



Tecnociencia, Vol. 23, N°1: 143- 159
Enero-Junio 2021

DESARROLLO EMBRIONARIO Y PRE-METAMÓRFICO DE LA RANA TUNGARA *Engystomops pustulosus* (FAMILIA LEIUPERIDAE) EN CAUTIVERIO.

Nelson Guevara A.^{1,2} 

¹Universidad de Panamá, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología, Escuela de Biología. ²Grupo Biológico Biomundi.
e-mail: bio.mundi18@gmail.com ;

RESUMEN

Se presenta la descripción del desarrollo embrionario y pre-metamórfico en *Engystomops pustulosus* (rana tungara), por medio de fotografías diarias tomando como base de las descripciones los cambios morfológicos. El estudio se llevó a cabo con individuos en cautiverio en la Universidad de Panamá. Los individuos de *E. pustulosus* completaron su desarrollo en periodo aproximado de 20 días.

PALABRAS CLAVE

Anfibios, desarrollo embrionario, pre-metamórfico, *Engystomops pustulosus*, metamorfosis.

EMBRYONIC AND PRE-METAMORPHIC DEVELOPMENT OF THE FROG *Engystomops pustulosus* (FAMILY LEIUPERIDAE) IN CAPTIVITY.

ABSTRACT

The description of the embryonic and pre-metamorphic development in *Engystomops pustulosus* (Tungara frog) is presented by means of daily photographs, taking as a basis for the descriptions the morphological changes. The study was carried out with individuals in captivity at the University of Panama. The individuals of *E. pustulosus* completed their development in approximately 20 days.

KEY WORDS

Amphibians, Embryonic development, Pre-metamorphic, *Engystomops pustulosus*, Metamorphosis.

INTRODUCCIÓN

El estudio de la ontogenia nos puede ayudar a comprender el desarrollo del curso en la evolución de varios grupos, considerando que esta nos permite interpretar de una forma u otra la historia de la biología (Torrey, 1978). Para esto, la embriología se encarga del estudio del desarrollo de los organismos desde las células gaméticas y ovocitos, pasando por el proceso de fecundación hasta el nacimiento de los organismos (Valdés *et al.*, 2012), lo cual ha tomado suma relevancia.

Los anfibios durante mucho tiempo han conformado excelentes modelos para el estudio de la Biología del Desarrollo (Andrade, 2015). Estos poseen características y ventajas a nivel embrionario que permiten la observación y manipulación de los embriones, debido al tamaño del huevo, la facilidad de manipulación y la gran cantidad de huevos que se logran obtener en cautiverio (Browder & Iten, 1998). Estas ventajas han permitido comparar el desarrollo embrionario en diferentes especies de anfibios (Del Pino *et al.*, 2007). Debido a sus cualidades reproductivas, los anfibios precisan volver al agua para reproducirse, permitiendo observar los huevos de diferentes especies en lugares como ríos, charcas, balsas o cerca de cualquier cuerpo de agua, esto permite a su vez la facilidad de ser conservados en acuarios o vivarios caseros,

tomando en cuenta los requerimientos fundamentales estos logran ser conservados, estudiados y reconocidos en cualquier fase de su desarrollo (Amestoy, 1958). El tiempo de desarrollo de los embriones es variable entre cada especie (Bernal y Lynch, 2009).

La rana túngara *Engystomops*

tomops pustulosus Cope, 1984 (Familia Leiuperidae) es una especie común de aproximadamente 30 mm de largo con una piel de coloración oscura y pustulosa (AmphibiaWeb 2019) de hábito nocturno y terrestre encontrada en bosques, sabanas, pastizales, áreas abiertas y urbanas (Köhler, 2010). Coloca sus huevos generalmente en zonas bajas o en el suelo sobre cuerpos de agua en nidos de espuma, la cual ayuda a evitar la desecación en temporada de lluvia (Ryan, 1985). Estos nidos flotan sobre el agua de forma temporal permitiendo a los renacuajos desarrollarse sobre la misma, protegiéndolos de depredadores (Ryan, 1985). Estos nidos son generalmente visibles, lo que permite su observación y colecta para diversos estudios (Davidson & Hough, 1969).

La especie *E.pustulosus* posee una amplia gama de estudios, en los cuales podemos mencionar los trabajos realizados por Davidson & Hough (1969), Ryan (1985) y Ron (*et al.*, 2006). A pesar de esto, la gran mayoría de la investigación embriológica en anfibios se centra en un solo género de ranas, *Xenopus* (Romero *et al.*, 2010). Por ende, el presente estudio tiene como objetivo contribuir en los conocimientos del desarrollo embrionario y pre-metamórfico de la especie *Engystomops pustulosus* en cautiverio, mediante observaciones en los cambios morfológicos diarios ocurridos en los individuos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El 15 mayo del 2018 a las 7:00 horas, recolectamos embriones de rana túngara *Engystomops pustulosus* en el sendero Camino de Plantaciones del Parque Nacional Soberanía (9°04'22 N, 79°39'20 W), Panamá, los cuales fueron llevados a los laboratorios de la Universidad de Panamá, Facultad de Ciencias Naturales; Exactas y Tecnología, Escuela de Biología (Fig.1).



Fig. 1. Muestra de masa de huevos de la rana túngara- *Engystomops pustulosus*, en el sendero Camino de Plantaciones, Parque Nacional Soberanía. Muestras encontradas entre los charcos y hojarasca húmeda de la zona.

Trabajo en laboratorio y toma de datos

Los embriones junto a la masa espumosa fueron colocados en recipientes con agua tomada del mismo lugar de colecta, para evitar sesgo entre los huevos estudiados debido al periodo de fecundación y gestación entre éstos. Se trabajó durante todo el estudio con la misma masa de huevos, colectada de un solo lugar (la masa se colectó solamente de un depósito de agua, conocido comúnmente como charco (ubicado en el sendero)).

Los huevos estudiados fueron escogidos al azar dentro de la masa espumosa, tomados con un gotero y colocados en tubos de ensayo con formalina al 4% para su fijación, se utilizaron pinzas para los individuos en etapas más avanzadas; los periodos o etapas de crecimientos fueron observados bajo un estereoscopio (marca Olympus, modelo SZ51). Se anotaron los cambios morfológicos que iban surgiendo entre cada día, las observaciones se hacían cada 24 horas aproximadamente. Durante cada observación se tomó la temperatura del laboratorio, cada tubo de ensayo fue rotulado con la fecha y hora de análisis para su debido control. Finalmente, se utilizaron las tablas de Waldo Shumway (1940) y Kenneth L. Gosner (1960) para realizar la comparación de desarrollo de los individuos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con temperatura promedio de 25°C el desarrollo de los individuos de *Engystomops pustulosus* se completó aproximadamente a los 20 días, desde su etapa de huevo hasta la etapa final de su metamorfosis. Las etapas y observaciones se presentan a continuación con sus respectivas figuras:

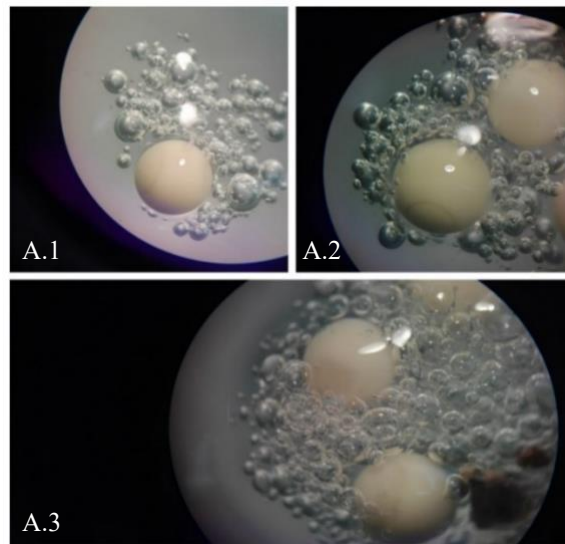


Fig. 2. Día 1: A.1: Huevos dentro del nido de espuma. A.2: Observación de media gástrula. A.3: Se observan los polos animal y vegetal desarrollados.

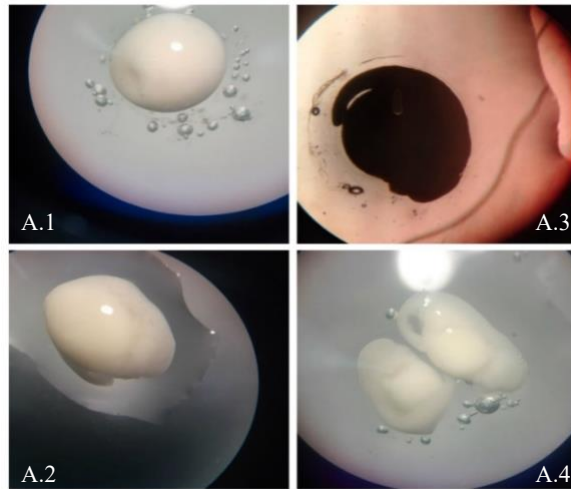


Fig.3. Día 2: Desarrollo de los embriones hasta la aparición de la cola.
 A.1: Observación de la membrana vitelina y pliegues neurales. A.2: Etapa de brote de la cola. A.3: Embrión en etapa de repuesta muscular. A.4: Vista dorsal del embrión, comienzo del desarrollo y diferenciación de la cola.

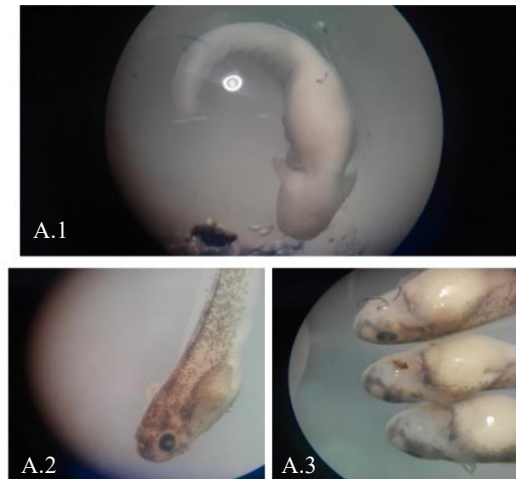


Fig.4. Día 3: A.1: Cola diferenciada presenta un mayor desarrollo, Respuesta muscular, cornea transparente. Día 4: A.2: Individuos en la formación de las branquias externas. El tronco adquirió algo de pigmento oscuro, comienzo del desarrollo de la zona ocular. A.3: Mayor aumento de la región de la cabeza desde el embrión en las branquias externas empiezan su desarrollo. Gradualmente aumentan de tamaño.

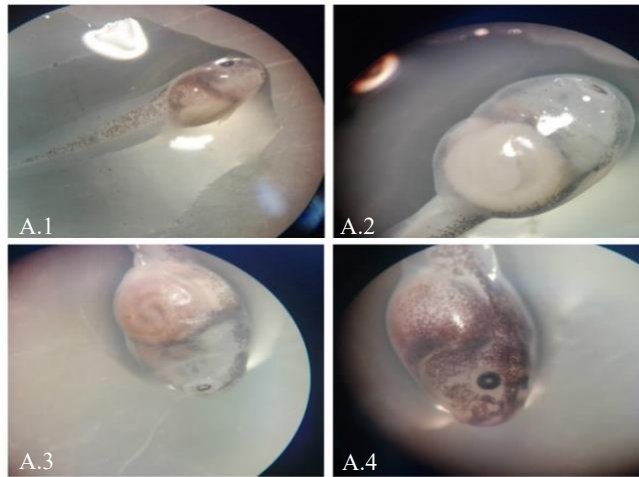


Fig.5. Día 5: A.1: Branquias más desarrolladas se observan de mayor tamaño. A.2: Se observan latidos del corazón, abertura oral, intestino en formación. Día 6: A.3: Se observa el intestino en forma de espiral. A.4: La coloración de la piel se torna más oscura, las branquias son más notables, mayor diferenciación de la zona ocular.

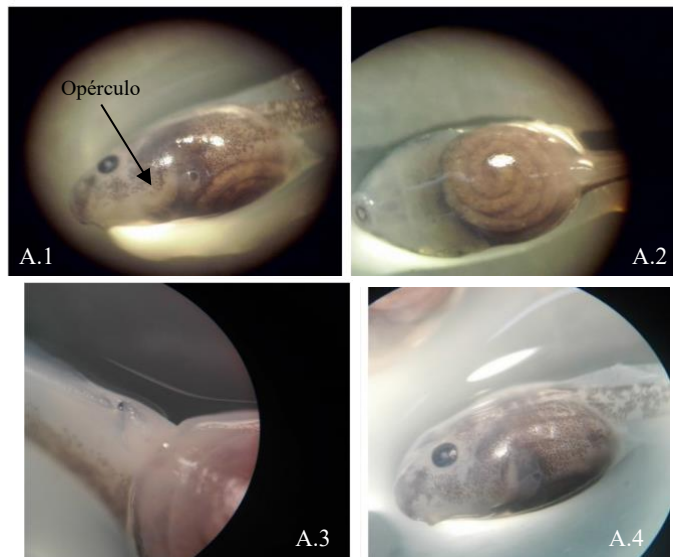


Fig.6. Día 7: A.1: Opérculo formado, el cuerpo empieza la división en dos regiones anteriores y posteriores, cola desarrollada. A.2: Intestino completo en forma de espiral, zona ocular de mayor tamaño. Día 8: A.3: Se presenta la abertura anal. A.4: desarrollo de musculatura en la parte dorsal, mayor diferenciación de la cola con el resto del cuerpo.

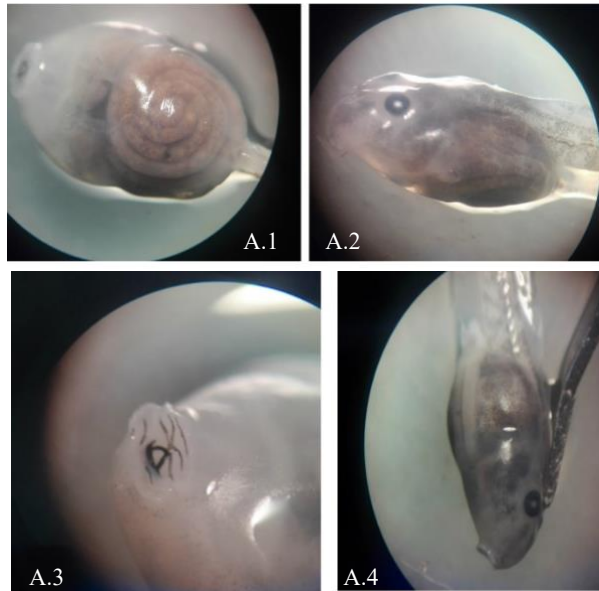


Fig.7. Días 9, 10 y 11: A.1: Musculatura en la parte dorsal y ventral marcada. Ojos más desarrollados, diferenciación de las partes del cuerpo en progreso, se observa claramente el intestino en forma de espiral. A.2: Crecimiento de la musculatura lateral. A.3: Crecimiento y apertura de la cavidad oral. A.4: Zonas del cuerpo mejor definidas, zona ocular en progresivo desarrollo, cola desarrollada de gran tamaño, se observa pequeños indicios del comienzo del desarrollo de la columna.





Fig. 8. Día 12: A.1: Desarrollo y crecimiento de la columna, se presenta el inicio de la metamorfosis, las extremidades posteriores empiezan su desarrollo, se observa pequeñas protuberancias en la parte posterior del cuerpo correspondiente a las extremidades, la boca presenta dientes, y músculos en la parte dorsal de la columna. Día 13: A.2: Marcado desarrollo de las extremidades de las posteriores, dedos presentes. A.3: Ano más desarrollado, área dorsal y ventral presentan más desarrollado, no se notan los intestinos u otros órganos.

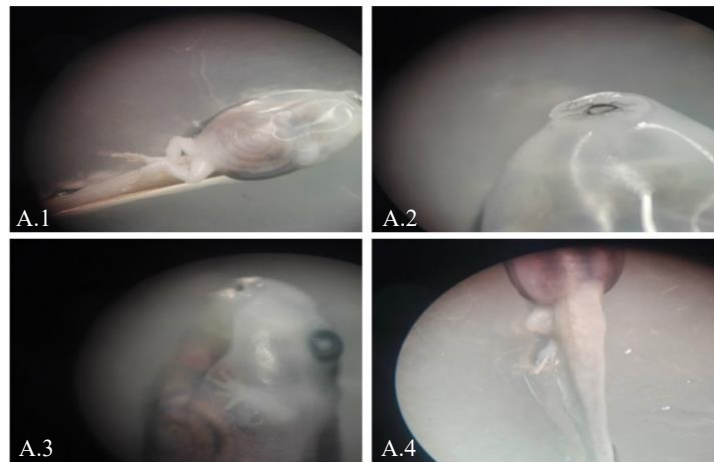


Fig.9. Días 14 y 15: A.1: Continuo crecimiento de las extremidades posteriores. A.2: Formación de la cavidad oral parcialmente completa. A.3: Observación y desarrollo de las extremidades anteriores, visibles a través de la piel, ojos más desarrollados Se puede diferenciar las partes del cuerpo (cabeza, zona anterior y posterior). Branquias poco notables. A.4: Cola de mayor grosor, se nota pequeña línea divisora entre el

cuerpo y la cola, Probablemente punto de separación durante la metamorfosis.

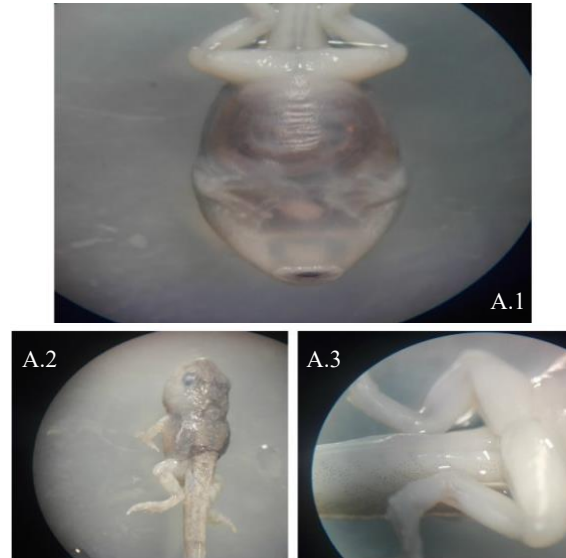


Fig.10. Días 16 y 17 A.1: Continuo crecimiento de las extremidades posteriores y anteriores, se pueden observar los dedos. Diferenciación de la cabeza con el resto del cuerpo, órganos pocos visibles, se puede notar el corazón latiendo, las branquias ya no se observan. A.2: Piel totalmente gruesa, ojos desarrollados, Se observa una metamorfosis avanzada, pequeños individuos con cola, línea divisora entre el cuerpo y la cola. La piel en el dorso se torna con contextura verrugosa. Reducción de la cola. A.3: Ano desarrollado.

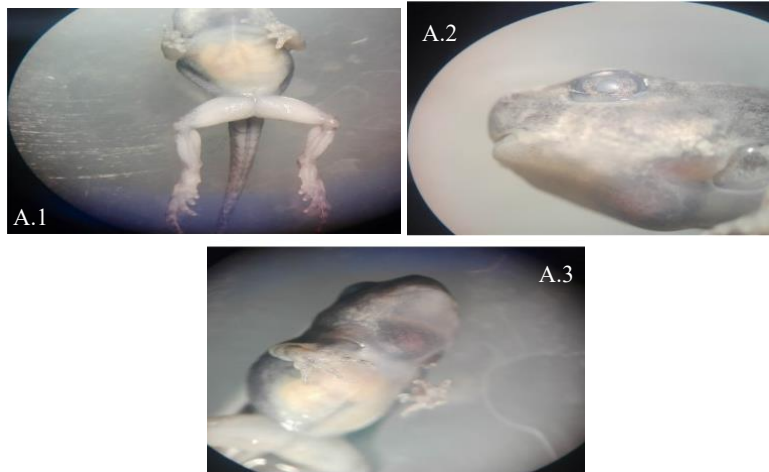


Fig.11. Día 18: A.1: Renacuajo en estadio final. A.2: Ojo totalmente diferenciado. Se Presentan manchas en la parte dorsal, cabeza completa. A.3: Desarrollo de musculatura en extremidades posteriores, extremidades anteriores completas. Diferenciación completa del cuerpo. Órganos no visibles.

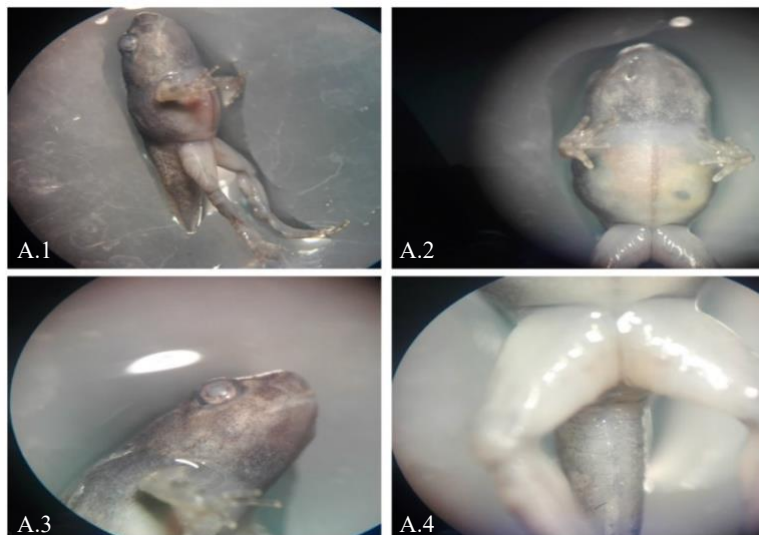


Fig.12. Día 19: A.1: Cola muy reducida. Notable coloración en el cuerpo y verrugosidad en la piel, algunos individuos demostraron pérdida de la cola. A.2: Extremidades y musculatura completamente desarrolladas. A.3: Diferenciación completa de ojos y boca. A.4: Notable gastrocnemio en las patas posteriores.



Fig.13. Día 20: Perdida de la cola. Metamorfosis completa. Cuerpo diferenciado, pequeños individuos de *Engystomops pustulosus* en movimiento. Día 20: liberación de individuos desarrollados. Foto: Astrid Lisondro.

El desarrollo completo de la mayoría de los individuos de *E. pustulosus* ocurrió aproximadamente a los 20 días, periodo un poco corto para lo establecido en esta especie, según Dalgetty & Kennedy (2010) el desarrollo y metamorfosis ocurre entre 4 y 6 semanas con un promedio de 25 a 28 días. Esta diferencia en cuanto al menor tiempo de desarrollo puede deberse a las condiciones presentes en el laboratorio, al no ser un espacio natural pudo ejercer una presión de supervivencia sobre los individuos, provocando el crecimiento de una manera más rápida, como mencionan Wilbur & Collins (1973) en especies como *E. pustulosus*, si las condiciones acuáticas son favorables para permitir un rápido crecimiento, los renacuajos podrían disminuir su desarrollo hasta metamorfearse a un tamaño más grande. Sin embargo, si las condiciones no son favorables, los renacuajos acelerarían su desarrollo y metamorfearse a un tamaño mínimo para continuar creciendo durante su etapa terrestre, esto con el fin de sobrevivir. Los renacuajos con un crecimiento rápido metamorfean en un menor tiempo disminuyendo la mortalidad acumulada (Alford & Richards, 1999).

De igual manera, aunque no se estableció el número de individuos estudiados debido a la gran cantidad de huevos que pueden poner por nido, de 80 a 450 huevos (Ospina y Bedoya, 2018), se observó que el desarrollo de todos los individuos no ocurría de manera igual, observando algunos individuos en diferentes etapas e incluso algunos sin poder desarrollarse por completo, probablemente por las condiciones dentro del recipiente donde habitaban, en espacios pequeños donde los niveles de oxígeno disuelto son menores y la excreciones de los renacuajos contaminan en mayor medida el agua, el desarrollo y crecimiento de estos disminuye (Montealegre *et al.*, 2013).

Etapas de crecimiento

El tiempo estimado del desarrollo y etapas observadas de los individuos pudo haber estado determinado por el periodo de fecundación de estos, según Del Pino (2010), los huevos de la rana túngara demoran aproximadamente 2 días en eclosionar, con los renacuajos entrando al agua subyacente. Sin embargo, Comparando lo observado en las muestras con la tabla de Shumway (1940), se logró determinar que estos se encontraban aproximadamente en el segundo estadio con una hora de vida, debido a la observación de los polos animal y vegetal en los huevos, la cual ocurre antes de la segmentación (Shumway, 1940).

Para las siguientes muestras observadas, se registra la formación de los pliegues neurales hasta aparecer las branquias y la repuesta muscular, donde los individuos habrían pasado aproximadamente por 18 estadios diferentes, donde también se llevó a cabo el proceso de neurulación, progresivamente desarrollándose y cerrando el tubo neural (Shumway, 1940). Según Gosrner (1960) el desarrollo de los órganos adhesivos (ventosas bucales) ocurre durante estas etapas. Sin embargo, la observación de la abertura oral se dio en los próximos días.

Durante las siguientes etapas se observa un corazón funcional emitiendo latidos y la formación del intestino en espiral, seguido de la aparición de cromatóforos en la piel de los renacuajos tornándose más oscura, con una cola muy diferenciada del resto del cuerpo, además de la aparición de un opérculo dividiendo el cuerpo en dos regiones, anterior y posterior.

En este momento según Shumway (1940) y Gosner (1960) los renacuajos han pasado aproximadamente por 25 estadios, alimentándose y nadando de forma libre preparándose para iniciar la metamorfosis. Lo cual concuerda con lo observado, registrando cambios como la reducción de cola y crecimiento de las extremidades.

Los últimos cambios notables como la apertura del ano, la visible musculatura dorsal, el desarrollo completo de las extremidades posteriores y anteriores, y formación de los dedos ocurre entre los estadios del 26 al 40, en los cuales se da el proceso de metamorfosis dando origen a individuo adulto (Gosner 1960). A pesar de que los resultados no mostraron prácticamente grandes diferencias en cuanto a las tablas de Shumway (1940) y Gosner (1960), pequeños cambios como el desarrollo de la abertura oral un día o horas después, puede deberse a factores como la fluctuación de los recursos, temperatura, oxígeno disponible, carga bacteriana y espacio de cada individuo dentro del recipiente, los cuales afectaran el desarrollo temprano o tardío de ciertas extremidades u órganos en los renacuajos (Rugh, 1934).

CONCLUSIÓN

El desarrollo y crecimiento de los renacuajos de anfibios como *Engystomops pustulosus* está directamente relacionado al espacio del habitan y a factores como la temperatura y competencia de este. Áreas con favorables condiciones permitirán un desarrollo lento pero adecuado, alcanzando etapas adultas de mayor tamaño, lo cual les permitirá a los individuos sobrevivir de mejor manera en su etapa terrestre.

Los renacuajos de *Engystomops pustulosus* pueden desarrollarse de manera independiente unos de otros a pesar de las condiciones del lugar, donde los individuos capaces de adaptarse o adaptar sus etapas de crecimiento y metamorfosis, tendrán mayor éxito de sobrevivir, reduciendo la mortalidad del grupo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecer al profesor Eduardo Valdés del Departamento de Fisiología y Comportamiento Animal de la Escuela de Biología de la Universidad de Panamá, por permitirme utilizar el laboratorio de Fisiología para dicho proyecto, además por brindar equipos durante la elaboración de este.

A la compañera Astrid Lisondro por el apoyo en la fotografía del individuo adulto de rana tungra *Engystomops pustulosus*.

REFERENCIAS

Alford, R., & Richards, S. 1999. The decline of amphibians worldwide: an applied ecology problem Annual Review of Ecology and Systematics, 30:133-165.

Amestoy, F. P. 1958. Huevos y larvas de anfibios. Munibe. Vol-10. Fascículo 4. Recuperado el 20 de mayo de 2020, de <http://www.aranzadi.eus/fileadmin/docs/Munibe/1958325344.pdf>.

AmphibiaWeb. 2019. *Engystomops pustulosus*: Túngara frog. University of California, Berkeley, CA, USA. Retrieved July 25, 2020, from <http://amphibiaweb.org/species/3414>.

Andrade, C.B. 2015. Desarrollo y somitogénesis de *Engystomops guayaco* (Anura: Leptodactylidae) desde el huevo fecundado hasta la eclosión del renacuajo. Tesis de Licenciatura de Biología. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Escuela de Ciencias Biológicas. Quito, Ecuador. 126 pp.

Bernal, H.M. y Lynch, D.J. 2009. Temperatura y tasas de desarrollo embrionario en anuros: relación con su modo reproductivo, microhábitat y distribución altitudinal. Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas. Vol.1, Núm.21: pags 20-30.

Browder, L., & Iten, L. 1998. Xenopus as a model system in developmental biology. Retrieved may 20, 2020, from <http://people.ucalgary.ca/~browder/frogsrus.html>.

Dalgetty, L., & Kennedy, M.W. 2010. Building a home from the frog's foam nest architecture Tungara and the three-phase construction process. *Journal list. Biol Lett.* Vol. 6. #3. Retrieved July 24, 2020, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2880057/>.

Davidson, E.H., & Hough, B.R. 1969. Synchronous oogenesis in *Engystomops pustulosus*, a neotropic anurane suitable for laboratory studies: location in the embryo of synthesized RNA in the lamp brush phase. *J Exp Zool.* 172:25–48.

Del Pino, E. M., Venegas-Ferrin, M., Romero-Carvajal, A., Montenegro-Larrea, P., Saenz-Ponce, N., Moya, I. M., Alarcón, I., Sudou, N., Yamamoto, S., & Taira, M. 2007. A comparative analysis of the frog's early development *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 104: 11882–11888.

Del Pino, E.M. 2010. La gastrulación en ranas con diversos modos de reproducción. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas.* Vol-31. Num 1 y 2.

Gosner, K. L. 1960. A simplified staging of Anuran embryos and larvae with notes on identification.

Köhler, G. 2010. *Amphibians of Central America.* Editorial Offenbach, Germany: Herpeton, c2011. Germany. 376 pp.

Montealegre, X.K., Karina, A. y Manuel, H.B. 2013. Efecto del tamaño del hábitat en la supervivencia, desarrollo y crecimiento en renacuajos de *Engystomops pustulosus* (Anura: Leuiperidae) y *Rhinella Humboldti* (Anura: Bufonidae). *Museu de Zoología da Universidad de Sao Paulo. Pap. Avulsos Zool. (São Paulo) vol.53 no.23.* Scielo. Recuperado el 24 de julio de 2020, de https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0031-10492013002300001&script=sci_arttext&tlng=es.

Ospina, A.M. y Bedoya, A.C. 2018. *Engystomops pustulosus* (Cope, 1864) rana túngara. *Catálogo de ranas y anfibios de Colombia.* Vol. 4 (1): 7-15 pp.

Romero, C.A., Sáenz, N.P., Venegas, M.F., Almeida, D.R., Lee, Ch., Bond, J., Ryan, M.J., Wallingford, J.B., & Del Pino, E.M. 2010. Embryogenesis and laboratory maintenance of foam nesting tungara frogs, genus *Engystomops* (= *Physalaemus*). United States National Library of Medicine. National Institute of Health. Retrieved July 15, 2020, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2934778/>.

Ron, S.R., Santos, J.C., & Cannatella, D.C. 2006. Phylogeny of the tungara frog genus *Engystomops* (= *Physalaemus pustulosus* species group; Anura: Leptodactylidae). *Mol Phylogenet Evol.* 39:392–403. Retrieved May 20, 2020, from <https://europepmc.org/article/med/16446105>.

Rugh, R. 1934. The space factor in the growth rate of caps. *Ecology* Vol. 15, No. 4 (Oct 1934). 407-411 pp.

Ryan, M.J. 1985. *The Túngara Frog: A Study on Sexual Selection and Communication*. University of Chicago Press, Chicago. 230 pp.

Shumway, W. 1940. Stages of normal frog development *Pipiens*. I. External Form. *Anat. Rec* 78: 139-144.

Torrey, T.W. 1978. *Morfogénesis de los vertebrados*. 3rd edn. Editorial Limusa. México. 576 pp.

Valdés, A., Hilda, P., Ramón, G. y Antonio, V. 2012. Embriología Humana. Premio en la instancia provincial del concurso premio anual de la salud 2012. Universidad de Ciencias Médicas. Santiago de Cuba. Cuba. 9 pp.

Wilbur, H., & Collins, J. 1973. Ecological aspects of amphibian metamorphosis. *Science*, 182(4119):1305-1324.

Recibido 25 de julio de 2020, aceptado 17 de agosto de 2020