

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Descripción parcial del desarrollo embrionario de *Gastrotheca orophylax*
(Anura, Hemiphractidae).

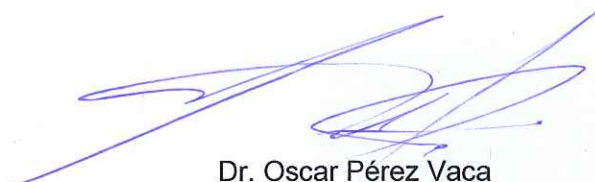
Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en Ciencias
Biológicas

Kathya Pamela Bustamante Enríquez

Quito, 2017

CERTIFICACIÓN

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Srta. Kathya Pamela Bustamante Enríquez ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



Dr. Oscar Pérez Vaca

Director de la Disertación

Quito, 03 de Agosto del 2017

A mis padres, por todo su apoyo y amor

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi director de tesis, Oscar Pérez por el financiamiento y respaldo en la realización de esta investigación, pero sobre todo por su tiempo, paciencia y dedicación desde el inicio hasta el final del proyecto. Sin duda su ayuda ha sido fundamental e invaluable. Agradezco también al Dr. Luis Coloma y al equipo de Wikiri (Elisio, Patricio, Gaby, Elena y Lola) por su ayuda con el material colectado tanto en el campo como en cautiverio. A mis lectores de tesis: Miryan, Andrés y Eugenia que me ayudaron con la mejor disposición a mejorar este trabajo con todos sus comentarios, sugerencias y buenas ideas. A mis compañeras de laboratorio Belén, Francesca, Michelle, Tefa Boada, Tefa Tapia, Joha, Jess y Lola, por todas sus recomendaciones, ayuda y guía durante el desarrollo de este proyecto, así como también por los momentos de distracción, las risas y la comida que no podía faltar.

A mis padres y hermano por sus buenos ánimos, paciencia, amor y comprensión en esta etapa de mi vida. Gracias también por el apoyo económico, por creer siempre en mí y por apoyarme tanto en todas mis decisiones tomadas. A mis abuelos y a mis tíos por su compañía, cariño y sus buenos consejos. A mis amigos, Mica, Marys, Nadia, Stephanie, Di y Pablo que supieron escucharme a todo momento y ayudarme en lo que más podían. A Laura y Vaca por su tiempo, por todas sus sugerencias, comentarios, correcciones, paciencia y compañía, definitivamente me ayudaron muchísimo a acabar este trabajo de la mejor manera.

Al jiu-jitsu y a mis compañeros de tatami por dispersar mi mente y por ayudarme a tener más disciplina. Por darme las ganas y la energía, para luego de cada entrenamiento poder continuar con más ganas mi investigación. Finalmente agradezco a mis ranitas por permitirme viajar y conocer el lugar donde viven, estudiarlas, aprender cosas nuevas de ellas y aportar un granito de arena a la ciencia, esperando que esto sirva para tomarlas más en cuenta, estudiarlas, protegerlas y conservarlas.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. MATERIALES Y MÉTODOS	8
4.1. OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	8
4.2. EXTRACCIÓN DE EMBRIONES	8
4.3. FOTOGRAFÍAS Y FIJACIÓN DE EMBRIONES	9
4.4. RECOPIACIÓN Y PROCESAMIENTO DE DATOS MORFOLÓGICOS	10
4.5. MORFOMETRÍA Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	11
5. RESULTADOS.....	12
5.1 ESTADIOS <i>Gastrotheca orophylax</i>	12
5.1.1 ESTADIO 5	12
5.1.2. ESTADIO 8.....	13
5.1.3. ESTADIO 11 ^{1/2}	13
5.1.4. ESTADIO 12	13
5.1.5. ESTADIO 16	14
5.1.6. ESTADIO 17	14
5.1.7. ESTADIO 18	15
5.1.8. ESTADIO 19	15
5.1.9. ESTADIO 20	16
5.1.10. ESTADIO 21	16
5.1.11. ESTADIO 22	16
5.1.12. ESTADIO 23	17
5.1.13. ESTADIO 24	17
5.1.14. ESTADIO 25	18
5.2. MORFOMETRÍA Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	18
6. DISCUSIÓN	20
7. CONCLUSIONES	28
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reproducción de <i>Gastrotheca orophylax</i>	34
Figura 2. Estadios embrionarios 8 y 11 ^{1/2} de <i>Gastrotheca orophylax</i>	35
Figura 3. Estadios embrionarios 12, 16 y 17 de <i>Gastrotheca orophylax</i>	36
Figura 4. Estadios embrionarios 18, y 19 de <i>Gastrotheca orophylax</i>	37
Figura 5. Estadio embrionario 20 de <i>Gastrotheca orophylax</i>	38
Figura 6. Estadio embrionario 21 de <i>Gastrotheca orophylax</i>	39
Figura 7. Estadio embrionario 22 y 23 de <i>Gastrotheca orophylax</i>	40
Figura 8. Estadio embrionario 24 y 25 de <i>Gastrotheca orophylax</i>	41
Figura 9. Variaciones en el nacimiento de embriones de <i>Gastrotheca orophylax</i>	42
Figura 10. Reabsorción de cola de <i>Gastrotheca orophylax</i> desde el nacimiento	43
Figura 11. Correlación de Pearson	44
Figura 12. Desviación estándar y media de LC	45
Figura 13. Desviación estándar y media de LRC	46
Figura 14. Tiempos aproximados de desarrollo entre estadios embrionarios de <i>Gastrotheca orophylax</i>	47

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Datos y características de las hembras y posturas de <i>G. orophylax</i>	49
Tabla 2. Tiempos del desarrollo de <i>Gastrotheca orophylax</i>	50
Tabla 3. Comparación de características de desarrollo embrionario para los diferentes modos reproductivos.....	51

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1.- Medias de LRC y LC en juveniles de <i>G. orophylax</i>	54
--	----

1. RESUMEN

Las ranas marsupiales presentan características únicas dentro del grupo Anura; el macho fertiliza los huevos de la hembra afuera del agua para después colocarlos dentro del marsupio presente en la espalda de la misma, además los embriones en desarrollo presentan branquias acampanadas. El presente estudio se basa en la descripción y análisis morfológico externo del desarrollo embrionario desde el clivaje hasta la eclosión de *Gastrotheca orophylax*, una especie de rana marsupial de la familia Hemiphractidae con desarrollo directo, nativa del Ecuador. Por medio de la extracción, fijación y observación de los embriones obtenidos, se pudo describir y analizar morfológicamente diversos estadios embrionarios en esta especie. Además, se realizó un estudio complementario acerca de la reabsorción de la cola que se llevó a cabo desde el nacimiento de los juveniles. Como resultado se obtuvo una tabla de tiempos de desarrollo, así como también una descripción detallada parcial de la morfología externa durante su embriogénesis. Al no existir ninguna descripción embriológica para ranas con desarrollo directo en esta familia, esta investigación aporta nuevos datos al grupo de los hemifráctidos, específicamente al género *Gastrotheca*.

Palabras clave: Clivaje, desarrollo directo, eclosión, embriones, rana marsupial.

2.ABSTRACT

Marsupial frogs present unique characteristics within the Anura group, the male fertilizes female eggs out of the water and then places them inside the marsupium on the back of the female; in addition, the developing embryos present bell-shaped gills. The present study is based on the description and external morphology analysis of the embryonic development from the cleavage to the hatching of *Gastrotheca orophylax*, a species of marsupial frog with direct development, from the Hemiphractidae family, native to Ecuador. Embryos were extracted, fixed and observed, several embryonic stages in this species could be described and analyzed morphologically. Moreover, a complementary study was carried out on the reabsorption of the tail of the juveniles from the birth. As a result, a table of development times was obtained, as well as a detailed description of the external morphology during embryogenesis. Since there is no embryological description for direct developers in this family, this research contributes new data to the group of hemiphractides, specifically to the genus *Gastrotheca*.

Keyword: Cleavage, direct development, embryos, hatching, marsupial frog.

3. INTRODUCCIÓN

La biología reproductiva de los hemifráctidos es única entre todas las especies de ranas conocidas. Ésta familia de anuros ha evolucionado a través de cambios en el desarrollo, la morfología, la fisiología y el comportamiento (Gomez-Mestre, Pyron y Wiens, 2012). Existen varios modos reproductivos dentro de este grupo, los cuales pueden resultar en: 1) Huevos que eclosionan como renacuajos, ya sea en estadio temprano o tardío, y completan su desarrollo como larvas de vida libre que se alimentan, como en algunas especies del género *Gastrotheca*. 2) Huevos que nacen como larvas de vida libre avanzadas, con extremidades formadas que no se alimentan, como es el caso de *Flectonotus* y *Fritziana*. 3) Nacimiento directo a ranas juveniles sin estadio larval como en *Cryptobatrachus*, *Hemiphractus*, *Stefania* y algunas especies del género *Gastrotheca* (Duellman, 2015). El segundo y tercer modo reproductivo se encuentran dentro de la categoría de larvas endotróficas. Éstas, ya sea como embriones no nacidos o como larvas de vida libre que no se alimentan, adquieren nutrición para su desarrollo únicamente a partir de fuentes parentales. Con más frecuencia a partir de la yema asignada a cada huevo durante la vitelogénesis (Altig y Johnston, 1989; Gomez-Mestre et al., 2012).

Para ser más específicos, dentro de Hemiphractidae, el género *Gastrotheca* es inusual pues, según la literatura, presenta distintos modos reproductivos dependiendo de las diferentes especies. En base a la literatura, se sabe que algunas especies producen larvas de vida libre que se alimentan, estas pueden nacer en estadio temprano o tardío. Mientras que otras especies producen ranas juveniles (Duellman, 2015). Sin embargo, no hay reportes de larvas con el segundo tipo de modo reproductivo en este género, es decir larvas endotróficas de vida libre que no se alimentan. Todas estas variaciones han despertado mucho interés dentro de la biología del desarrollo y han abierto un gran campo de investigación. De hecho, existen algunos reportes parciales respecto al desarrollo temprano y a la embriogénesis en general de algunos grupos dentro de Hemiphractidae (Elinson, del Pino, Townsend y Eichhorn, 1990; Schmid et al., 2012), sin embargo, la información

sigue siendo escasa dentro de varios géneros y hay muchas preguntas que responder en torno a su reproducción y desarrollo.

Para este estudio se escogió a *Gastrotheca orophylax* (Anura, Hemiphractidae), una especie nativa para el Ecuador (Coloma et al., 2004; Icochea et al., 2004) que se encuentra en la categoría de vulnerable, según la lista roja de especies amenazadas de la AmphibiaWebEcuador (Ron et al, 2016). Su nombre se deriva etimológicamente de dos palabras griegas; *oros*, que significa “montaña” y *phylax* que significa “guardia” o “guardián”.

Los adultos de esta rana marsupial son moderadamente grandes, con longitud rostro-cloacal de aproximadamente 7.4cm (Duellman, 2015). Son ranas nocturnas, con coloración verde esmeralda, el color es uniforme en la parte dorsal, a excepción de una corta línea color bronce en la parte superior del tímpano y líneas también color bronce en el borde de las extremidades (Figura 1). El vientre presenta una coloración uniforme de tonalidad crema. Esta especie es fácilmente confundible en tamaño y estructura con *G. plumbea* (Frolich et al, 2005; Duellman y Hillis, 1987). Se distribuye entre los 2620-3074 m.s.n.m., se la puede encontrar en bosques nublados o sub-páramos en las elevaciones amazónicas de la Cordillera Oriental de los Andes en el extremo norte de Ecuador y en el extremo Sur de Colombia. Se las encuentra principalmente sobre los 2m del suelo en vegetación, cerca de plantas de la familia Gunneraceae (Duellman, 2015).

El amplexus de esta especie se da en hábitats terrestres: el macho deposita el esperma en el dorso de la hembra y coloca los huevos en el marsupio con la ayuda de sus patas posteriores, los huevos permanecerán ahí hasta completar su nacimiento (Duellman, 2015). En cuanto al tamaño del huevo, existen datos tomados de hembras grávidas en los cuales se reporta que la media para *G. orophylax* es de 6.1mm de diámetro (del Pino y Escobar, 1981).

Los embriones de *Gastrotheca orophylax*, según la literatura, presentan desarrollo directo, lo que significa que hay ausencia de estadio larval (Lima et al., 2016). Es decir que el embrión procede a generar directamente una rana juvenil (Gilbert, 2014). Se sabe que el desarrollo directo de huevos a ranas juveniles evolucionó independientemente muchas veces en diversos grupos de anuros (Duellman, 2015; Goldberg, Candiotti y Akmentins, 2012), por ejemplo, lo podemos encontrar en la rana acuática del género *Pipa* (Pipidae) de Sudamérica (Rabb y Snedigar, 1960), y por otro lado en varios grupos de ranas terrestres y arbóreas (Duellman, 2015).

Sin embargo, de todas las ranas que presentan desarrollo directo, solo los embriones de hemifructidos se conoce que pasan a través de estadios larvales en su desarrollo embrionario; por esta razón, los embriones lucen como renacuajos (Duellman, 2015). De hecho, en *G. orophylax*, se conoce que cuando el nacimiento se da en laboratorio la hembra deposita los embriones en agua y estos nacen como renacuajos de estadio avanzado que no se alimentan (del Pino y Escobar, 1981) lo cual deja en duda si, por definición, esta especie pertenece al grupo de las ranas con desarrollo directo o no.

La taxonomía de esta familia ha sido cambiante. Se han planteado muchos esquemas con diferentes relaciones filogenéticas para Hemiphraetidae y sus géneros afines (Wiens, Kuczynski, Duellman y Reeder, 2007; Wiens, Fetzner, Christopher, Parkinson y Reeder, 2005), los cuales han variado constantemente. Estos estudios se basaron principalmente en características morfológicas, y recién en el siglo XX, se le da más importancia al aspecto histórico-evolutivo (Duellman, 2015). Además, los análisis filogenéticos, sobretodo del género *Gastrotheca* no han abordado aspectos biogeográficos. La mayoría de especies del género *Gastrotheca* se distribuyen en los Andes, desde el norte de Colombia al norte de Argentina. Sin embargo, *Gastrotheca* también se encuentra desde el borde del Caribe en Costa Rica y Panamá, sobre la cuenca alta del Amazonas en Ecuador y el norte de Perú, la cordillera de la Costa en

el norte de Venezuela y el Bosque Costero Atlántico en el este de Brasil (Blackburn, 2013; Duellman, 2015).

El principal objetivo de este estudio fue elaborar una tabla de desarrollo para *G. orophylax*. Al extraer embriones de hembras grávidas se pudo describir morfológicamente y analizar de manera parcial las características externas de los mismos y clasificarlos en diferentes estadios. Además de fotografiarlos, se calculó el tiempo de desarrollo entre un estadio y otro. Como estudio complementario se pudo tomar datos sobre la reabsorción de la cola a partir del nacimiento.

La importancia de esta investigación radica en que no existe ninguna descripción embriológica detallada para ranas con desarrollo directo en esta familia. De hecho, se supo por primera vez que *G. orophylax* presenta este tipo de desarrollo gracias al reporte de dos hembras grávidas colectadas en Ecuador que parieron entre agosto y septiembre de 1980 (Duellman y Pyles, 1980). Se han reportado algunas características reproductivas en esta especie como la forma del marsupio, los meses estimados en el año para el nacimiento o el tiempo estimado de incubación. Además de algunas características embrionarias como el desarrollo de las estructuras bucales, el estadio al nacimiento y algunos detalles sobre las branquias (Duellman y Chavez, 2010; Duellman y Scott, 1980; Wassersug y Duellman, 1984); sin embargo, no existe información más detallada respecto a la reproducción y desarrollo embrionario de esta especie.

El estudio de las ranas marsupiales es un tema de alto interés debido a que presentan características únicas dentro del grupo Anura, tanto en su tipo de fertilización, como en las características embrionarias. Los embriones en desarrollo presentan branquias acampanadas o similares a hojas (Duellman, 2015). Aun así no existen descripciones formales de ningún estadio embrionario para una rana marsupial (familia Hemiphractidae) que presente desarrollo directo. Por lo tanto, esta investigación sería el primer reporte de este tipo, aportando nuevos e innovadores datos al grupo de los hemifráctidos, específicamente al género *Gastrotheca*.

El objetivo principal de esta investigación fue obtener una tabla parcial de desarrollo embrionario para *G. orophylax* por medio de microfotografías de la morfología externa de los embriones colectados. Como objetivos específicos se esperó obtener embriones de esta especie mediante la extracción de hembras grávidas. Describir morfológicamente y clasificar en estadios los embriones obtenidos. Finalmente calcular los tiempos de desarrollo de un estadio a otro.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE MATERIAL BIOLÓGICO

Se realizaron dos salidas de campo a la localidad de Santa Bárbara, provincia de Carchi, Ecuador, con el fin de colectar especímenes adultos de la rana marsupial *G. orophylax*. Se colectaron varios individuos, entre machos y hembras, a una altura de 2828 m.s.n.m. en la noche, en las coordenadas N 00°38.308' W 77°29.756. Los especímenes se encontraron al borde de la carretera, en un remanente de bosque intervenido, generalmente en plantas de la familia Gunneraceae, lejos de cuerpos de agua, a una altura aproximada de dos metros y medio del suelo. Una vez colectados se los trasladó al Laboratorio 113 de Biología del Desarrollo de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

En cuanto a las condiciones del cautiverio, los individuos se colocaron en grupos de tres (dos machos y una hembra) en terrarios plásticos de 72cm de largo por 38cm de ancho, manteniendo la humedad constante con agua ozonificada. La alimentación se la realizó dos veces por semana, siendo los grillos el principal componente de la dieta (Grillario QCAZ-PUCE). El manejo y cuidado de los especímenes se basó en el libro de Wright y Whitaker (2001) titulado "Amphibian Medicine and Captive Husbandry".

Por otro lado, una de las hembras grávidas de *G. orophylax* utilizadas en este estudio se obtuvo gracias a la colaboración de la empresa WIKIRI-Selva Viva.

4.2. EXTRACCIÓN DE EMBRIONES

Se obtuvieron hembras grávidas de *G. orophylax* por medio de dos métodos: por un lado, por reproducción espontánea de los especímenes adultos en cautiverio con cambios en la temperatura y humedad de los terrarios. Por otro lado, por medio de hembras colectadas en el campo en estado de gravidez. Como ya se ha descrito

en protocolos anteriores para *G. riobambae*, los embriones fueron extraídos del marsupio de las hembras sin afectar a la madre o al desarrollo de los otros embriones que quedan dentro (Elinson, del Pino, Townsend, Cuesta y Eichhorn, 1990).

El inicio del seguimiento de las hembras grávidas varió dependiendo de la disponibilidad de las mismas, en ciertos casos fue posible iniciar la extracción de embriones poco tiempo después del amplexus, en otros casos no, debido a que se colectó a las hembras en estado de preñez media o avanzada. Los embriones fueron removidos del marsupio de las hembras con la ayuda de una linterna de cabeza para iluminar el interior y un par de pinzas de punta roma. Se extrajo con cuidado de la bolsa un embrión a la vez. Una vez extraídos, se los colocó en placas Petri pequeñas con una solución salina High-Salt MBS, concentración 1X (Sive, Grainger y Harland, 2000). El número de embriones removidos dependió del tamaño aproximado de la puesta obtenida. Por lo general se extrajo un embrión vivo por semana.

4.3. FOTOGRAFÍAS Y FIJACIÓN DE EMBRIONES

Una vez obtenidos los embriones, se agregó 20ml de High-Salt MBS en las placas Petri pequeñas para que la solución cubra por completo al embrión. En un inicio, se retiraron las capas de gelatina de los embriones con cisteína al 2%, pH 7.8 en solución 0.1x MMR (Marc's Modified Ringer's Solution). Sin embargo, posterior a esto se realizaron tres lavados en 0.1x MMR para eliminar los restos de cisteína (Richter, 1999). A partir de la neurulación la gelatina se retiró manualmente. Una vez que las capas de gelatina fueron removidas se procedió a extraer la envoltura vitelina con un par de pinzas delgadas (Dumont Tweezer, Style 5) siguiendo el protocolo 6.2 del libro "Early Development of *Xenopus laevis*. A Laboratory Manual" (Sive et al., 2000).

Posterior a la extracción de envolturas, se tomaron fotografías digitales con luz directa a través de un estereoscopio (Zeiss - Stemi SV6) con acople de cámara

fotográfica (Infinity1-3C). El equipo estuvo enlazado a una computadora HP ProDesk 600 con el software Infinity Capture (Lumenera®) incluido. Las fotografías se tomaron en distintas magnificaciones (0.8-1.6X) dependiendo del tamaño y detalles morfológicos del embrión. Las imágenes se guardaron en formato JPG y SIF para su posterior procesamiento y edición en Adobe Photosop CC 2015, se modificó contraste e iluminación sin alterar el contenido de las imágenes.

Una vez que los embriones se fotografiaron vivos, se procedió a fijarlos en tubos de micro centrífuga de 2ml con un fijativo fosfatado denominado MEMFA 1X (0.1M MOPS pH7.5, 2mM EGTA, 1mM MgSO₄, 3.7% formaldehído) para su correcta preservación, se los mantuvo en este reactivo por 12 horas, para finalmente transferirlos a fijativo Dent's (4 Metanol: 1 DMSO) para almacenarlos a menos 20°C (Sive et al., 2000).

4.4. RECOPIACIÓN Y PROCESAMIENTO DE DATOS MORFOLÓGICOS

Se analizaron los embriones en vivo, así como sus respectivas fotografías con el fin de clasificarlos en estadios definidos. Para esto, se usaron descripciones embriológicas existentes en la literatura para *G. riobambae* (del Pino y Escobar, 1981) y la clásica tabla de desarrollo de Gosner (1960). Para esta clasificación se tomaron en cuenta características morfológicas externas de los embriones y los cambios en las mismas a lo largo del tiempo. Además, se tomaron medidas de las estructuras más importantes en los diferentes estadios que aporten información adicional en la descripción morfológica (Duellman y Trueb, 1986). Las medidas se realizaron con el software Infinity Capture.

Se realizó en base a este análisis una tabla descriptiva-morfológica del desarrollo de *G. orophylax*, así como también una tabla de tiempos entre estadios para inferir la velocidad del desarrollo.

4.5. MORFOMETRÍA Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Como complemento de este estudio, se obtuvo una hembra recién parida de *G. orophylax* con sus respectivos juveniles. Se los adaptó en terrarios para proceder con la toma de datos y el proceso de experimentación. Se seleccionaron diez individuos juveniles del total de la puesta con el fin de observar y analizar la relación del crecimiento versus la reabsorción de la cola. Para esto se colocó en terrarios pequeños individuales a los especímenes con numeración del uno al diez para identificarlos y se tomó datos de la longitud rostro-cloacal (LRC) y del largo de la cola (LC) según la metodología de Di Cerbo y Biancardi (2010). Los datos se tomaron con un calibrador digital (0-2000mm, marca Tresna) cada dos días hasta la completa reabsorción de la cola.

Finalmente, con las medidas de LRC y LC de los juveniles de *G. orophylax* se hicieron análisis estadísticos en el programa JMP 13 con el fin de analizar la relación entre el crecimiento corporal de los juveniles y la reabsorción de la cola. Se realizaron pruebas de Shapiro-Wilk para comprobar la normalidad de los datos y se transformó con logaritmo en base 10 con el fin de cumplir con los supuestos de normalidad. Posteriormente, se realizó una correlación de Pearson de la longitud rostro-cloacal (LRC) versus la longitud de la cola (LC). Adicionalmente, se realizaron gráficos de la media y desviación estándar de la longitud rostro-cloacal y la longitud de la cola con el fin de determinar una tendencia de crecimiento.

5. RESULTADOS

5.1 ESTADIOS *Gastrotheca orophylax*

Se obtuvieron cinco puestas pertenecientes a cuatro hembras adultas de *G. orophylax* (Tabla 1). En dos de las posturas fue posible evidenciar el momento del amplexus y otras características de la reproducción de esta especie (Figura 1), sin embargo, cabe recalcar que no todas llegaron a desarrollarse con normalidad hasta la eclosión. Dos de las posturas se obtuvieron al momento de nacimiento. En base a toda la información reunida de las diferentes posturas se pudo describir y analizar parcialmente las características morfológicas de los embriones en los diferentes estadios, además de realizar una tabla de tiempos del desarrollo entre un estadio y otro (Tabla 2). El estadio más temprano que se obtuvo fue el número cinco, correspondiente a clivaje según la descripción realizada por del Pino y Escobar (1981) en *Gastrotheca riobambae*.

5.1.1 ESTADIO 5

El embrión en clivaje presenta aproximadamente 16 células. Las células del polo animal son más pequeñas, llamadas micrómeros, estas en promedio miden 13.52mm de diámetro. Se observó que el polo animal tiene un clivaje más rápido. Por otro lado, el polo vegetal presentó células con abundante yema y mayor tamaño, denominadas macrómeros las cuales en promedio miden 18.85mm de diámetro. Por otro lado, el diámetro del embrión es de 41.66mm. No se tiene evidencia fotográfica de este estadio debido a que el embrión fue fijado antes de ser fotografiado en vivo, lo que hizo que las células no preserven su estructura. Doce días antes se observó la finalización del amplexus de los especímenes adultos, por lo que se estima que la edad aproximada del embrión es de doce días. Al ser este el embrión más temprano obtenido se inicia el seguimiento a partir del mismo, tomando en cuenta al clivaje como tiempo 00h00.

5.1.2. ESTADIO 8

En el estadio ocho, el embrión se encuentra en gástrula media (Figura 2A). Se distinguió un abultamiento circular en el polo vegetal que podría ser el tapón de yema. Según las medidas realizadas, este ocupa aproximadamente el 37% del total del diámetro del embrión. El tapón de yema, presentó un diámetro de 1.63mm, a diferencia del diámetro total del embrión que fue de 4.38mm. Sin embargo, esta estructura encontrada, también podría tratarse del disco embriónico. La edad aproximada del embrión es de 21 días.

5.1.3. ESTADIO 11^{1/2}

Tras el proceso de gastrulación, el embrión ya posee neuroporo anterior y posterior, los pliegues neurales se han cerrado para dar lugar al tubo neural. El embrión presenta tres pares de somitas y en la parte anterior, una estructura similar a una cabeza reconocible. Se observan los arcos branquiales con sus respectivas ramas de la cresta neural craneal denominadas: branquial, hioidea y mandibular (Figura 2B). El diámetro del embrión es de 6.11mm, mientras que la longitud del cuerpo del embrión es de 3.19mm. No se pudo estimar la edad aproximada del embrión ya que las puestas obtenidas no coincidieron entre ellas en este punto. Por lo que se tomó en cuenta a este estadio como un nuevo tiempo 00h00.

5.1.4. ESTADIO 12

Durante este estadio se observó la cabeza en posición anterior, además del neuroporo anterior que es muy evidente. Los arcos branquiales se han alargado y continúan desarrollándose como engrosamientos prominentes cada vez más visibles. Se distinguen claramente las ramas de la cresta neural craneal denominadas; branquial anterior y posterior además de la mandibular e hioidea. El embrión presenta cinco pares de somitas al lado lateral del tubo neural (Figura 3A). Mide en promedio 6.68mm de diámetro mientras que la longitud del cuerpo del embrión es de

4.42mm. La edad aproximada del embrión a partir del estadio once y medio de 12 días.

5.1.5. ESTADIO 16

Durante este estadio, el corazón se posiciona en la parte anterior a la cabeza del embrión, el cual ya presenta latido cardíaco. Las ramas de la cresta neural craneal anterior y posterior dan lugar a un par de branquias acampanadas y pequeñas que ya presentan circulación. El cuerpo del embrión presenta células pigmentadas en la parte dorsal. En la parte posterior del embrión se ha formado una separación entre la pequeña cola y resto del cuerpo (Figura 3B). Por otro lado, células sanguíneas se desarrollan en el polo vegetal distribuyéndose cada vez más sobre la yema (Figura 3C). El embrión mide en promedio 6.79mm de diámetro. Por otro lado el cuerpo del embrión mide 5.45mm de longitud. La edad aproximada del embrión a partir del estadio once y medio es de 18 días.

5.1.6. ESTADIO 17

El desarrollo del pliegue de la cabeza trae al corazón a su posición media ventral. El aparato bucal se encuentra en la parte ventral. En este punto, el embrión presenta ojos bien diferenciados y la pigmentación de la parte dorsal se vuelve gradualmente más notoria. Las branquias acampanadas han crecido en estructuras similares a discos y cubren casi todo el cuerpo del embrión con excepción de la cola. Los vasos sanguíneos que conectan cada branquia con el cuerpo se juntan para formar dos tallos branquiales bien diferenciados (Figura 3D). El embrión mide en promedio 5.70mm de diámetro. Por otro lado, el cuerpo del embrión mide 4.09mm de longitud. La edad aproximada del embrión a partir del estadio once y medio es de 23 días.

5.1.7. ESTADIO 18

El embrión aparece como un pequeño y medianamente pigmentado renacuajo en la parte superior de la masa de yema. Los ojos del embrión son visiblemente pigmentados. Las branquias acampanadas han crecido, cada una envuelve una mitad del embrión, ambas se juntan en la denominada línea media hasta cubrirlo casi por completo. Cada branquia está conectada al cuerpo del embrión por dos tallos branquiales (Figura 4A). En la cola se ha desarrollado una aleta transparente. El aparato bucal empieza a desarrollarse, pero no presenta pigmento. Los órganos internos se empiezan a desarrollar. Se observan primordios de las extremidades anteriores (Estadio 29 de Gosner) y posteriores (Estadio 28 de Gosner) (Figura 4B). Hay presencia de contracción muscular. La longitud del cuerpo del embrión es de 5.84mm. La edad aproximada del embrión a partir del estadio once y medio es de 29 días.

5.1.8. ESTADIO 19

El pliegue del opérculo se ha formado, dejando una amplia apertura de donde salen los tallos de las branquias. Este pliegue también cubre por completo las extremidades anteriores del embrión. A partir de este estadio las envolturas de protección que cubrían a los embriones se rompían al extraerlos de la bolsa, por lo que solo se los pudo fotografiar sin envolturas. La superficie dorsal del embrión, así como su cola se encuentra más pigmentada. Se observa un doblez en la yema, lo que indica el inicio del enrollamiento del tracto digestivo. Los ojos del embrión ya presentan movimiento y se encuentran totalmente pigmentados (incluso la córnea). Los primordios de las extremidades anteriores (Estadio 30 de Gosner) y posteriores (Estadio 29 de Gosner) continúan desarrollándose (Figura 4C). La boca aún no está pigmentada (Figura 4D). La longitud del cuerpo del embrión es de 10.13mm. La edad aproximada del embrión a partir del estadio once y medio es de 48 días.

5.1.9. ESTADIO 20

Durante este estadio, el pliegue del opérculo se cierra ventralmente cada vez más, cubriendo los tallos de las branquias y las extremidades anteriores. Las branquias cubren por completo el cuerpo del embrión, el cual se ha engrosado considerablemente tomando forma globular. La figura 5 muestra embriones sin la cobertura de branquias. El embrión ha crecido y su pigmentación es más oscura (Figura 5A), tiene pigmentación incluso en el techo interior de la boca (Figura 5B). El intestino se encuentra visiblemente plegado, además se observan los depósitos de carbonato de calcio en la parte anterior del embrión cerca de los ojos. Las extremidades anteriores y posteriores presentan un pie en forma de paleta (Figuras 5C y 5D) (Estadio 31 según Gosner). La longitud del cuerpo del embrión es de 12.48mm. La edad aproximada del embrión a partir del estadio once y medio es de 55 días.

5.1.10. ESTADIO 21

Al retirar la envoltura vitelina que recubre al embrión se observa que las branquias están posicionadas hacia la parte anterior de la cabeza del mismo, los tallos branquiales están cubiertos cada vez más por el opérculo que continúa cerrándose (Figuras 6A y 6 B). Se aprecia claramente el inicio de la formación de los dedos en las extremidades anteriores y posteriores (Estadio 33 de Gosner), así como la curva que separa el pie del resto de la extremidad (Figuras 6C y 6D). Las extremidades sobrepasan las 1000um de longitud y presentan poco pigmento. La longitud del cuerpo del embrión es de 14.70mm. La edad aproximada del embrión a partir del estadio once y medio es de 62 días.

5.1.11. ESTADIO 22

Las extremidades del embrión miden aproximadamente 1500um y presentan mayor pigmentación, la formación de los dedos es cada vez más evidente

(Estadio 34 según Gosner). Se observan claramente los pliegues del tracto digestivo en la parte ventral del embrión (Figuras 7A y 7B). La longitud del cuerpo del embrión es de 15.31mm. La edad aproximada del embrión a partir del estadio once y medio es de 72 días.

5.1.12. ESTADIO 23

La cabeza se separa claramente del resto del cuerpo, ésta tiene forma cada vez más similar a la de una rana juvenil. Las extremidades anteriores y posteriores (Estadio 36 de Gosner) presentan articulación por primera vez aunque éstas no son móviles todavía y presentan pigmentación abundante (Figura 7C). Se puede evidenciar el tubo de ventilación (Figura 7D). Se observa el músculo que empieza a recubrir la parte ventral del embrión a la altura del aparato digestivo. En este estadio no se pudo observar el posicionamiento de las branquias debido a una ruptura de las mismas al momento de la extracción del embrión. La longitud del cuerpo del embrión es de 19.45mm. La edad aproximada del embrión a partir del estadio once y medio es de 80 días.

5.1.13. ESTADIO 24

Durante este estadio, los dedos del pie de las extremidades están separados y bien diferenciados, se los puede apreciar individualmente. Las extremidades anteriores se abren paso a través del opérculo para quedar medianamente libres, aún no son móviles (Figura 8A). Las extremidades posteriores (Estadio 38 de Gosner) ya se mueven con facilidad. El embrión aún presenta tubo de ventilación (Figura 8B). En la parte dorsal se empieza a observar pigmentación verdosa. Los ojos del embrión presentan párpados superior e inferior. La longitud del cuerpo del embrión es de 21.25mm. La edad aproximada del embrión a partir del estadio once y medio es de 93 días.

5.1.14. ESTADIO 25

Rana juvenil al nacimiento. Los juveniles presentan una pigmentación verdosa a lo largo de todo el cuerpo, los dedos de las extremidades están muy bien desarrollados, las extremidades anteriores se han liberado por completo del pliegue del opérculo (Figura 8C) y presentan facilidad de movimiento (Estadio 42 de Gosner), el tubo de ventilación ha desaparecido (Figura 8D). La cabeza tiene forma triangular, la cola es más corta que el cuerpo del embrión. El músculo ventral ha cubierto por completo al embrión lo cual dificulta la observación del tracto digestivo. Las branquias están totalmente cubiertas por el opérculo. Se observan variaciones significativas en este estadio ya que en otra postura los embriones nacieron con branquias externas (Figura 9). La cola se encuentra parcialmente reabsorbida o no. Los juveniles son dependientes del agua y presentan boca y apariencia similar a un renacuajo con extremidades bien desarrolladas. En este estadio sucede la eclosión y nacimiento. La longitud del cuerpo del juvenil es de 26.25mm. La edad aproximada del embrión a partir del estadio once y medio es de 102 días.

5.2. MORFOMETRÍA Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se obtuvieron medidas (Ver Anexo 1) de la Longitud rostro-cloacal (LRC) y el largo de la cola (LC) de 10 individuos juveniles de *G. orophylax* a partir del nacimiento (estadio 25) hasta la reabsorción completa de la cola (Estadio 46 según Gosner) (Figura 10). Según la correlación de Pearson, se observó una relación negativa entre el crecimiento de la longitud rostro-cloacal vs. la longitud de la cola. En donde, a medida que aumenta la longitud rostro-cloacal disminuye la longitud de la cola ($r=-0.3007$) (Figura 11).

Con los gráficos de la desviación estándar y la media, se pudo corroborar dicha tendencia ya que a medida que pasa el tiempo, aumenta el tamaño del individuo y disminuye el tamaño de la cola (Figuras 12 y 13). Durante este tiempo se observó que los metamorfos no se alimentaban, su aparato digestivo estaba lleno de

yema, se observó la primera ingesta de comida (grillos) al momento de la completa reabsorción de la cola, ocho días posterior al nacimiento.

6. DISCUSIÓN

Es muy poco lo que se sabe sobre la reproducción y desarrollo de *Gastrotheca orophylax*. Pese a que el principal objetivo de este estudio fue describir y analizar el desarrollo embrionario desde el clivaje hasta la eclosión de esta especie, se pudo además cubrir múltiples aspectos de su biología reproductiva.

En primer lugar, la forma del marsupio de las hembras colectadas coincide con la descripción realizada previamente por del Pino (1980), en donde se indica que esta especie presenta un marsupio de tipo cinco. Esto significa que se extiende anterior y lateralmente desde su apertura. Además, su forma es circular, con apertura en forma de U invertida (Figura 1D). La región anterior del marsupio es más pequeña que las regiones laterales, el marsupio se mantiene dentro del espacio linfático dorsal y, cuando está con embriones, al distenderse totalmente, puede alcanzar el septo cefálico en la parte de atrás de la cabeza y lateralmente el septo ventral, ocupando ambos lados del cuerpo (Figura 1C). Según lo observado, la disposición en la que se encuentra el marsupio va a depender del estado reproductivo de la hembra (del Pino, 1983). Cuando está lista para reproducirse, el marsupio se presenta contraído. Posterior al amplexus, el marsupio está cerrado, con un pliegue presente en la entrada, mucho más ajustado (Figura 1B). Esto era de esperarse ya que la hembra debe contener a los embriones en su espalda por los próximos meses (Figura 1C). Al momento de la expulsión de los embriones el marsupio quedó relajado en forma de U hacia abajo (Figura 1D). El amplexus duró entre uno y dos días dependiendo de la puesta (Tabla 1).

En cuanto a la embriogénesis, existen diversos estudios sobre ranas con desarrollo directo en especies pertenecientes a otras familias. Por ejemplo, entre los más importantes, Townsed y Stewart (1985) describen el desarrollo directo de *Eleutherodactylus coqui*, un Leptodactylidae con reproducción terrestre. Este estudio realiza una tabla de desarrollo en base a cambios en la estructura morfológica externa. Por otro lado, de Lima et al. 2016 habla sobre los aspectos del desarrollo en

Adelophryne maranguapensis, una especie de rana de la familia Eleutherodactylidae que presenta desarrollo directo. Este estudio muy detallado se enfoca en el desarrollo de las extremidades, cola, células ciliadas de la piel y el diente del huevo. Estos estudios nos permiten entender y analizar el desarrollo embrionario directo, sin embargo, al no ser ranas marsupiales y al no presentar ninguna característica larval, difieren bastante de la especie estudiada en esta investigación. Además, pese a que existen similitudes en el desarrollo de embriones dentro de grupos de vertebrados, estas similitudes se dan posiblemente porque los embriones, de un grupo taxonómico en particular, están sometidos a condiciones ambientales similares (del Pino y Elinson, 1983). Con esta información como antecedente y al encontrar en un inicio más similitudes dentro del mismo género, se usó, como punto de comparación principal, el estudio realizado previamente por del Pino y Escobar (1981) en *Gastrotheca riobambae*. Mientras que para el desarrollo de las extremidades y parte de la metamorfosis se usó la tabla realizada por Gosner (1960).

El clivaje de *G. orophylax*, se asemeja al de *G. riobambae* en varios aspectos. Pese a que al momento de fijar se perdió calidad en la estructura de los embriones, en vivo se pudo observar que, en el clivaje de ambas especies, hay una gran diferencia en el tamaño y forma de los blastómeros del polo animal (células pequeñas y redondeadas) y vegetal (células grandes y aplanadas) durante el clivaje. El embrión presentaba una coloración amarilla pálida, sin embargo, tenía una región más blanca que indicaba el polo animal y una región más amarilla que indica el polo vegetal. Según la literatura para *G. riobambae*, los surcos de las divisiones celulares en el embrión en clivaje son muy evidentes y el polo animal se divide con mayor rapidez que el vegetal (Elinson y del Pino, 1985). En *G. orophylax* se esperaba lo mismo, sin embargo, durante este estudio, no fue posible constatar esto. En cuanto al tiempo de desarrollo, las especies sí presentaron diferencia, pese a que en ambas especies este paso es muy lento, *G. orophylax* se tarda el doble (12 días) que *G. riobambae* en llegar a clivaje (del pino y Escobar, 1981). Esto tomando en cuenta el tiempo desde la finalización del amplexus para *G. orophylax*. No hay evidencia fotográfica de este estadio.

En cuanto a la gastrulación, la diferencia en el tiempo de ambas especies es mayor, *G. orophylax* se demora 21 días desde el clivaje hasta la gástrula media, mientras que *G. riobambae* se tarda solo 4 días (del Pino y Escobar, 1981; Elinson y del Pino, 1985). Estos datos fueron tomados de una puesta de individuos adultos reproducidos en el laboratorio; pero la hembra abortó en el día 46 de gestación por lo que no se sabe si el tiempo tomado es normal o los embriones se desarrollaban muy lento por alguna falla en el desarrollo. De todas formas, los embriones estaban vivos y desarrollándose normalmente a simple vista, hasta el día 21. Debido a la coloración de los embriones, es complicado observar claramente el tapón de yema, sin embargo, se nota que esta estructura representa el 37% del diámetro total del embrión (Figura 2A). El tapón de yema consiste en un grupo de células elongadas (Moya y del Pino, 2007). Durante el proceso de gastrulación los movimientos epibólicos permitirán cubrir las células vegetales con las células animales (Elinson y del Pino, 1985).

No fue posible obtener estadios de neurulación; sin embargo, se obtuvo un estadio intermedio entre el 11 (pliegue neural) y 12 (tubo neural) según *G. riobambae*, descrito por del Pino y Escobar (1981) al que denominamos 11_{1/2} (Figura 2D). En este punto, se pudo diferenciar la parte anterior del embrión, similar a una cabeza bastante reconocible, así como el tubo neural y algunos arcos branquiales. En este estadio aún no se diferencian los arcos branquiales posterior y anterior. Las observaciones del estadio 11_{1/2} y del siguiente, correspondiente al estadio 12 (Figura 3A) nos permitió constatar la formación de cada uno de los arcos branquiales. Este proceso fue similar al de *G. riobambae*, en donde se observan los arcos branquiales posterior, anterior, hioideo y mandibular. Los dos primeros darán lugar a las branquias acampanadas con dos tallos branquiales y cuatro vascularizaciones a cada lado de la cabeza, las mismas que envolverán totalmente al embrión (Figura 3D). En el caso del arco hioideo, este dará lugar al aparato hioideo que se ubica en el piso de la boca y da soporte a la lengua. Finalmente, el arco mandibular dará lugar posteriormente a la mandíbula (del Pino y Escobar, 1981; del Pino y Medina, 1988; Duellman, 2015). *G. orophylax* también difiere con *G. riobambae* durante la

somitogénesis, en el estadio 12, la primera presenta cinco pares de somitas, mientras que la segunda presenta seis pares en el mismo estadio. El proceso de somitogénesis es muy variable dependiendo de cada especie (Gatherer y del Pino, 1992).

En cuanto a las extremidades, los primordios se desarrollaron en el mismo estadio reportado para *G. riobambae*, estadio 18, (Figuras 4A y 4B). Como en otros estudios de ranas con desarrollo directo, los primordios de las extremidades tanto anteriores como posteriores surgen simultáneamente, sin embargo, salen mucho más tarde en comparación con otras especies. Por ejemplo, en *Adelophryne maranguapensis* los primordios de las extremidades ya son visibles en estadio de gástrula tardía o inicio de neurulación, lo mismo sucede con *Eleutherodactylus coqui* (de Lima et al., 2016; Townsend y Stewart). Las extremidades anteriores en esta especie están cubiertas completamente por el pliegue del opérculo, esta estructura también se encargará de cubrir las branquias más adelante. El desarrollo del opérculo ha sido muy bien estudiado en *E. coqui*, sin embargo, al ser éste un desarrollador directo clásico se demuestra que los denominados pliegues dermales son homólogos a los pliegues del opérculo en ranas con metamorfosis (Callery y Elinson, 2000). *G. orophylax* presenta claramente cámara opercular y pliegue del opérculo. También se observan diferencias con respecto al tracto digestivo, *G. orophylax* empieza a formar pliegues en el intestino a partir del estadio 19 en donde se ve el primer doblez de la yema (Figura 4C), mientras que en *G. riobambae*, en el estadio 19 ya se evidencia claramente el intestino enrollado (del Pino y Escobar, 1981).

A diferencia de las otras estructuras morfológicas, el desarrollo de la boca (Figuras 4B, 5B y 6B, 7B) sí se ha estudiado en detalle para esta especie. Wasserug y Duellman (1984) hacen un estudio muy completo sobre las estructuras orales y su desarrollo en diferentes especies de la familia Hemiphractidae. Aquí se describe la boca de individuos juveniles de *G. orophylax* en estadio 34 según Gosner (1960) y se diferencian varias estructuras internas y externas. Entre ellas, las mandíbulas con cobertura parcialmente queratinizada, denticulos ausentes, piso de la boca en forma

de diamante, filtros de las branquias, velo ventral y trampas para comida, branquias filamentosas y proyecciones bucales y papilas. Todas estas estructuras permitieron a los autores determinar que la boca de esta especie es similar a la de un renacuajo.

El nacimiento de los juveniles durante este estudio, en las tres puestas observadas, fue distinto al encontrado en la literatura que corresponde a ranas con desarrollo directo. En ningún caso nacieron como ranas juveniles idénticas a sus progenitores. Los juveniles presentaron al nacer patas bien desarrolladas, fueron dependientes del agua y con cola sin reabsorber (Figuras 8C y 8D). Presentaban el intestino lleno de yema (Figura 9A), por lo que no se alimentaron hasta ocho días después, luego de que el intestino esté casi sin yema y posterior a que reabsorbieran la cola por completo. Esta descripción de nacimiento corresponde a una larva de vida libre endotrófica ya que los juveniles no se alimentaron al nacer y consumieron la yema disponible, dada durante la vitelogénesis, como fuente de energía. Este tipo de nacimiento ha sido reportado anteriormente dentro de la familia Hemiphractidae, en los géneros *Fritziana* y *Flectonotus* (Duellman y Gray, 1983; Weygoldt y de Carvalho e Silva, 1991), mas no en el género *Gastrotheca*.

Por otro lado, todos los juveniles nacieron en estadio 25, con leve variación en la reabsorción de la cola, pero con las mismas características en el desarrollo de las patas, boca y con ausencia del tubo de ventilación (Figura 8D). Además, dependiendo de la puesta, presentaron variaciones en cuanto a las branquias (Figura 9). En una de las tres puestas, los metamorfos presentaban branquias externas funcionales (con circulación), mientras que, en las dos puestas restantes, al nacer, el opérculo cubría las branquias por completo. Este suceso es muy extraño ya que, durante la descripción del desarrollo de esta especie, se pudo evidenciar el proceso de reabsorción de las branquias (Figuras 4C, 6B, 8C). Esto sugiere una plasticidad al momento del nacimiento, lo cual podría ser debido a condiciones ambientales variables, por amenaza, estrés u otras razones como ya se ha reportado antes en varios estudios sobre anfibios (Buckley, Michael y Irschick, 2005; Warkentin, 2011;

Warkentin, 2012). En este caso se observa que pueden nacer con branquias reabsorbidas o externas y sobrevivir sin ningún inconveniente hasta su adultez.

Debido a que no se contaba con que los juveniles de esta especie iban a nacer aún dependientes del agua y con cola, se realizó un estudio complementario sobre la reabsorción de la cola. Tomando en cuenta la relación entre el crecimiento de la longitud rostro-cloacal y la reducción de la longitud del largo de la cola. Éste, como era de esperarse, arrojó resultados similares a estudios realizados anteriormente para otras especies con desarrollo bifásico (Di Cerbo y Biancardi, 2010), en donde a medida que el individuo crece, el tamaño de la cola disminuye. A partir del nacimiento la cola se reabsorbió en ocho días.

Con los datos obtenidos de cada puesta y luego de clasificar los embriones dentro de los diferentes estadios, se calculó el tiempo aproximado de desarrollo de un estadio a otro, para obtener una figura que resuma todos los tiempos tomados (Figura 14). No fue posible obtener el tiempo entre el estadio 8 y 11_{1/2} debido a que ninguna de las puestas coincidió entre ellas en este punto, sin embargo con los datos colectados se obtuvo un valor total aproximado de 123 días de desarrollo, esto sin tomar en cuenta el tiempo en el que se tarda el embrión desde el amplexus hasta el clivaje (nuestro tiempo 0), sin tomar en cuenta el vacío de tiempo antes mencionado del estadio 8 al 11_{1/2} ni el dato de que esta especie presenta desarrollo asíncrono. Se llegó a esta última afirmación, ya que luego de analizar los resultados obtenidos, se encontró que dentro del marsupio de una misma hembra no todos los embriones estaban en igual estadio de desarrollo. Esto puede deberse a que los huevos son fecundados en distintos tiempos o que, por alguna otra razón haya variación de temperatura o disponibilidad de espacio dentro del marsupio de la hembra. Por todas estas razones, los tiempos de desarrollo entre estadios son una aproximación a la realidad, mas no valores exactos, ya que se pueden presentar variaciones de muchos tipos.

Cabe recalcar que obtener cada una de las puestas fue muy complicado, fue muy difícil reproducir estos animales en cautiverio, no es fácil obtener una hembra en estado temprano de gravidez para obtener todos los estadios en secuencia, e incluso, si esto sucede, la hembra puede abortar sus embriones antes de completarse el desarrollo. Pese a esto, el nacimiento como ranas juveniles en esta especie, es reportado por primera vez por Duellman y Pyles (1980), lo que lleva a clasificar a *G. orophylax* como una rana con desarrollo directo. Algunos otros estudios posteriores a éste, continúan mencionando que el nacimiento se da de este modo. Sin embargo, del pino y Escobar (1981) reporta que el nacimiento en laboratorio se da en agua y los embriones nacen similares a renacuajos. Éste reporte, más los datos colectados durante ésta investigación, nos lleva a plantear la interrogante de si esta especie presenta realmente desarrollo directo y si esta forma de nacimiento, dependiente del agua, es una excepción por nacer en laboratorio o es una forma tan común como la producción de ranas juveniles en esta especie.

El desarrollo directo, por definición significa que la embriogénesis es caracterizada por la ausencia de estadio larval, es decir, que el embrión procede a generar directamente una rana juvenil (Gilbert, 2014). También se conoce que, en el desarrollo directo, los anfibios omiten el estadio de larva de vida libre, dejando su reserva de yema que nutre al huevo que se coloca en suelo húmedo u hojas de plantas (de Lima et al., 2016). Pese a que se ha reportado que en Hemiphractidae, algunas larvas de ranas con desarrollo directo se parecen a renacuajos antes de nacer como ranas juveniles y que, en laboratorio, esta especie en particular, nace dependiente del agua, se sigue clasificando como desarrollador directo a *G. orophylax*.

La historia de vida ancestral de la mayoría de anfibios es bifásica, lo que significa que los embriones se desarrollan en larvas que pueden alimentarse, nadan en hábitats acuáticos y pasan por metamorfosis para alcanzar la forma adulta (Callery, 2006; Duellman y Trueb, 1994). Esto en parte es cierto para la especie que se estudia en esta investigación, ya que los embriones se desarrollan básicamente

como larvas acuáticas con extremidades bien desarrolladas. Sin embargo, no pueden alimentarse debido a la gran cantidad de yema acumulada en su tracto digestivo (característica peculiar de las ranas con desarrollo directo o larvas de vida libre endotróficas). Otra característica larval que presenta esta especie es en cuanto a las extremidades. En ranas con desarrollo directo, los primordios de las extremidades (anteriores y posteriores) aparecen poco después del cierre del surco neural y antes de que los primordios de las branquias aparezcan. En los embriones acuáticos las branquias ya se han desarrollado y están parcialmente cubiertas por el opérculo antes de que los primordios de las extremidades aparezcan (Gosner, 1960; Townsend y Stewart, 1985). Éste último es el caso de *G. orophylax*.

Todo esto ha dejado a *G. orophylax* sin una clasificación definida en cuanto a su modo reproductivo. Por lo que, con el fin de esclarecer su posición, se realizó una tabla comparativa (Tabla 3) que contrasta los distintos modos reproductivos y analiza diferencias y similitudes entre las distintas características presentes durante el desarrollo. *G. orophylax* no comparte casi ningún rasgo con la especie modelo de desarrollo directo: *Eleutherodactylus coqui*. Mientras que, con el modelo para ranas marsupiales: *G. riobambae*, comparte un par de características como: la presencia de branquias acampanadas, opérculo y el intestino enrollado (del Pino y Escobar, 1981). Sin embargo, se observa que comparte con el género *Fritziana* (que presenta larva de vida libre endotrófica), varias características importantes que definen al modo reproductivo. Por ejemplo: 1) Aparecimiento simultáneo de los primordios de las extremidades, posterior al aparecimiento de las branquias. 2) Larva de vida libre, dependiente del agua que no se alimenta. 3) Extremidades bien desarrolladas al nacer y cola. 4) Presencia de gran reserva de yema (Duellman y Gray, 1983).

Por lo tanto, se propone que se incluya a *G. orophylax* dentro de la clasificación número dos de modos reproductivos, correspondiente a una larva de vida libre endotrófica que no se alimenta. Debido a que según lo observado en este estudio no encaja dentro de las ranas con desarrollo directo, ni dentro de las ranas que producen larvas de vida libre que se alimentan.

7. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, se pudo cumplir con los objetivos propuestos al inicio de esta investigación. Se obtuvo una tabla parcial de tiempos entre estadios para el desarrollo de *G. orophylax* y una descripción detallada de la morfología externa de los embriones gracias a las fotografías tomadas de los mismos, ya sean vivos y/o fijados.

Se obtuvieron cinco diferentes puestas provenientes de cuatro hembras adultas, colectadas de la localidad de Santa Bárbara (Carchi, Ecuador). No fue posible dar seguimiento a todas las hembras desde el momento del amplexus, algunas ya se colectaron en estado avanzado de preñez. Por esta razón los tiempos son un estimado de la recopilación de datos de varias puestas. Se describió un total de catorce estadios embrionarios para esta especie, entre el clivaje y la eclosión. Sin embargo, posterior al nacimiento se prosiguió la observación de algunos juveniles hasta el fin de la metamorfosis, donde estos ya habían reabsorbido por completo la cola.

El desarrollo embrionario de la especie en estudio presentó varias semejanzas con *G. riobambae*, sin embargo, también presenta algunas variaciones en los tiempos y varias características morfológicas como el desarrollo de extremidades anteriores o la diferencia de tiempo en el inicio del enrollamiento del intestino.

El estudio complementario sobre la reabsorción de la cola en esta especie fue exitoso y se adapta a otros estudios similares en los que la longitud rostro cloacal crece a medida que la longitud de la cola se reduce en especies bifásicas.

Durante este estudio, no se obtuvieron ranas juveniles independientes del agua al momento del nacimiento en ninguno de los eventos de reproducción, por esto y por varias otras características se sugiere clasificar a esta especie como larva de vida libre endotrófica que se alimenta.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altig, R. y Johnston, G. F. (1989). Guilds of anuran larvae: relationships among developmental modes, morphologies, and habitats. *Herpetological monographs*, 81-109.
- Blackburn, D. C. y Duellman, W. E. (2013). Brazilian marsupial frogs are diphyletic (Anura: Hemiphractidae: Gastrotheca). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 68(3), 709–714.
- Buckley, C. R., Michael, S. F. y Irschick, D. J. (2005). Early hatching decreases jumping performance in a direct-developing frog, *Eleutherodactylus coqui*. *Functional ecology*, 19(1), 67-72.
- Callery, E. M. (2006). There's more than one frog in the pond: A survey of the Amphibia and their contributions to developmental biology. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 17, No. 1, pp. 80-92). Academic Press.
- Callery, E. M. y Elinson, R. P. (2000). Opercular development and ontogenetic reorganization in a direct-developing frog. *Development genes and evolution*, 210(7), 377-381.
- Coloma, L., Ron, S., Lynch, J. y Almeida, D. (2004). *Gastrotheca orophylax*. The IUCN Red List of Threatened Species. Retrieved October 11, 2016, from <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T55349A11297121.en>.
- de Lima, A. V., Reis, A. H., Amado, N. G., Cassiano-Lima, D., Borges-Nojosa, D. M., Oriá, R. B. y Abreu, J. G. (2016). Developmental aspects of the direct-developing frog *Adelophryne maranguapensis*. *genesis*, 54(5), 257-271.
- del Pino, E. M. (1980). Morphology of the pouch and incubatory integument in marsupial frogs (Hylidae). *Copeia*, 10-17.
- del Pino, E. M. (1983). Progesterone induces incubatory changes in the brooding pouch of the frog *Gastrotheca riobambae* (Fowler). *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 227(1), 159-163.
- del Pino, E.M. y Elinson, R.P. (1983). A novel development pattern for frogs: gastrulation produces an embryonic disk. *Nature*, 306, 589-591.
- del Pino, E. M. y Escobar, B. (1981). Embryonic stages of *Gastrotheca riobambae* (Fowler) during maternal incubation and comparison of development with that of other egg- brooding hylid frogs. *Journal of Morphology* 167:277–295.

- del Pino, E. M. y Loor-Vela, S. (1990). The pattern of early cleavage of the marsupial frog *Gastrotheca riobambae*. *Development*, 110(3), 781-789.
- del Pino, E. M. y Medina, A. (2003). Neural development in the marsupial frog *Gastrotheca riobambae*. *International Journal of Developmental Biology*, 42(5), 723-731.
- Di Cerbo, A.R. y Biancardi, C.M. (2010). Morphometric study on tadpoles of *Bombina variegata* (Linnaeus, 1758) (Anura; Bombinatoridae). *Acta Herpetologica*, 5 (2), 223-231.
- Duellman, W. E. (2015). *Marsupial Frogs: Gastrotheca & Allied Genera*. Maryland: Johns Hopkins University Press.
- Duellman, W. E. y Chavéz, G. (2010). Reproduction in the marsupial frog *Gastrotheca testudinea* (Anura: Hemiphractidae). *Herpetology Notes*, 3, 87-90.
- Duellman, W. E. y Gray, P. (1983). Developmental biology and systematics of the egg-brooding hylid frogs, genera *Flectonotus* and *Fritziana*. *Herpetologica*, 333-359.
- Duellman, W.E. y Hills, D.M. (1987). Marsupial Frogs (Anura: Hylidae: *Gastrotheca*) of the Ecuadorian Andes: Resolution of Taxonomic Problems and Phylogenetic Relationships. *Herpetologica*, 43, 141-173.
- Duellman, W. E. y Maness, S. J. (1980). The reproductive behavior of some hylid marsupial frogs. *Journal of Herpetology*, 213-222.
- Duellman, W.E. y Pyles, R.A. (1980). A new marsupial frog (Hylidae: *Gastrotheca*) from the Andes of Ecuador. *Occasional papers of the Museum of Natural History. The University of Kansas*, 84, 1-3.
- Duellman, W. E. y Trueb, L. (1986). *Biology of amphibians*. JHU press.
- Elinson, R. P. y del Pino, E. M. (1985). Cleavage and gastrulation in the egg-brooding, marsupial frog, *Gastrotheca riobambae*. *Development*, 90(1), 223-232.
- Elinson, R.P., del Pino, E.M., Townsend, F.C. y Eichhorn, P. (1990). A practical guide to the developmental biology of terrestrial-breeding frogs. *Biological Bulletin*, 179, 163-177.
- Frolich, L.M., Schultz, N., Almeida, D. y Nogales, F. (2005). *Las ranas de los Andes Norte de Ecuador: Cordillera Oriental*. Quito-Ecuador.

- Gatherer, D. y del Pino, E. M. (2002). Somitogenesis in the marsupial frog *Gastrotheca riobambae*. *International Journal of Developmental Biology*, 36(2), 283-291.
- Gilbert, S. F. (2014). *Developmental Biology* (Tenth Edition). Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.
- Goldberg, J., Candiotti, F. V. y Akmentins, M. S. (2012). Direct-developing frogs: ontogeny of *Oreobates barituensis* (Anura: Terrarana) and the development of a novel trait. *Amphibia-Reptilia*, 33(2), 239-250.
- Gomez-Mestre, I., Pyron, R. A. y Wiens, J. J. (2012). Phylogenetic analyses reveal unexpected patterns in the evolution of reproductive modes in frogs. *Evolution*, 66(12), 3687-3700.
- Gosner, K. L. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16(3), 183-190.
- Icochea, J., Coloma, L.A., Ron, S., Reichle, Steffen., Angulo, A. y Cisneros-Heredia Diego. (2004). *Gastrotheca testudinea*. The IUCN Red List of Threatened Species. Retrieved October 18, 2016, from <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T55361A11299009.en>
- Moya, I.M., Alarcón, I. y del Pino, E.M. (2007). Gastrulation of *Gastrotheca riobambae* in comparison with other frogs. *Developmental Biology*, 304, 467-478.
- Rabb, G.B. y Snedigar, R. (1960). Observations on breeding and development of the Surinam toad, *Pipa pipa*. *Copeia*, 1960, 40-44.
- Ritcher, J.D. (1999). *A comparative methods approach to the study of oocytes and embryos*. New York: Oxford University Press.
- Ron, S. R., Guayasamin, J. M., Yanez-Muñoz, M. H., Merino-Viteri, A. Ortiz, D. A. y Nicolalde, D. A. (2016). AmphibiaWebEcuador. Version 2016.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Retrieved November 7, 2016, from <http://zoologia.puce.edu.ec/Vertebrados/anfibios>
- Sive, H.L., Grainger, R.M. y Harland, R.M. (2000). *Early development of Xenopus laevis, a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schmid, M., Steinlein, C., Bogart, J.P., Feichtinger, W., Haaf, T., Nanda, I., del Pino, E.M., Duellman, W.E. y Hedges, S.B. (2012). The hemiphractid frogs: phylogeny, embryology, life history, and cytogenetics. *Cytogenetic and Genome Research*, 138(2-4), 69-384.
- Townsend, D. S. y Stewart, M. M. (1985). Direct development in *Eleutherodactylus coqui* (Anura: Leptodactylidae): a staging table. *Copeia*, 423-436.

- Warkentin, K. M. (2011). Environmentally cued hatching across taxa: embryos respond to risk and opportunity. *Integrative and Comparative Biology*, 51(1), 14-25.
- Warkentin, K. M. (2012). Plasticity of hatching in amphibians: evolution, trade-offs, cues and mechanisms. *Integrative and comparative biology*, 51(1), 111-127.
- Wassersug, R. J. y Duellman, W. E. (1984). Oral structures and their development in egg-brooding hylid frog embryos and larvae: Evolutionary and ecological implications. *Journal of morphology*, 182(1), 1-37.
- Weygoldt, P. y de Carvalho e Silva, S. P. (1991). Observations on mating, oviposition, egg sac formation and development in the egg-brooding frog, *Fritziana goeldii*. *Amphibia-Reptilia*, 12(1), 67-80.
- Wiens, J. J., Fetzner Jr, J. W., Parkinson, C. L. y Reeder, T. W. (2005). Hylid frog phylogeny and sampling strategies for speciose clades. *Systematic Biology*, 54(5), 778-807.
- Wiens, J. J., Kuczynski, C. A., Duellman, W. E. y Reeder, T. W. (2007). Loss and re-evolution of complex life cycles in marsupial frogs: does ancestral trait reconstruction mislead?. *Evolution*, 61(8), 1886-1899.
- Wright, K.M. y Whitaker, B. R. (2001). *Amphibian Medicine and Captive Husbandry*. Malabar: Krieger Publishing Company.

10. FIGURAS

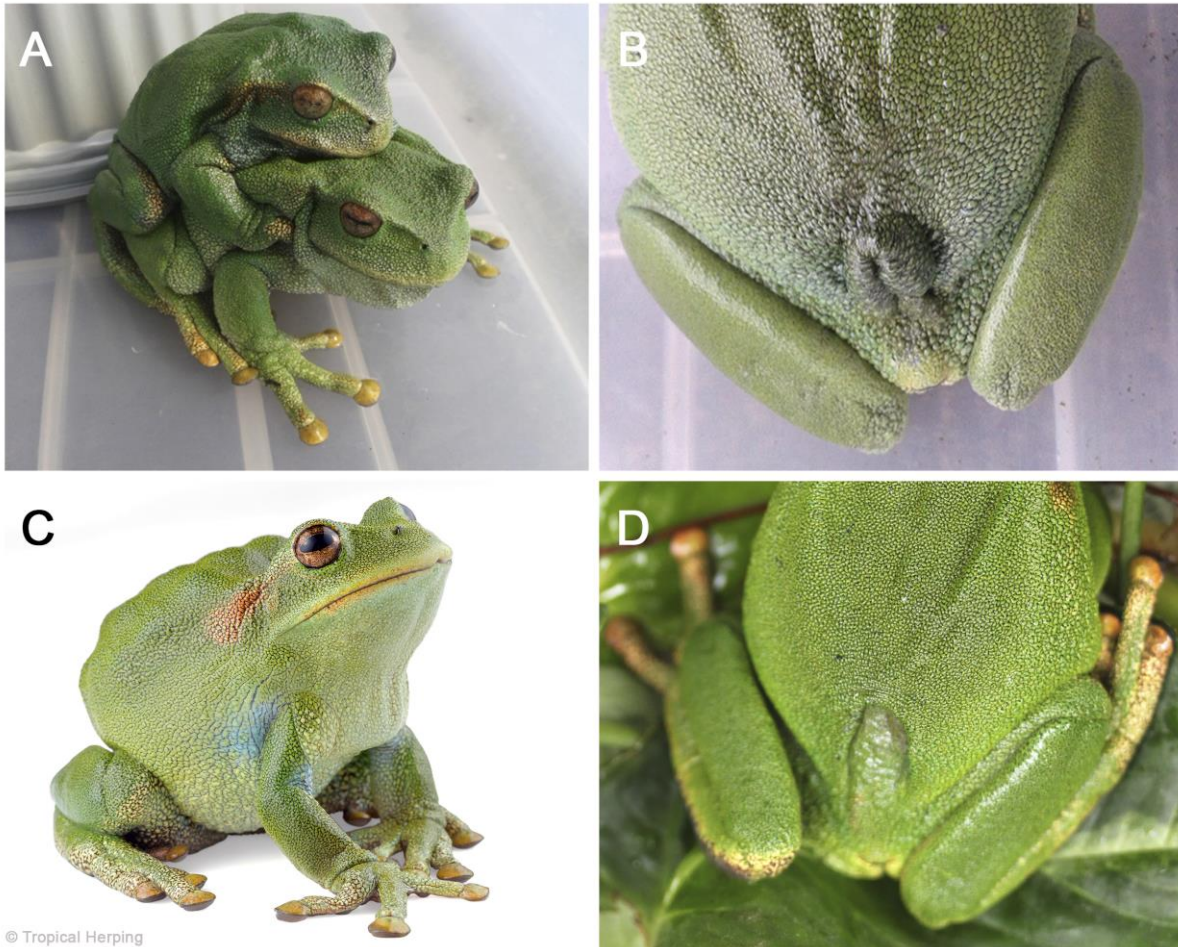


Figura 1. Reproducción de *Gastrotheca orophylax*. (A) Amplexus axilar. Hembra y macho adultos mantenidos en cautiverio durante un año y ocho meses colectados en la localidad de Santa Bárbara (Carchi, Ecuador). **(B)** Detalle de la abertura de la bolsa de la hembra posterior al amplexus. Bolsa cerrada **(C)** Hembra en estado de incubación embrionica, se observan los embriones a manera de pequeños abultamientos en la espalda. **(D)** Detalle de la abertura de la bolsa posterior al nacimiento de los juveniles. Bolsa abierta.

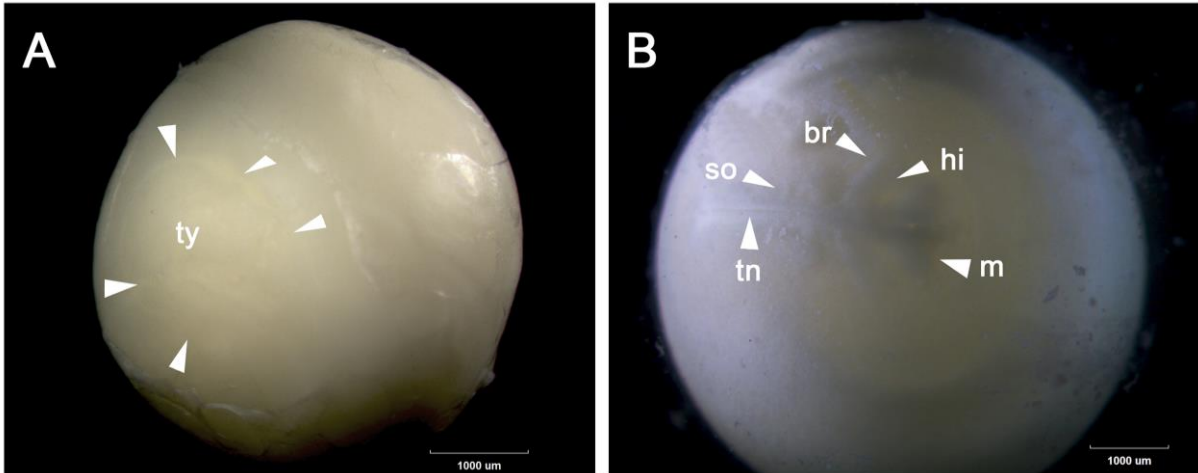


Figura 2. Estadios embrionarios 8 y 11^{1/2} de *Gastrotheca orophylax*. (A) Embrión en estadio ocho, correspondiente a gástrula media, se observa el tapón de yema (ty) en el polo animal, las flechas bordean esta estructura. También podría tratarse del disco embrionario. **(B)** Embrión en estadio once y medio, correspondiente a neurulación. Se identifica el tubo neural (tn), las ramas: mandibular (m), hioideo (hi) y branquial (br) de la cresta neural cranial, los tres pares de somitas (so) presentes y el neuroporo anterior y posterior.

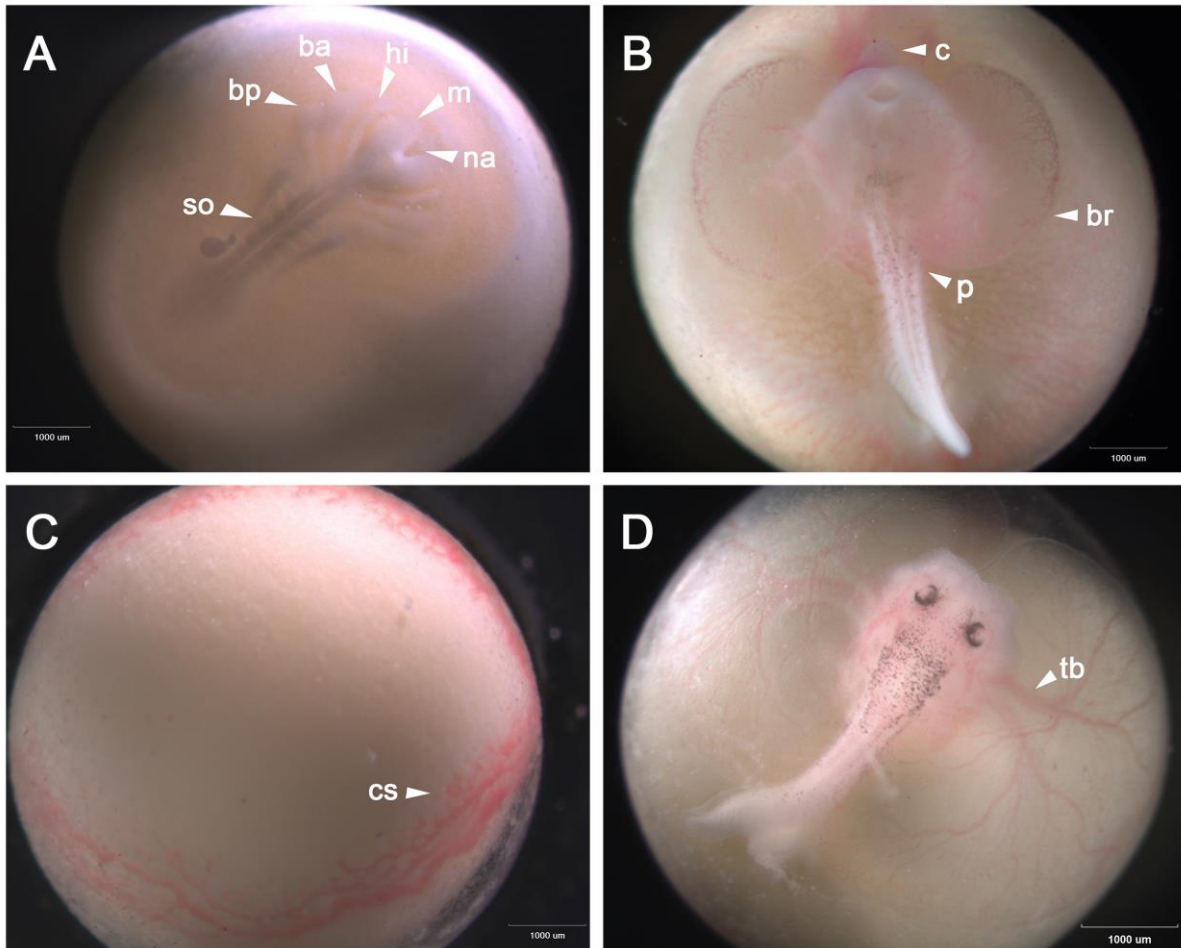


Figura 3. Estadios embrionarios 12, 16 y 17 de *Gastrotheca orophylax*. (A) Embrión en estadio 12. Las ramas de la cresta neural cranial se han alargado hasta hacerse muy notorios, se diferencian claramente las ramas: mandibular (m), hioideo (hi), branquial anterior (ba) y branquial posterior (bp) que ocupan sus respectivos arcos branquiales. El embrión presenta neuroporo anterior (na) y cinco pares de somitas (so). (B) Embrión en estadio 16, vista del polo animal. Presenta una cabeza reconocible. Se han formado un par de branquias acampanadas (br) que ya presentan circulación y cubren parcialmente la cabeza. Se observa el corazón (c) en posición anterior a la cabeza, el mismo que ya presenta latidos y pigmentación en la parte dorsal (p). (C) Vista vegetal de un embrión en estadio 16, vista de las células sanguíneas (cs). (D) Embrión en estadio 17. El corazón ya no se encuentra en la parte anterior a la cabeza. La parte dorsal del embrión ya se encuentra pigmentada, se observan ojos reconocibles y dos tallos branquiales (tb) a cada lado de la cabeza.

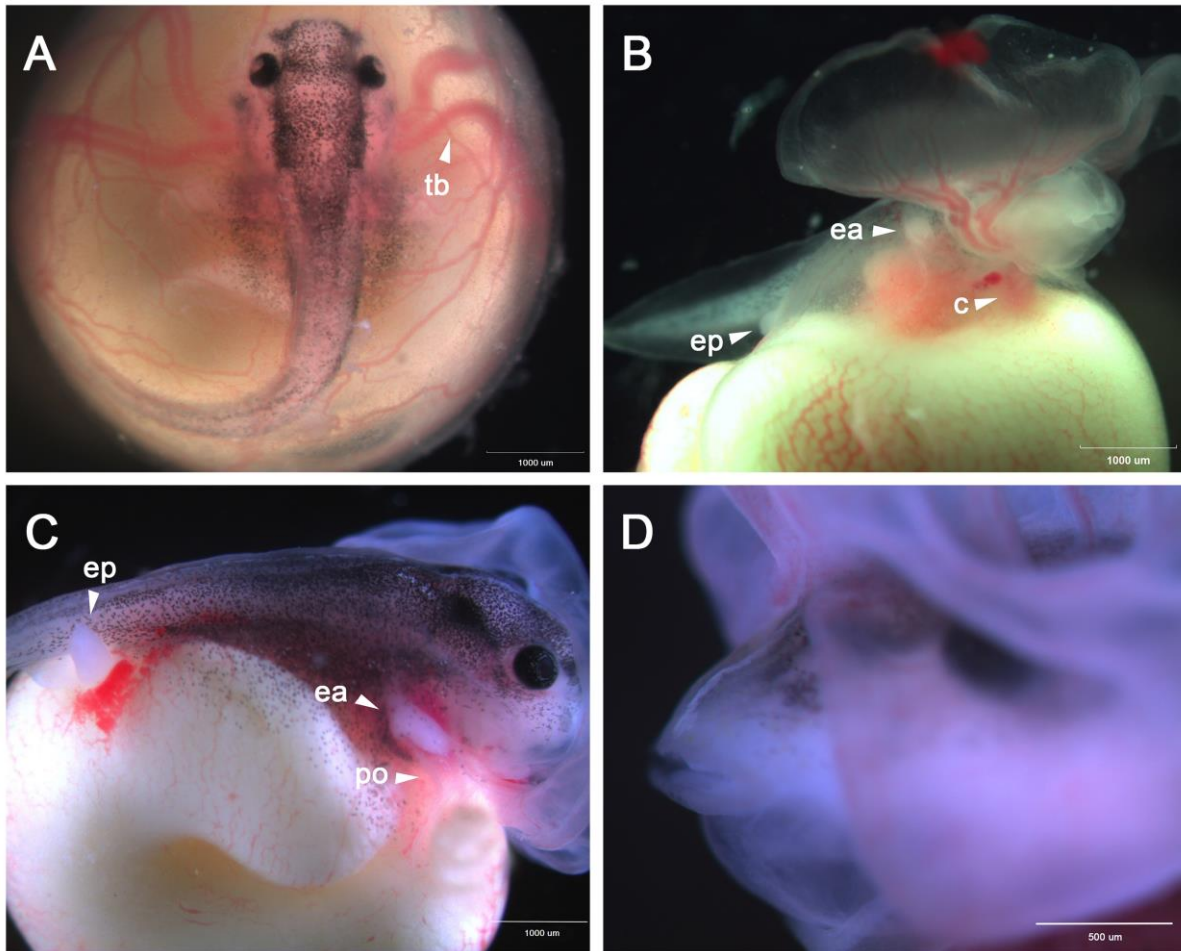


Figura 4. Estadios embrionarios 18, y 19 de *Gastrotheca orophylax*. **(A)** Embrión en estadio 18, se observan claramente los tallos branquiales (tb) a cada lado de la cabeza del embrión, así como las branquias acampanadas. La pigmentación está distribuida la parte dorsal, incluyendo los ojos. **(B)** Embrión en estadio 18, vista lateral, sin envoltura vitelina. Se observan los primordios de extremidades anteriores (ea) y posteriores (ep), el corazón (c) anterior y la boca sin pigmento. **(C)** Embrión en estadio 19, vista lateral, sin envoltura vitelina, el pliegue del opérculo (po) es evidente y cubre por completo las extremidades anteriores (ea), así como parte de los tallos branquiales. Las extremidades posteriores (ep) continúan desarrollándose. El embrión presenta el primer doblez en su yema que marca el inicio del enrollamiento del intestino. Ojos completamente pigmentados. **(D)** Embrión en estadio 19. Vista lateral de la boca, aún no presenta pigmentación.

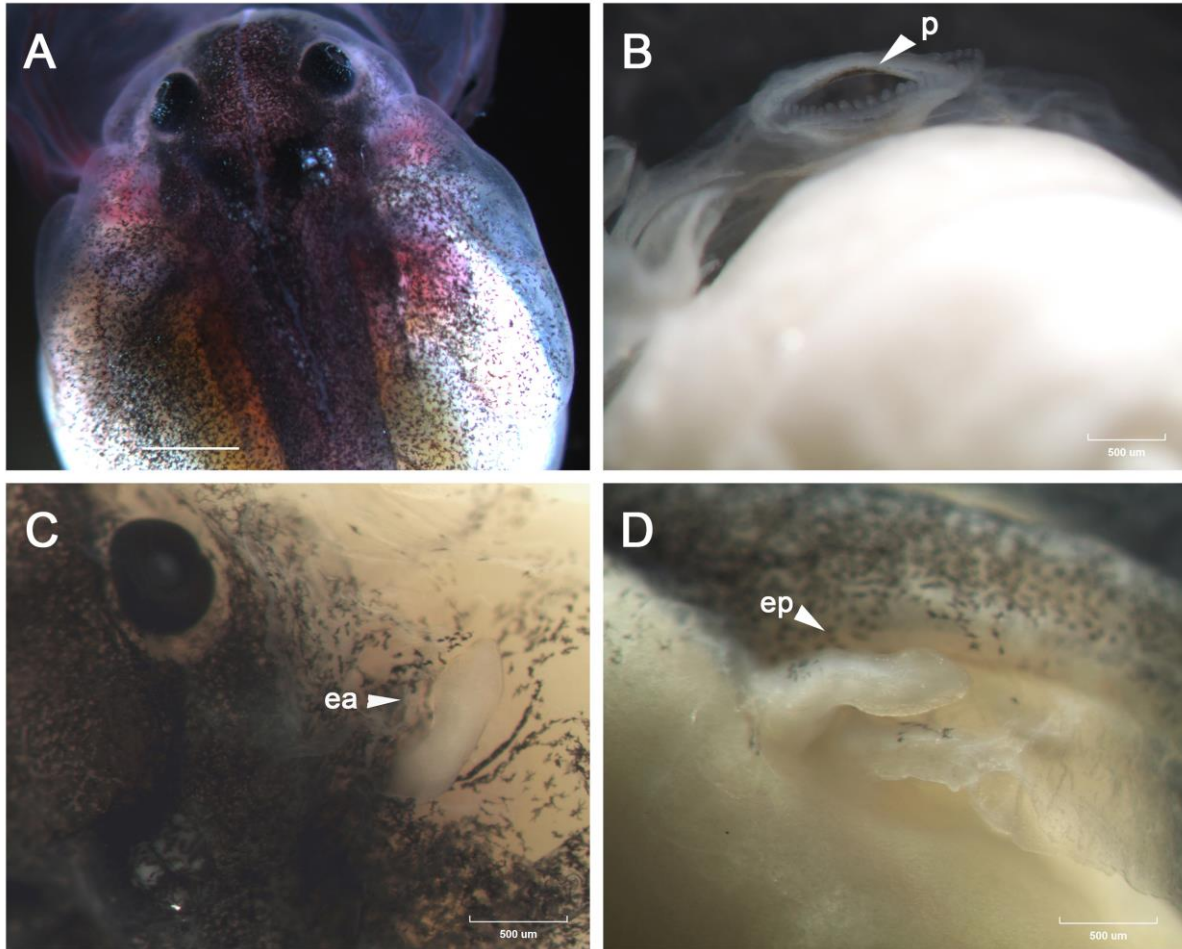


Figura 5. Estadio embrionario 20 de *Gastrotheca orophylax*. (A) Vista dorsal de embrión en estadio 20, el cuerpo presenta forma globular. Al no presentar envoltura vitelina, las branquias acampanadas se despliegan hacia la parte anterior del embrión sin cubrirlo. (B) Detalle de la boca ligeramente pigmentada (p) en la parte superior. (C) Extremidad anterior (ea) manualmente liberada del pliegue del opérculo, presenta pie en forma de paleta. (D) Extremidad posterior (ep) con pie en forma de paleta.

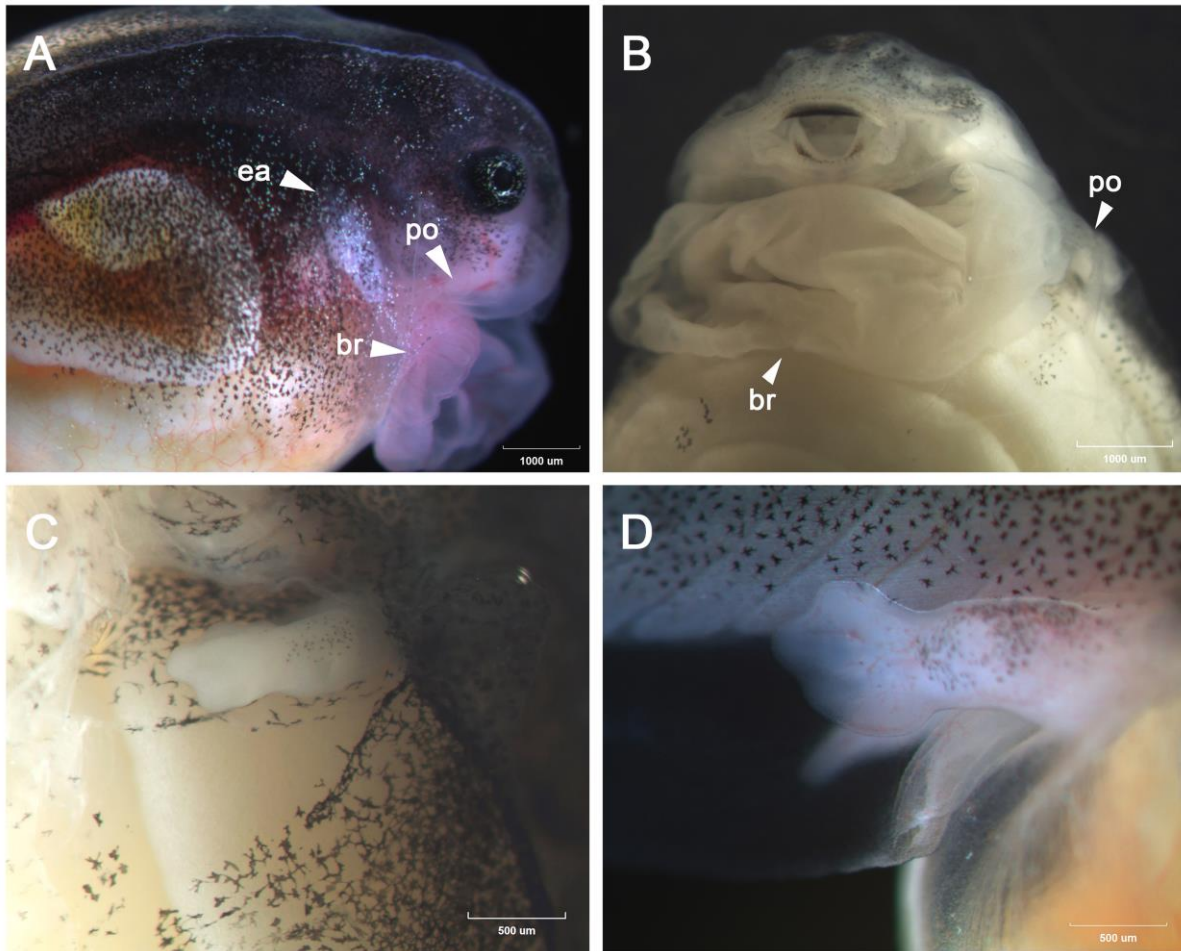


Figura 6. Estadio embrionario 21 de *Gastrotheca orophylax*. **(A)** Vista lateral de embrión en estadio 21 sin envoltura vitelina. Los tallos de las branquias acampanadas (br) se encuentran cada vez más cubiertos por el pliegue del opérculo (po), las branquias están hacia la parte anterior del embrión. Se observa una de las extremidades anteriores (ea) bajo el opérculo. **(B)** Detalle de la boca pigmentada en la parte superior e inferior. Pliegue del opérculo (po) cubriendo gran parte de las branquias (br). **(C)** Extremidad anterior manualmente liberada del pliegue del opérculo, presenta inicio de formación de los dedos. **(D)** Detalle de la extremidad posterior con inicio de formación de dedos.

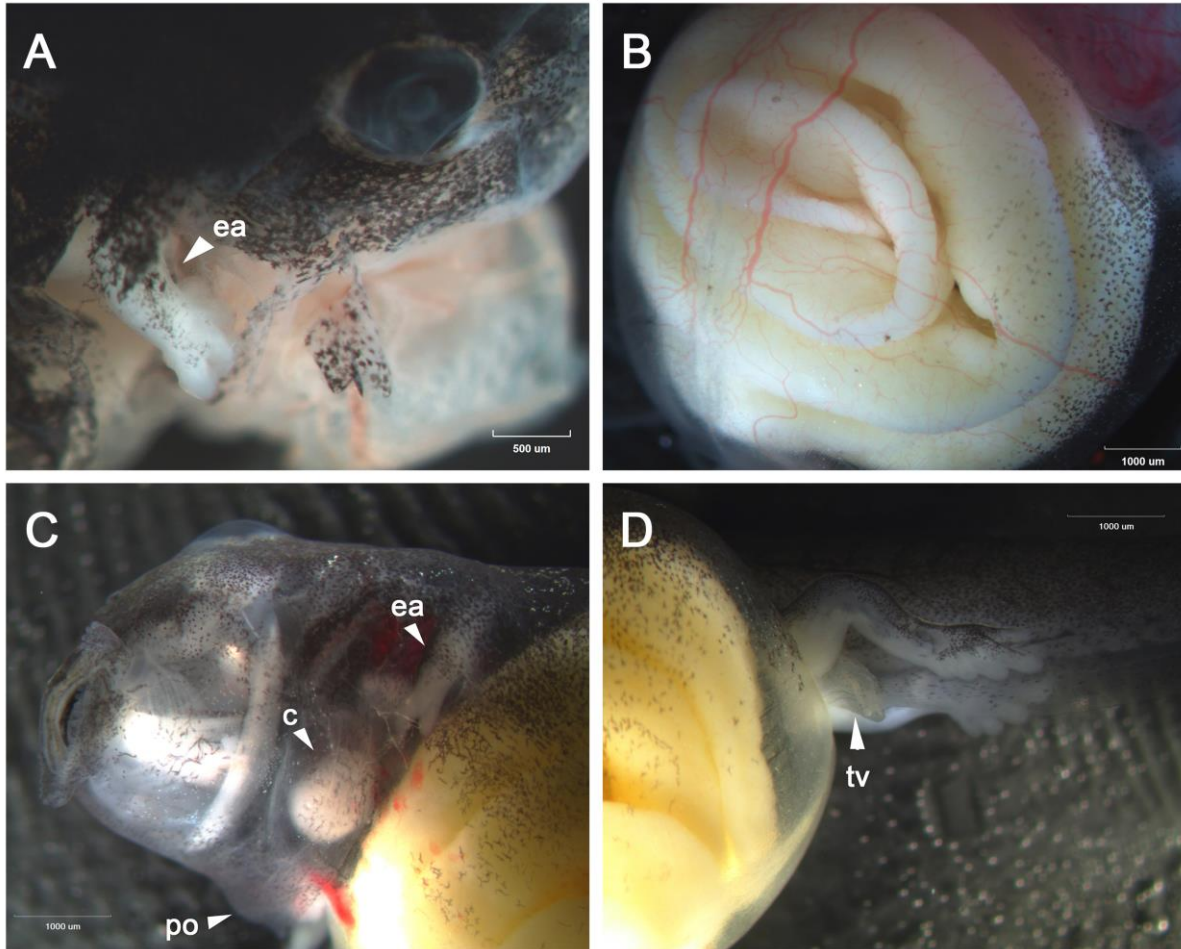


Figura 7. Estadio embrionario 22 y 23 de *Gastrotheca orophylax*. (A) Vista lateral de embrión en estadio 22 sin envoltura vitelina, se observa el detalle de la extremidad anterior (ea) con sus dedos al ser liberada manualmente del pliegue del opérculo. (B) Detalle del plegamiento del tracto digestivo en embrión estadio 22. Vista ventral. (C) Vista ventral de embrión estadio 23, se observa el corazón (c) y las extremidades anteriores (ea) cubiertas por el pliegue del opérculo (po). Las branquias no son visibles debido a una ruptura de las mismas al momento de la extracción del embrión del marsupio de la hembra. (D) Detalle de las extremidades posteriores con articulación y dedos. Se observa el tubo de ventilación (tv).

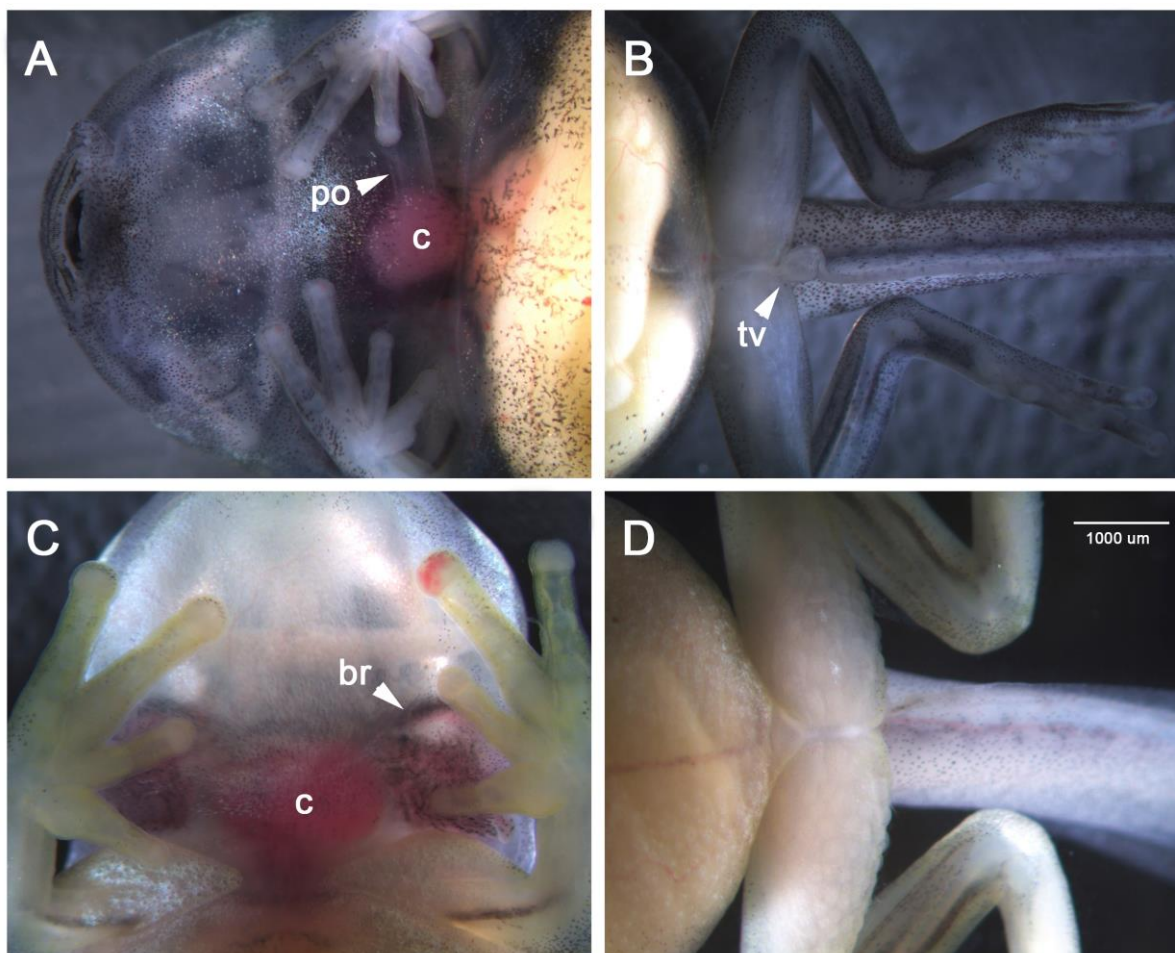


Figura 8. Estadio embrionario 24 y 25 de *Gastrotheca orophylax*. (A) Vista ventral-anterior de embrión en estadio 24. Se observa el corazón (c) y las extremidades anteriores parcialmente fuera del pliegue del opérculo (po). (B) Vista ventral-posterior del embrión en estadio 24, se observa el tubo de ventilación (tv) ligeramente reducido. (C) Vista ventral-anterior del embrión en estadio 25 al nacimiento. Se observa el corazón (c) y las extremidades anteriores totalmente liberadas del pliegue del opérculo. Además, se observan las branquias (br) reabsorbidas, cubiertas por el opérculo. (D) Vista ventral-posterior del embrión en estadio 25, el tubo de ventilación ya no se encuentra presente.

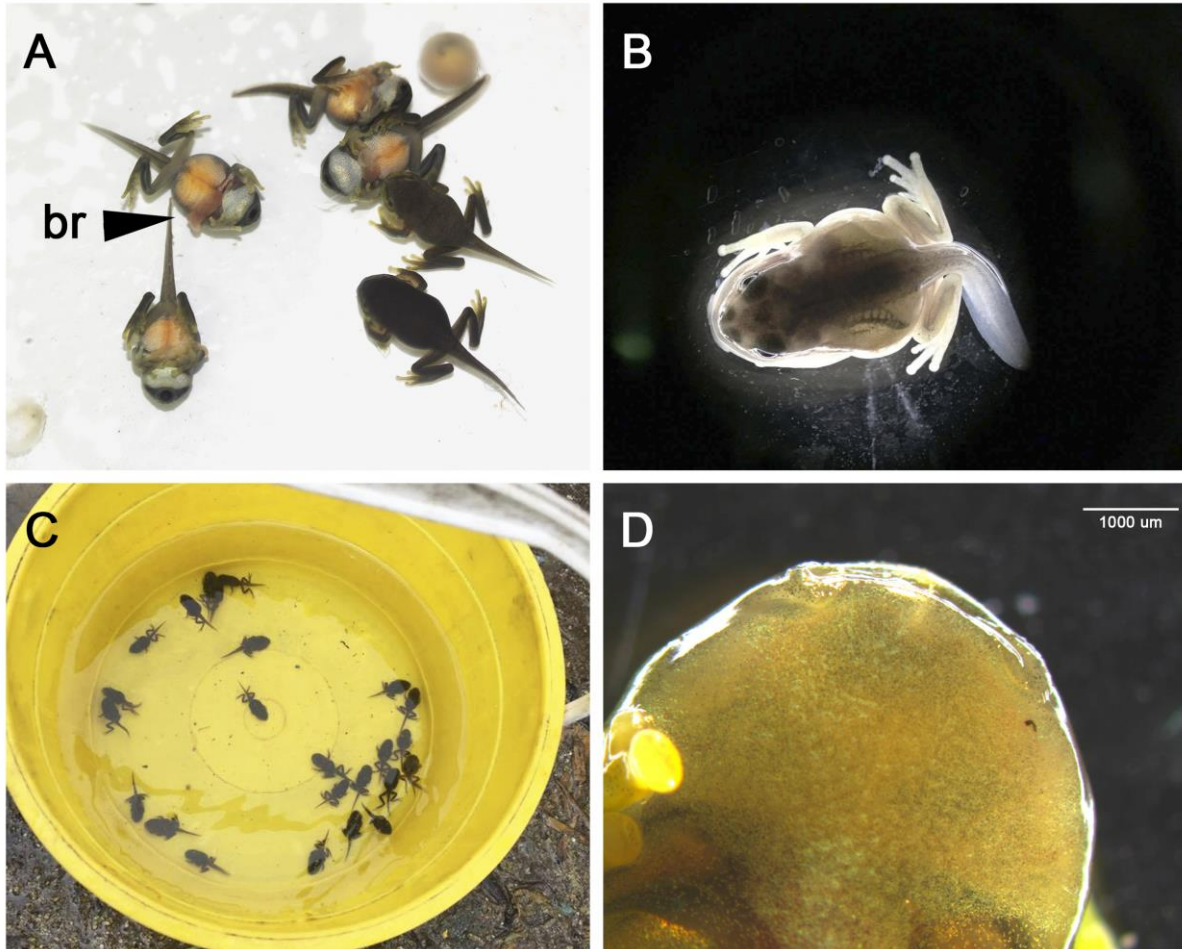


Figura 9. Variaciones en el nacimiento de embriones de *Gastrotheca orophylax*
(A) Nacimiento de juveniles en estadio 25 con cola, patas bien desarrolladas y branquias externas (br) con circulación. Intestino lleno de yema. Puesta 1. **(B)** Nacimiento de juvenil con cola, patas bien desarrolladas, branquias reabsorbidas. Puesta 4. **(C)** Puesta 5. Juveniles con cola, patas bien desarrolladas y branquias reabsorbidas completamente. **(D)** Detalle de la boca de juvenil al momento del nacimiento. Puesta 5.

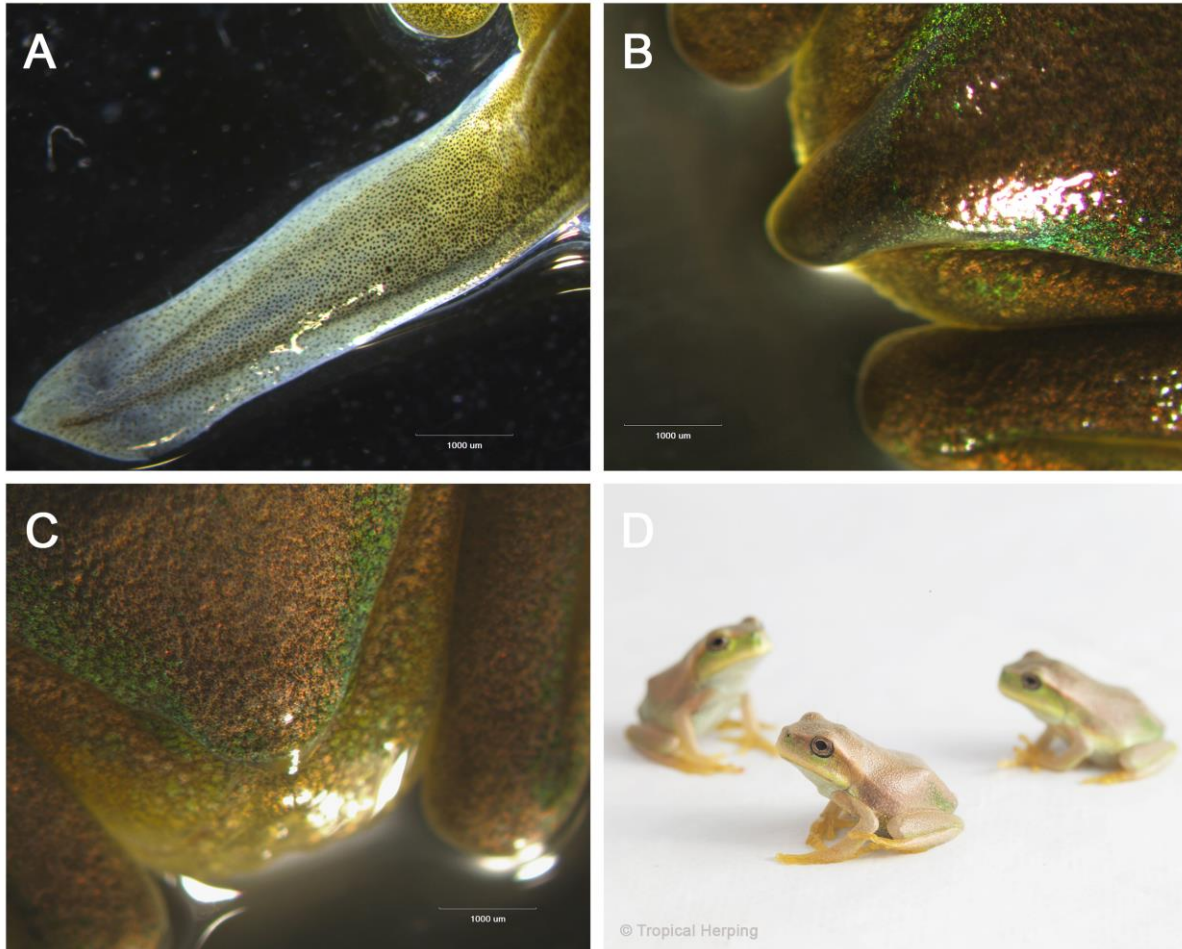


Figura 10. Reabsorción de cola de *Gastrotheca orophylax* desde el nacimiento
(A) Detalle de la cola de juvenil al nacimiento en estadio 25. **(B)** Detalle de la cola casi por completo reabsorbida. **(C)** Detalle de la cola totalmente reabsorbida de rana juvenil. **(D)** Individuos juveniles totalmente metamorfoseados.

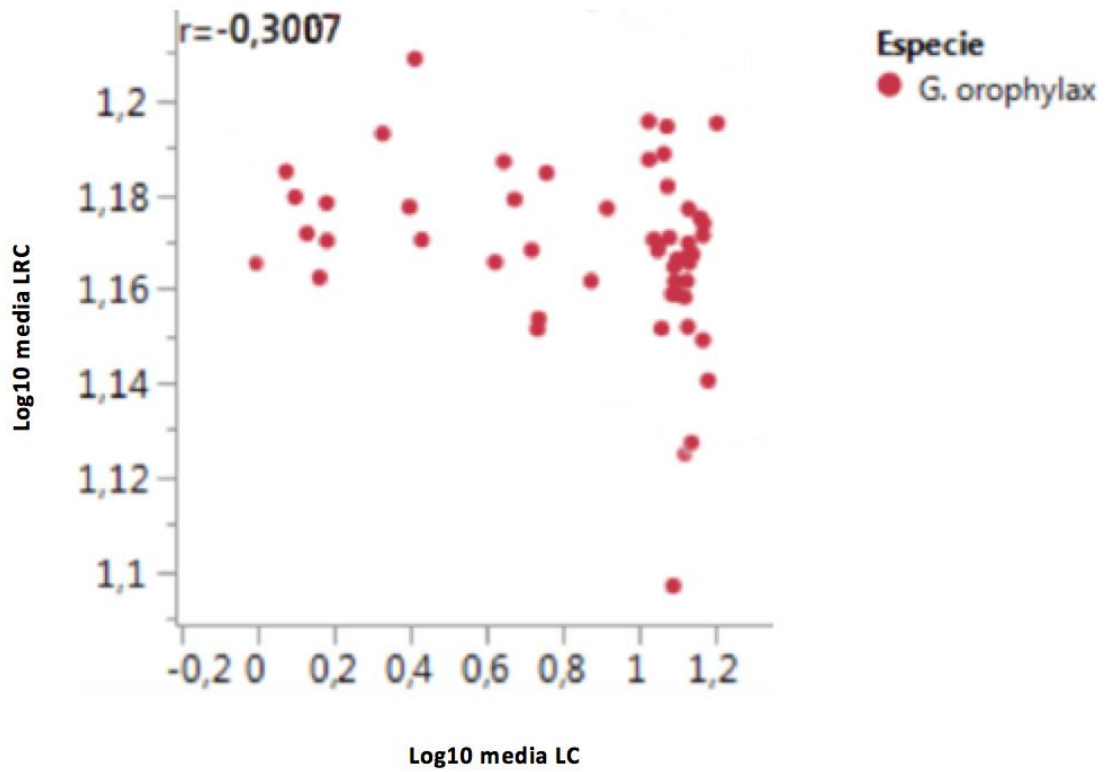


Figura 11. Correlación de Pearson. Se muestra la correlación de la longitud rostro-cloacal vs. La longitud de la cola ($r = -0.3007$). $p < 0.005$

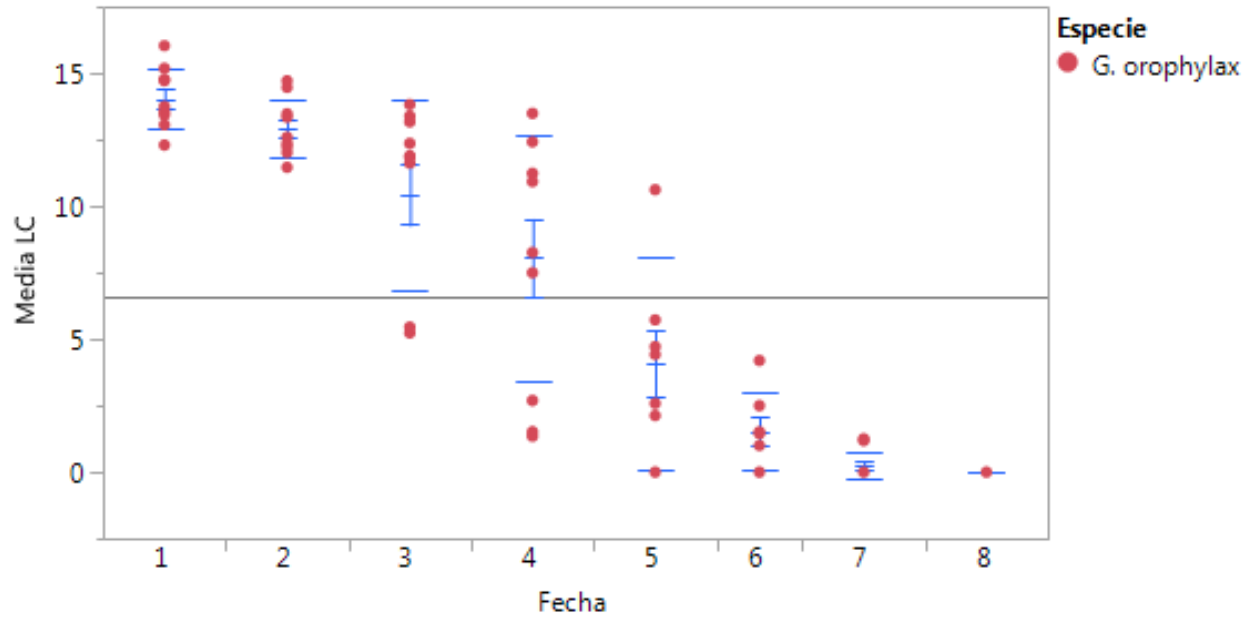


Figura 12. Desviación estándar y media de LC. Se muestra la desviación estándar y media de la longitud de la cola (LC) de metamorfos de *Gastrotheca orophylax*.

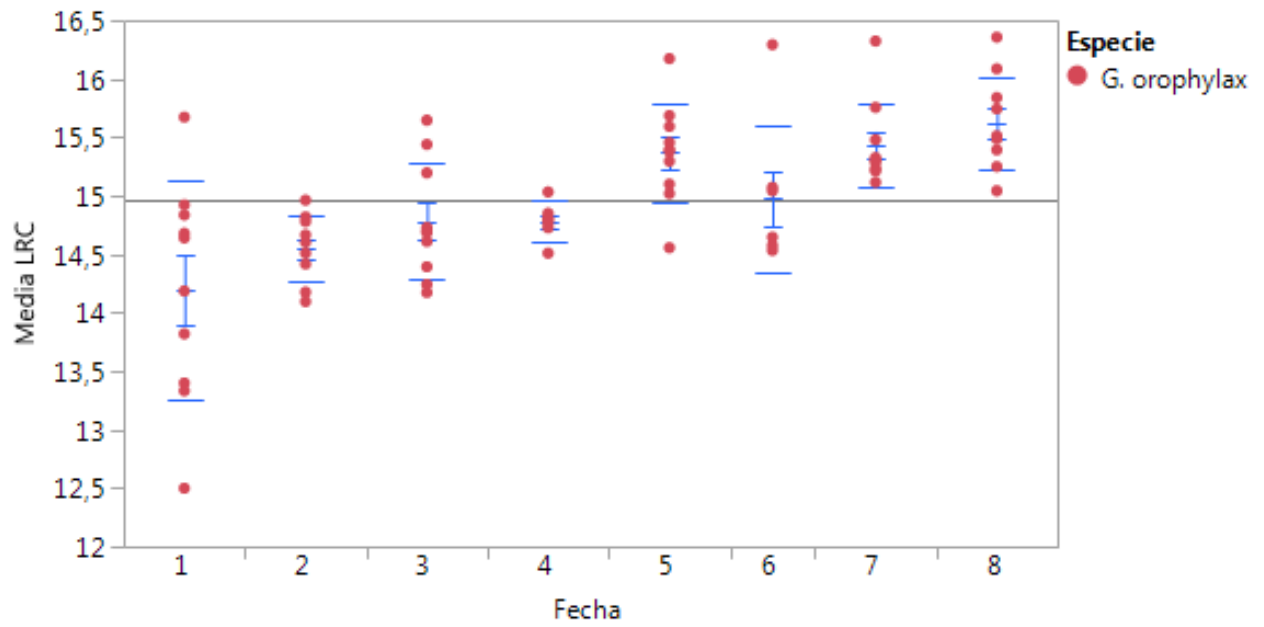


Figura 13. Desviación estándar y media de LRC. Se muestra la desviación estándar y media de la longitud rostro-cloacal (LRC) de metamorfos de *Gastrotheca orophylax*.

Estadio No.	5	8	11 _{1/2}	12	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Tiempo	21 días		12 días		5 días		19 días		7 días		8 días		9 días	
				6 días		6 días		7 días		10 días		13 días		

Figura 14. Tiempos aproximados de desarrollo entre estadios embrionarios de *G. orophylax*. Se muestran los tiempos entre estadios embrionarios, existe un vacío de datos entre el estadio 8 al 11^{1/2}. El tiempo total en días es de 123.

11. TABLAS

Tabla 1. Datos y características de las hembras y posturas de *Gastrotheca orophylax*. Se muestran datos adicionales de las hembras y sus respectivas posturas utilizadas en este estudio.

Postura	1	2	3	4	5
Hembra No.	1 PUCE	2 PUCE	3 Wikiri	3 Wikiri	4 PUCE
Longitud rostro cloacal	8,04 cm	7,48 cm	7,03 cm	7,03 cm	6,55 cm
Inicio de amplexus	-	12/11/14	-	14/1/16	-
Finalización de amplexus	-	14/11/14	-	15/1/16	-
Inicio de seguimiento	26/8/13	26/11/14	22/4/15	5/2/16	30/11/16
Fecha de eclosión	26/8/13	-	-	18/4/16	30/11/16
Tamaño de la puesta (No. de embriones)	29	16	25	28	23
Observaciones	Solo se observa el nacimiento	Reproducción en laboratorio, embriones abortados a los 21 días	Hembra aborta el único embrión que le quedaba vivo	Seguimiento completo desde el amplexus hasta nacimiento	Solo se observa el nacimiento

Tabla 2. Tiempos del desarrollo de *Gastrotheca orophylax*. Se muestran los tiempos en días entre estadios de los embriones de *G. orophylax* en cada una de las diferentes posturas. El tiempo 0 indica el inicio de las observaciones. El tiempo total, sin tomar en cuenta el tiempo desde el amplexus hasta clivaje es de 123 días.

Postura	1	2	3	4	5
Inicio de seguimiento	26/8/13	26/11/14	22/4/15	5/2/16	30/11/16
Fecha de eclosión	26/8/13	-	-	18/4/16	30/11/16
Estadio	Días				
5		0			
8		21			
5,5			0		
12				0	
16				6	
17			23	11	
18			29	17	
19			48		
20			55		
21			62		
22			72		
23				52	
24				65	
25	0			74	0

Tabla 3. Comparación de características de desarrollo embrionario para los diferentes modos reproductivos. Se muestra una lista de características embrionarias para cuatro especies de anuros con diferentes modos reproductivos. La letra “X” indica presencia del rasgo.

	Desarrollo directo	Larva de vida libre endotrófica	Larva de vida libre que se alimenta	Rana marsupial en estudio
	<i>Eleutherodactylus coqui</i>	<i>Fritziana fissilis</i>	<i>Gastrotheca riobambae</i>	<i>Gastrotheca orophylax</i>
Características				
Ausencia de larva de vida libre	X			
Aparecimiento simultáneo de las extremidades, inmediatamente después del cierre de la cavidad neural y antes del aparecimiento de branquias	X			
Aparecimiento simultáneo de las extremidad, después del aparecimiento de las branquias		X		X
Aparecimiento no simultáneo de las extremidades, después del aparecimiento de las branquias			X	
Presencia de organo adhesivo u opérculo		X	X	X
Reducción extrema o ausencia de branquias	X			
Ausencia de intestino enrollado	X			
Presencia Intestino enrollado		X	X	X
Gran reserva de yema	X	X	X	X
Desarrollo de cola larga y membranosa	X			
Branquias acampanadas pequeñas que no cubren a todo el embrión		X		
Branquias acampanadas grandes que cubren casi por completo al embrión			X	X

Larva de vida libre que se alimenta		X	
Larva de vida libre que no se alimenta	X		X
Extremidades bien desarrolladas al nacer y cola	X		X
Dos pares de branquias con un tallo por branquia	X		
Un par de branquias con dos tallos por branquia		X	X

12. ANEXOS

Anexo 1.- Medias de LRC y LC en juveniles de *Gastrotheca orophylax*. Medidas de LRC (Longitud rostro-cloacal) y LC (Largo de la cola) de 10 individuos juveniles de *G. orophylax* a partir del nacimiento hasta la reabsorción completa de la cola.

Especie	Fecha	Individuo	Media Lrc	Media Lc
<i>G. orophylax</i>	30/11/16	1	15,673	16,033
<i>G. orophylax</i>	30/11/16	2	14,837	14,717
<i>G. orophylax</i>	30/11/16	3	14,680	13,550
<i>G. orophylax</i>	30/11/16	4	14,923	14,773
<i>G. orophylax</i>	30/11/16	5	14,187	13,433
<i>G. orophylax</i>	30/11/16	6	13,333	13,063
<i>G. orophylax</i>	30/11/16	7	13,400	13,753
<i>G. orophylax</i>	30/11/16	8	12,500	12,297
<i>G. orophylax</i>	30/11/16	9	14,640	13,537
<i>G. orophylax</i>	30/11/16	10	13,820	15,183
<i>G. orophylax</i>	2/12/16	1	14,510	13,343
<i>G. orophylax</i>	2/12/16	2	14,780	13,473
<i>G. orophylax</i>	2/12/16	3	14,413	12,590
<i>G. orophylax</i>	2/12/16	4	14,963	14,467
<i>G. orophylax</i>	2/12/16	5	14,667	12,593
<i>G. orophylax</i>	2/12/16	6	14,417	12,230
<i>G. orophylax</i>	2/12/16	7	14,177	11,460
<i>G. orophylax</i>	2/12/16	8	14,820	12,017
<i>G. orophylax</i>	2/12/16	9	14,603	12,367
<i>G. orophylax</i>	2/12/16	10	14,097	14,713
<i>G. orophylax</i>	4/12/16	1	15,440	11,617
<i>G. orophylax</i>	4/12/16	2	14,243	5,453
<i>G. orophylax</i>	4/12/16	3	14,173	5,417
<i>G. orophylax</i>	4/12/16	4	14,393	13,170
<i>G. orophylax</i>	4/12/16	5	14,610	12,360
<i>G. orophylax</i>	4/12/16	6	14,687	13,387
<i>G. orophylax</i>	4/12/16	7	15,647	11,847
<i>G. orophylax</i>	4/12/16	8	14,730	5,233
<i>G. orophylax</i>	4/12/16	9	15,197	11,890
<i>G. orophylax</i>	4/12/16	10	14,700	13,820
<i>G. orophylax</i>	6/12/16	1	15,033	8,257
<i>G. orophylax</i>	6/12/16	2	14,803	2,693
<i>G. orophylax</i>	6/12/16	3	14,797	1,520
<i>G. orophylax</i>	6/12/16	4	14,770	11,233
<i>G. orophylax</i>	6/12/16	5	17,843	7,497
<i>G. orophylax</i>	6/12/16	6	14,507	12,420
<i>G. orophylax</i>	6/12/16	7	14,807	10,923
<i>G. orophylax</i>	6/12/16	8	14,850	1,347

<i>G. orophylax</i>	6/12/16	9	14,727	11,213
<i>G. orophylax</i>	6/12/16	10	15,030	13,490
<i>G. orophylax</i>	8/12/16	1	16,173	2,583
<i>G. orophylax</i>	8/12/16	2	15,457	0,000
<i>G. orophylax</i>	8/12/16	3	14,557	0,000
<i>G. orophylax</i>	8/12/16	4	15,100	4,720
<i>G. orophylax</i>	8/12/16	5	15,593	2,127
<i>G. orophylax</i>	8/12/16	6	15,397	10,620
<i>G. orophylax</i>	8/12/16	7	15,380	4,423
<i>G. orophylax</i>	8/12/16	8	15,020	0,000
<i>G. orophylax</i>	8/12/16	9	15,297	5,723
<i>G. orophylax</i>	8/12/16	10	15,687	10,603
<i>G. orophylax</i>	10/12/16	1	16,293	0,000
<i>G. orophylax</i>	10/12/16	2	-	-
<i>G. orophylax</i>	10/12/16	3	-	-
<i>G. orophylax</i>	10/12/16	4	15,073	1,517
<i>G. orophylax</i>	10/12/16	5	14,577	0,000
<i>G. orophylax</i>	10/12/16	6	14,643	4,197
<i>G. orophylax</i>	10/12/16	7	14,533	1,453
<i>G. orophylax</i>	10/12/16	8	-	-
<i>G. orophylax</i>	10/12/16	9	14,647	1,003
<i>G. orophylax</i>	10/12/16	10	15,043	2,500
<i>G. orophylax</i>	12/12/16	1	16,323	0,000
<i>G. orophylax</i>	12/12/16	2	15,327	0,000
<i>G. orophylax</i>	12/12/16	3	15,757	0,000
<i>G. orophylax</i>	12/12/16	4	15,327	0,000
<i>G. orophylax</i>	12/12/16	5	15,480	0,000
<i>G. orophylax</i>	12/12/16	6	15,307	1,187
<i>G. orophylax</i>	12/12/16	7	15,287	0,000
<i>G. orophylax</i>	12/12/16	8	15,213	0,000
<i>G. orophylax</i>	12/12/16	9	15,233	0,000
<i>G. orophylax</i>	12/12/16	10	15,117	1,253
<i>G. orophylax</i>	14/12/16	1	16,357	0,000
<i>G. orophylax</i>	14/12/16	2	12,510	0,000
<i>G. orophylax</i>	14/12/16	3	16,087	0,000
<i>G. orophylax</i>	14/12/16	4	15,513	0,000
<i>G. orophylax</i>	14/12/16	5	15,743	0,000
<i>G. orophylax</i>	14/12/16	6	15,487	0,000
<i>G. orophylax</i>	14/12/16	7	15,483	0,000
<i>G. orophylax</i>	14/12/16	8	15,393	0,000
<i>G. orophylax</i>	14/12/16	9	15,043	0,000
<i>G. orophylax</i>	14/12/16	10	15,250	0,000

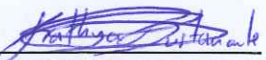
DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Kathya Pamela Bustamante Enríquez, con C.C. 1723123681, autora del trabajo de graduación intitulado "Descripción parcial del desarrollo embrionario de *Gastrotheca orophylax* (Anura, Hemiphractidae).", previa a la obtención del grado académico de **LICENCIADA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior de Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 03 de Agosto del 2017


f) Kathya Bustamante
C.c 1723123681

2436304-0984076490
kathya.bio@gmail.com