de este trabajo.

A la Doctora Nubia Perdomo, por sus importantes puntos de vista y recomendaciones para culminar de la forma más adecuada los objetivos propuestos.

A Melline Varandas.

A Daniel Ramírez.

A Alejandra Franco.

A Andrés Quintero.

También quiero dar mis más sinceros agradecimientos a todas las personas que directa o indirectamente estuvieron involucrados en la elaboración de este trabajo de grado, las cuales me dieron voces de aliento, ánimo y fuerzas para no desistir en los momentos difíciles.

Tabla de Contenido

	Pág
1. Resumen.....	7
2. Introducción.....	8
3. Problema y justificación.....	9
4. Pregunta de investigación.....	10
5. Antecedentes.....	10
6. Marco teórico.....	12
6.1 Taxonomía de la especie.....	12
6.2 Generalidades de la especie.....	12
6.3 Tablas de desarrollo.....	14
6.4 Factores que influyen en Tablas de Desarrollo.....	14
6.5 Desarrollo embrionario.....	16
7. Objetivos.....	17
7.1 Objetivo general.....	17
7.2 Objetivos específicos.....	17
8. Materiales y métodos.....	18
8.1 Población de Estudio.....	18
8.2 Mantenimiento en cautiverio y montaje.....	18
9. Resultados.....	23
10. Tabla. Desarrollo embrionario de la rana sabanera <i>Dendropsophus labialis</i> a una temperatura de 30° C.....	42
11. Discusión.....	43
12. Conclusiones.....	49
13. Recomendaciones.....	50
14. Bibliografía.....	51

1. Resumen

El presente estudio es una descripción macroscópica del desarrollo embrionario pre-metamórfico de la rana sabanera *Dendropsophus labialis* a una temperatura de 29°C.

Se capturaron dos parejas de *Dendropsophus labialis* y se mantuvieron en cautiverio en acuarios previamente ambientados en el laboratorio de Biología de Desarrollo evitando posible estrés (que no ocurriera ovoposición y fertilización a los embriones); se estimularon por tres semanas con grabaciones con el canto de los machos en época reproductiva para incitar a los individuos en cautiverio a llevar a cabo el amplexus. Los individuos fueron alimentados con pequeños artrópodos e hígado. En las siguientes doce semanas se observaron las características macroscópicas propias del desarrollo embrionario en esta especie.

Se realizó la tabla de desarrollo embrionario determinando un total de veinte y cuatro estadios. La secuencia de los datos registrados se inició con la fecundación del espermatozoide al oocito extendiéndose hasta el cierre del opérculo completo y una reabsorción total del vitelo.

Para la realización del presente estudio se analizaron dos desoves, en los cuales se estudiaron los embriones en sus primeras horas de vida cada treinta minutos y posteriormente cada dos horas, hasta llegar al día cinco, donde se observó el cierre del opérculo completo y una reabsorción del vitelo con un total de ciento y treinta y dos horas de vida del embrión.

Los embriones obtenidos fueron analizados y descritos, in vivo, luego se tomaron los correspondientes registros fotográficos a cada estadio de desarrollo. Finalmente se fijó el material en formol buferizado al 10% para analizarse posteriormente de una forma más detallada.

2. Introducción

Los anfibios han conformado excelentes modelos para la realización de experimentos a nivel embrionario por sus características, ya que permiten la observación y manipulación de los embriones, tal como lo demuestra la mayoría de los trabajos realizados en las diferentes especies de anfibios. Aunque un gran número de especies están adaptadas a la vida terrestre, precisan volver al agua para reproducirse, característica que facilita la elaboración de las tablas de desarrollo embrionario.

Las tablas de desarrollo, permiten establecer las diferentes fases indicando el grado de madurez alcanzado por un embrión en especial durante la organogénesis. De ahí la importancia de realizar este tipo estudios, para el establecimiento de tablas de referencia y determinar patrones en los cuales se puedan basar investigaciones posteriores sobre morfología e histología normal de diferentes embriones de anfibios. Como también su aplicación como modelo biológico en la determinación de efectos teratogénicos y toxicológicos.

Por otro lado en cuanto a los estudios realizados sobre la embriología normal de *Dendropsophus labialis* (Peters, 1863), se han desarrollado tres trabajos. El primero de ellos, dio a conocer la tabla de desarrollo del estado embrionario pre-metamórfico a nivel macroscópico; posteriormente Ladino (1983), elaboró la descripción del desarrollo metamórfico y finalmente se realizó la misma tabla, pero esta vez enfocada a nivel histológico.

Con este trabajo se pretendió complementar datos específicos de los estadios apertura de boca, circulación caudal, pliegue opercular, cierre opérculo derecho, opérculo completo determinando características morfológicas macroscópicas en *Dendropsophus labialis* a una temperatura constante de 29°C, determinando secuencialmente el tiempo de cada estadio y el tiempo total de desarrollo embrionario pre-metamórfico.

Se espera por medio de esta investigación la complementación y divulgación de los distintos eventos que caracterizan las etapas de desarrollo a nivel embrionario en cada uno de los estadios pre-metamórficos de *Dendropsophus labialis*, así como dar registro de los respectivos cambios a través del tiempo por medio de observaciones macroscópicas con registro fotográfico detallado.

3. Problema y Justificación

Colombia es considerado uno de los países con mayor número de especies de vertebrados en el ámbito global, ocupando así el primer lugar en cuanto al número de especies de aves y anfibios. Para el caso específico de anfibios, algunos autores sugieren que la alta diversidad es una consecuencia derivada de su posición geográfica, la cual genera un gran número de hábitats que poseen condiciones ideales para el desarrollo de las distintas especies de anfibios. Estas condiciones son particularmente críticas e importantes durante ciertas etapas de la historia de vida como es la etapa embrionaria (Ruiz *et al* 1996).

El desarrollo embrionario es considerado como uno de los procesos más importantes en el desarrollo de cualquier organismo ya que es de las etapas más sensibles e importantes, en la cual ocurren procesos de diferenciación y movimientos celulares que van a garantizar al embrión un crecimiento normal, dando origen a un plan corporal general con la aparición de diversos tejidos y órganos hasta llegar al final de su desarrollo, por lo que si llega a ser alterado dichos proceso con cambios en temperatura u otro factor abiótico presentara variaciones en su desarrollo que pueden afectar al embrión en su crecimiento o viabilidad (Purves *et al* 2004).

El estudio de desarrollo embrionario se realiza mediante la elaboración de tablas de desarrollo en las cuales se consignan cada una de las características presentes en el embrión, desde el momento en que es fertilizado por el espermatozoide, hasta la madurez que implica principalmente el proceso de organogénesis (diferenciación de órganos), indicando el grado de desarrollo alcanzado por el embrión en cada uno de sus estadios (Werneburg, 2009).

Guevara (1981) realizó la tabla de desarrollo embrionario pre-metamórfico de la rana sabanera *Dendropsophus labialis* teniendo en cuenta características macroscópicas, las cuales permitieron identificar 24 estadios de su desarrollo y que posteriormente fueron corroborados a nivel histológico por Palacios (1985). Sin embargo se hace necesario reelaborar la tabla de desarrollo embrionario a nivel macroscópico de *Dendropsophus labialis*, por la escasas de tecnología y falta de información con la que se contaba en la época que fue realizada dicha tabla; como también los medios para un mejor manejo de estos parámetros a nivel de laboratorio, donde no se controló la variación y diferencias en las condiciones ambientales como cambios en la temperatura en la cual fue realizada (temperatura ambiente día-noche). De esta forma se

complementaron las características macroscópicas de los estadios: apertura de boca, circulación caudal, pliegue opercular, cierre opérculo derecho y opérculo completo del desarrollo embrionario de la especie *Dendropsophus labialis*, propuestas por Guevara (1981) teniendo en cuenta una temperatura constante.

De acuerdo a lo anterior, la tabla se basó en la información aportada en la investigación de Guevara (1981) con el fin de describir y evaluar las características generales y específicas a nivel macroscópico en los diferentes estadios embrionarios de la especie en estudio. La complementación de esta tabla con los resultados obtenidos en la presente investigación, permitirá el fomento a la investigación y el desarrollo científico referentes al área. Determinando cuales son las características macroscópicas del desarrollo embrionario de la especie *Dendropsophus labialis* (Peters, 1863).

4. Pregunta de Investigación

- ¿Cuáles son las características morfológicas (embrionarias) más relevantes en el desarrollo y cuál es el tiempo empleado en el transcurso de los diferentes estadios del desarrollo embrionario de la rana sabanera *Dendropsophus labialis* a una temperatura constante?

5. Antecedentes

Dullman & Trueb (1994), citan que existen aproximadamente 44 tablas de desarrollo normal para anfibios. Guevara (1981) cita que Wintrebert (1905), fue el primero en elaborar las tablas de desarrollo. El describió para las especies *Rana temporaria* y *Rana viridis* 10 estadios, relacionándose con el desarrollo premetamórfico de los miembros posteriores.

A principios del siglo XX, Tschernoffs (1907) en Guevara 1981 realizó para la especie *Rana arvalis* la tabla de desarrollo, estableciendo 11 estadios para el desarrollo de los miembros posteriores.

Posteriormente, Emmet & Allen (1919) en Guevara (1981) establecieron para la *Rana pipiens* 11 estadios, que se basaron en la características macroscópicas premetamórficas.

Pollister y Moore (1937) en Guevara (1981), definieron 23 estadios embrionarios para *Rana sylvatica*.

Eakin (1938) en Guevara (1981), describió secuencialmente los cambios durante la metamorfosis de *Ambistoma punctatum*.

En la década de los cuarenta Shumway (1940) en Guevara (1981), describió e ilustró para *Rana pipens* 25 estadios. Cinco años más tarde Weiz (1945) en Guevara (1981), estudió el desarrollo embrionario de *Xenopus leavis* identificando 23 estadios.

Taylor & Kollros (1946) en Guevara (1981), trabajaron con *Abistoma punctatum*, asignándole un número a cada estadio morfológico. Posteriormente Eakin & Harris (1947) en Guevara (1981), elaboraron la tabla para *Hylla regilla*. En la década de los cincuenta. Gallien & Hovillon (1951) en Guevara (1981), describieron el desarrollo embrionario de *Discoglossus pictus*. En la década de los sesenta Gosner (1960), realizó una descripción general del desarrollo embrionario de los anfibios, identificando 25 estadios tempranos, asignándoles a cada uno un número aravico.

Posteriormente, Gosner & Rossman (1960), realizaron la descripción de los embriones y las larvas para las especies *Hyla crucifer* y *Hyla ocularis*. Packer (1966), describió el desarrollo embrionario de *Heleioporus eyrei*, coincidiendo con los clásicos 25 estadios descritos por los autores anteriores.

En el siglo XXI Del Pino *et al* (2004), elaboraron la tabla de desarrollo embrionario para el dendrobatido *Colostethus machalilla*, analizando la morfología del desarrollo temprano, identificando 25 estadios.

Sayim & Kaya (2008), realizaron la descripción del desarrollo embrionario de *Hyla arborea*, que va desde la fertilización hasta el cierre completo del opérculo. Posteriormente realizaron una comparación de las características morfológicas externas entre la especie en estudio e *Hyla japonica*, *H. avivoca* y *R. pipens*.

Los trabajos realizados en Colombia sobre embriología son muy pocos. Falco & Restrepo (1983) en Guevara (1981), desarrollo la tabla de desarrollo embrionario de *Bufo marinus*,

estableciendo 25 estadios. Posteriormente Cervantes & Falco (1984) en Guevara (1981) realizaron la tabla de desarrollo para la misma especie pero a nivel larvario.

Consecutivamente, Guevara (1981) elaboró la tabla de desarrollo embrionario a nivel macroscópico de *Dendropsophus labialis* (Peters, 1863), estableciéndose 24 estadios y determinándose la edad total en horas para alcanzar el desarrollo. Finalmente Palacios (1985) elaboro la tabla para la misma especie pero a nivel histológico.

6. Marco Teórico

6.1. Taxonomía de la especie *Dendropsophus labialis* (Peters, 1863)

Originalmente esta especie fue registrada como perteneciente al género *Hyla*, sin embargo fue cambiado su nombre por Faivovich *et al* (2005), el cual la cambio al género *Dendropsophus*. Su taxonomía actual es entonces: Clase: Amphibia, Subclase: Lissamphibia, Orden: Anura, Suborden: Neobatrachia, Superfamilia: Bufonoidea, Familia: Hylidae, Genero: *Dendropsophus*, Especie: *Dendropsophus labialis* (Peters, 1863). (IUCN 2008).

6.2. Generalidades de la especie

Dendropsophus labialis pertenece a la familia Hylidae, que es una de las familias más diversas de anfibios (más de 850 especies descritas hasta 2005). Desde el punto de vista taxonómico *Dendropsophus labialis* es clasificada por (Peters, 1863), como una especie que pertenece al género *Dendropsophus* distribuida en las montañas y alrededores de Bogotá. Otro estudio demuestra que *Dendropsophus labialis* también se encuentra en el Parque Nacional Natural Chingaza y es la especie de mayor tamaño hallada hasta el momento de anuros en este lugar (IUCN, 2008).

Esta especie se caracteriza por presentar un tamaño no mayor a los 6 cm y a nivel de coloración dorsal varía de una escala que va desde el café claro hasta el verde, esta diferencia poblacional, está relacionada con la altitud. La superficie posterior del muslo es de color azul y no poseen membranas entre los dedos (Hoyos, 1991).

Otras características particulares de esta especie son que la mayoría de sus miembros son ranas arborícolas. En general las ranas y sapos tienen un ciclo de vida muy especial, se inicia con el huevo que se desarrolla en renacuajo o larva hasta llegar al estado adulto. (Lynch & Rengifo, 2001).

Los anuros, presentan diversas estrategias de reproducción, las ranas del genero *Dendropsophus* presentan el modo tipo 1, es decir, las hembras depositan los ovocitos en cuerpos de agua, formando montones gelatinosos, por unión de las capas mucosas que envuelven los huevos; permitiendo que floten en la superficie del agua (Duellman & Trueb 1994).

A nivel embriológico *Dendropsophus labialis* ha sido estudiada por ser considerada como un modelo biológico que posee organismos con altas tasas de fertilidad, lo cual permite obtener un gran número de embriones que se caracterizan por ser de gran tamaño facilitando así su seguimiento en el desarrollo embrionario a través de métodos simples de laboratorio, característica que facilita la elaboración de tablas de desarrollo (Chipman, 2002).



Foto 1. Amplexus



Foto 2. Rana hembra

6.3. Tablas de desarrollo

Las tablas de desarrollo embrionario son instrumentos empleados a nivel embriológico ya que describen el desarrollo de un organismo permitiendo conocer las características morfológicas alcanzadas por el embrión y el grado de desarrollo de las mismas (nivel celular, tejidos y órganos) desde el inicio hasta el fin de su desarrollo (Balinsky, 1983).

Para conocer el proceso de organogénesis se han elaborado tablas de estadios de desarrollo para varias especies de animales, especialmente para aquellas que se emplean con mayor frecuencia en investigación, como es el caso de los anfibios (Balinsky, 1983), las cuales permiten establecer las diferentes fases embrionarias indicando el grado de madurez alcanzado por el embrión, en especial durante la organogénesis (Guevara, 1981).

Además las tablas de desarrollo se han utilizado como modelos biológicos indispensables para trabajos experimentales relacionados con fármacos, insecticidas, metales pesados entre otros, determinando la toxicidad y efectos teratogénicos sobre el desarrollo embrionario (Guevara 1997), aportando acciones inmediatas tendientes a evaluar el estado de salud de las poblaciones, identificando las amenazas potenciales para su subsistencia, de tal forma que esta información básica permita la formulación de planes específicos (Duellman & Trueb 1994).

Finalmente para la elaboración de las tablas de desarrollo, se tienen en cuenta características que se relacionan con la edad, el tamaño, y peculiaridades morfológicas del embrión. Es decir, la identificación de cada estadio se basa, principalmente, en las características externas (Guevara, 1997).

6.4. Factores que influyen en Tablas de Desarrollo

Existen varios factores que se deben tener en cuenta en el momento de la elaboración de una tabla de desarrollo: La temperatura, la densidad de la población y la heterocronía (Jorquera & Izquierdo 1964; Guevara 1981). Los anfibios, por ser ectotermicos carecen de mecanismos

eficientes para la termorregulación fisiológica, lo que determina una estrecha dependencia del crecimiento y desarrollo sobre la temperatura (Brattstrom 1963 en Álvarez & Nicieza 2002). Por lo tanto, la temperatura ha sido considerada como un factor limitante en la variación y tamaño del embrión y el tiempo en el que transcurre la metamorfosis. Bajas temperaturas retardan la diferenciación, es así, como aquellas larvas que crecen en estas condiciones presentan periodos de desarrollo más prolongados (Duellman & Trueb 1994; Álvarez & Nicieza 2002).

En general la temperatura, tiene un efecto muy importante durante el desarrollo embrionario y larval, se han realizado estudios en diferentes especies de anfibios para analizar la relación entre la temperatura y el desarrollo embrionario, en los cuales se evidenció que un aumento puede generar daños morfológicos, histológicos, aceleración en los tiempos o incluso interrumpirse el proceso embrionario (Bachmann, 1969).

Desde los trabajos de Hertwig (1898) y Guevara (1981), se cree que la aceleración en el desarrollo embrionario por un aumento en la temperatura, se puede interpretar como consecuencia de la aceleración de los procesos químicos y fisiológicos.

En cuanto a la densidad de la población, la información es escasa y este factor genera efectos sobre el desarrollo de la larva por la interferencia en el movimiento causado por la sobrepoblación (Rugh, 1934).

En general los anfibios ponen los ovocitos y luego los abandonan, lo que genera una alta mortalidad; por ende deben colocar gran número de embriones para asegurar el éxito reproductivo. Gracias a los trabajos realizados, se ha estimado que el número promedio de huevos expulsados por la especie a estudiar se encuentra alrededor de los 200 por postura (Guevara 1981; Palacio 1985).

Finalmente la heterocronía o velocidad desigual en el desarrollo hace referencia a que a pesar de que los caracteres morfológicos constituyen el mejor criterio para establecer la fase o estadio de desarrollo de un embrión, existen ciertas limitaciones en su empleo; se ha comprobado que el desarrollo de diferentes órganos del embrión no está estrictamente coordinado con el tiempo; en ocasiones, algunas partes se desarrollan más rápidamente que otras, así que dos o más embriones

que tengan ciertos órganos exactamente iguales es posible que difieran en el grado de desarrollo de otras (Guevara, 1981).

6.5. Desarrollo embrionario

El desarrollo embrionario de un organismo, implica una serie de procesos biológicos en los que está la gametogénesis, fecundación, segmentación, gastrulación, crecimiento y diferenciación histológica, diferenciación celular; lo cual genera una gran variedad de estructuras con funciones especializadas (Balinsky, 1983).

En general el ciclo de vida de los anfibios, se inicia con el ovocito que se desarrolla en renacuajo o larva hasta llegar al estado adulto. Desde la postura de los ovocitos hasta el final de la metamorfosis, el embrión y la larva pasan por una serie de etapas del desarrollo denominadas estadios (Lynch & Rengifo 2001).

El desarrollo embrionario se puede dividir en dos etapas: La primera denominada desarrollo embrionario temprano, que comprende el proceso de fecundación, segmentación, blastulación, gastrulación, neurulación, y el segundo proceso comprende la organogénesis, es decir, la formación de los órganos (Balinsky, 1983; Gerhart, 1986).

En las fases del desarrollo temprano se tiene en cuenta el número y tamaño de los blastómeros (células que se van a diferenciar). El primer proceso dentro de esta fase inicial es la segmentación, el cual es un proceso lento caracterizado por una serie de divisiones mitóticas de las células de organismos multicelulares, donde el citoplasma es dividido en numerosas células, denominado también hiperplasia (Gilbert, 2005). Estas células segmentadas son pluripotentes (célula no diferenciada que da lugar a cualquier célula especializada) y totipotentes (células con capacidad de producir un organismo completo), que se tornan más pequeñas en cada división y se les denomina blastómeros, los cuales se encuentran agrupados de manera laxa hasta que llegan a ser ocho y alrededor de tres días después de la fecundación, hasta formar 16 células o blastómeros (Langman, 2007). Posteriormente ocurre la gastrulación en la que se forma un labio

dorsal, ventral y lateral, siendo sucedido por la fase de Neurula donde se fusionan los pliegues de los labios.

Los procesos como la gastrulación, neurulación, y la organogénesis son etapas interconectadas e interdependientes, ya que son procesos que afectan a todo el embrión, y por lo tanto se presentan en una secuencia específica. La duración relativa de cada uno de estos procesos no necesariamente se conserva, por lo que la variación en el momento de la aparición de las características morfológicas propias de cada fase pueden presentar cambios en su secuencia (Chipman, 2002).

7. Objetivos

7.1. Objetivo General

- Complementar los estadios apertura de boca, circulación caudal, pliegue opercular, cierre opérculo derecho, opérculo completo determinando sus características morfológicas en *Dendropsophus labialis*.

7.2. Objetivos Específicos

- Determinar secuencialmente el tiempo de desarrollo de cada estadio.
- Establecer las nuevas características que complementen cada uno de los estadios.
- Determinar el tiempo total de desarrollo embrionario a una temperatura de 29°C en *Dendropsophus labialis*.

8. Materiales y métodos

8.1. Población de Estudio

Los individuos de la rana sabanera *Dendropsophus labialis* fueron colectados en los alrededores de la población de Tenjo-Cundinamarca, Colombia con coordenadas 4° 52' 21,23'' N; 74° 08' 35,72'' W con una altitud aproximada de 2587 m.s.n.m. Fueron previamente seleccionados de acuerdo a su nivel de maduración, ya que individuos juveniles serian inadecuados para este estudio por lo que no se encontrarían aptos para llevar a cabo la reproducción. Se colectaron cuatro individuos (dos parejas). Posteriormente fueron trasladados al laboratorio de Biología del Desarrollo de la Pontificia Universidad Javeriana, en una nevera de icopor pequeña con el fin de elaborar el respectivo estudio.

8.2. Mantenimiento en cautiverio y montaje

Los individuos colectados se colocaron por parejas en acuarios de 60 centímetros de longitud por 45 centímetros de ancho y 50 centímetros de alto los cuales fueron previamente ambientados con gradilla (piedrecillas), algunas plantas (plantas artificiales y musgo natural), agua, y en su parte posterior fueron cubiertos por gasa con ayuda de cinta de enmascarar para evitar que se escaparan.

Los individuos en cautiverio fueron alimentados con artrópodos como: zancudos, moscas, lombrices pequeñas etc. Este método estimuló a la caza, a los individuos de *Dendropsophus labialis* y ayudo a que sintieran menos las condiciones de estrés a las que se pudieron enfrentar al estar en cautiverio. Sin embargo en las ocasiones que no se obtuvo el alimento requerido para su mantenimiento, se elaboró un pate de hígado, alimentando así a cada individuo independientemente, tratamiento que fue establecido con anterioridad como uno de los más eficaces para suplir la dieta durante el periodo de estudio y cautiverio (Ladino,1983).

Debido a que se colocaron las parejas en acuarios separados, se gravaron los sonidos vocales de machos de esta especie durante la colecta para que luego en sus respectivos acuarios fueran reproducidos y pudieran ser un medio de estimulación para el macho de *Dendropsophus labialis*

llevar a cabo el amplexus (cortejo). Otro método que se pensó en usar para estimular la reproducción era de emplear el extracto de hipófisis de *Bufo marinus* (glándula pituitaria), la cual sería inyectada a cada individuo, la cantidad mínima requerida sería de una hipófisis de *Bufo* por rana de *Dendropsophus labialis*. Pero finalmente se descarto esta opción ya que las parejas capturadas ovopositaron sin necesidad de llevar a cabo este procedimiento.

El amplexus y la ovulación se observarían 18 horas más tarde, según lo establecido por Guevara (1981).

Posteriormente y luego de que ocurrió la ovoposición o desove se preparó una solución fisiológica Holtfreter Madre y luego una Holtfreter Estándar adicionando 300-400 ml por acuario la cual se encargó de mantener los embriones en un medio optimo para llevar a cabo el desarrollo permitiendo así su viabilidad. A continuación se describe la composición de la solución Holtfreter madre y la que se utiliza como estándar para los medios de cautiverio:

8.2.1. Modo de preparación Holtfreter madre

- Erlenmeyer de 1000 ml.
- Agregar 1000 ml de agua destilada.
- Pesar: 3,5 gr de NaCl
0,05 gr de KCl
0,1 gr de CaCl₂
0,2 gr de CO₃HNa
- Tomar el CO₃HNa y llevarlo a un horno a temperatura de 150°C por un tiempo de 30 minutos.
- Luego tomar el NaCl, KCl, CaCl₂ y disolverlos en 1000 ml de agua destilada. Agitar bastante para que se oxigene.

8.2.2. Preparación Holtfreter estándar

- Tomar en una probeta 100 ml de solución madre Holtfreter y agregar 900 ml de agua destilada.
- Agitar esta solución de tal forma que se pueda oxigenar
- Agregar 0,02 gr de CO_3HNa .

Se cambio la solución fisiológica cada 12 horas para evitar cualquier tipo de contaminación. En las primeras dos horas cada 20-30 minutos se tomaron los embriones para realizar las lecturas respectivas que ayudaron a la caracterización e identificación de los diferentes estadios de desarrollo. Cabe aclarar que el trabajo en el laboratorio, consistió en la observación mediante estereoscopio y microscopio del desarrollo embrionario de cada uno de los estadios. A medida que se observaba y se reconocían los distintos eventos del desarrollo, se hizo un registro con las anotaciones correspondientes a cambios macroscópicos. Finalmente se registraron, de acuerdo a los diferentes tiempos, y al nivel de desarrollo los posibles cambios involucrados en sus estadios hasta el final de cierre de opérculo completo de la rana sabanera *Dendropsophus labialis*. Los embriones estudiados se fijaron en formol buferizado al 10%.

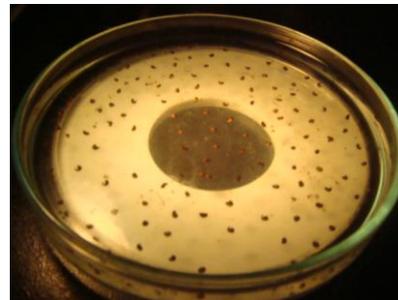


Foto 3. Acuario previamente ambientado. Foto 4. Caja de petri con embriones.

8.3.1 Métodos de laboratorio

8.3.2 Para el primer objetivo específico (Determinar secuencialmente el tiempo de desarrollo de cada estadio)

Fueron realizadas con la ayuda del estereoscopio y microscopio observaciones de los embriones de *Dendropsophus labialis*, así como del grado de desarrollo de cada uno de los estadios. A medida que se realizaban las observaciones y sucedían los diferentes cambios en las estructuras presentes en el embrión, se hizo un registro con las anotaciones correspondientes a cambios morfológicos presentes en cada estadio y al tiempo requerido para el paso a un nuevo estadio. En el análisis morfológico externo general y específico se tuvieron en cuenta: La coloración de los casquetes, tamaño del embrión, tamaño del tapón vitelino, pliegues neurales, respuesta muscular, latido cardíaco, circulación branquial, cierre de operculo etc., características que dependieron del estadio observado.

8.3.3 Para el segundo objetivo específico (Establecer las nuevas características que complementen cada uno de los estadios)

Para establecer las nuevas características que complementaron cada uno de los estadios se tuvo en cuenta el procedimiento correspondiente al objetivo anterior con la diferencia que este se vio enfocado a unos estadios en particular los cuales se mencionan a continuación: apertura de boca, circulación caudal, pliegue opercular, cierre opérculo derecho, opérculo completo. Posteriormente fue consignada la información observando minuciosamente cada característica que se consideró propia a cada uno de los estadios ya mencionados.

8.3.4 Para el tercer objetivo específico (Determinar el tiempo total de desarrollo embrionario a una temperatura de 29°C en *Dendropsophus labialis*)

Para la determinación del tiempo, se tomo una muestra de los ovocitos una vez fueron colocados por la hembra y fertilizados por el macho. Se pusieron en cajas de petri con bastante solución Holtfreter standard para evitar su desecación y viabilidad. Posteriormente, con la ayuda de un cronometro, se tomo el tiempo desde que ocurrió la ovoposición (tomándolo como el tiempo

cero) y a medida que se fue presentando cada uno de los cambios morfológicos y fisiológicos mencionados anteriormente se tomo el tiempo que había transcurrido desde el tiempo cero.

Una vez obtenidos los tiempos entre cada estadio. Se registró, la edad en horas requeridas por el embrión para alcanzar su desarrollo embrionario pre-metamórfico completo hasta cierre de opérculo completo a una temperatura constante. Luego se promediaron los tiempos de duración entre cada estadio, obtenidos en las reproducciones.

9. Resultados

De acuerdo con la toma de tiempos de cada estadio y las respectivas observaciones macroscópicas realizadas a cada uno de los embriones se obtuvieron de forma secuencial los siguientes resultados de la fase temprana de desarrollo embrionario de la rana sabanera *Dendropsophus labialis*:

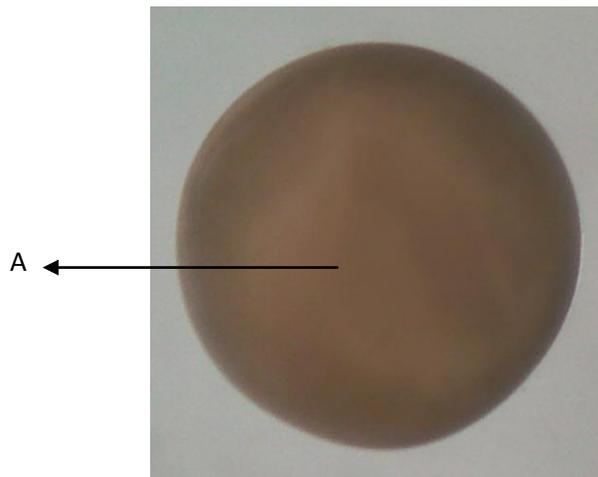


Figura 1.

Estadio 1.

Oocito sin fertilizar

Figura 1. (A. Oocito no fertilizado).

Hora 0-0.

“Va desde el oocito sin fertilizar hasta oocito fertilizado”.

En este estadio el oocito se caracteriza por estar rodeado de una capa densa denominada ganga o gelatina, presenta una parte pigmentada denominada casquete animal que puede variar entre un color café claro hasta un café muy oscuro, el cual se extiende hasta la parte media del oocito o área ecuatorial donde se empezará a diferenciar el casquete vegetativo, que presenta un color blanco marfil. El tamaño promedio del oocito es 1.32mm.

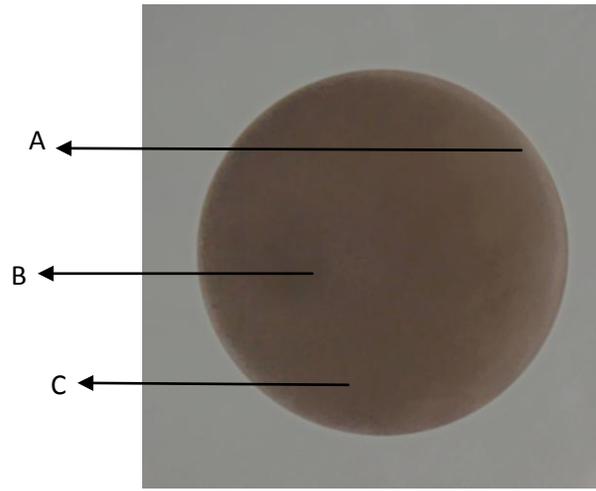


Figura 2.

Estadio 2.

Oocito fertilizado

Figura 2. (A. Casquete vegetativo; B. Punto de penetración del espermatozoide; C. Casquete animal).

Hora 0-4'.

“Comprende desde la fertilización del oocito hasta la formación del primer clivaje”.

Se caracteriza por el punto de penetración del espermatozoide en la parte superior del casquete animal, dando lugar a la formación del espacio perivitelino y a la membrana de fecundación.

Con la penetración del espermatozoide por el casquete animal, el citoplasma cortical rota hacia el sitio de ingreso, formándose en el lado opuesto y quedando despigmentada una pequeña zona llamada la media luna gris. El tamaño promedio del oocito es 1.44mm.

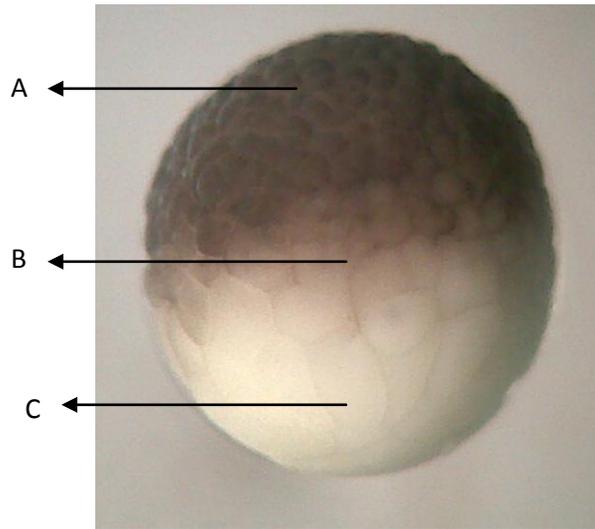


Figura 8. Vista lateral.

Estadio 8.

Blástula media

Figura 8. (A. Micrómeros; B. Mesómeros; C. Macrómeros).

Hora 4.07' – 6.20'.

“Comprende desde el estadio de blástula media hasta el inicio de blástula tardía”.

Este estadio se caracteriza por la reducción del casquete vegetativo debido a la expansión del área oscura del oocito (casquete animal), donde se hace muy difícil contar los blastómeros por el gran número presente; habiendo una pérdida en la sincronización de los planos de división, lo cual no corresponde a un patrón de clivación. Sin embargo se puede distinguir con gran facilidad un blastómero del otro, observándose que son de un mayor tamaño los blastómeros ubicados en el casquete vegetativo con respecto al animal, variando también en su número (menor número en casquete vegetativo).

La discoblástula media se caracteriza por presentar células más pequeñas que las del estadio anterior conservando la relación en el tamaño de acuerdo al casquete. El tamaño promedio del oocito es 1.68mm.

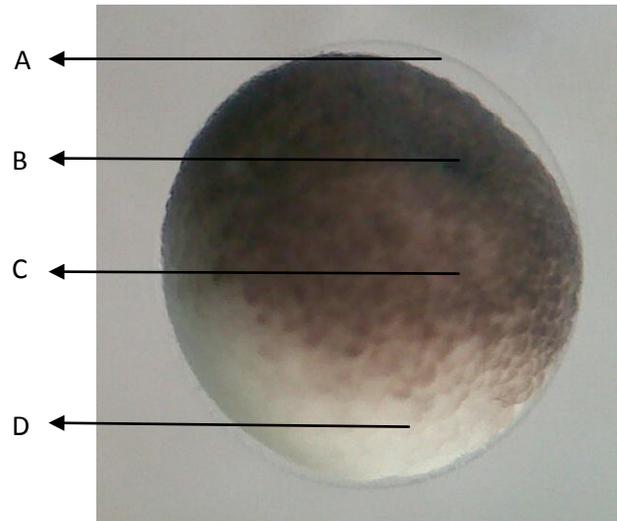


Figura 9. Vista lateral

Estadio 9.

Blástula tardía

Figura 9. (A. Membrana de fecundación; B. Punto de penetración; C. Micrómeros; D. Macrómeros).

Hora 6.20'- 10.20'.

“Comprende desde el estadio de blástula tardía hasta el inicio del labio dorsal o gástrula temprana”.

Este estadio se caracteriza por presentar un mayor número de blastómeros en el casquete animal con respecto al estadio anterior y un menor número en el casquete vegetativo. Al observar en conjunto el blastodermo, es muy difícil identificar separadamente un blastómero del otro.

Comparando este estadio con el anterior, la principal diferencia radica en que el tamaño de los blastómeros de la blástula tardía son más pequeños, guardando siempre la relación que se ha observado a través de la blastulación.

En este estadio el casquete animal cubre prácticamente unas tres cuartas partes del oocito debido a la expansión, forma y multiplicación de sus células. El tamaño promedio del oocito es 1.72mm.

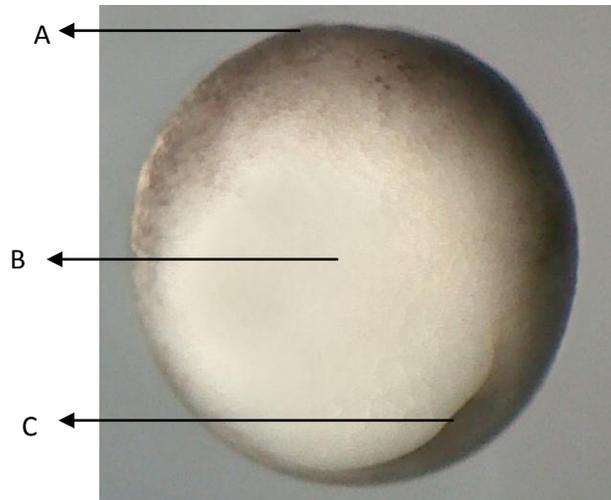


Figura 10.

Estadio 10.

Gástrula temprana o labio dorsal

Figura 10. (A. Casquete animal; B. Casquete vegetativo; C. Labio dorsal).

Hora 10.20' - 16.30'.

“Va desde el inicio del labio dorsal hasta el inicio de la gástrula media o formación del labio ventral”.

El punto de penetración del espermatozoide determinó la parte ventral del embrión y opuesto a este, se diferenció el lado dorsal del mismo. Justo por debajo del ecuador, en la región de la media luna gris. Aquí las células se invaginan formando el labio dorsal del blastoporo. Esta invaginación indica el comienzo de la gastrulación.

Al igual que en el estadio anterior se hace muy difícil de observar las células o blastómeros presentes en ambos casquetes del embrión debido a una reducción en sus tamaños.

La gástrula rodeada por la membrana de fecundación conserva su forma esférica. El tamaño promedio del oocito es 1.9mm.

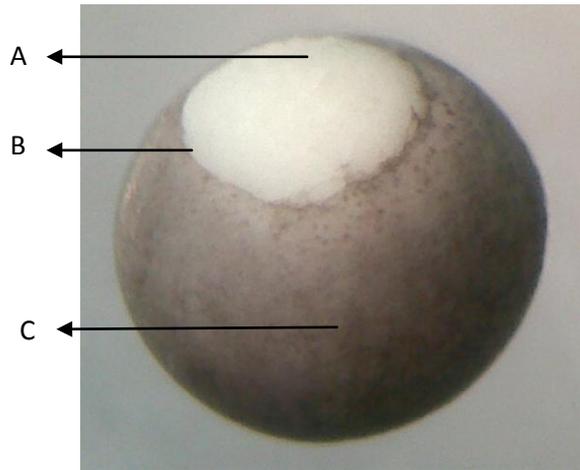


Figura 11. Vista lateral.

Estadio 11.

Gástrula media o labio ventral

Figura 11. (A. Tapón vitelino; B. Labio ventral; C. Casquete animal).

Hora 16.30'- 23. 37'.

“Comprende desde el inicio de gástrula media o labio ventral hasta gástrula tardía”.

Se caracteriza por formar el labio ventral del blastoporo.

El labio del blastoporo se expande lateral y ventralmente a medida que continúan los movimientos de epibolia e invaginación, formándose los labios laterales y el labio ventral alrededor del blastoporo. Con la formación del labio ventral, el blastoporo ha formado el anillo germinal alrededor de las grandes células vitelinas, que se mantienen expuestas por un determinado periodo sobre la superficie del casquete vegetativo y se conocen con el nombre de tapón vitelino. El tamaño promedio del oocito es 1.94mm.

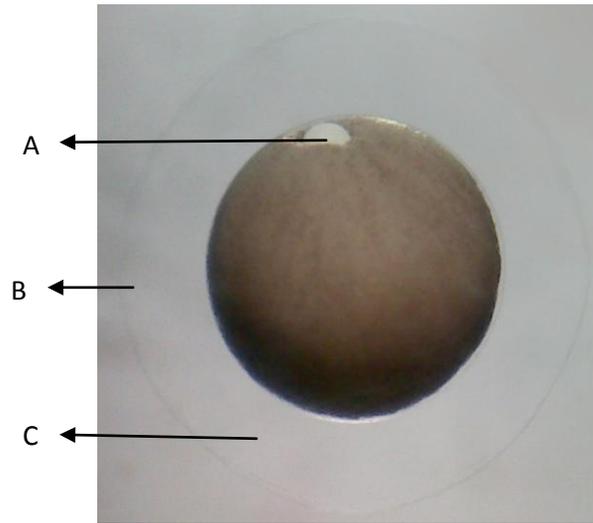


Figura 12. Vista lateral.

Estadio 12.

Gástrula tardía

Figura 12. (A. Tapón vitelino o blastoporo; B. Membrana de fecundación; C. Espacio perivitelino).

Hora 23.37'- 25.10'.

“Va desde el estadio de gástrula tardía hasta el inicio de placa neural”.

El tapón vitelino es lentamente internalizado, observándose mucho más pequeño que en el estadio anterior debido a la desaparición gradual de las grandes células vitelinas que lo conforman. Posteriormente este tapón se cierra y continúa su invaginación hasta el punto en que la comunicación entre el arquenterón y el exterior sea hecha por medio del blastoporo.

La superficie del embrión por el movimiento de epibolia se observa totalmente pigmentada. El tamaño promedio del oocito es 1.98mm.



Figura 13. Vista dorsal.

Estadio 13.

Placa neural

Figura 13. (A. Placa).

Hora 25.10' - 27.05'.

“Comprende desde el inicio de placa neural hasta que aparecen formados los pliegues neurales”.

El embrión que en los estadios anteriores se presentaba de una forma esférica, empieza a tornarse piriforme (forma irregular); llevando a la formación de la placa neural que se extiende sobre toda la longitud de la cara dorsal del oocito, la cual se presenta más ancha en la región cefálica y estrecha en la región caudal, en cuyo contorno se forma una saliente que adopta la forma de un rodete (forma de raqueta). Presentando una prominencia causada por una agrupación de células haciéndose fácil de observar al estereoscopio. El tamaño promedio del oocito es 2.02mm.

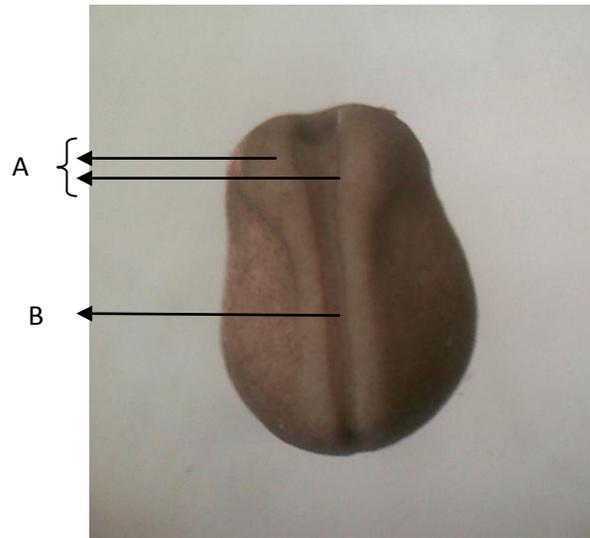


Figura 14. Vista dorsal.

Estadio 14.

Pliegue Neural

Figura 14. (A. Pliegues; B. Surco neural).

Hora 27.05' - 28.20'.

“Comprende desde la formación de los pliegues hasta que comienza la formación del tubo neural”.

Este estadio se caracteriza por un movimiento de evaginación de los lados laterales de la placa y algo de invaginación de la parte central de la misma, conservando, el diámetro mayor en la parte anterior (0.4mm) y un diámetro menor en la parte posterior (0.2mm), formando una depresión en la parte media de los pliegues denominada surco neural. Simultáneamente este surco empieza a estrecharse uniendo los dos pliegues neurales que aumentaron un poco en altura. Así se dará paso al estadio siguiente del desarrollo.

Además el embrión presenta una forma ovoide y una ligera elongación hacia sus extremos (hay crecimiento). El tamaño promedio del embrión es 2.04mm.

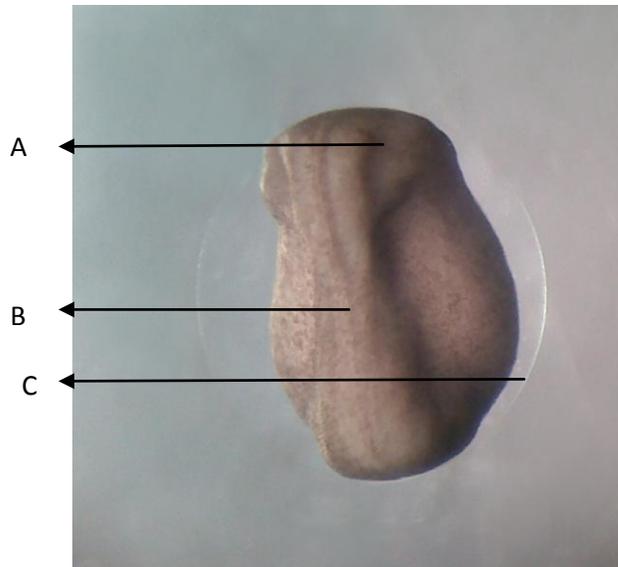


Figura 15. Vista dorsal.

Estadio 15.

Tubo neural

Figura 15. (A. Esbozo de placodas olfatorias; B. Tubo; C. Membrana de fecundación).

Hora 28.20'- 29.05'.

“Comprende desde la formación del tubo neural hasta la aparición del esbozo de cola o botón caudal”.

Este estadio se caracteriza por dar inicio a la fusión de los pliegues neurales en la parte media del embrión y continuando en dirección cefálica y caudal. Permanecen separados por algún tiempo, donde forman los respectivos neuroporos anterior y posterior; además se observa un leve arqueamiento de una apariencia bastante rígida y de nuevo una mínima elongación por parte del embrión. Se empieza a diferenciar claramente en la parte anterior del embrión un ensanchamiento que dará lugar a la parte cefálica, observándose dos pequeñas hendiduras que posteriormente darán origen a las placodas olfatorias; así como su parte posterior un poco más estrecha y que dará origen a la parte caudal. También se logra diferenciar la parte dorsal de la ventral.

El tamaño promedio del embrión es 2.6mm.

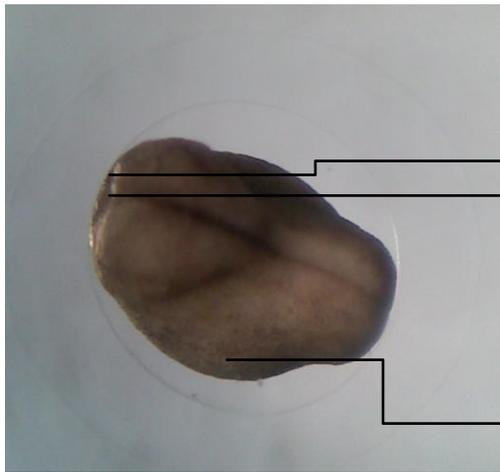


Figura. 16. Vista dorsal.



Figura. 17. Vista lateral.

Estadio 16.

Botón caudal

Figuras 16 y 17. (A. Esbozo de placodas olfatorias; B. Estomodeo; C. Esbozo de suctores orales; D. Vitelo; E. Botón caudal).

Hora 29.05'- 42.20'.

“Va desde la aparición del esbozo de cola o botón caudal hasta el inicio de contracción muscular”.

Al inicio de este estadio el embrión presenta claramente en la parte posterior de su plano corporal el esbozo de cola, que le da origen a su parte caudal. La cual comenzará a crecer rápidamente presenciando un alargamiento considerable en esta área del embrión.

También, aparece una invaginación (estomodeo) en la parte media del área rostral que originará en un estadio más avanzado la boca del individuo, así como también es posible identificar bajo esta área dos abultamientos producidos por agrupaciones de células de forma semilunar que son los suctores orales u órganos de fijación del embrión.

Finalizando este estadio es posible contarle al embrión en la parte media dorsal algunos pares de somitas que varían entre ocho y trece. Se observara entre dos a tres pliegues en su parte cefálica lateral que formarán las branquias del embrión. El tamaño promedio del embrión es 3.34mm.

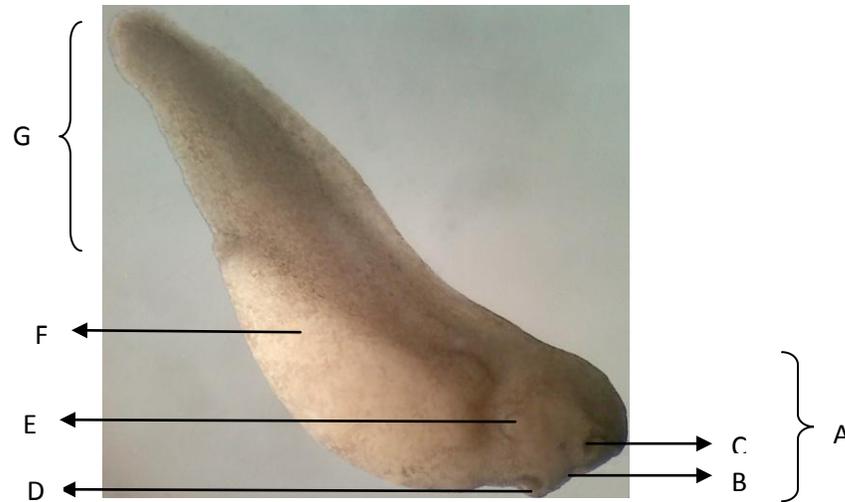


Figura 18. Vista lateral.

Estadio 17.

Contracción muscular

Figura 18. (A. Parte cefálica; B. Estomodeo; C. Placodas olfatorias; D. Suctores orales; E. Esbozos branquiales; F. Vitelo; G. Parte caudal).

Hora 42.20' - 48.45'.

“Comprende desde contracción muscular hasta el inicio de latido cardiaco”.

La contracción muscular se observa por medio de cortas flexiones realizadas por el embrión como respuesta a estímulos mecánicos. En este estadio se observan dos protuberancias formadas por células en ambos costados laterales del embrión, dando origen a los esbozos branquiales del individuo.

Por otra parte se observan claramente dos pequeñas regiones pigmentadas en la parte rostral superior que corresponden al inicio de la diferenciación de las placodas olfatorias.

Además se observa una segmentación transversal en la parte caudal-media del embrión que corresponde a las somitas. Hacia su parte caudal, progresivamente se esbozan y transparentan los pliegues de la aleta dorsal y ventral respectivamente.

El tamaño promedio del embrión es 5mm.

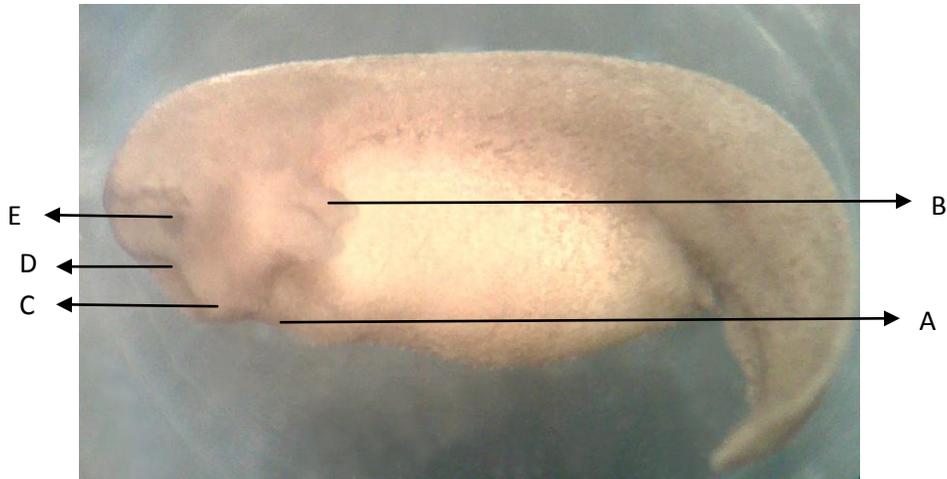


Figura 19. Vista lateral.

Estadio 18.

Latido cardiaco

Figura 19. (A. Corazón; B. Branquias; C. Suctores orales; D. Estomodeo; E. Esbozo de placodas olfatorias).

Hora 48.45' - 55.20'.

“Comprende desde el latido cardiaco hasta el inicio de la circulación branquial”.

En la región del cuello y hacia la parte ventral del embrión aparece en medio de los suctores orales, el corazón, observándose traslucido y formando una protuberancia que generará unas pulsaciones periódicas e intermitentes, que a medida que avance el desarrollo se van hacer más frecuentes. También se observan dos bifurcaciones laterales muy pronunciadas a la altura de la cabeza que sobresalen del embrión y formarán las branquias. Esto se puede observar de una forma más clara mientras se estudia el embrión de perfil.

En la región cefálica rostral se observa una invaginación mucho más profunda que en otros estadios en la parte central, denominada estomodeo, que originará la boca del individuo y hacia su parte superior, las placodas olfatorias.

Los pliegues de aleta dorsal y ventral aunque ya se han empezado a transparentar, continúan opacos. El tamaño promedio del embrión es 5.1mm.



Figura 20. Vista frontal-lateral.

Estadio 19.

Circulación branquial

Figura 20. (A. Placodas olfatorias; B. Suctores orales; C. Branquias; D. Aleta ventral; E. Aleta dorsal).

Hora 55.20' - 73.05'.

“Va desde que aparece la circulación branquial hasta el inicio de apertura de boca”.

Los brotes branquiales que originalmente se encontraban como dos bifurcaciones en la parte lateral del embrión a la altura media de la cabeza, se empiezan a ramificar dando lugar a la formación de filamentos por los cuales se observa un flujo lento pero continuo de corpúsculos sanguíneos transparentes que se hacen visibles en el tejido superficial de las branquias con la ayuda del estereoscopio.

Los suctores orales aumentan un poco en su tamaño haciéndose más prominentes y pigmentados en su parte inferior.

Hacia la parte caudal se hacen un poco más traslucidos los pliegues de las aletas dorsal y ventral.

El tamaño promedio del embrión es 5.24mm.

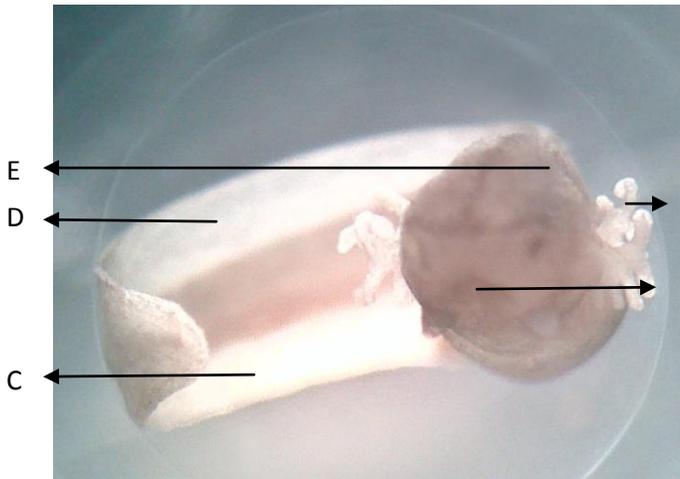


Figura 21. Vista frontal.

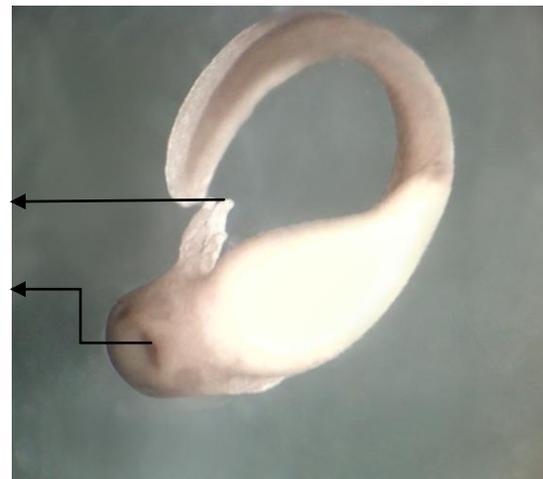


Figura 22. Vista ventral.

Estadio 20.

Apertura de boca

Figuras 21 y 22. (A. Boca; B. Branquias; C. Aleta ventral; D. Aleta dorsal; E. Ojo).

Hora 73.05' - 93.00'.

“Comprende desde que sucede la apertura de boca hasta el inicio de circulación caudal”.

Hacia la parte central de la región cefálica rostral se encuentra el estomodeo, que se profundiza con la rotura de la membrana bucofaríngea dando origen a la boca del embrión, que a su vez presenta un leve abultamiento a su alrededor (bordes papilares).

También ocurre un gran crecimiento branquial lo que facilita observar más claramente y con mayor frecuencia el flujo de corpúsculos sanguíneos que pasa a través de las branquias. Se hace muy notorio al inicio de la parte caudal y hasta el final de la misma, una segmentación transversal que corresponderá a las somitas; de igual forma se ve diferenciado el pliegue de la aleta dorsal y el pliegue de la ventral aunque no translucidos totalmente si de una forma parcial (un poco opacos).

Se comienza a observar externamente el ojo, que comprende la formación de cornea, donde al inicio del estadio es un poco pigmentada y al final se hace transparente, esto se observa en la parte cefálica dorso-lateral. El tamaño promedio del embrión es 5.9mm.

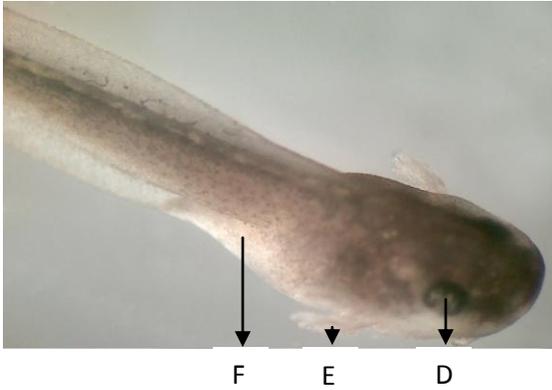


Figura 23. Vista dorso-lateral.

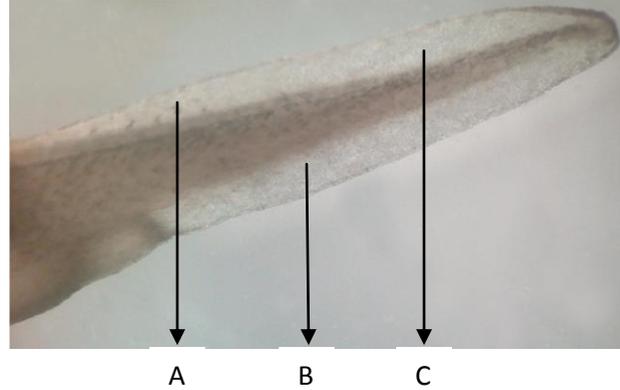


Figura 24. Vista lateral.

Estadio 21.

Circulación caudal

Figuras 23 y 24. (A. Vasos sanguíneos; B. Aleta ventral; C. Aleta dorsal; D. Ojo; E. Branquia; F. Vitelo).

Hora 93.00'- 102.30'.

“Comprende desde el inicio de la circulación caudal hasta el inicio de la formación del pliegue opercular”.

Este estadio se caracteriza por la formación de vasos sanguíneos de un color oscuro tanto en la aleta dorsal como en la ventral, los cuales son fáciles de observar debido a que la epidermis de los dos pliegues de las aletas se ha transparentado. A lo largo de su cuerpo y lateralmente se observan muchos puntos pigmentados de colores oscuros (melanóforos). Las placodas olfatorias se han invaginado dando lugar a la formación de las fositas olfatorias que se observan en la parte rostral media del embrión. En su parte cefálica dorso-lateral se observan bien diferenciados los ojos, así como una reducción considerable en la cantidad de vitelo si se compara con el estadio inmediatamente anterior (se reduce a la mitad).

Otro aspecto importante es que el embrión presenta una reacción inmediata por medio de movimientos musculares fuertes ante cualquier estímulo mecánico por mínimo que este sea; permitiendo la eclosión del individuo luego de la ruptura de la membrana de fecundación. El tamaño promedio de la parte cefálica es 2.2mm y de la parte caudal es 4.76mm.



Figura 25. Vista dorsal.

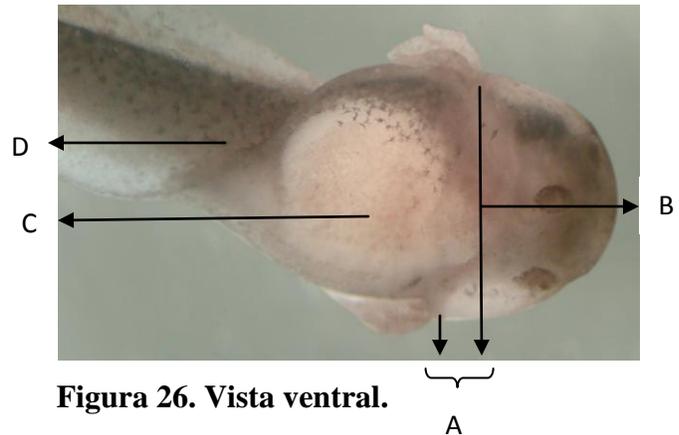


Figura 26. Vista ventral.

Estadio 22.

Pliegue opercular

Figuras 25 y 26. (A. Pliegues operculares; B. Corazón; C. Asas intestinales; D. Pigmentos; E. Ojos).

Hora 102.30'- 116.20'

“Comprende desde la formación del pliegue opercular hasta el cierre del opérculo derecho”.

A la altura de las branquias se comienza a formar el pliegue opercular de forma sincrónica en ambos costados del embrión. La cornea, cristalino y retina se encuentran bien formados haciendo que el embrión reaccione ante estímulos de luz muy fuertes y directos. La epidermis de la cabeza se comienza a transparentar y los bordes papilares de la boca se amplían. Aparece una pigmentación producida por los lipóforos que causa una coloración amarilla-naranja a lo largo de su parte cefálica, y otra por melanóforos observándose puntos negros hacia su parte caudal. Además se observa claramente el corazón junto con su latido cardiaco, y debido a la translucidez que cada vez se hace mayor en la parte ventral del embrión se comienzan a observar algunas asas intestinales. El tamaño promedio de su parte cefálica es 2.1mm y de su parte caudal es 4.86mm.



Figura 27. Vista dorsal.

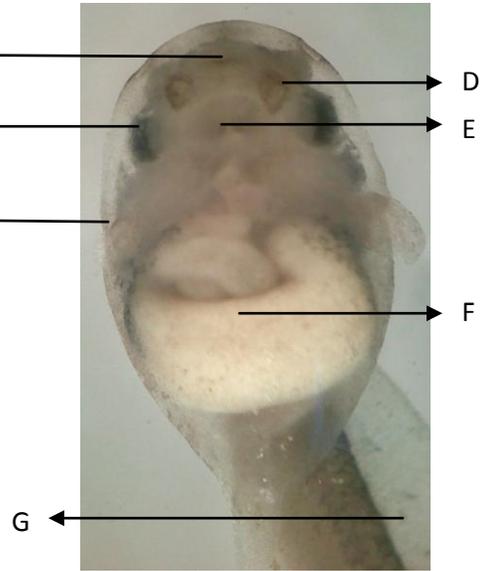


Figura 28. Vista ventral.

Estadio 23.

Cierre del opérculo derecho

Figuras 27 y 28. (A. Boca-Pico corneo; B. Ojo; C. Cierre del opérculo derecho; D. Suctores orales; E. Corazón; F. Sistema digestivo; G. Vasos sanguíneos).

Hora 116.20' - 132.00'.

“Va desde el cierre del opérculo derecho hasta opérculo completo”.

El pliegue opercular del lado derecho crece cubriendo la branquia de este lado del embrión, a la vez que se observa internamente por este lado del individuo un flujo de corpúsculos a través de vasos sanguíneos a la altura del cierre del opérculo, que pasan por el ojo (en observaciones in vivo), el cual adquirió una pigmentación amarilla (puntos) a su alrededor por la acción de los iridoforos. Presenta un movimiento continuo y rápido de la boca, que es rodeada por bordes papilares, teniendo un grado de diferenciación mayor que en los tres estadios anteriores. En la región media de la boca se ha desarrollado el pico corneo, presentando una pigmentación negra. La parte superior de la boca se sobrepone a la parte inferior.

Presenta una gran cantidad de pigmentos en la parte cefálica dorso-lateral hasta la parte media ventral. Además en el pliegue de la aleta dorsal se hacen evidentes una gran cantidad de vasos sanguíneos, permitiendo apreciar de una forma más clara la circulación caudal en esta parte del embrión. Promedio parte cefálica es 2mm y parte caudal 6.2mm.

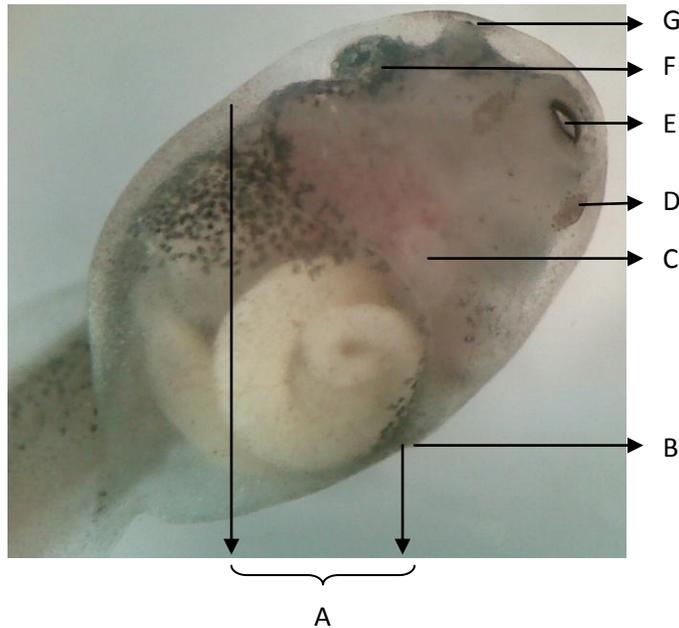


Figura 29. Vista dorsal.

Estadio 24.

Cierre del opérculo completo

Figura 29. (A. Cierre de los dos costados operculares; B. Sifón; C. Corazón; D. Suctores orales; E. Pico corneo; F. Ojos; G. Placodas olfatorias).

Hora 132.00'.

“Comprende desde que se inicia el cierre del opérculo izquierdo hasta el fin del mismo formando el sifón”

Se caracteriza por continuar el crecimiento del pliegue opercular sobre la branquia izquierda causando una reducción entre el espacio donde se encuentra la branquia y el medio exterior, hasta que finalmente se cierra formando un orificio denominado sifón que se ubica del mismo lado.

Se observa un movimiento de la boca y corazón muy acelerado, así como un mayor tamaño de los bordes papilares y mucho mas pigmentado el pico corneo. Tanto la parte caudal que incluye los pliegues de la aleta dorsal y ventral como la parte cefálica se encuentran totalmente transparentes facilitando la observación de los diferentes órganos que están en el interior y han

sido mencionados en los estadios anteriores tales como corazón, asas intestinales, estomago, vasos sanguíneos entre otros. El cuerpo del embrión continua manteniendo pigmentos a los largo del mismo lateral y ventralmente. El tamaño promedio de su parte cefálica es 1.9mm y parte caudal 7.4mm.

10. Tabla 1. Desarrollo embrionario de la rana sabanera *Dendropsophus labialis* a una temperatura de 29° C.

Numero del estadio	Nombre del estadio	Tiempo entre cada estadio	Edad total en horas	Tamaño promedio del embrión. mm
1	Oocito sin fertilizar		0.00'	1.32
2	Oocito fertilizado	0.4'	0.4'	1.44
8	Blástula media	4.03'	4.07'	1.68
9	Blástula tardía	2.17'	6.20'	1.72
10	Gástrula temprana	4.00'	10.20'	1.9
11	Gástrula media	6.10'	16.30'	1.94
12	Gástrula tardía	7.07'	23.37'	1.98
13	Placa neural	1.33'	25.10'	2.02
14	Pliegue neural	1.55'	27.05'	2.04
15	Tubo neural	1.15'	28.20'	2.6
16	Botón caudal	3.00'	31.20'	3.34
17	Contracción muscular	11.00'	42.20'	5
18	Latido cardiaco	6.25'	48.45'	5.1
19	Circulación branquial	6.35'	55.20'	5.24
20	Apertura de boca	17.45'	73.05'	5.9
21	Circulación caudal	19.55'	93.00'	6.92
22	Pliegue opercular	9.30'	102.30'	6.96
23	Cierre del opérculo derecho	13.50'	116.20'	8.2
24	Cierre del opérculo completo	15.40'	132.00'	9.3

11. Discusión

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se puede afirmar que el desarrollo embrionario de *Dendropsophus labialis* (Peters, 1863), en términos generales sigue el patrón descrito para oocitos heterolecíticos, con una segmentación holoblástica total desigual. Lo cual quiere decir que este tipo de individuos posee en sus oocitos una cantidad de vitelo media, siendo mucho más concentrada en el casquete vegetativo que en el casquete animal, donde se encuentra situado su núcleo. La división en el oocito será completa originando células de diferente tamaño (Guevara, 1981). Según Guevara (1981), debido a la densidad que tiene el vitelo en este tipo de individuos; esto ocasionará que se retarden un poco la formación de los planos de división (clivajes).

Lo contrario sucede en individuos como aves, reptiles y peces, que se caracterizan por tener oocitos de tipo telolecíticos, donde el vitelo se encuentra totalmente distribuido y concentrado en su casquete vegetativo, la segmentación es meroblástica discoidal, dividiéndose solo el casquete animal y conllevando a la formación de un disco para dar posteriormente el inicio a la siguiente etapa del desarrollo embrionario (Guevara, 1997).

Por otro lado, la tabla de desarrollo embrionario pre-metamórfico realizada en fases normales para la rana sabanera *Dendropsophus labialis* (Peters, 1863), fue comparada con otras tablas de desarrollo, realizadas para otras especies de anfibios, en las que se tuvo en cuenta principalmente las características morfológicas macroscópicas de distintos estadios involucrados en el desarrollo embrionario y centrándose particularmente en los estadios de apertura de boca, circulación caudal, pliegue opercular, cierre opérculo derecho y opérculo completo (Guevara, 1981).

Las características macroscópicas seleccionadas son fáciles de analizar, por lo que se pueden comparar entre las distintas especies, ya que se tiene con exactitud el tiempo y secuencia de aparición de cada una en las respectivas tablas; cuantificando las características macroscópicas

del desarrollo embrionario pre-metamórfico de *Dendropsophus labialis* (Peters, 1863) y siendo de gran importancia para investigaciones futuras.

Las especies que se tuvieron en cuenta para realizar las comparaciones mencionadas anteriormente son *Hyla labialis* (Guevara, 1981), *Hyla arborea* (Sayim & Kaya, 2008), *Spicospina flammocaerulea* (Dziminsky & Anstis, 2004), *Heleioporus eyrei* (Packer, 1966), *Colostethus machalilla* (Del Pino *et al* 2004), y la tabla realizada por Kenneth Gosner (1960); utilizada en muchos trabajos realizados en esta área como modelo a seguir para la identificación de embriones en anuros. Las tablas de las especies variaron en el número de estadios pre-metamórficos, lo que comprende desde el momento en que el oocito es fertilizado hasta el cierre del opérculo (Guevara, 1981).

Para el caso de *Hyla labialis* (Guevara, 1981), describió el desarrollo total pre-metamórfico en 24 estadios; el mismo número de estadios que se describen en la presente tabla. Por el contrario para Gosner (1960), *Hyla arborea* (Sayim & Kaya, 2008), *Colostethus machalilla* (Del Pino *et al* 2004) y *Heleioporus eyrei* (Packer, 1966), describen este mismo desarrollo en 25 estadios, difiriendo de la especie *Spicospina flammocaerulea* (Dziminsky & Anstis, 2004), descrita en 27 estadios de desarrollo embrionario, lo cual demuestra lo dicho por Balinsky (1983), que hace referencia a que las características macroscópicas para la selección de cada estadio, dependen del criterio y decisión del investigador.

Así mismo se tuvo en cuenta la temperatura y el tiempo en el que fue realizada cada una de las tablas de desarrollo; acorde a lo dicho, la temperatura y tiempo en que se realizó la tabla para *H. labialis* fue a 15° C con un tiempo total de 265 horas; para *H. arborea* fue a 21° C y un tiempo de 211 horas y 30 minutos; en el caso de *S. flammocaerulea* se realizó el estudio a una temperatura promedio de 27° C, para la especie *H. eyrei* fue a una temperatura de 21° C (no se obtuvo el tiempo total) y para *C. machalilla* fue entre 18-23° C, y un tiempo de 480 horas (20 días) para alcanzar la totalidad de su desarrollo embrionario pre-metamórfico. Es así como la temperatura se considera un factor abiótico de vital importancia cuando se realizan investigaciones de tipo embrionario (Rueda-Almonacid *et al* 2004), por lo que un aumento o

disminución en la misma se verá reflejado en la aceleración o retraso del crecimiento y desarrollo embrionario del individuo. Bajas temperaturas retardan la diferenciación, es así, como aquellos individuos que crecen en estas condiciones presentan periodos de desarrollo más prolongados que individuos que se desarrollan a temperaturas más elevadas (Duellman & Trueb 1994; Álvarez & Nicieza 2002). De acuerdo a lo anterior es posible explicar las diferencias obtenidas en el tiempo total de desarrollo respecto a la temperatura, si se compara la presente investigación con el estudio hecho a *Hyla labialis* por Guevara (1981), ya que se redujo casi a la mitad del tiempo empleado por Guevara, con un total de 132 horas a una temperatura de 29° C alcanzando el cierre del operculo completo (desarrollo pre-metamórfico completo), y a su vez corroborando que al haber un incremento de la temperatura, se acelerará el desarrollo embrionario del individuo.

Si se observa detenidamente el tiempo total de desarrollo de cada una de las especies mencionadas con anterioridad, se notará que en las tablas realizadas a temperaturas por encima de los 20° C, los embriones alcanzaron su desarrollo pre-metamórfico con mayor brevedad que cuando la temperatura era inferior a este valor; difiriendo únicamente la tabla hecha para la especie *C. machalilla*, que presento un tiempo total de 480 horas (20 días) y una variación de la temperatura entre 18-23° C, esta diferencia posiblemente se produjo ya que la temperatura no fue constante desde el inicio hasta la culminación del estudio.

En el presente estudio, como características macroscópicas relevantes se describió en el estadio que corresponde a la apertura de boca (estadio 20), una invaginación (orificio profundo) hacia el centro de la parte cefálica rostral que diferenció la boca del embrión y a su vez un leve abultamiento a su alrededor que diferenció los bordes papilares. También se observó un gran crecimiento branquial que facilitó apreciar de forma más clara como es el flujo de corpúsculos sanguíneos a través de las branquias (in vivo) y a su vez una diferenciación clara de ambos pliegues de las aletas dorsal y ventral. Se diferencia externamente el ojo. Para *H. labialis*, Guevara (1981), aunque en el mismo número de estadio, describe solamente la apertura de la boca como única característica del embrión en esta fase de desarrollo, con una edad de 142.50', diferenciándose a su vez de la edad alcanzada por el embrión en este estudio, la cual fue de

73.05'. Si se compara con los otros estudios como el hecho por Gosner (1960) y *H. arbórea* (Sayim & Kaya, 2008), este estadio de apertura de boca no es descrito literalmente, y en su lugar describen la diferenciación de las vesículas ópticas y denominan este estadio como cornea transparente en estadios 21 y 20 respectivamente. Para *S. flammocaerulea* (Dziminsky & Anstis, 2004), *H. eyrei* (Packer, 1966), aunque corroboran lo mencionado por los dos autores citados anteriormente, sus estudios se diferencian, ya que describen estas características, en números de estadios completamente diferentes pero ratifican al igual que en el presente estudio un gran crecimiento branquial y diferenciación del ojo. Estadio 21, 22 respectivamente (Packer, 1966; Dziminsky & Anstis, 2004).

El estadio 21 de este estudio corresponde a circulación caudal, en el que se describieron características que comprueban lo mencionado por Guevara (1981), donde se observan los vasos sanguíneos de un color oscuro tanto en la aleta dorsal como en la ventral identificándose fácilmente debido a que la epidermis de los dos pliegues de las aletas se ha transparentado totalmente. Por otra parte se observa a su vez la aparición de puntos de un color oscuro a lo largo del cuerpo y lateralmente denominados melanóforos (Gosner, 1960). Para *H. arbórea* (Sayim & Kaya, 2008), estas características del embrión son fácilmente observables solo hasta llegar al estadio 22 de su desarrollo que corresponde a circulación caudal al igual que este estudio. Mientras que para *S. flammocaerulea* (Dziminsky & Anstis, 2004), *H. eyrei* (Packer, 1966), *C. machalilla* (Del Pino *et al* 2004), aunque no especifican literalmente el nombre del estadio se podría inferir que incluyen esta circulación en estadios que denominan con otros nombres, incluyendo características de estadios de desarrollo más avanzados. Además se observo al final de este estadio la eclosión del embrión por medio de movimientos fuertes y prolongados; característica que también es mencionada por los autores Sayim & Kaya (2008), Dziminsky & Anstis (2004), como propia del estadio; pero que difiere de lo dicho Gosner (1960), el cual menciona que la eclosión del embrión se da entre los estadios 17-20 y de lo dicho por Packer (1966), que hace énfasis en que el embrión eclosiona en el estadio 18 que correspondería a latido cardiaco.

Con respecto al los estadios de pliegue opercular y cierre del opérculo derecho (estadios 22 y 23 del presente estudio), se describen características donde a la altura de las branquias se comienza a formar el pliegue opercular de forma sincrónica en ambos costados del embrión, que posteriormente cubre las dos branquias comenzando primero con la derecha. Aparece una pigmentación producida por los lipóforos que produce una coloración amarilla-naranja a lo largo de su parte cefálica, la cual se perderá cuando el embrión sea fijado (Gosner, 1960). Debido a la translucidez que cada vez se hace mayor en la parte ventral del embrión se comienzan a observar algunas asas intestinales, característica que también fue descrita por Guevara (1981) en su estudio con *H. labialis*, pero que a su vez se diferencia del actual estudio en cuanto a la descripción hecha de la coloración amarilla-naranja en su parte cefálica y en las mediciones hechas al embrión que de igual forma servirán como complemento del estudio.

El pliegue opercular del lado derecho crece cubriendo la branquia de este lado del embrión. En la región media de la boca se ha desarrollado el pico corneo, presentando una pigmentación negra. Además en el pliegue de la aleta dorsal se hacen muy evidentes una gran cantidad de vasos sanguíneos así como también es posible apreciar la circulación caudal en esta parte del embrión. Al comparar lo mencionado anteriormente con otros estudios se evidencio que en Guevara (1981), Packer (1966) y Del Pino *et al* (2004), no fue descrita la diferenciación del pico corneo, que según Gosner (1960), Sayim & Kaya (2008), Dziminsky & Anstis (2004), es una de las características macroscópicas más relevantes de este estadio, conocida también como disco oral, en donde se comenzará la diferenciación de las hileras de dientecillos que se desarrollaran gradualmente, así como las papilas orales (Gosner, 1960).

Finalmente y como ultimo estadio desarrollo pre-metamórfico en *Dendropsophus labialis* (Peters, 1863), se describe el opérculo completo que corresponde al estadio 24. El cual se caracteriza por continuar el crecimiento del pliegue opercular sobre la branquia izquierda causando una reducción entre el espacio donde se encuentra la branquia y el medio exterior, hasta que finalmente se cierra formando un orificio denominado sifón que se ubica del mismo lado; confirmando lo dicho por los autores Gosner (1960), Guevara (1981), Sayim & Kaya (2008), Packer (1966) y Del Pino *et al* (2004), los cuales describieron en sus estudios la

formación de este sifón al lado izquierdo del embrión. Sin embargo Gosner (1960), también menciona en su estudio que este orificio es posible observarlo de este lado en la mayoría de los renacuajos norte americanos; excepto en microhylidos donde este orificio o sifón se ubica ventralmente cerca al ano.

Se observa un movimiento de la boca y corazón muy acelerado (in vivo), así como un mayor tamaño de los bordes papilares y mucho mas pigmentado el pico corneo, característica que es tomada en cuenta únicamente por los autores Sayim & Kaya (2008). Tanto la parte caudal que incluye los pliegues de la aleta dorsal y ventral como la parte cefálica, se encuentran totalmente transparentes facilitando la observación de los diferentes órganos que están en el interior del embrión revalidando lo descrito por Guevara (1981), como otra característica importante de este estadio.

El desarrollo embrionario pre-metamórfico, junto con la aparición de las estructuras propias a cada estadio es muy similar en la mayoría de los anfibios, difiriendo únicamente en el tiempo de aparición, tamaño del embrión y según el criterio de algunos autores en el número y cantidad de estadios que se determinen entre otros.

12. Conclusiones

- Determinando secuencialmente el tiempo de desarrollo para cada estadio, se observó que a medida que el embrión tenía un grado mayor de diferenciación de sus estructuras, el tiempo entre estadios aumentaba, con respecto a otros estadios donde la diferenciación era menor.
- Para el desarrollo embrionario pre-metamórfico de *Dendropsophus labialis* (Peters, 1863), se describieron características que no fueron tenidas en cuenta en el primer estudio; complementando así el trabajo hecho por Guevara (1981) en *H. labialis*.
- El tiempo total de desarrollo embrionario pre-metamórfico de *Dendropsophus labialis* (Peters, 1863) a una temperatura de 29°C, es de ciento y treinta y dos horas desde que el oocito es fertilizado, hasta cierre de operculo.
- El patrón de desarrollo embrionario de *Dendropsophus labialis* (Peters, 1863), es similar al observado para las especies *Hyla arborea* (Sayim & Kaya, 2008), *Spicospina flammocaerulea* (Dziminsky & Anstis, 2004), *Heleioporus eyrei* (Packer, 1966) y *Colostethus machalilla* (Del Pino et al 2004).

13. Recomendaciones

Como estudios posteriores, se recomienda re-elaborar la tabla de desarrollo embrionario a nivel histológico de *Dendropsophus labialis* (Peters, 1863); y así poder complementar el estudio hecho por Palacios (1985) con algunas características propias a cada estadio, que posiblemente fueron omitidas por el autor. Y como fue hecho en el presente estudio compararla con otras tablas de desarrollo; y ser utilizada como modelo a seguir para futuros estudios.

14. Bibliografía

- Álvarez, D. Nicieza, A. 2002. Effects of temperature and food quality on anuran larval growth and metamorphosis. *Functional Ecology* 16: 640–648.
- Balinsky, B. 1983. Introducción a la Embriología. Animales Pluricelulares. Editorial Omega. Quinta edición. Barcelona. España. Pag 727.
- Bachmann, K. 1969. Temperature Adaptations of Amphibian Embryos. *The American Naturalist* 103 (930): 115 – 130.
- Brattstrom, B. 1963. A preliminary review of thermal requirements of amphibians. *Ecology* 44: 238–255 p. En Álvarez, D. & A. G. Nicieza. 2002. Effects of temperature and food quality on anuran larval growth and metamorphosis. *Functional Ecology* 16: 640–648.
- Chipman, A. 2002. Variation, plasticity and modularity in anuran development. *Zoology* 105: 80– 99 p.
- Del pino, E. Ávila, M. Pérez, O. Benítez, M. Alarcón, I. Noboa, V. Moya, I. 2004. Development of the dendrobatid frog *Colostethus machalilla*. *Int. J. Dev. Biol.* 48: 663-670 pp.
- Dziminsky, M. Anstis, M. 2004. Embryonic and larval development of the sunset frog *Spicospina flammocaerulea* (Anura: Myobatrachidae), from Southwestern Australia. Pp 896-609.
- Duellman, W. Trueb, L. 1994. *Biology of amphibians*. New York, McGraw-Hill, 670 p.
- Eakin, W. 1938. Grow and reabsorption phenomena in anuran metamorphosis. I. *Physiol. Zool.* 5: 275 – 300 p. En. Guevara, E. 1981. Tabla de desarrollo de *Hyla labialis*. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Bogotá.
- Emmet & Allen. 1919. Nutritional Studies on the grow of frog larvae (*Rana pipiens*) J. *Biol. Chem.* 38: 325 – 344p. En. Guevara, E. 1981. Tabla de desarrollo de *Hyla labialis*. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Bogotá.

- Faivovich, J. Haddad, P. Frost, D. Campbell, J. Wheeler, W. 2005. Systematic Review of The Frog Family Hylidae, With Special Reference To Hylinae: Phylogenetic Analysis And Taxonomic Revision. Bulletin of the American Museum of Natural History: 240 p.
- Gerhart, J. Black, S. Scharf, R. Gimlich, J. Vincent, M. Danilchik, B. Rowing. Roberts, J. 1986. Amphibian Early Development. Research supports a stepwise view of amphibian development in which each stage builds on the previous one. Vol 36. No 8.
- Gilbert, S. 2005. Biología del Desarrollo. Editorial Médica Panamericana. Séptima edición. Pág 242-246,330-334; 376.
- Gosner, K. 1960. A Simplified Table for Staging Anuran Embryos and Larvae with Notes on Identification. Herpetologica, 16 (3): 183-190 pp.
- Gosner, K. Rossman, D. 1960. Eggs and Larval Development of the Treefrogs *Hyla crucifer* and *Hyla ocularis*. Herpetologica. 16 (4): 225-232 pp.
- Guevara, E. 1997. Estudio embrionario y larval, macroscopico e histologico de *Betta Splendens* (Regan, 1909). Biologa. Tesis de Maestria. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. Departamento de Biología. Laboratorio de Biología del Desarrollo. Bogotá. 84 pp.
- Guevara, E. 1981. Tabla de Desarrollo Embrionario de *Hyla Labialis*. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Biología. Bogotá, Colombia. Pag 2-21.
- Hertwig, O. 1898. Arch. Mikrosk. Anat. 51. 319 p. En Guevara, E. 1982. Tabla de desarrollo de *Hyla labialis*. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Bogotá.
- Hoyos, J. 1991. *Hyla labialis* del Parque Nacional Natural Chingaza. Cuadernos Divulgados. Bogotá- Colombia. N 22.
- Jorquera, B. Izquierdo, L. 1964. Tabla de desarrollo normal de *Calyptocephalella gavi*. Biologica 36: 43 – 53p. En. Guevara, E. 1981. Tabla de desarrollo de *Hyla labialis*. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Bogotá.

- Ladino, E. 1983. Tabla de desarrollo del estado metamórfico en *Hyla labialis*. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Bogotá.
- Langman, S. 2007. Embriología medica con orientación clínica. Editorial Médica Panamericana. Décima Edición. Pag 41.
- Lynch, J. Renjifo, J. 2001. Guía de anfibios y reptiles de Bogotá y sus alrededores. Alcaldía Mayor de Bogotá. Departamento Técnico Administrativo del Medio Ambiente (DAMA). Bogotá, Colombia.
- Packer, W.C. 1966. Embryonic and Larval Development of *Heleioporus eyrei* (Amphibia: Leptodactylidae). Copeia. 1966 (1): 92-97 p.
- Palacios, M. 1985. Tabla de desarrollo normal a nivel histológico del estado embrionario en *Hyla labialis*. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Bogotá.
- Peters, W. 1863. Uber Verschiedene Batrachien Momentlich Uber Die Original Exemplare der Von Shneider Und Weigman Beschrieben. Arten Des Zoologischer Muscum zu Berlin monasb akad wiss. Berlin. Alemania . pag 445-471.
- Purves, W. Sadava, D. Orians, G. Heller, H. 2004. Life: The Science of Biology. Seventh edition. Sinauer Associatle, inc. USA. pag 700.
- Pollister, A. Moore, A. 1937. Tables of normal development of *Rana sylvatica*. Anat. Rec. 68: 489 – 496p. En. Guevara, E. 1981. Tabla de desarrollo de *Hyla labialis*. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Bogotá.
- Rueda-Almonacid, J. Lynch, J. Amézquita, A. 2004. Libro Rojo de los Anfibios de Colombia. Conservación Internacional. Colombia. 384 p.
- Ruiz, P. Ardila, D. Lynch. 1996. Lista actualizada de la fauna Amphibia de Colombia Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales 20(77):365-415.

- Rugh, R. 1934. Induced Ovulation and Artificial Fertilization in the Frog. *Biological Bulletin* 66 (1): 22 – 29.
- Sayim, F. Kaya, U. 2008. Embryonic development of the tree frog, *Hyla arborea*. *Versita*. 63(4): 588 – 593 pp.
- Shumway, W. 1940. Stages in the normal development of *Rana pipens*. I. External Form. *Anat. Rec.* 78: 139 – 144p. En. Guevara, E. 1981. Tabla de desarrollo de *Hyla labialis*. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Bogotá.
- Taylor, A. Kollros, J. 1946. Stages in the normal development of *Rana pipens* larvae. *Anat. Rec.* 94: 7 – 23p. En. Guevara, E. 1981. Tabla de desarrollo de *Hyla labialis*. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Bogotá.
- Tschernoffs, N. 1907. Embryonalentwicklung der hinteren extremitaten des Frosches. *Ant. Anz.* 30: 593 – 612 p. En. Guevara, E. 1981. Tabla de desarrollo de *Hyla labialis*. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Bogotá.
- IUCN RED LIST. 2008. Sensibilidad de las especies a los Impactos de Cambio Climático.
- Weiz, P. 1945. The normal stages in the development of the South African clawed toad, *Xenopus leavis*. *Anat. Rec.* 93: 161 – 169p. En. Guevara, E. 1981. Tabla de desarrollo de *Hyla labialis*. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Bogotá.
- Werneburg, I. 2009. A Standard System to Study Vertebrate Embryos. *Palaontologisches Museum und Institut der Universität Zurich, Zurich, Switzerland.*

