

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA AMBIENTAL SOBRE EL DESARROLLO DE PLEURODEMA BIBRONI

Influence of environmental temperature on the development of *Pleurodema bibroni*.

L. IZQUIERDO y J. PEREDA

Departamento de Biología, Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Recibido para su publicación el 16 de Marzo de 1964.

RESUMEN

Se examinan las condiciones necesarias para obtener ovulación y fecundación fuera de temporada en *Pleurodema bibroni*, se presenta una tabla que comprende el desarrollo normal a 18°C desde el huevo virgen hasta la formación del sifón y se estudia el efecto de la temperatura ambiental sobre la velocidad de desarrollo y mortalidad en los diferentes estados.

INTRODUCCIÓN

Pleurodema bibroni Tschudi (1838), sub-familia Leptodactylinae, familia Bufonidae (Noble, 1), conocido vulgarmente en Chile como "sapito de cuatro ojos" por el aspecto que le prestan dos glándulas lumbaras, es una especie de Anuro, muy polimorfa, distribuida abundante y extensamente en el país desde Atacama hasta Aysén (2).

Este batracio es pequeño, fácil de mantener en el laboratorio y se presta para provocar su ovulación y la fecundación de los huevos en cualquier época del año. Los embriones son de pigmentación clara y se desarrollan con extraordinaria rapidez. Todo esto contribuye para que esta especie sea un material particularmente adecuado para la investigación y la enseñanza de la embriología.

En este trabajo se refieren como antecedentes las condiciones necesarias para obtener ovulación fuera de temporada, se presenta una tabla de su desarrollo normal, basada en caracteres externos fácilmente observables, la que comprende etapas que van desde el huevo virgen hasta el establecimiento del sifón, y se estudia el efecto de la temperatura sobre la velocidad de desarrollo y sobre la mortalidad en las diversas etapas.

PROCEDIMIENTO

Ovulación fuera de temporada.

Si bien el mecanismo de la ovulación en la clase Anfibios no está bien dilucidado, es

improbable que sea provocado por un aumento de la presión intrafolicular, pues en ellos no existe "liquor folliculi". Es posible que medie una acción enzimática (3 y 4) y que intervengan la ACTH y la cortisona (5). En todo caso, cualquiera que sea el mecanismo, la ovulación está mediada por hormonas de la hipófisis anterior (revisión en Asdell, 6). En efecto, la prueba directa, es decir la ovulación causada por implantación de hipófisis, fue obtenida por primera vez por Houssay, Giusti y Lazcano-González (7) en *Bufo marinus* y por Wolf (8) en *Rana pipiens*. Pronto se confirmó en otras especies de Anuros y de Urodelos (rev. en Creaser y Corbman, 9, y en Rugh, 10). En general, se consigue más fácilmente la ovulación administrando hipófisis o extractos hipofisarios de la propia especie, y resulta más difícil lograrla mientras mayor es la diferencia taxonómica entre el dador y el receptor. En los Anuros esta limitación es mayor que en los Urodelos, en los cuales puede obtenerse fácilmente ovulación mediante hormona de Mamíferos (9 y 11).

Se sabe que en los Anfibios las hormonas hipofisarias actúan directamente sobre el ovario, sin mediación de otros órganos y aún es posible provocar la ovulación haciendo actuar estas hormonas sobre el ovario aislado in vitro (12). Cuando se emplean LH y FSH de Mamíferos, es necesario combinarlas para obtener ovulación (11). Aunque estas fracciones no han sido aisladas en los Anfibios, puede suponerse que en ellos, como en otras clases, la LH actuaría sobre el ovario preparado por la FSH.

Los animales utilizados en nuestro estudio fueron colectados en las siguientes localidades de la Provincia de Santiago: Las Condes, Manquehue, Puente Alto, Peñalolén, Rungue y Til-Til. Hembras que pesaron seis o más gramos recibieron inyección intraperitoneal de hipófisis enteras recién obtenidas de animales de la misma especie, molidas en Ringer-Anfibio, en dosis espaciadas por menos de 24 horas para conseguir una acción adi-

tiva (13). La ovulación se obtiene dentro de las veinte horas que siguen a la última inyección que ha completado una dosis total eficaz.

El procedimiento indicado resulta más sencillo y eficaz que otro que consiste en coleccionar gran número de hipófisis en la época de actividad sexual normal, molerlas en agua destilada y liofilizarlas. Del liofilizado se preparan suspensiones de cantidades conocidas de hipófisis, las que se inyectan para provocar la ovulación. Nuestra experiencia muestra que la cantidad de hipófisis preparadas en esta forma que son necesarias para ocasionar ovulación es mayor que la de hipófisis frescas.

La cantidad de hipófisis de hembras (*) que debe administrarse en las diferentes épocas del año para obtener ovulación, deducida de los resultados obtenidos en 175 animales, se resume en la Tabla I.

No es posible saber si estos resultados son la consecuencia de que las hipófisis inyectadas en distintas épocas del año poseen actividades gonadotróficas diferentes o si la reactividad del ovario disminuye a medida que se aleja el período de la ovulación normal. Por otra parte, el número de huevos liberados en cada ovulación varía con la dosis de gonadotropina (14, 15, 16) y como no hemos practicado un cómputo de los huevos obtenidos, las cantidades de hipófisis que aquí se señalan deben ser consideradas sólo como una aproximación útil.

En los Anuros, una vez producida la ovulación, los huevos caen a la cavidad peritoneal y son impulsados hacia la entrada del oviducto por actividad ciliar y en algunas especies, por succión del oviducto (1). Los huevos recorren el oviducto impulsados por los cilios del epitelio que recubre la pared y son envueltos por una secreción gelatinosa. Hay grandes variaciones entre las especies en cuanto a las características de la secreción glandular del movimiento ciliar y de la mus-

culatura del oviducto, lo cual se expresa en la diversa morfología de la envoltura gelatinosa.

En el caso del *Pleurodema bibroni* los huevos son retenidos en la región terminal del oviducto o falso útero sin que se produzca postura espontánea. Es necesario hacerlos salir comprimiendo el abdomen, pues en caso contrario pronto sufren un proceso de citólisis. Así como en otras especies de Anuros (véase comparación de *Xenopus* y *Rana* en Waring, Landgrebe y Neil, 17), es probable que la postura (distingase de ovulación) no sea manejada por el sistema hormonal sino que por el sistema nervioso estimulado por el abrazo sexual.

Fecundación.

Los huevos obtenidos se recibieron en solución de Holtfreter al 10%, que aparece como el medio sintético más satisfactorio para embriones de Anuros (18). El medio líquido ocasiona una imbibición considerable de la envoltura gelatinosa de los huevos, fenómeno que constituye un inconveniente para cualquier operación posterior y para una buena técnica microscópica, de modo que conviene eliminar esta envoltura por medios mecánicos antes de la fijación o bien después de la fijación colocando los huevos en una solución de hipoclorito de sodio. Los huevos de Anfibios recogidos en la cavidad peritoneal no tienen envoltura gelatinosa, pero por causas desconocidas, no son fecundables aun cuando ya han completado la meiosis I.

La fecundación se obtuvo en el mismo medio salino agregando testículos maduros desmenuzados, los que en cualquier época del año contienen abundantes espermios activos. Los gametos se dejaron en contacto durante 20 minutos y luego se lavaron los huevos. Los cultivos se mantuvieron en cápsulas de Petri a una concentración aproximada de 12 embriones por ml de solución de Holtfreter al 10%, medio que se renovó diariamente. Durante el período estudiado los animales no utilizan aún el alimento del medio externo. El tiempo de desarrollo se computó a partir del momento en que los huevos se expusieron a la solución de espermios.

En *Pleurodema bibroni*, como en otros Anuros, la fecundación se reconoce exteriormente por la rotación que experimentan los huevos, que antes de ella se encontraban con el polo vegetativo hacia arriba.

Después de la reacción cortical y antes de iniciarse la segmentación, es fácil reconocer en los Anuros la expulsión del segundo polo-cito y la formación del "creciente gris". Este último fenómeno requiere un comentario. El huevo de Anuro no es muy rico en vitelo, pero contiene lo suficiente como para que se dificulte la observación de otros caracteres citoplasmáticos, salvo la distribución del pigmento. Este es superficial y recubre todo el huevo, excepto una parte más o menos considerable del polo vegetativo o región ventral. Las plaquetas de vitelo, en cambio, están dispuestas en un gradiente dorso-ventral, alcanzando la mayor concentración en el polo ve-

TABLA I

Cantidad de hipófisis de hembras que es necesario inyectar para obtener ovulación

Periodo	Número de hipófisis
Junio	12 a 8
Julio	8 a 4
Agosto	4 a 1
Septiembre a Noviembre	ovulación espontánea
Noviembre a Diciembre	3 a 5
Enero	5 a 10
Febrero	10 a 12
Marzo a Mayo	12

(*) Para este efecto se estima (3) que dos hipófisis de macho tienen la actividad gonadotrófica equivalente a una hipófisis de hembra.

getativo (rev. en 19). El huevo presenta así una simetría radial, la que llega a ser bilateral cuando se produce la rotación y aparece el "crescente gris" como una zona de pigmentación clara intercalada entre la región pigmentada y la despigmentada. Esta formación no ha sido observada en todos los Anuros, y en las especies en que lo ha sido, no es siempre bien definida. La banda gris que se observa en *Pleurodema bibroni* es muy probablemente homóloga del creciente gris típico de otras especies y, como él, desaparece antes de la gastrulación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desarrollo observado a 18°C.

A continuación se indican los distintos estados de desarrollo con la cronología correspondiente observada a 18°C. La Fig. 1 representa estos diversos estados.

Estado 1. "Oocito" 0 horas.

Los huevos se encuentran en medio de una masa informe de gelatina, son esféricos y miden alrededor de 1,4 mm de diámetro, con escasa variación. La pigmentación presenta una distribución con pocas variaciones individuales: los 3/4 superiores son de color pardo o pardo-verdoso y el resto de color blanquecino o blanco amarillento, con una zona de transición estrecha entre ambas áreas. En medio del área pigmentada, en el polo animal, se encuentra una pequeña zona incolora de 0,15 a 0,20 mm de diámetro con un pequeño punto central, que corresponde al sitio por donde se expulsa el primer polocito.

Estado 2. "Huevo fecundado" 0 a 2:15 horas.

Desde la exposición a espermios hasta la aparición del primer surco.

Como consecuencia de la fecundación, 15 a 20 minutos después de ser expuestos al medio con espermios, los huevos giran libremente dentro de la membrana vitelina. La zona de transición entre el área pigmentada y la despigmentada se ensancha formando una banda gris, que desaparece a mediados de este estado. Entre tanto, en la zona incolora del polo animal se producen varios cambios de relieve que culminan con la expulsión del segundo polocito. Esta zona desaparece antes de iniciarse la segmentación.

Estado 3. "Segmentación inicial" 2:15 a 7 horas.

Desde la iniciación del primer surco hasta la aparición del quinto surco.

A las tres horas de edad ya se ha formado el primer surco, que es meridional y se completa antes de que aparezca el segundo. El segundo, también meridional, aparece a las tres horas y cincuenta minutos de edad y se completa antes de que aparezca el tercero que

es supra-ecuatorial. A las 5 horas y 30 minutos se observa ya el doble cuarto surco que es meridional, y que no alcanza a completarse antes que aparezca el quinto hacia las 6:15 horas.

En consecuencia, al término de este estado se encuentran 16 a 32 blastómeros.

Estado 4. "Segmentación avanzada" 7 a 19 horas.

Desde la aparición del quinto surco hasta la aparición del blastoporo.

La segmentación continúa y se reduce cada vez más el tamaño de los blastómeros hasta que se inicia la gastrulación. No se aprecian diferencias de importancia en la distribución del pigmento con respecto a los estados anteriores.

Estado 5. "Gastrulación" 19 a 29 horas.

Desde la iniciación hasta la reducción del blastoporo.

El labio dorsal del blastoporo aparece justamente en el límite del área pigmentada con la despigmentada. Se extiende y arquea completando en alrededor de 7 horas un círculo de 0,8 mm de diámetro que incluye toda el área despigmentada, luego el blastoporo se constriñe y termina por ser un pequeño orificio al fondo del cual se divisa un tapón vitelino muy reducido. Simultáneamente, el hemisferio opuesto se observa un pequeño relieve que señala el límite del arquenteron.

Estado 6. "Pliegues neurales" 29 a 42 horas.

Desde que aparece la placa neural hasta que toman contacto los pliegues neurales.

Cuando el blastoporo alcanza un diámetro de 0,2 a 0,1 mm, se esboza la placa neural, que mide alrededor de 1,7 mm de longitud y tiene una amplitud de 1,0 mm en la región cefálica, que es la más ancha. El blastoporo toma la forma de una hendidura extendida en sentido céfalo-caudal. Los bordes de la placa neural se destacan y engruesan, constituyendo los pliegues neurales, que están separados entre sí por un surco que se ensancha y profundiza en el extremo céfálico donde estos son más prominentes. El huevo ha perdido la forma esférica a causa del desarrollo de los pliegues que se extienden desde el blastoporo hasta más allá de su antipoda. Los pliegues se aproximan en toda su longitud hasta tocarse. Lateralmente, en la región cefálica, se observan las placas branquiales. Al fin de este estado, el embrión mide 1,8 a 1,9 mm de largo.

Estado 7. "Tubo neural" 42 a 53 horas.

Desde la fusión de los pliegues hasta la aparición de las ventosas.

La sutura de los pliegues neurales no deja más rastro que una línea débilmente pigmentada. El dorso del embrión se extiende en sentido céfalo-caudal y se angosta lateralmente. Ya se esbozan la cabeza, el tronco y la cola. En la parte inferior de la cara se inicia una depresión que es el origen de la boca. En las caras laterales de la cabeza hacen relieve las placas branquiales, las que comien-

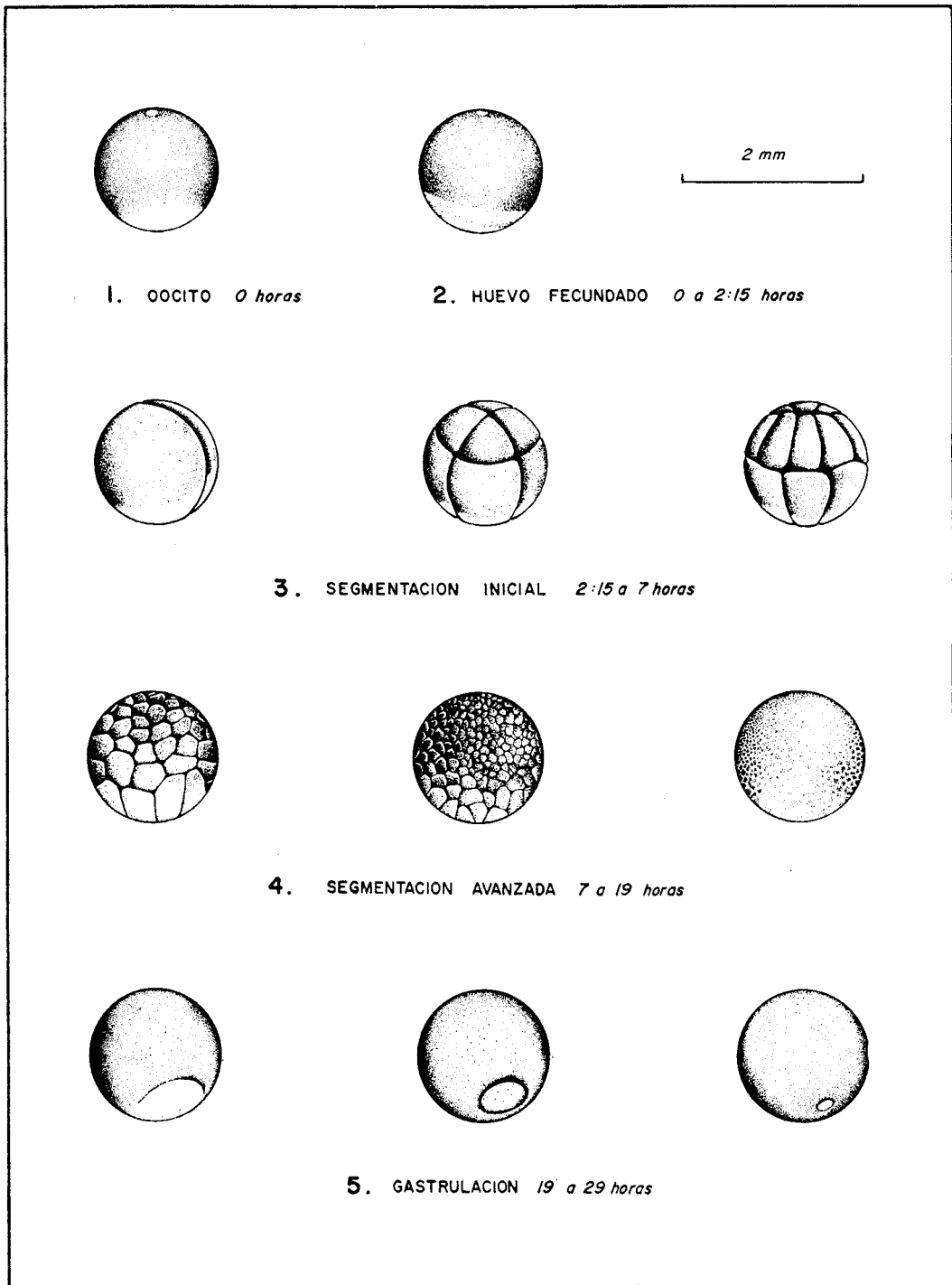


FIG. 1. Estados de desarrollo del *Pleurodema bibroni*. Las horas corresponden al desarrollo a 18°C.

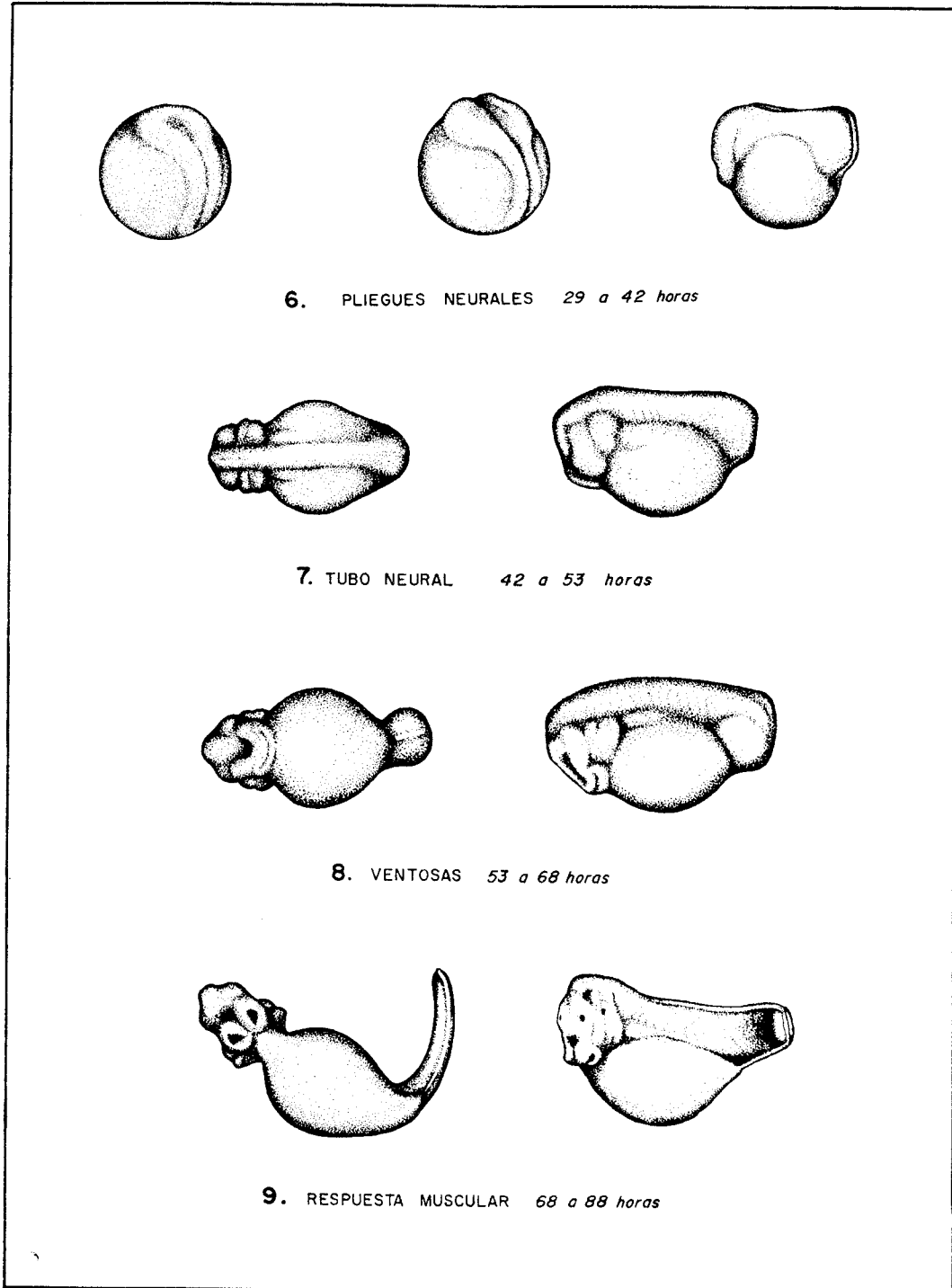


FIG. 1. Continuación.

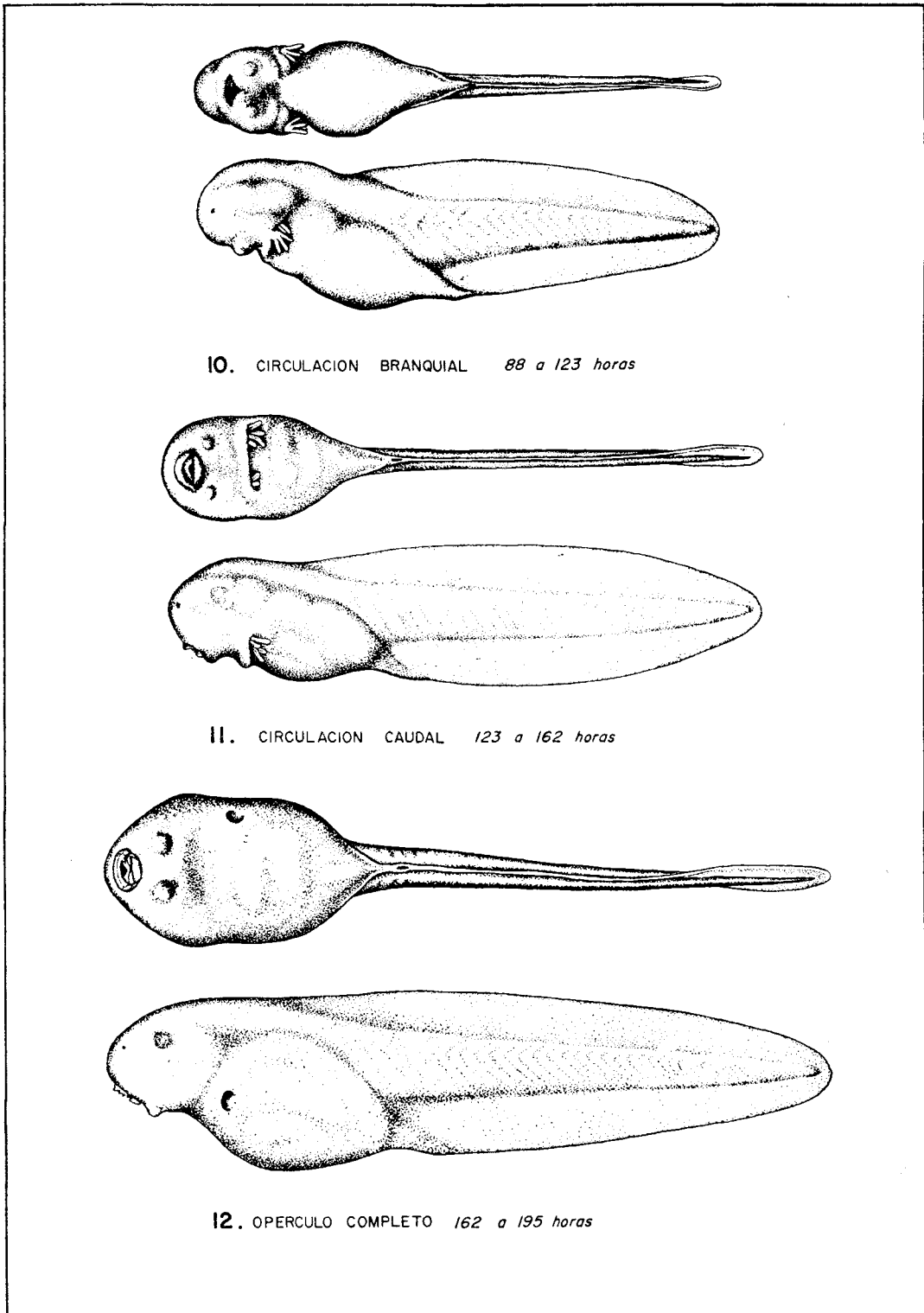


FIG. 1. Continuación.

zan a dividirse. Detrás de las placas branquiales, el cuerpo del embrión se estrecha lateralmente, formando un "cuello". Caudalmente con respecto a las placas branquiales, se destaca el leve abultamiento del pronefros. En el dorso se dibujan débilmente los somitos, como bandas alargadas en sentido dorsoventral. El brote caudal está claramente delimitado del vientre, por detrás del ano, mientras que por la región dorsal aparece como una prolongación sin transición de los órganos axiales. Hacia el fin de este estado, los embriones miden 2,2 a 2,8 mm de longitud.

Estado 8. "Ventosas" 53 a 68 horas.

Desde la aparición de las ventosas hasta la iniciación de la respuesta muscular.

En este estado se acentúan los caracteres descritos en el estado anterior y surgen nuevas estructuras, especialmente en la región rostral. Bajo la boca se desarrolla un relieve semilunar de concavidad anterior, que luego se excava constituyendo las ventosas. Sobre la boca, dos protuberancias bilaterales anuncian el desarrollo de las placodas olfatorias. Progresan la división de las placas branquiales. Detrás del "cuello" el pronefros se destaca y prolonga caudalmente. La cola se observa como grueso brote de extremo truncado, bien limitado del tronco en su inserción ventral y lateral. Hacia el final de este estado el embrión mide 2,5 mm de longitud.

Estado 9. "Respuesta muscular" 68 a 88 horas.

Desde que se observa la respuesta muscular hasta que aparece la circulación branquial.

Antes que se pierda la cápsula vitelina, que aparezcan los brotes branquiales y que se observen latidos cardíacos, los animales comienzan a responder con una contracción lateral a la estimulación mecánica. En la cabeza se diferencian ventosas en los extremos del relieve semilunar descrito más arriba. Las placodas olfatorias se han pigmentado y deprimido. De las placas branquiales surge el primer brote branquial. En el tronco, se acentúan los somitos. El abdomen se ha hecho más largo y angosto. La longitud de la cola crece considerablemente; su extremo es aguzado y en su contorno comienza a diferenciarse la aleta mediana. Hacia el final de este estado, los embriones miden 4,4 mm de longitud, correspondiendo a la cola 1,5 a 1,6 mm medido desde el ano hasta el extremo.

Estado 10. "Circulación branquial" 88 a 123 horas.

Desde que se observa la circulación branquial hasta que aparece la circulación caudal.

El primer brote branquial se ramifica y aparece el segundo. En la región ventral, inmediatamente detrás de las ventosas, una observación cuidadosa permite reconocer el latido cardíaco, primero intermitente, luego más regular. Muy poco después se observa circulación en las branquias. En la cara, la

boca se profundiza y extiende lateralmente; las fositas olfatorias se ven más hundidas. Hacia el final del estado se reconoce la pigmentación del ojo. Las placas branquiales se extienden hacia la línea media ventral, donde va a formar un fino relieve que será el comienzo del opérculo. El abdomen aparece menos abombado y se prolonga caudalmente bajo la aleta, alojando la cloaca. La aleta se ha desarrollado ampliamente; por el lado dorsal se extiende hasta las vesículas encefálicas. La pigmentación del tegumento se hace cada vez más débil. Se inicia el desove en algunos animales, pero no llega a completarse para toda la población. Al final de este estado los embriones miden más o menos 6,2 mm de longitud, correspondiendo 3,5 mm a la cola.

Estado 11. "Circulación caudal" 123 a 162 horas.

Desde que se observa la circulación caudal hasta que se completa el opérculo derecho.

La delgadez y transparencia de la aleta caudal permite observar con luz transmitida el momento en que irrumpen la circulación al iniciarse este estado. La forma general del cuerpo cambia por el borramiento del "cuello" causado por el desarrollo del opérculo. Este crece hacia la región ventral, más rápidamente al lado derecho que al izquierdo. Al final del estado, las branquias del lado derecho quedan cubiertas. La boca presenta movimientos y se han desarrollado palpos labiales. Las fositas nasales se ven angostas y profundas. La córnea es más transparente sobre el ojo. Las ventosas están muy desarrolladas y sobresalientes. Durante este estado todos los animales terminan el desove. Hacia el final, la longitud total es de 7,5 mm con una cola de 4,6 mm desde el ano al vértice.

Estado 12. "Opérculo completo" 162 a 195 horas.

Desde que se completa el opérculo derecho hasta que se forma el sifón.

Después de cubrir las branquias del lado derecho, continúa el cierre del opérculo al lado izquierdo, dejando un orificio cada vez más estrecho por donde las branquias asoman primero y luego se ocultan. La forma del embrión es de una masa ovoidea que comprende la cabeza y el tronco fusionados. Inserta en esa masa está la cola larga y aguzada con sus relevantes miótomos, rodeada de una amplia y delgada aleta media. En la cara, los palpos labiales se queratinizan y presentan dientecillos. Las narinas son angostas y profundas. Las ventosas son ya menos prominentes. El ojo revela su irrigación. Bajo la córnea es posible observar el cristalino y la retina. El tegumento es transparente en todas sus partes. En el vientre puede verse el intestino que presenta movimientos peristálticos. Ya hay defecación. Los animales miden ahora 9,2 a 10,0 mm de largo, la cola desde su inserción en la cara lateral del cuerpo hasta el extremo alcanza de 6,0 a 6,2 mm.

TABLA II

Material utilizado en los estudios sobre velocidad de desarrollo

Temperatura del cultivo °C	Grupos experimentales	Número de individuos
9	6	918
14	7	583
18	50	10 217
22	5	535
27	11	1 822
29	6	847
32	6	1 015

Influencia de la temperatura sobre el desarrollo.

Los cultivos de *Pleurodema* se mantuvieron a temperaturas constantes de 9°, 14°, 18°, 22°, 27°, 29° y 32°C con variaciones no superiores a $\pm 0,5^\circ\text{C}$, sin modificación de otras condiciones del cultivo.

En la Tabla II se indica el número de grupos experimentales y el número total de individuos estudiados a las diferentes temperaturas.

El desarrollo de los diversos individuos fue sincrónico, pues no se observaron variaciones de importancia entre los individuos de cada grupo experimental ni entre los distintos grupos sometidos a iguales condiciones, aun cuando estos experimentos se realizaron en diferentes épocas del año. La figura 2 muestra la influencia de la temperatura sobre la velocidad del desarrollo sobre la base de los promedios obtenidos en el material que se resume en la Tabla II.

Las ordenadas representan los diversos estados en una escala proporcional a la duración que cada uno de ellos mostró en los cultivos realizados a 18°C. Puede observarse que el desarrollo es más rápido cuanto más elevada es la temperatura, pero este efecto no es equivalente a los distintos estados, de modo que las líneas que lo representan no son rectas. Los estados 7 y 8 aparecen proporcionalmente más acelerados por la temperatura y la inflexión máxima de la curva corresponde al fin del estado 8, o sea cuando aparece la respuesta muscular. En experimentos referidos en la literatura (20, 21) se ha observado, en cambio, que las tem-

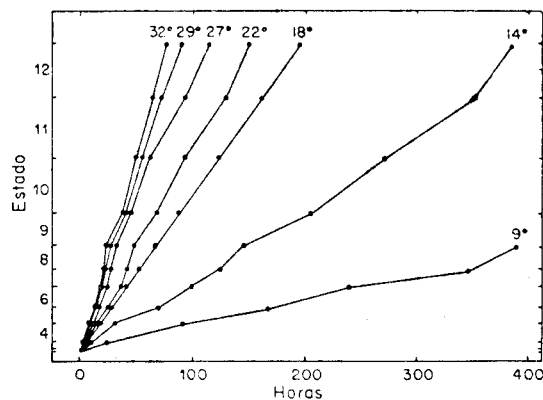


FIG. 2. Influencia de la temperatura sobre el desarrollo del *Pleurodema Bibroni*. La escala de los estados se ha confeccionado de modo que el desarrollo a 18°C sea una recta.

peraturas elevadas ocasionan un aumento de la velocidad relativa de desarrollo que es menor en los estados tempranos que en los avanzados. Para formarse un juicio sobre el origen de estas discrepancias sería necesario estudiar el desarrollo individual de los embriones, pues los puntos de la figura corresponden a promedios de un número diverso de experimentos. Por otra parte, debe considerarse la posibilidad de que el retardo relativo observado entre los estados 5 y 9 en altas temperaturas pueda explicarse porque se incluyen en las observaciones una proporción importante de embriones moribundos. Trabajando a bajas temperaturas (4°C a 10°C) Lovtrup (22) ha obtenido resultados coincidentes con los nuestros.

La figura 3 compara el desarrollo de las tres especies de Anuros más abundantes en el valle central de Chile, cultivados a 18°C en condiciones semejan-

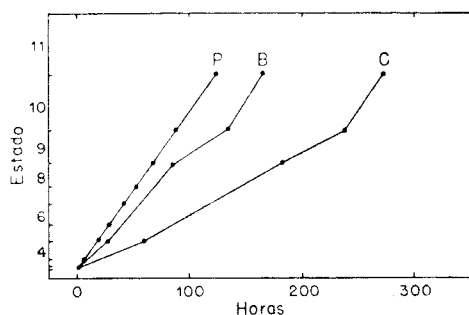


FIG. 3. Comparación del desarrollo de *Pleurodema bibroni* (P), *Bufo spinulosus* (B) y *Calyptocephalella gayi* (C), a 18°C.

tes (véase Valencia, 23, para *Bufo spinulosus* y Jorquera e Izquierdo, 24, para *Calyptocephalella gayi*). Esta figura muestra que no sólo el desarrollo es más rápido en *Pleurodema* que en *Bufo* y especialmente que en *Calyptocephalella*, sino que además, la forma de la curva expresa diferencias de la velocidad relativa con que se cumplen las distintas etapas consideradas. Estas diferencias entre las especies, tanto en la duración total como en la duración relativa de las distintas etapas, plantean problemas de adaptación al medio durante la vida embrionaria (véase Moore, 25). No hemos explorado este problema y ni siquiera estamos seguros de que estas tres especies, aunque se encuentren en una misma localidad, pongan sus huevos en aguas de igual temperatura.

Influencia de la temperatura sobre la mortalidad.

En general resulta fácil determinar el porcentaje de mortalidad en los cultivos que se realizan a temperatura elevada. Al parecer la temperatura de 32°C constituye un límite en el cual la mortalidad es de 98%. A temperaturas bajas, en cambio, la determinación del límite de tolerancia es más difícil: a 4°C no llega a iniciarse la segmentación, pero tampoco se observa citólisis y cuando los cultivos vuelven a colocarse a una temperatura más elevada hay desarrollo normal aún después de haber estado hasta 24 horas a la temperatura de 4°C.

Entendemos por "porcentaje total de mortalidad" la proporción de embriones citolizados entre la iniciación del estado 3 y el término del estado 12. No se incluyen en él los embriones que no alcanzan a iniciar la segmentación, porque entre los huevos citolizados hasta ese momento un número variable puede no haber sido fecundado.

En la Tabla III se refiere el número de individuos en los cuales se estudió la mortalidad a diferentes temperaturas; los datos corresponden al número existente a la iniciación del desarrollo. En la figura 4 se expresa la relación entre el porcentaje de mortalidad total y la temperatura del cultivo. Puede observarse que entre 9°C y 22°C no hay diferencia significativa con respecto al porcentaje de mortalidad, y que a temperaturas superiores

TABLA III

Material utilizado en los estudios sobre mortalidad

Temperatura del cultivo °C	Número de individuos
9	374
14	358
18	2 516
22	385
27	1 218
29	847
32	920

éste se eleva hasta alcanzar prácticamente el 100% a la temperatura de 32°C.

La tolerancia térmica en los diversos estados del desarrollo aparece en la figura 5, que expresa el porcentaje de mortalidad para cada estado a base de los resultados obtenidos en 14 series o grupos de desarrollo a 18°C sobre un total de 2.516 embriones. Puede observarse que el período más crítico del desarrollo comprende la gastrulación y la formación de los órganos axiales (estados 5 y 6) luego disminuye el porcentaje de mortalidad para ascender nuevamente en los estados 11 y 12.

No es extraño que la mortalidad sea más alta durante la gastrulación-neurulación, porque se dispone de muchos datos que señalan esta etapa como un momento crítico del desarrollo. Así lo demuestran los experimentos de hibridación (rev. en Moore, 26, y Brachet, 27) y de choque térmico (28), así como los

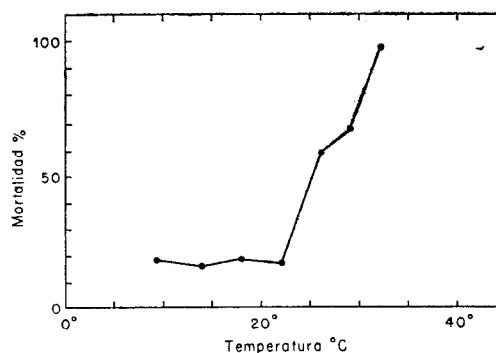


FIG. 4. Influencia de la temperatura sobre la mortalidad durante el desarrollo de *Pleurodema bibroni*.

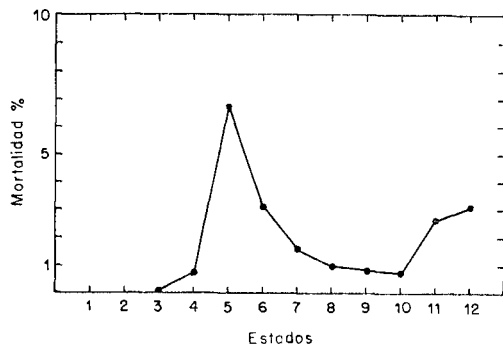


FIG. 5. Mortalidad del *Pleurodema bibroni* en los diferentes estados de desarrollo a 18°C.

profundos cambios del metabolismo de los ácidos nucleicos y de las proteínas que se producen en estos estados. La síntesis de ácido desoxiribonucleico (DNA) sólo se inicia cuando está bien avanzado el estado de blástula (rev. en Chen, 29), lo que ha sido cuidadosamente examinado porque implica el almacenamiento de esta substancia en el citoplasma. En cuanto al ácido Ribonucleico (RNA) tanto el análisis (29) como la incorporación de precursores (30, 31) demuestra que la síntesis es nula o muy escasa durante la segmentación, aumentando considerablemente a partir de la gastrulación. La síntesis de proteína aumenta también claramente a partir de la gastrulación-neurulación, tal como podía suponerse por la relación que tiene con la síntesis del RNA. Así lo demuestra la incorporación de aminoácidos (32), de C^{14} (33) y la aparición de nuevas proteínas que pueden reconocerse por métodos serológicos (34). La síntesis de enzimas, en cambio, ofrece un cuadro difuso debido a numerosos resultados contradictorios (discusión en Brachet, 28, y Urbani, 35).

El incremento de la mortalidad que se observa en los estados 11 y 12 es más difícil de interpretar. El aspecto edematoso de los embriones que mueren en estos estados hace pensar en el "síndrome de haploidia" (36) que ha sido atribuido a defectos en el desarrollo de la hipófisis (37) y del sistema excretor.

Es posible que la forma en que se distribuye la mortalidad por estados dependa también de la densidad de población que se produce en el cultivo, tal como se ha observado en *Calyptocephalella gayi* (24). Sin embargo, es poco probable que en las condiciones en que se han realiza-

do los cultivos de *Pleurodema*, ésta influya sobre la mortalidad durante la gastrulación-neurulación.

SUMMARY

Pleurodema bibroni is an abundant and widely spread amphibian in the central valley of Chile. Its ovulation can be induced by grafting hypophysis in amounts depending on the season, as shown in Table I. In vitro, fertilization can be obtained and rapid development follows, procuring suitable material for experimental embryology. A series of normal developmental stages at 18°C is pictured in Fig. 1. The effect of different temperatures on the speed of development (see table II) is indicated in Fig. 2, where development at 18°C is taken as a parameter. The comparison with two other sympatric species in cultures at 18°C, shows that the speed of development of *Pleurodema bibroni* is higher than in *Bufo spinulosus* and *Calyptocephalella gayi* as shown in Fig. 3. The results of a number of experiments summarized in Table III, dealing with thermal tolerance, are presented in Fig. 4 which shows the percentage of total mortality as a function of temperature. In the course of normal development at 18°C, the more sensitive stages proved to be gastrulation and neurulation (stages 5 and 6), as seen in Fig. 4.

REFERENCIAS

- 1.—NOBLE, G. K. — The Biology of the Amphibia, Dover, New York, 1954.
- 2.—CEI, J. M.—Inv. Zool. Chil. 4:300, 1958.
- 3.—RUGH, R. — Jour. Exp. Zool. 71:149, 1935.
- 4.—RUGH, R. — The Frog. Blaskiston, Philadelphia, 1951.
- 5.—CHANG, C. y WITSCHI, E. — Endocrinology 61:514, 1957.
- 6.—ASDELL, S. A. — The Mechanism of Ovulation en "The Ovary". Ed. by Solly Zuckerman, vol. I. Academic Press, London, 1962.
- 7.—HOUSSAY, B. A.; GIUSTI, L. y LASCANO-GONZÁLEZ, J. M. — Rev. Soc. Argent. Biol. 5:397, 1929.
- 8.—WOLF, O. M. — Proc. Soc. Exp. Biol. y Med. 26:692, 1929.

- 9.—CREASER, C. W. y GORBMAN, A. — Quart. Rev. Biol. 14:311, 1939.
- 10.—RUGH, R. — Experimental Embryology, Burgess, Minneapolis, 1948.
- 11.—WRIGHT, P. A. y HISAW, F. L. — Endocrinology 39:247, 1946.
- 12.—WRIGHT, P. A. — Jour. Exp. Zool. 100:565, 1945.
- 13.—RUGH, R. — Biol. Bull. 66:22, 1934.
- 14.—NOVELLI, A. — Rev. Soc. Argent. Biol. 8:454, 1932.
- 15.—NOVELLI, A. — C. R. Soc. Biol., Paris 111:476, 1932.
- 16.—RUGH, R. — Physiol. Zool. 10:84, 1937.
- 17.—WARING, H.; LANDGREBE, F. W. y NEILL, R. M. — Jour. Exp. Biol. 18:11, 1942.
- 18.—HOLTFRETER, J. — Arch. f. Entw. mech. 124:404, 1931.
- 19.—PASTEELS, J. J.—Bull. Soc. Zool. France, 76:231, 1951.
- 20.—ATLAS, M. — Physiol. Zool. 8:290, 1935.
- 21.—RYAN, F. J. — Biol. Bull. 81:432, 1941.
- 22.—LØTRUP, S. — Jour. Exp. Zool. 147:227, 1961.
- 23.—VALENCIA, J. — Tabla de desarrollo normal de *Bufo spinulosus* Wiegmann, por publicar.
- 24.—JORQUERA, B. e IZQUIERDO, L. — Tabla de desarrollo normal de *Calyptocephalella gayi*, por publicar.
- 25.—MOORE, J. A. — En Genetics, Paleontology and Evolution. Princeton Univ. Press, 1949.
- 26.—MOORE, J. A. — Advanc. in Genetics 7:139, 1955.
- 27.—BRACHET, J. — Biochemical Cytology. Academic Press, New York, 1957.
- 28.—BRACHET, J. — The Biochemistry of Development. Pergamon Press, London, 1960.
- 29.—CHEN, P. S. — Exp. Cell. Res. 21:523, 1960.
- 30.—ROUNDS, D. E. y FLICKINGER, R. A. — Jour. Exp. Zool. 137:479, 1958.
- 31.—GRANT, P. — J. Cell. Comp. Physiol. 52:227, 1958.
- 32.—EAKIN, R. M.; KUTSKY, P. B. y BERG, W. E. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 78:502, 1951.
- 33.—TIEDEMANN, H. y TIEDEMANÑ, H. — Naturwiss. 41:535, 1954
- 34.—CLAYTON, P. M.—Jour. Embryol. Exper. Morphol. 1:25, 1953.
- 35.—URBANI, E. — Advances in Morphogenesis 2:61, 1962.
- 36.—FANKHAUSER, G.—En Analysis of Development. Saunders, Philadelphia, 1955.
- 37.—BLAIR, F. W. — Evolution 17:1, 1963.