

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
Departamento de Biología Animal I (Zoología)



**TESIS DOCTORAL**

**Evolución de Pelobatidos y Peloditidos (Amphibia, Anura):  
morfología y desarrollo del sistema esquelético**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**María del Rosario Rodríguez Talavera**

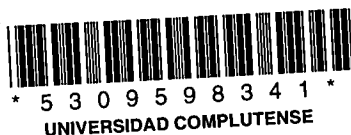
Director

**Francisco de Borja Sanchiz y Gil de Avalle**

Madrid  
Ed. electrónica 2019

15.898

Departamento de Biología Animal I  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Complutense de Madrid



**EVOLUCION DE PELOBATIDOS Y PELODITIDOS (AMPHIBIA, ANURA):  
MORFOLOGIA Y DESARROLLO DEL SISTEMA ESQUELETICO**

Memoria presentada para optar al grado  
de doctor en Ciencias Biológicas por  
María del Rosario Rodríguez Talavera

VO BO  
del director de la tesis

*F. Borja Sánchez*

Dr. D. Francisco de Borja Sanchíz  
y Gil de Avalle  
Investigador del CSIC en el  
Museo Nacional de Ciencias Naturales

*RRTalavera*

Madrid, octubre de 1989

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Sanchíz, director de esta tesis, por sugerirme el tema de investigación y por su valiosa colaboración, tolerancia y acertadas críticas durante el desarrollo del trabajo.

El Dr. Castanet (Laboratoire d'Anatomie Comparée, Université Paris VII) revisó amablemente los resultados esqueletocronológicos.

Numerosas personas me acompañaron en los viajes de recolección de material. Especialmente agradezco la colaboración de Begoña Arano y Asunción Rodríguez Espeso en Portugal; Juan Carlos Arrechea y Jesús Dorda en Marruecos, y Marisa Esteban en el sur de España.

Las siguientes personas colectaron material adicional para este estudio: Begoña Arano, Ignacio Doadrio, Jesús Dorda, Carmen Díaz-Paniagua, Marisa Esteban, Mario García-Paris, Paloma Garzón, Rafael Márquez y Carolina Martín-Albaladejo.

Rosa María Gómez-Prieto colaboró pacientemente en el trabajo de laboratorio, y mecanografió las tablas.

Luis García-Hidalgo, Jose Enrique Gonzalez y Miguel Tejedo me ayudaron a abordar la estadística.

Antonio Madrigal, Manolo Merino y Rafael Merino, pasaron a tinta las figuras.

Angel Sanz, con su dominio de las técnicas fotográficas, mejoró la resolución de las preparaciones histológicas.

Pilar Herrero, Carmen Díaz-Paniagua, Rosa María Gómez, Mercedes Hervás y Teresa Aparicio me animaron constantemente en el curso de la investigación.

Juan Carlos Arrechea me acompañó en innumerables y tediosos muestreos semanales por la provincia de Madrid todos estos años. Realizó los últimos retoques en las figuras y me ayudó a comprobar las referencias internas del texto.

El personal del Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid facilitó mi estancia en el Centro y el desarrollo del trabajo.

Este trabajo ha sido parcialmente financiado con una beca predoctoral del CSIC en el Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid y una beca de intercambio entre el CSIC y el CNRS en el Laboratoire d'Anatomie Comparée de la Université de Paris VII. La investigación se incluye en el proyecto CSIC-CAICYT 211 (1985-1988).

## INDICE

1. INTRODUCCION	1
2. MATERIALES, TECNICAS ANALITICAS Y METODOLOGIA	12
2.1.    MATERIALES	13
2.2.    TECNICAS DE MUESTREO	15
2.3.    TECNICAS HISTOLOGICAS	17
2.3.1.    Tinciones de cartilago y hueso	17
2.3.2.    Preparación de esqueletos desarticulados	20
2.3.3.    Técnicas de esqueletocronología	21
2.4.    PROTOCOLO DE LOS EXPERIMENTOS DE CRECIMIENTO Y DESARROLLO LARVARIO	25
2.4.1.    Experimento para determinar la temperatura óptima de crecimiento	25
2.4.2.    Experimento para determinar la edad a que se alcanza cada estadio de desarrollo	25
2.5.    DEFINICION DE LA BIOMETRIA EXTERNA	26
2.5.1.    Medidas externas de renacuajos	26
2.5.2.    Medidas externas de adultos	27
2.6.    ANALISIS CUANTITATIVOS	30

3. RESULTADOS Y DISCUSION	31
3.1. TRABAJOS PRELIMINARES	32
3.1.1. <u>Pelobates cultripes</u> . TEMPERATURA OPTIMA DE CRECIMIENTO LARVARIO	32
3.1.2. <u>Pelobates cultripes</u> . EDAD A QUE SE ALCANZA CADA ESTADIO DE DESARROLLO DEL PERIODO LARVARIO A TEMPERATURA OPTIMA	36
3.1.3. TALLA EN CADA ESTADIO DE DESARROLLO DE <u>Pelobates cultripes</u> Y <u>Pelodytes punctatus</u>	40
3.1.4. ESTRUCTURA POR SEXOS Y EDADES DE LAS POBLACIONES POSTMETAMORFICAS DEL GENERO <u>Pelobates</u> ANALIZADAS	46
.1. <u>Pelobates cultripes</u>	46
.2. <u>Pelobates varaldii</u>	56
.3. <u>Pelobates fuscus</u> y <u>P. syriacus</u>	60
3.1.5. TAMAÑO DE LOS EJEMPLARES ADULTOS	62
.1. Dimorfismo sexual en <u>Pelobates cultripes</u> y <u>P. varaldii</u>	62
.2. Diferencias morfométricas intraespecíficas en <u>Pelobates cultripes</u>	66
.3. Tamaño medio de los adultos de las especies estudiadas	70
3.1.6. RELACION ENTRE EDAD Y TAMAÑO EN <u>Pelobates</u> <u>cultripes</u> y <u>P. varaldii</u>	72

3.2.	DESARROLLO DE LOS SISTEMAS ESQUELETICOS DE <u>Pelobates cultripes</u> Y <u>Pelodytes punctatus</u>	77
3.2.1.	CRANEO	77
	.1. Descripción del cráneo adulto de <u>Pelobates cultripes</u>	77
	.2. Secuencia de osificación del cráneo de <u>P. cultripes</u>	77
	.3. Comparación con <u>Pelodytes punctatus</u> y otras especies de Anuros	95
3.2.2.	COLUMNA VERTEBRAL	118
	.1. Descripción de la columna adulta de <u>Pelobates cultripes</u>	118
	.2. Desarrollo de la columna vertebral de <u>Pelobates cultripes</u>	118
	.3. Secuencia de osificación de la columna vertebral de <u>P. cultripes</u>	120
	.4. Malformaciones de la columna vertebral de <u>P. cultripes</u>	129
	.5. Comparación con <u>Pelodytes punctatus</u> y las restantes especies de Anuros	136
3.2.3.	MIEMBRO ANTERIOR Y CINTURA ESCAPULAR	150
	.1. Descripción del miembro anterior y de la cintura escapular adulta de <u>Pelobates cultripes</u>	150
	.2. Secuencia de osificación del miembro anterior y cintura escapular de <u>P. cultripes</u>	150
	.3. Comparación con <u>Pelodytes punctatus</u> y otras especies de Anuros	170

3.2.4.	MIEMBRO POSTERIOR Y CINTURA PELVIANA	195
.1.	Descripción del miembro posterior y de la cintura pelviana de <u>Pelobates cultripes</u>	195
.2.	Secuencia de osificación del miembro posterior y cintura pelviana de <u>P. cultripes</u>	195
.3.	Comparación con <u>Pelodytes punctatus</u> y otras especies de Anuros	214
4.	CONCLUSIONES GENERALES	246
5.	BIBLIOGRAFIA	254
6.	APEÑDICE	279

**1. INTRODUCCION**

## 1. INTRODUCCION

Los caracteres osteológicos juegan un papel fundamental en la macrosistemática de los anuros. Lynch (1973) utilizó 38 caracteres en su análisis evolutivo del orden; veintitrés de ellos, casi las dos terceras partes, eran osteológicos. Al mismo tiempo, el esqueleto es casi el único sistema orgánico disponible para estudios paleontológicos y evolutivos del pasado. Por otra parte, podemos añadir la utilidad del sistema esquelético para estudios de biología evolutiva; existen tendencias recientes en esta disciplina que hipotetizan alteraciones en la duración relativa de los acontecimientos del desarrollo (heterocronías) como una de las causas fundamentales del cambio morfológico (Alberch et al., 1979).

Este trabajo revisa y actualiza los conocimientos existentes sobre la osificación del esqueleto de los anuros. Paralelamente examina el proceso de condricación de los miembros anteriores y posteriores, especialmente en lo referente al carpo y al tarso, y de sus respectivas cinturas. Su aportación más original reside en el estudio del proceso de osificación con una visión muy amplia del desarrollo, pues considera parte importante del mismo no sólo todos los estadios larvarios, sino también todas las clases de edad de las etapas juvenil y adulta. Al mismo tiempo, determina la variabilidad de caracteres osteológicos de importancia sistemática, y establece homologías atendiendo al origen embriológico de los elementos. De hecho, el método de trabajo permite utilizar ejemplares preservados en alcohol o formol largo tiempo y, específicamente, integrar datos procedentes de series ontogénicas fósiles.

Los estudios de este tipo son necesarios, pues los parámetros básicos para dilucidar la participación de procesos heterocrónicos en los cambios morfológicos todavía no se han cuantificado en el esqueleto completo de ningún anuro. Tales parámetros son: momentos de inicio y finalización de la osificación, tamaño de las piezas al comienzo de la misma, y tasa de crecimiento de los elementos esqueléticos. Por lo cual, es evidente la necesidad de conocer con detalle la cronología de la diferenciación de todos los elementos esqueléticos de algunas especies clave, medir en ellas el mayor número de parámetros del desarrollo y precisar su variabilidad

intraespecífica. Esto nos proporcionaría un marco de referencia para determinar qué parámetros y procesos del desarrollo del esqueleto tienen utilidad taxonómica y filogenética, así como identificar caracteres que resulten convergentes en la etapa adulta.

-----

Hasta el momento se ha investigado el proceso de osificación del cráneo de dieciocho especies de anuros, de las 3.438 existentes (Duellman & Trueb, 1986). Estas especies pertenecen a ocho de las veintidós familias reconocidas (Duellman & Trueb, 1986). Para nuestros propósitos tres de estos trabajos son importantes, ya que se realizaron con un número suficiente de ejemplares y se estudió toda la etapa larvaria:

- Kemp & Hoyt (1969) sobre Rana pipiens. Estos autores además de realizar una descripción completa y detallada de la cronología de la osificación de todos los huesos de cráneo, describen dos alteraciones de la secuencia de osificación normal en renacuajos tratados con tiroxina en estadios tempranos del desarrollo. Entre los inconvenientes a la hora de utilizar sus datos en nuestros estudios comparativos, podemos señalar que utilizaron una tabla de desarrollo específica de Rana pipiens, la de Taylor & Kollros (1946); además, la descripción del progreso de la osificación se interrumpe al fin de la metamorfosis, y por último, los animales fueron criados en cautividad.
  
- Gaudin (1978) sobre Bufo boreas. En este trabajo se comparan las secuencias de osificación de renacuajos de campo de dos localidades distintas con renacuajos de laboratorio. Se pone de manifiesto que la osificación en los animales de laboratorio se retrasa respecto a los del campo. Se reseñan todos los huesos y se describe el avance de la osificación en la etapa postmetamórfica, dividiendo los ejemplares en clases de tamaño. Se utiliza la tabla de desarrollo de Limbaud & Volpe (1957), muy parecida a la de Gosner (1960). Los datos que aporta son sin duda los que mejor se ajustan a nuestros requerimientos comparativos.

- Hanken & Hall (1984) sobre Bombina orientalis. Los autores describen cuatro variaciones intraespecíficas de la secuencia normal de osificación de la especie. Clasifican los renacuajos con la tabla de Gosner (1960), pero no describen la osificación de tres huesos que presumiblemente mineralizan después de concluir la metamorfosis. El estudio se realizó con ejemplares criados en cautividad.

Sorprendentemente sólo existen estudios de la osificación postcraneal de dos especies de anuros: Xenopus laevis (Bernasconi, 1951; Nieuwkoop & Faber, 1956) y Rana pipiens (Kempt & Hoydt, 1969). Ambas especies se utilizan asiduamente en estudios experimentales embriológicos o fisiológicos. Las descripciones de la osificación de sus esqueletos se efectuaron al margen de cualquier propósito comparativo, empleando las tablas específicas de desarrollo de cada especie -Bernasconi (1951) no utilizó ninguna-, y valiéndose de animales criados en cautividad. Por otra parte, en ninguno de los trabajos se citan todos los centros de osificación. Este inconveniente es especialmente importante en las descripciones de la columna, en las cuales los autores se limitan a señalar el inicio de la osificación en las vértebras y en el urostilo, sin más detalles. Tampoco se continuaron las investigaciones después de la metamorfosis, por lo que la osificación del carpo y el tarso no se describe.

-----

Debido a que la osificación postcraneal se efectúa sobre un soporte cartilaginoso previo, nos vimos obligados a revisar el estado del conocimiento sobre los grandes planes estructurales que se supone se repiten en el desarrollo de las vértebras y del quiridío de los tetrápodos.

El modelo de los arcualia de Gadow (1896) que postula el origen de las vértebras por la reorganización de cuatro pares de arcualia, fué confirmado en anfibios por las investigaciones de Mookerjee (1930, 1931), y resultó duramente criticado por primera vez por Williams (1959). Este autor revisó los trabajos existentes sobre la embriología de la columna vertebral de los tetrápodos y, aunque reconoce que el modelo explica muy bien las vértebras fósiles de los tetrápodos y que las vértebras de todas las especies actuales

son homólogas, concluye que los datos embriológicos no se ajustan a la hipótesis de Gadow y que, por tanto, es necesaria una nueva síntesis que sólo podrá realizarse cuando se disponga de descripciones libres de la influencia de la teoría de los arcualia. Wake (1970) examina el desarrollo vertebral en los anfibios y no encuentra pruebas de resegmentación en los esclerotomos, ya que no detecta esclerocele; pone en evidencia que, a falta de fósiles, la homologación de los centros vertebrales de los anfibios actuales con pleurocentros o intercentros no es posible.

El modelo básico de quiridio, justificado con todo detalle por Holgrem (1933), poseía en el carpo/tarso tres filas de huesos; una proximal con tres elementos, una central con cuatro elementos centrales más un elemento Y, y una distal con 5 carpales/tarsales. A este carpo/tarso seguían cinco metacarpianos/metatarsianos. Este patrón se reproduciría más o menos completamente en la ontogenia de todos los tetrápodos; la ausencia de algunos elementos se explicaba por "fusiones" en los estadios precondrogénicos. El modelo se ajustaba bastante bien al carpo fósil bien conservado más antiguo que se conoce, el de Eryops, y a la condricación del carpo de Pelobates fuscus (Emery, 1894; Schmalhausen, 1907) y Bombina bombina (= "Bombinator igneus") (Steiner, 1921), trabajos precursores del modelo de Holgrem. Este modelo fue refutado por los experimentos de Hinchliffe (1977) en embriones de pollo (Gallus domesticus). Según describen Hinchliffe & Johnson (1980), el marcaje con sulfato radioactivo de las condensaciones precondrogénicas del carpo de pollo puso de manifiesto que eran cuatro, el mismo número que piezas podían observarse en el adulto; mientras que el número de condensaciones precartilaginosas aceptado previamente era de trece, creyéndose que luego unas se fusionaban y otras se perdían. Recientemente Shubin & Alberch (1986) proponen la homología del quiridio de los tetrápodos, apoyándose en que los mecanismos básicos para la generación de nuevas condensaciones cartilaginosas son los mismos en todos ellos: segmentación, bifurcación y condensaciones "de novo".

-----

La elección de Pelobátidos y Pelodítidos para este trabajo de tesis se debe a su controvertida posición en la evolución de los anuros. Lynch (1973),

trabajando sólo con adultos, los situó en un nivel de transición entre los anuros con caracteres primitivos -Archaeobatrachia- y los que poseían caracteres fundamentalmente derivados -Neobatrachia-. En cambio Sokol (1975), en la filogenia que estableció basándose exclusivamente en caracteres larvarios, consideró dos linajes principales, Discoglossoidei y Ranoidei, y situó a los Pelobatoidea en la base de la radiación adaptativa de estos últimos. Por otra parte, Rocek (1970) apoyándose en la peculiarísima ontogenia del frontoparietal de Pelobates fuscus, ubicó el género Pelobates, junto con Pípidos, Paleobatrácidos y Rinofrínidos en un orden nuevo -Archaeosalientia-, mientras el orden Neosalientia agrupaba a los restantes anuros. En vista de la controversia existente, es evidente que cualquier información relativa a la estructura y desarrollo de los Pelobatoidea será de extraordinario interés para los que trabajan en sistemática de anuros.

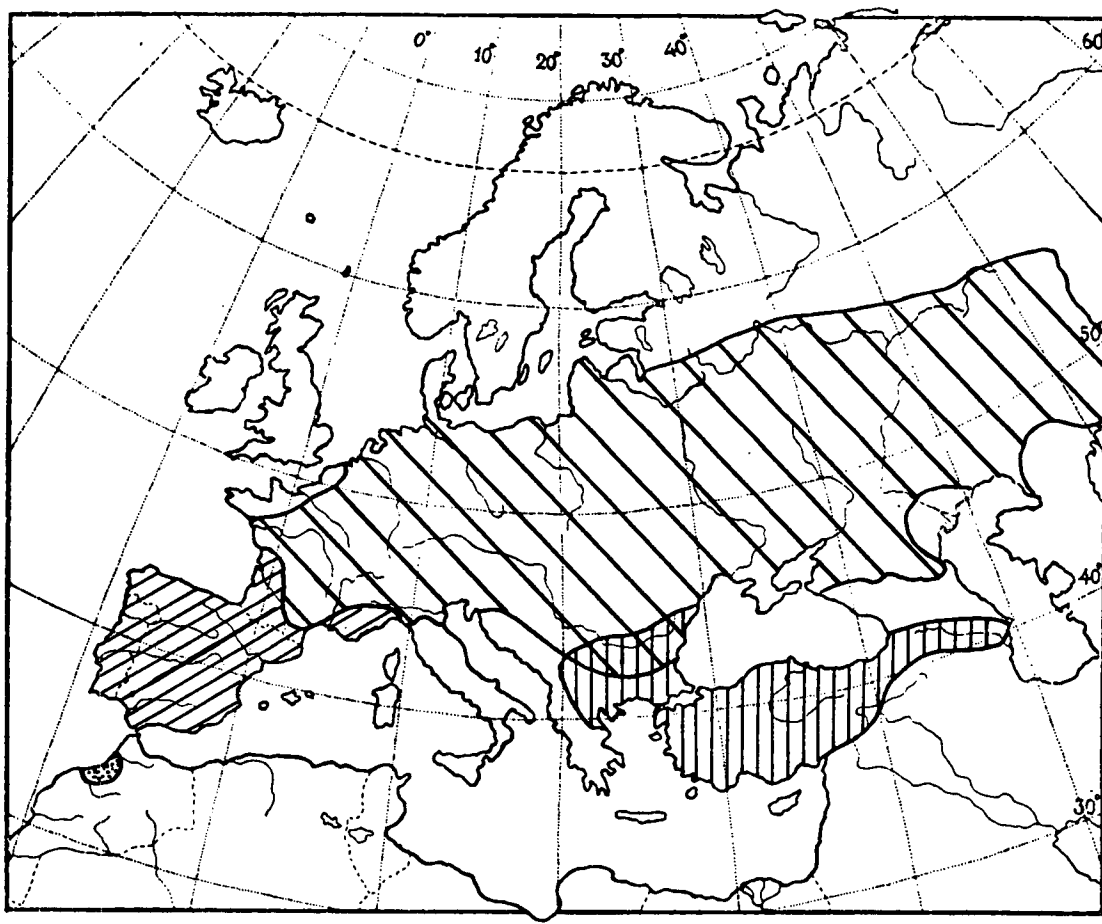
La superfamilia Pelobatoidea agrupa tres familias: Pelobatidae, Pelodytidae y Megophryidae (Cannatella, 1985).

La familia Pelobatidae está constituida por tres géneros y once especies. El género Pelobates se distribuye actualmente por Eurasia y norte de Africa (consultar la figura 1) y está constituido por cuatro especies: P. cultripes, P. fuscus, P. syriacus y P. varaldii. Los géneros Scaphiopus y Spea se localizan en Norteamérica, en las áreas señaladas en la figura 2.

La familia Pelodytidae es monogénica y sólo tiene actualmente dos especies: Pelodytes punctatus en la Península Ibérica y suroeste de Francia y P. caucasicus en el Caucaso. Las áreas de distribución de ambos taxones se indican en la figura 3.

La familia Megophryidae está poco estudiada. Frost (1985) reconoce 72 especies, distribuidas por el sudeste asiático e islas adyacentes, en el área rayada de la figura 3.

Lógicamente, nos hemos centrado en el estudio detallado de las especies ibéricas (Pelobates cultripes y Pelodytes punctatus) y norteafricanas del grupo (Pelobates varaldii), aunque también hemos conseguido muestras aceptables de Pelobates fuscus, P. syriacus, Scaphiopus couchii y Spea







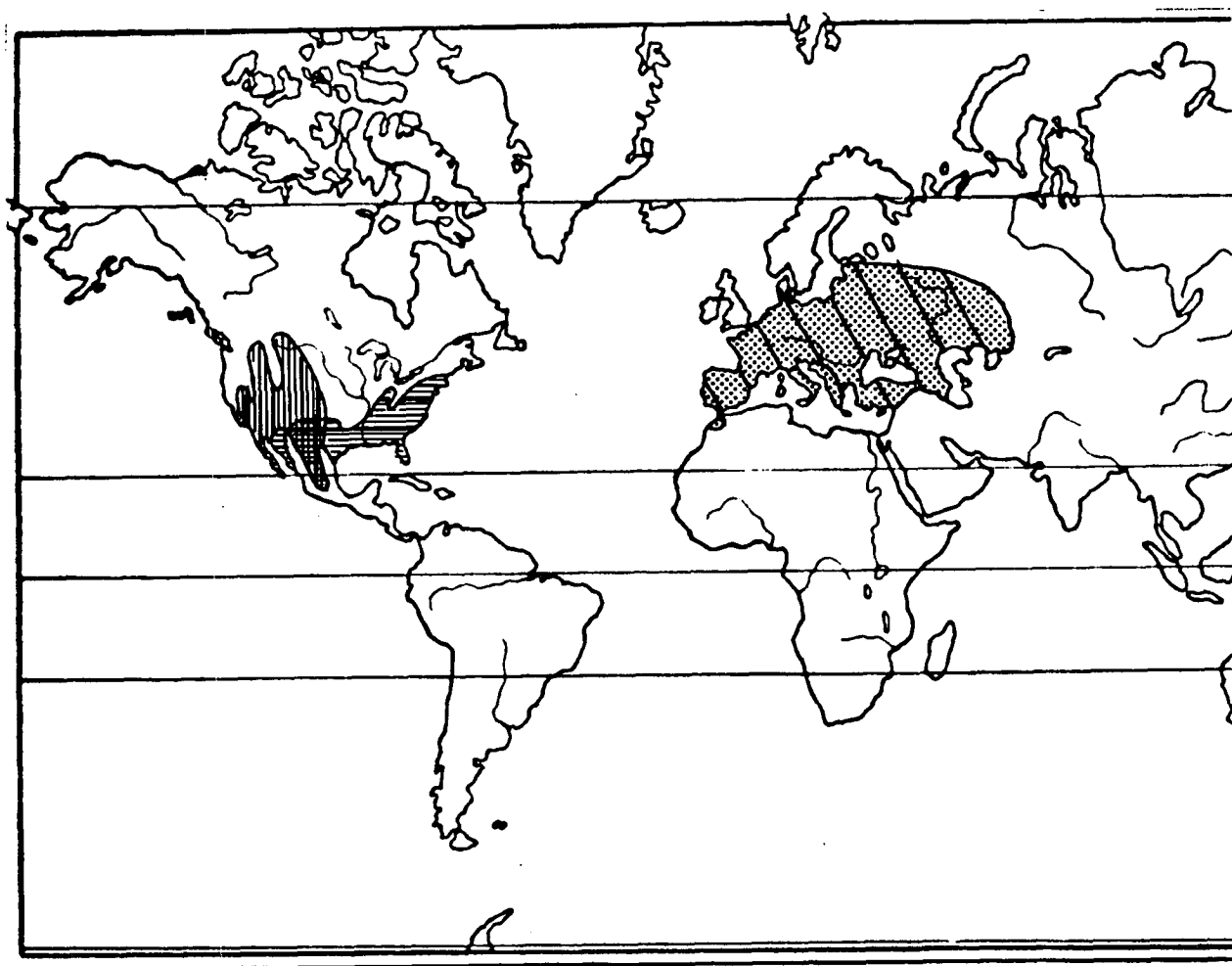
-  Pelobates cultripes
-  Pelobates fuscus
-  Pelobates syriacus
-  Pelobates varaldii

Figura 1.- Areas de distribución de las especies del género Pelobates.






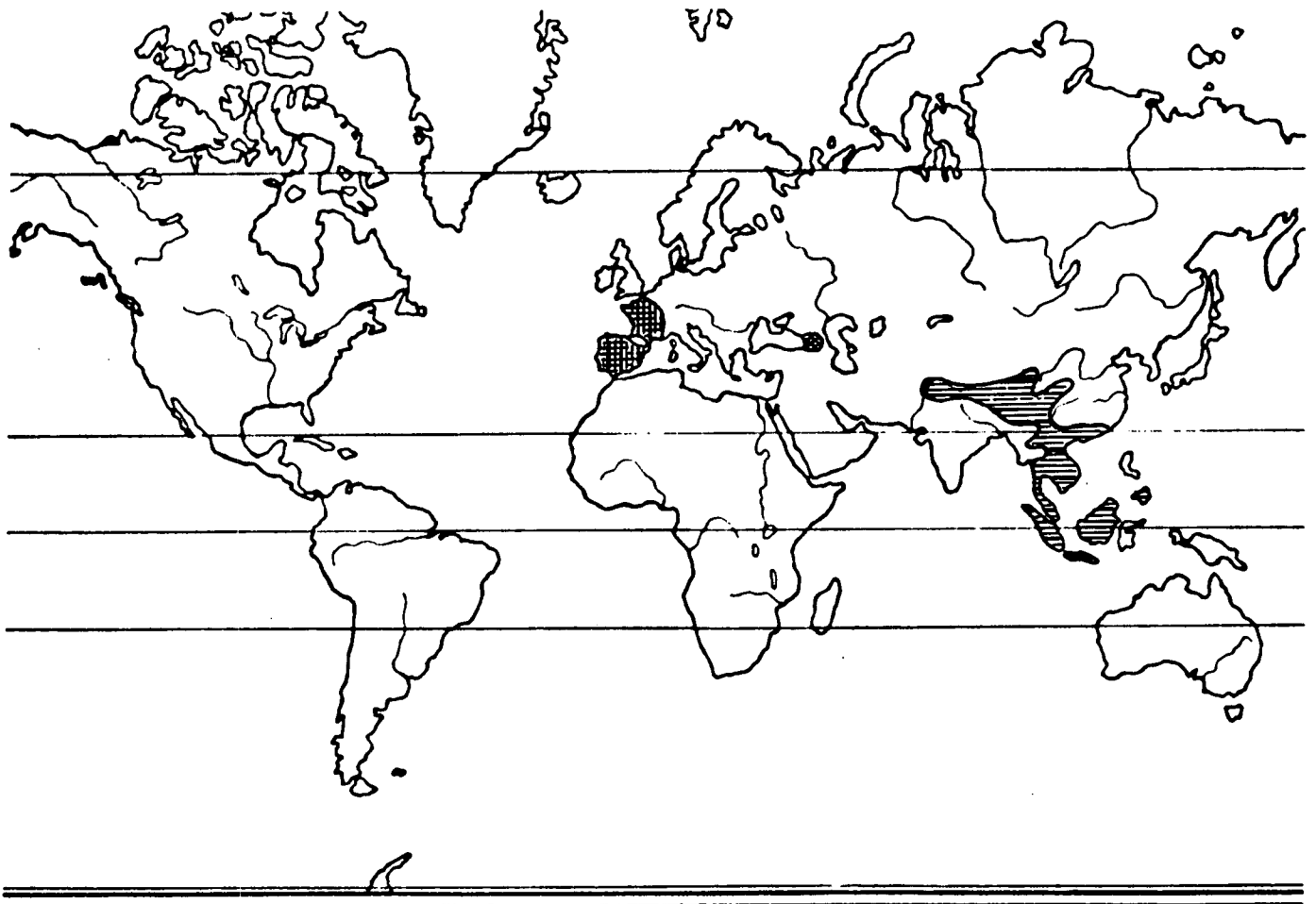
-  género Pelobates
-  género Scaphiopus
-  género Spea

Figura 2.- Area de distribución de la familia Pelobatidae.







- 
- 
-  familia MEGOPHRYIDAE
  -  familia PELODYTIDAE
  -  Pelodytes punctatus
  -  Pelodytes caucasicus

Figura 3.- Areas de distribución de las familias Pelodytidae y Megophryidae.

multiplicatus, entre los Pelobátidos; Pelodytes caucasicus (Pelodítidos), y Megophrys montana y Leptobrachium hasseltii como representantes de los dos grandes grupos en que se dividen los Megófridos.

Tanto Pelobates como Pelodytes presentan ciclos de vida dobles, típicos de la clase Amphibia. Tienen una fase embrionaria y larvaria acuática, que afecta a huevos y renacuajos y dura entre tres y seis meses según la especie y la latitud (Díaz-Paniagua, 1986; Díaz-Paniagua & Arrizabalaga, 1987; y datos propios). Y una fase terrestre que incluye recién metamorfoseados, juveniles y adultos, cuya duración máxima detectada en libertad es de doce años en Pelobates cultripes (datos en esta tesis).

Los renacuajos del género Pelobates son los de mayor tamaño de la fauna europea; los de P. cultripes llegan a los 100 mm de longitud total y los de P. varaldii y P. fuscus pueden rebasar esa cota. En cambio, los de Pelodytes punctatus muestran un tamaño intermedio dentro del rango que exhiben las especies ibéricas.

-----

Los resultados de este trabajo se exponen en dos capítulos. En el primero se detalla el criterio que se ha seguido para calcular la duración en días de cada uno de los 22 estadios del periodo larvario; cómo se han separado los ejemplares postmetamórficos en 13 clases dependiendo de sus años de vida, y finalmente, se analiza la relación que existe entre edad y tamaño a lo largo de todo el desarrollo.

El segundo capítulo aborda la descripción del avance de la osificación. Se divide en cuatro subcapítulos: cráneo, columna vertebral, miembro anterior y miembro posterior. Al principio de cada subcapítulo se detalla el proceso de osificación del esqueleto de Pelobates cultripes: se relacionan todos los centros de osificación de cada hueso y la secuencia en que inician su mineralización todos los centros; el estadio de desarrollo y la edad -en días o años- a que se produce cada acontecimiento; las alteraciones detectadas respecto a la secuencia modal, y por último, los porcentajes de distintos tipos de malformaciones en renacuajos y adultos. A continuación se reseñan

las diferencias que presenta el desarrollo del esqueleto de Pelodytes punctatus y las otras especies de la familia Pelobatidae. Finalmente, se recopilan los datos dispersos en la bibliografía sobre osificación de otros anuros vivientes y fósiles.

La información que se ofrece sobre las dos familias estudiadas es original en su mayor parte. Mientras que la literatura revisada sobre osificación y condricación del esqueleto de los anuros es extremadamente variada en contenido, calidad y enfoque, con el agravante de que hasta la década de los cincuenta no se generalizó la estandarización de las etapas de la fase larvaria y que sólo en la década de los ochenta se ha optado decididamente por la tabla de Gosner (1960) en los estudios comparados. En el intervalo, se han utilizado tablas de desarrollo específicas, cuyas equivalencias con la de Gosner son tediosas de establecer caso por caso.

-----

**2. MATERIALES, TECNICAS ANALITICAS Y METODOLOGIA**

## 2.1. MATERIALES

En total se han utilizado para este estudio 195 renacuajos de P. cultripes, 43 de P. varaldii, 9 de P. fuscus, 161 de Pelodytes punctatus y 227 ejemplares juveniles y adultos de distintas especies de Pelobátidos, Pelodítidos y Megófridos, cuyos números de colección y tipo de manipulación a que fueron sometidos se reseñan en el apéndice I.

La mayoría del material fue capturado personal y expresamente para esta tesis.

Los renacuajos fueron clasificados atendiendo a su estado de desarrollo en 22 clases distintas correspondientes a los estadios 25 a 46 de la tabla de Gosner (1960), desde que el renacuajo comienza a alimentarse hasta que se completa la reabsorción de la cola. En la figura 4 se muestran las características que identifican cada estadio de desarrollo.

En cada aspecto del desarrollo se ha utilizado un número variable de renacuajos, cuya cantidad se especifica en cada caso, bien porque la tinción no era óptima, bien porque la estructura en cuestión no se había desarrollado todavía o se había perdido durante el proceso de tinción, o ya sea porque se consideró que no había variabilidad que justificara estudiar con detalle todos los ejemplares disponibles de cada estadio de Gosner.

Para algunos tratamientos posteriores, los juveniles y adultos del género Pelobates se clasificaron en grupos de edad. El número de años se determinó por métodos esqueletocronológicos (Smirina, 1972; Castanet, 1975).

La mayoría de los esqueletos adultos fueron desarticulados. Previamente se disecó un miembro anterior a nivel de la hemicintura escapular y uno posterior a nivel de la articulación de la tibiofíbula con el tibialfibular y se sometieron a doble tinción para cartilago y hueso; la otra mano disecada a nivel de la muñeca y el otro pie disecado a nivel de la articulación del tibialfibular con el resto del tarso, se sometieron sólo a tinción ósea. Esto se hizo así porque el estudio detallado del carpo, tarso y cintura escapular no es posible en esqueletos desarticulados.

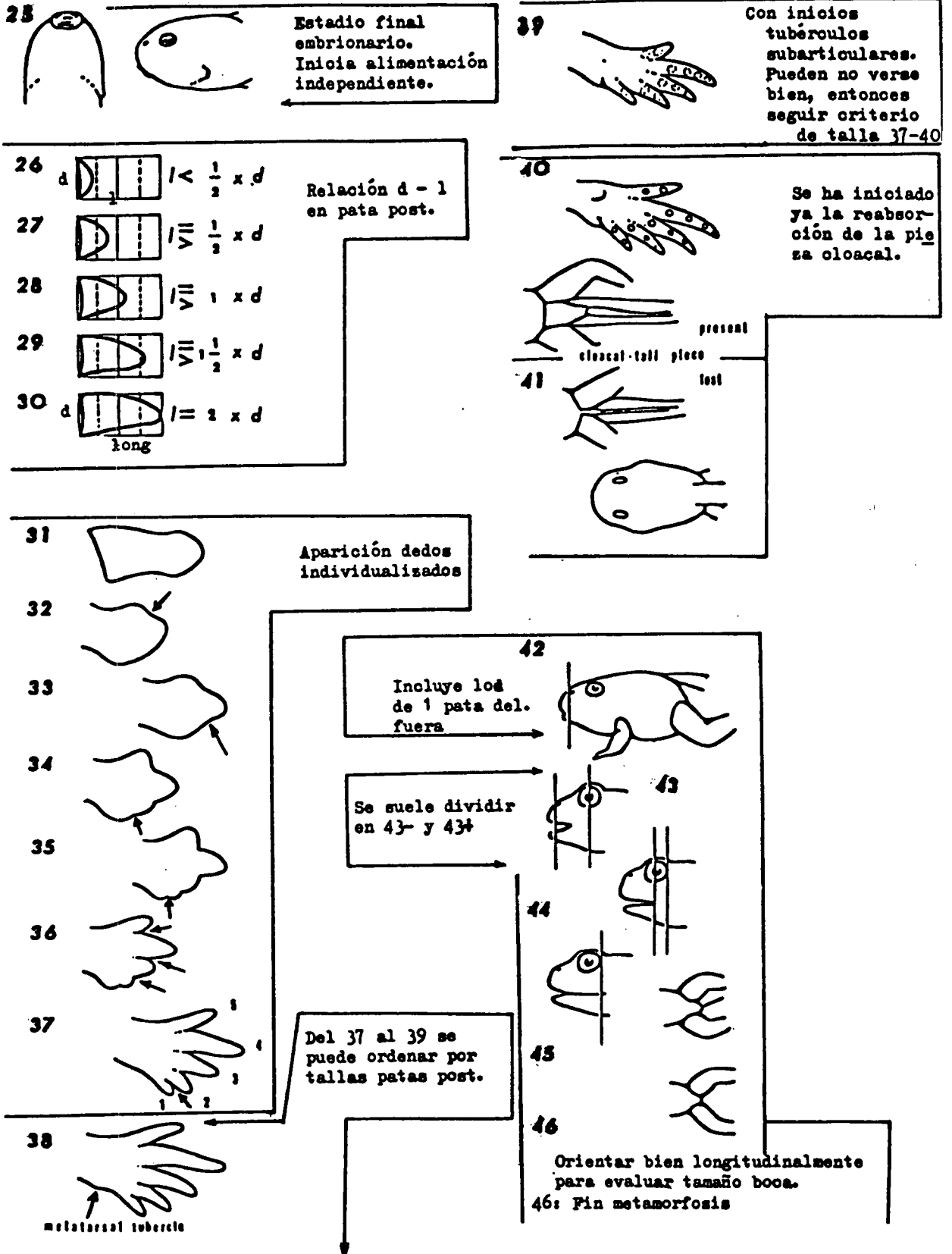


Figura 4.- Características de los estadios de desarrollo 25 a 46 de la tabla de Gosner (1960).

## 2.2. TECNICAS DE MUESTREO

El trabajo de campo consistió en la captura de ejemplares juveniles y adultos y en muestreos periódicos de una charca para obtener renacuajos de todos los estadios de desarrollo, determinar la duración del periodo larvario y la estructura de la población.

La captura de juveniles y adultos se realizó mediante recorridos nocturnos en coche a poca velocidad (10-15 Km/h) en noches de lluvia, a través de biotopos adecuados, resultando más fructíferas las primeras semanas de lluvia intensa de otoño y primavera así como los recorridos a pie por las orillas de las charcas de reproducción. En este último caso sólo se obtuvieron adultos, y con el primer método se consiguieron además individuos que no habían alcanzado todavía la madurez sexual.

Los ejemplares en los últimos estadios de la metamorfosis, que ya habían abandonado el agua, y los recién metamorfoseados se localizaban fácilmente bajo piedras en las proximidades de las charcas. En sitios con pocas piedras se ocultaban en las grietas del barro cuarteado; en este caso, cuando se observaba en una grieta tierra removida, se escarbaba con un palito o con el dedo hasta que la humedad era la adecuada y empezaban a aparecer los sapitos. Por lo general había más de uno en cada escondrijo.

Estos ejemplares eran trasladados vivos al laboratorio y, una vez pesados, se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Para la obtención de renacuajos se utilizaron salabres de 34 a 45 cm de diámetro, con una red de pesca incorporada de 2,5 mm de abertura de malla. De pie dentro de la charca, o desde la orilla, se pasa la manga en un sentido y otro dos o tres veces, próxima al fondo y entre la vegetación de la orilla -cuando la hay-, antes de sacarla fuera. Después de separar los renacuajos de los restos de vegetación y barro arrastrados con ellos, la muestra se fija en formalina al 4% tamponada con 0,5 g de carbonato magnésico por litro, para evitar la descalcificación de los huesos.

Las puestas se localizan a simple vista en las orillas de la charca, a

poca profundidad. La que se empleó en los experimentos fue trasladada al laboratorio en agua de la propia charca.

La charca de donde proceden la mayor parte de los renacuajos de P. cultripes está situada en San Agustín de Guadalix (Madrid) a 40° 41' de latitud N y 3° 37' de longitud W, y a 684 m sobre el nivel del mar. Es una excavación artificial sobre el cauce de un pequeño arroyo estacional, efectuada para que el ganado vacuno disponga de agua hasta comienzos del verano. Cuando se encuentra al máximo de su capacidad, en diciembre y enero, mide 6.45 x 16.74 m y tiene una profundidad máxima de 0.90 m.

Fue visitada desde el año 82 al 86, cada temporada con mayor asiduidad que la anterior. El último año se muestreó semanalmente durante los meses de febrero a julio, hasta que se secó. A los renacuajos obtenidos se les determinó el estadio de desarrollo, siguiendo la tabla de Gosner (1960). Se seleccionaron al azar 10 individuos de cada estadio para los estudios de crecimiento en condiciones naturales. Posteriormente, estos mismos ejemplares se utilizaron para describir el desarrollo del esqueleto.

## 2.3. TECNICAS HISTOLOGICAS

### 2.3.1. Tinciones de cartílago y hueso

Se han utilizado dos técnicas distintas de tinción de esqueletos articulados. En la primera se tiñó el hueso con alizarina roja S y el cartílago con azul de alcian 8GX (Simons & Horn, 1971; Wassersug, 1976; Dinkerkus & Uhler, 1977), y en la segunda sólo se coloreó el hueso con alizarina roja S (Taylor, 1967).

El azul de alcian se une específicamente a los mucopolisacáridos ácidos de la sustancia fundamental del cartílago (Simons & Horn, 1971; Dinkerkus & Uhler, 1977), y la alizarina se asocia con las sales cálcicas del hueso (Locquin & Langeron, 1985).

Prácticamente en cada uno de los pasos se han introducido modificaciones no publicadas, por ello paso a detallarlas aquí.

Las primeras manipulaciones son comunes a los dos procedimientos, y son:

**Fijación.** En formalina al 4% tamponada con 0.5 g de carbonato magnésico ( $(\text{CO}_3\text{Mg})_2\text{Mg}(\text{HO})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , aprox.) por cada litro de solución, al menos durante dos días. También es posible utilizar material de colecciones conservado en metanol o etanol de 60-70%, pero hay que dejarlo en formalina algunos días antes de empezar y en este caso la transparencia de las masas musculares que se consigue no es tan buena como cuando el material ha sido fijado y conservado en formalina desde el primer momento.

**Evisceración.** Retirar la piel del espécimen. Cuando se van a teñir ejemplares completos, es preciso extraer también la totalidad de las vísceras y los ojos, así como los tejidos conjuntivos fuertemente pigmentados que luego ocultarían las estructuras sobre las que se encuentran.

**Lavado.** Sumergir el ejemplar en abundante agua del grifo, cambiándola al

menos dos veces, durante 12 horas. La utilización de agua templada acelera el proceso. Si el ejemplar presenta abundante pigmentación oscura bajo la piel, es preciso sumergirlo en una solución de agua oxigenada al 3% durante 2 o 3 horas en estufa a 30°C para blanquear los pigmentos. Lavar con agua del grifo y depositarlo en baños sucesivos de agua desionizada cada 2 horas, tres o cuatro veces.

A partir de aquí el proceso difiere según se vaya a realizar una tinción doble (cartilago-hueso) o sencilla (hueso).

Si se va a proceder a una tinción doble del sistema esquelético, se comienza por:

**Tinción del cartilago.** Se seca el exceso de agua del ejemplar con papel de filtro y se introduce, junto con su número grabado en cinta plástica, en una solución teñidora constituida por 15 mg de azul de alcian 8GX, 70 ml de etanol absoluto y 30 ml de ácido acético glacial. Si el proceso se realiza en estufa a 30°C requiere unas 12-14 horas; a temperatura ambiente puede necesitar más de 24 horas, depende del tamaño del ejemplar y del tiempo que haya permanecido en líquidos conservadores. Los mejores resultados se obtienen con especímenes fijados y conservados expofeso para la utilización de esta técnica. Es muy importante no dejar el ejemplar en la solución teñidora más tiempo del necesario, pues en este caso también se tife de azul la musculatura, haciendo prácticamente imposible conseguir que transparente después.

**Fijación de la tinción.** Se realiza por deshidratación completa en etanol absoluto, secando el ejemplar previamente con papel de filtro. Hay que cambiar el etanol por lo menos una vez o más, hasta que deje de virar a color azulado con el paso de las horas. Debe estar en etanol al menos dos días. Es importante que la deshidratación sea completa para evitar que el colorante destiña y se difunda por todas las estructuras. En caso de necesidad, el proceso de tinción puede interrumpirse en este momento durante varias semanas.

**Transparentación.** Primero se procede a la rehidratación del ejemplar,

pasándolo por una serie de baños de etanol de concentración decreciente (75º, 50º, 25º) hasta agua desionizada, donde debe permanecer unas dos horas. Los ejemplares más pequeños pueden transferirse a alcohol de 50º y al agua directamente; los mayores pueden requerir hasta dos o tres horas en cada paso. Seguidamente, sumergir el espécimen en una solución enzimática elaborada con 30 ml de agua saturada con borax (tetraborato sódico,  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ), 70 ml de agua desionizada y 1 g de tripsina, en estufa a 30ºC. Dejar el ejemplar en este baño hasta que los tejidos estén suficientemente macerados -el cuerpo parece goma al levantarlo con pinzas y los huesos son visibles a través de los tejidos-, cambiando la solución cada dos o tres días, o más frecuentemente si toma un color azulado o huele a podrido. Es importante sacar el material a tiempo, pues de lo contrario se descompondría en fragmentos.

**Tinción del hueso.** Se introduce el ejemplar en una disolución de hidróxido potásico (KOH) al 1.5%, a la que se ha añadido 1 ml de solución teñidora por cada 100 ml. La solución teñidora se elabora con: 5 ml de ácido acético, 10 ml de glicerina, 60 ml de solución del hidrato de cloral al 1% y se satura con alizarina roja S.

Se mantiene el ejemplar sumergido hasta que los huesos se colorean de rojo. El proceso dura menos de 24 horas y se debe interrumpir cuanto antes. Si antes de llegar a este paso el ejemplar ha macerado en exceso, se utilizan disoluciones menores de KOH -hasta del 0.5%-.

**Acabado del proceso de transparentación.** Pasar a la solución constituida por: 20 partes de glicerina, 3 partes de KOH al 4% y 77 partes de agua desionizada. Si el ejemplar se encuentra perfectamente transparentado este paso no es necesario.

**Preparación para el almacenaje.** Transferir a una mezcla de 40 partes de glicerina y 60 partes de etanol de 65º. Dejar el ejemplar allí hasta que suba a la superficie; requiere dos o tres días a temperatura ambiente y de 6 a 12 horas a 30ºC, dependiendo del volumen.

Seguidamente, pasar a 70 partes de glicerina y 30 partes de etanol de 65º. Mantenerlo aquí hasta que <sup>no</sup> flote: dos-tres días. Se acelera con la

temperatura.

Finalmente, pasar a glicerina pura. Dejarlo hasta que <sup>no</sup> suba a la superficie: un día. Se acelera con la temperatura.

**Almacenaje.** Cambiar la glicerina y añadir un cristal de timol para evitar el crecimiento de mohos y bacterias.

Si únicamente va a procederse a la tinción del hueso, se continúa el proceso en la fase de transparentación sin pasar por los baños decrecientes de alcohol -porque el ejemplar se encontraría totalmente hidratado- y se ejecutan todos los pasos siguientes de la manera ya descrita hasta el almacenamiento final en glicerina.

Con estos métodos de preparación se evitan los problemas de interpretación derivados de la reconstrucción a partir de material seccionado serialmente.

-----

Los ejemplares se examinaron a la lupa binocular varias veces. De cada uno, se anotaron todas las piezas teñidas con alizarina del cráneo, la columna vertebral, los miembros anteriores y posteriores y sus respectivas cinturas. En los estadios de desarrollo más tempranos se apuntaron también todos los elementos diferenciados por el azul de alcian en los miembros.

De cada estadio de desarrollo se efectuaron dibujos, con una cámara clara Wild Heerbrugg typ. 308700, y fotos, al menos en norma dorsal, del estado de osificación y/o condricación de los cuatro segmentos en que hemos dividido el esqueleto. Y también, del carpo y del tarso de juveniles y adultos de distintos tamaños.

### **2.3.2. Preparación de esqueletos desarticulados**

Para la preparación de esqueletos desarticulados se siguieron dos procedimientos, según el material fuera fresco o hubiera estado conservado en

alcohol o formol.

Los ejemplares frescos, después de retirarles la piel, las vísceras y los ojos y de ensartar un hilo de nylon de pescar a través de todas las vértebras, se introducen enteros en frascos de cristal llenos de agua en sus dos terceras partes y se cierran herméticamente. Se colocan en estufa a 40°C y se dejan macerar agitando energicamente cada doce horas. El tiempo que tardan en pudrirse varía entre dos y siete días. Una vez se observan en el fondo del frasco todos los huesos desarticulados y restos de tejidos, se vierte el contenido sobre un tamiz de 0.5 mm o 0.1 mm de luz, según el tamaño del ejemplar y se procede a un concienzudo lavado con agua del grifo. Se vuelven a introducir los huesos, ya separados de los restos, en el frasco y se añade una solución de agua oxigenada al 3% dejándola actuar desde unos minutos hasta media hora, dependiendo nuevamente del tamaño, con objeto de desengrasar, blanquear y desinfectar los huesos. Nuevamente se lava con abundante agua, y se dejan secar completamente sobre papel de filtro, desde donde se introducen en las cajitas de almacenaje hasta su posterior estudio.

Los ejemplares procedentes de colecciones de museo que han permanecido largo tiempo en soluciones de alcohol o formol, después de retirarles la piel, las vísceras y los paquetes musculares más importantes de los miembros, se introducen en una disolución de KOH al 4% en estufa a 40°C. El proceso debe vigilarse muy de cerca, ya que necesita ser interrumpido antes de que los huesos estén completamente limpios, pues ello significa que el KOH ha comenzado a deteriorarlos. Se lavan con abundante agua corriente y se terminan de limpiar a la lupa con pinzas; en este supuesto no es imprescindible desinfectar con agua oxigenada. Posteriormente, se secan y almacenan como en el caso anterior.

### 2.3.3. Técnicas de esqueletocronología

La determinación de la edad de los ejemplares postmetamórficos del género Pelobates se realizó contando el número de líneas hematoxínófilas de detención del crecimiento -LAC, en francés- en cortes transversales de fémur, previamente descalcificados con ácido nítrico (NO<sub>3</sub>H) al 5%, siguiendo las

técnicas publicadas por Smirina (1972) y Castanet (1975; 1981).

Estas marcas histológicas representan paradas momentáneas de la osteogénesis. Son siempre de espesor muy débil (10-15  $\mu\text{m}$  máximo), translúcidas, más refringentes y más cromófilas que el resto del tejido óseo (Castanet, 1987). Están constituidas por una yuxtaposición bastante desordenada y más o menos linear de fibras de colágeno. La menor organización estructural del hueso explica en gran parte que el mineral y la sustancia fundamental estén ligeramente más concentradas a su nivel: este aspecto físico así como las propiedades químicas particulares adquiridas por una superficie ósea en parada de crecimiento, originan las propiedades hematoxinófilas de las líneas cimentantes (Castanet, 1981). No se tiñen con colorantes específicos para el colágeno. Se consideran basófilas pues son fuertemente positivas al reactivo de Shiff, aunque no se ha realizado ningún estudio específico para probarlo (Castanet, 1981).

Se procede a continuación a la descripción de algunas modificaciones introducidas en nuestro trabajo, respecto a las técnicas de los autores mencionados.

Los fémures utilizados procedían de esqueletos desarticulados por los procedimientos expuestos anteriormente. Tentativas previas nos demostraron que las líneas cimentantes se ponen de manifiesto incluso en los huesos de anuros procedentes de egagrópilas de lechuga (Tyto alba), después de haber pasado por el estómago del ave, y de haber estado en el campo a la intemperie durante años. Por tanto, no es necesario fijar previamente el material en Bouin o etanol de 70 $^{\circ}$ , como aconsejan los autores anteriormente citados y como nosotros mismos hicimos al comienzo del trabajo.

**Descalcificar.** Los fémures secos se introducen en un solución abundante de ácido nítrico al 5% entre  $\frac{1}{2}$  y 2 horas, hasta que puedan ser atravesados fácilmente por un alfiler entomológico. Si el hueso es muy grueso, se cambia la solución una o dos veces. Se lava en agua del grifo durante 12 horas, renovándola con frecuencia y se fija en etanol de 70 $^{\circ}$ .

**Cortar.** Con microtomo de congelación a 20  $\mu$  de espesor.

**Tañir.** En un porta excavado con varias gotas de hematoxilina de Ehrlich durante 20-35 min, según el grado de madurez del tinte. La hematoxilina se preparó mezclando: 50 ml de agua destilada, 50 ml de etanol absoluto, 50 ml de glicerina, 5 ml de ácido acético glacial, 1 g de hematoxilina y añadiendo sulfato aluminico potásico ( $(SO_4)_2 AlK. 12H_2O$ ) hasta la saturación. Se deja madurar por lo menos un mes y se filtra antes de su utilización. Mientras más tiempo lleva preparada, menos minutos necesita para teñir.

**Lavar.** Con agua desionizada, cambiando los cortes de un pocillo a otro por lo menos una vez.

**Montar.** Los cortes ya hidratados entre porta y cubre con glicerol-gelatina de Merck.

-----

De cada individuo se montaron entre 15 y 20 cortes de la diáfisis del fémur izquierdo. Después de estudiar cada corte al microscopio, se seleccionó el mejor y se realizó una fotografía en blanco y negro del mismo. Todas las fotos fueron realizadas con el mismo objetivo y reveladas con la misma ampliación. Las fotografías permitieron comparar unas poblaciones con otras, realizar medidas sobre ellas y comprobar si la primera línea de detención del crecimiento había sido completamente reabsorbida.

En los cortes transversales de huesos largos de anfibios adultos se observan dos estructuras óseas: un anillo exterior de origen pericondral, que crece en grosor por aposición de capas desde el exterior y en el que se encuentran las líneas de detención del crecimiento, y un anillo interno, de origen endocondral, de crecimiento centripeto hacia el interior de la médula, en el que también se aprecian líneas hematoxinófilas mucho más próximas entre sí y difíciles de contar. El límite entre ambos tipos de hueso lo señala la línea de reabsorción; se tiñe con hematoxilina más intensamente que todas las demás y presenta un perfil irregular (Castanet, 1975).

Antes de que comience la formación de hueso endocondral, se produce reabsorción en la parte interna del anillo pericondral. Este proceso es de distinta intensidad según las especies y las poblaciones (Hemelaar, 1981;

Esteban & Sanchíz, 1986). En el peor de los casos se ha comprobado la desaparición completa de la primera línea y parte de la segunda en Rana temporaria (Smirina, 1972).

Para averiguar si en un adulto ha desaparecido completamente la primera línea, hemos superpuesto la fotografía de su corte sobre una de un juvenil con una sola línea y hemos comparado los perímetros de la primera línea de ambos a contraluz. Si en el adulto la primera línea que se aprecia -completa o parcialmente reabsorbida- es de diámetro semejante al de la única línea del juvenil, suponemos que dicha línea es la primera; en cambio, si su diámetro es mucho mayor, hemos considerado que la primera línea se ha reabsorbido completamente y que, en realidad, la primera que vemos es la segunda.

El error en la determinación de la edad lo hemos calculado realizando exámenes sucesivos de la misma preparación, separados por periodos de tiempo de más de una semana. Si al tercer repaso no se había detectado ninguna diferencia en la determinación del número de líneas, la edad se daba por buena; si había diferencias, se repetían las observaciones hasta conseguir tres resultados iguales seguidos; si en el décimo examen no se había llegado a un compromiso, se aceptaba la edad modal y se establecía como error el rango de los tres últimos resultados.

## 2.4. PROTOCOLO DE LOS EXPERIMENTOS DE CRECIMIENTO Y DESARROLLO LARVARIO

### 2.4.1. Experimento para determinar la temperatura óptima de crecimiento

Se prepararon tres acuarios de 9 litros de capacidad con 27 renacuajos cada uno (densidad = 3 renacuajos/litro). Sustrato arenoso con rocas calcáreas; pH = 7,4. Todos los renacuajos procedían de la misma puesta y se encontraban en estadios de desarrollo alrededor del 30 de la tabla de Gosner. Fueron elegidos al azar de un acuario a temperatura ambiente donde se había depositado una puesta recogida en San Agustín de Guadalix (Madrid). Se les alimentó con lechuga fresca ad libitum. Mediante un calentador con termostato se mantuvo constante la temperatura del agua de cada acuario a 25, 28 y 31°C, respectivamente. A intervalos regulares se midió el peso total de los renacuajos de cada acuario en balanza de precisión, con una aproximación de 0.001 g. A los 18 días se dio por terminado el experimento al aparecer los primeros individuos en metamorfosis.

### 2.4.2. Experimento para determinar la edad a que se alcanza cada estadio de desarrollo a temperatura óptima

Dos grupos de renacuajos, de cuatro ejemplares cada uno y procedentes de la misma puesta, fueron criados en laboratorio a temperatura óptima y a temperatura ambiente, respectivamente.

Los acuarios tenían una capacidad de 28 litros (densidad = 1 renacuajo/7 litros) para que el agua no tuviera que ser cambiada a lo largo de todo el experimento. Los ejemplares fueron alimentados con hojas de lechuga cruda ad libitum y pienso compuesto para truchas. Se introdujo en el recipiente una piedra caliza y se les sometió al ciclo natural de luminosidad. Cada renacuajo fue examinado diariamente a la misma hora, anotándose su estadio de desarrollo (Gosner, 1960), su longitud cabeza + cuerpo, su longitud total y la temperatura máxima y mínima del agua desde el día anterior.

## 2.5. DEFINICION DE LA BIOMETRIA EXTERNA

### 2.5.1. Medidas externas de renacuajos

En norma lateral (figura 5) y estableciendo como eje de orientación el que pasa entre el extremo más anterior del hocico y el extremo de la cola, se realizaron dos medidas paralelas a dicho eje:

**LCC:** Longitud cabeza + cuerpo. Distancia entre el extremo más anterior del hocico y el punto más posterior de la pieza cloacal.

**LT:** Longitud total. Distancia entre el extremo más anterior del hocico y el extremo de la cola.

Se midieron todos los renacuajos antes de ser teñidos. Las medidas se efectuaron con la ayuda de un micrómetro digital Nikon measurescope 10 con precisión 0.001 mm, redondeándose a la centésima de milímetro más próxima.

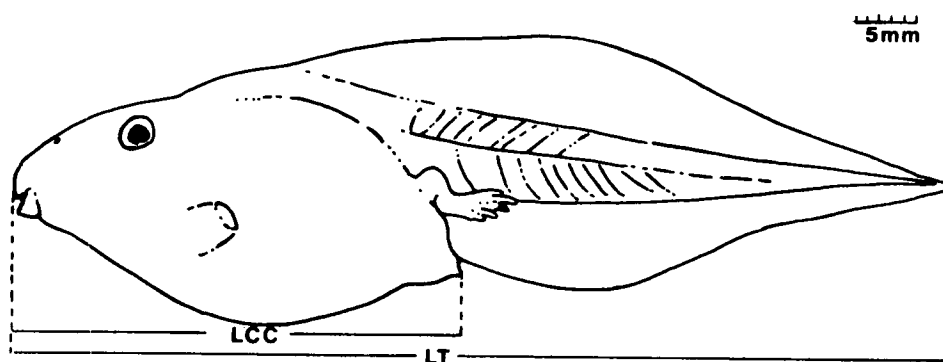


Figura 5.- Medidas externas efectuadas sobre renacuajos. LCC, longitud cabeza + cuerpo, y LT, longitud total.

### 2.5.2. Medidas externas de adultos

Los ejemplares se midieron en fresco, recién sacrificados o recién descongelados. Sólo se midieron conservados en alcohol los procedentes de Museos.

Se definieron las medidas señaladas en la figura 6. La mayoría se tomaron con calibre Mitutoyo (precisión 0.05 mm), excepto LCC (con regla, precisión 0.5 mm), TMA y TML (con micrómetro digital, precisión 0.001 mm, redondeando a la centésima de mm más próxima) y PESO (con balanza Mettler PE 160, precisión 0.001 g).

**LCC:** Longitud cabeza + cuerpo. Distancia entre el extremo más anterior del hocico y el final del animal, medida sobre regla con tope en el cero y presionando el ejemplar ligeramente contra ella, señalando el extremo posterior sobre la regla con un compás de puntas finas.

**AC:** Anchura de la cabeza, al nivel de la articulación de la mandíbula inferior con la superior.

**MA:** Longitud del miembro anterior, desde el arranque del brazo por su parte anterior hasta el final del 3º dedo.

**MP:** Longitud del miembro posterior. Con la pata extendida al máximo, desde el punto medio de la cloaca hasta el final del dedo más largo.

**F:** Longitud del fémur. Con las articulaciones flexionadas en ángulo recto, desde el punto medio de la cloaca hasta la articulación del fémur con la tibio-fíbula.

**T:** Longitud de la tibia, con las articulaciones flexionadas en ángulo recto, desde la articulación del fémur con la tibio-fíbula hasta la articulación de ésta con el tibialfibular.

**PIE:** Longitud del pie, con las articulaciones de la pata flexionadas en ángulo recto, desde la articulación del tibialfibular con el resto del tarso hasta el

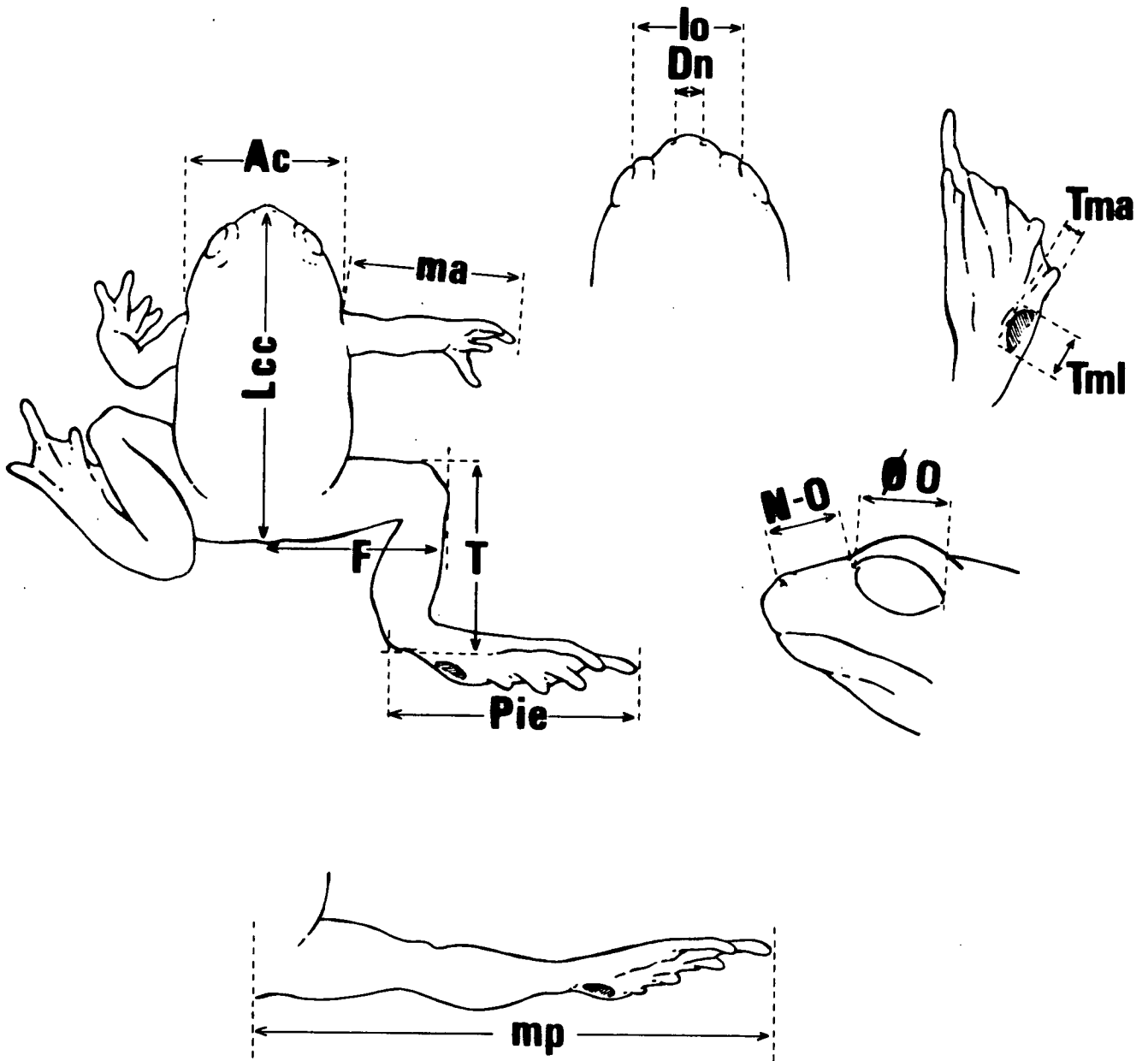


Figura 6 .- Medidas externas efectuadas sobre adultos.

extremo del 4º dedo, que es el más largo.

**IO:** Distancia mínima entre los globos oculares.

**DN:** Distancia mínima entre las narinas.

**NO:** Distancia mínima entre la narina y el globo ocular.

**DO:** Diámetro del globo ocular.

**TML:** Longitud del tubérculo metatarsiano, por su cara dorsal, al nivel del borde de la espuela, medida con micrómetro digital.

**TMA:** Altura máxima de la espuela, ortogonal al eje longitudinal de la misma, medida con micrómetro digital.

Se tomaron estas medidas sobre todos los ejemplares del género Relobates cuyo número de colección aparece seguido de (ME) en el apéndice I; en las restantes especies sólo se consideró la variable LCC.

## 2.6. ANALISIS ESTADISTICOS

En primer lugar, se realizó una descripción básica de las características de las variables, considerando su media ( $\bar{x}$ ), su desviación típica ( $s$ ), el número de casos examinados ( $n$ ) y los valores máximos y mínimos detectados. A partir de estos datos, y sólo cuando se consideró necesario para las representaciones gráficas, se calcularon también los límites de confianza de la media al 95%.

El tipo de distribución de las variables -si eran normales o nó- se determinó con el programa Microstat, en un ordenador personal AT compatible con IBM, Ataió Comet 11.5.

La comparación de los valores medios de una variable con distribución normal (p. e., LCC o cualquier otra variable métrica con distribución continua) entre dos poblaciones, se realizó con un test de la  $t$  de Student para varianzas separadas, siendo la hipótesis nula ( $H_0$ ) que las dos muestras proceden de la misma población y, por tanto, tienen la misma media.

Cuando las variables a comparar no presentaban una distribución normal (p.e., la edad) se utilizó el test de la  $U$  de Mann-Witney, siendo la hipótesis nula que las dos muestras provienen de poblaciones que siguen el mismo tipo de distribución.

Para determinar la existencia de asociación entre dos variables cuando una de ellas no se distribuía normalmente (p. e., la edad y el tamaño) utilizamos el coeficiente de correlación ordenada de Spearman, comprobando si la hipótesis nula  $r_s < 0$  se podía rechazar con un nivel de significación del 95% ( $P < 0.05$ ), del 99% ( $P < 0.01$ ), o del 99.9% ( $P < 0.001$ ).

Los cálculos se realizaron con la ayuda de los programas de la serie BMDP, en el Centro de Cálculo del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSION

### 3.1. TRABAJOS PRELIMINARES

#### 3. 1. 1. Pelobates cultripes. TEMPERATURA OPTIMA DE CRECIMIENTO LARVARIO

La temperatura óptima de crecimiento larvario de Pelobates cultripes es aproximadamente de 28°C (Talavera & Sanchíz, 1985). En las figuras 7 y 8 y en la tabla 1 puede verse que el peso medio por renacuajo y el porcentaje de incremento de peso es mayor a 28°C que a las otras dos temperaturas estudiadas -25°C y 31°C-, y simétrico respecto a ellas.

A los 18 días de iniciado el experimento (en el estadio 30 de desarrollo de la tabla de Gosner) los primeros renacuajos alcanzaron el climax metamórfico (estadio 42) en el acuario a 28°C. Los incrementos de peso a 25°C son aceptables y los renacuajos llegan a completar la metamorfosis a esa temperatura; mientras que en el acuario a 31°C, después de 30 días, ningún individuo había superado el estadio 36. Por tanto, el rango de temperaturas que seleccionaría P. cultripes incluiría los 25°C, pero no llegaría a los 31°C.

Este resultado se encuentra en el rango de temperaturas seleccionadas por Pelobates fuscus: 25,1 - 28,6°C (Rühmekorf, 1958), situándose próximo a su extremo superior. Se incluye igualmente en los rangos de temperaturas preferidos por Bombina variegata, Bufo bufo y Rana esculenta (Rühmekorf, 1958); queda por encima de los rangos de Alytes muletensis (Kadel & Hemmer, 1984; Martens, 1984), Alytes obstetricans, Hyla arborea, Rana temporaria y R. arvalis (Rühmekorf, 1958), y por debajo de las temperaturas preferidas por Bufo calamita y B. viridis (Rühmekorf, 1958).

Peso medio  
por renacuajo

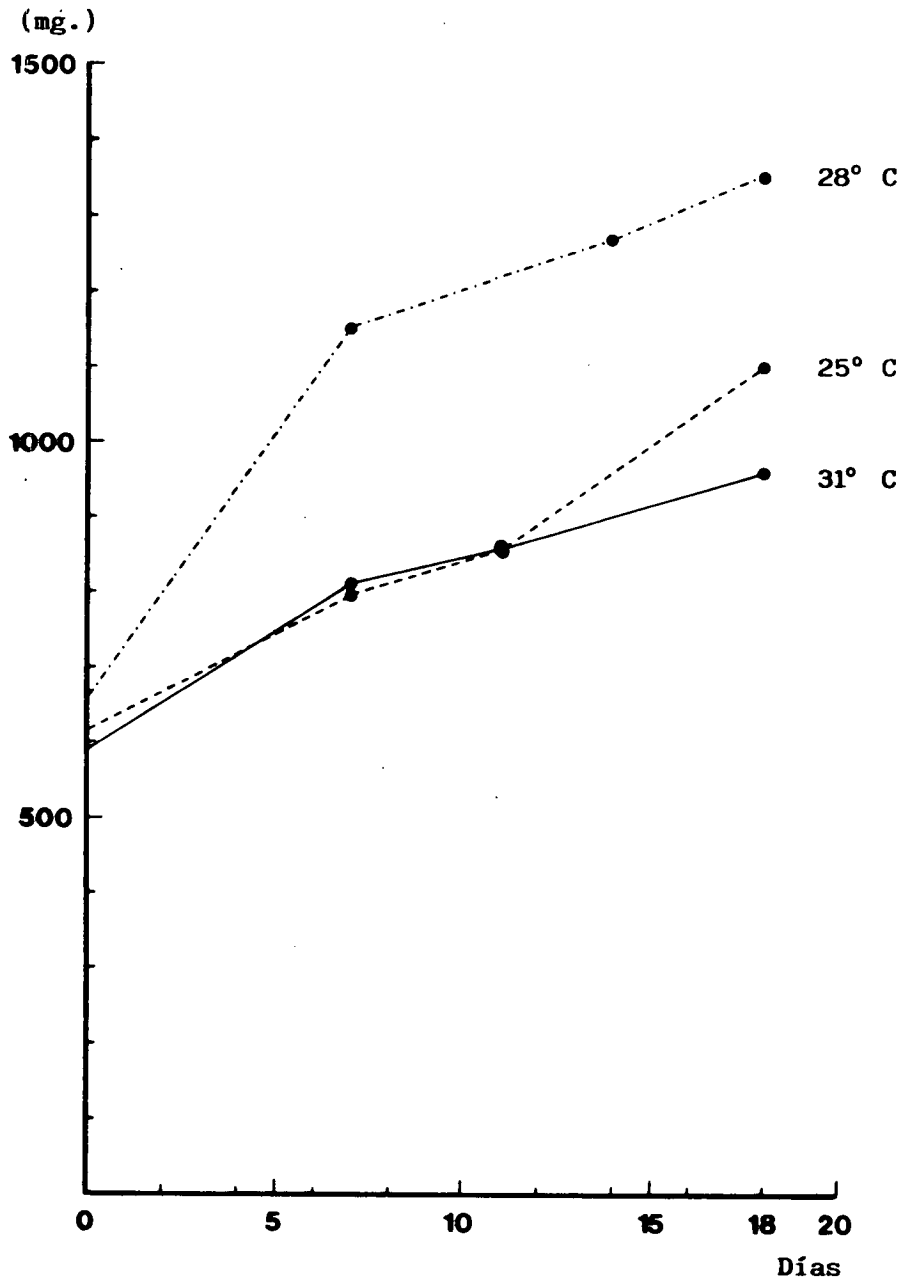


Figura 7.- Pelobates cultripes. Peso medio (mg) por renacuajo, en los acuarios a 25, 28 y 31°C.

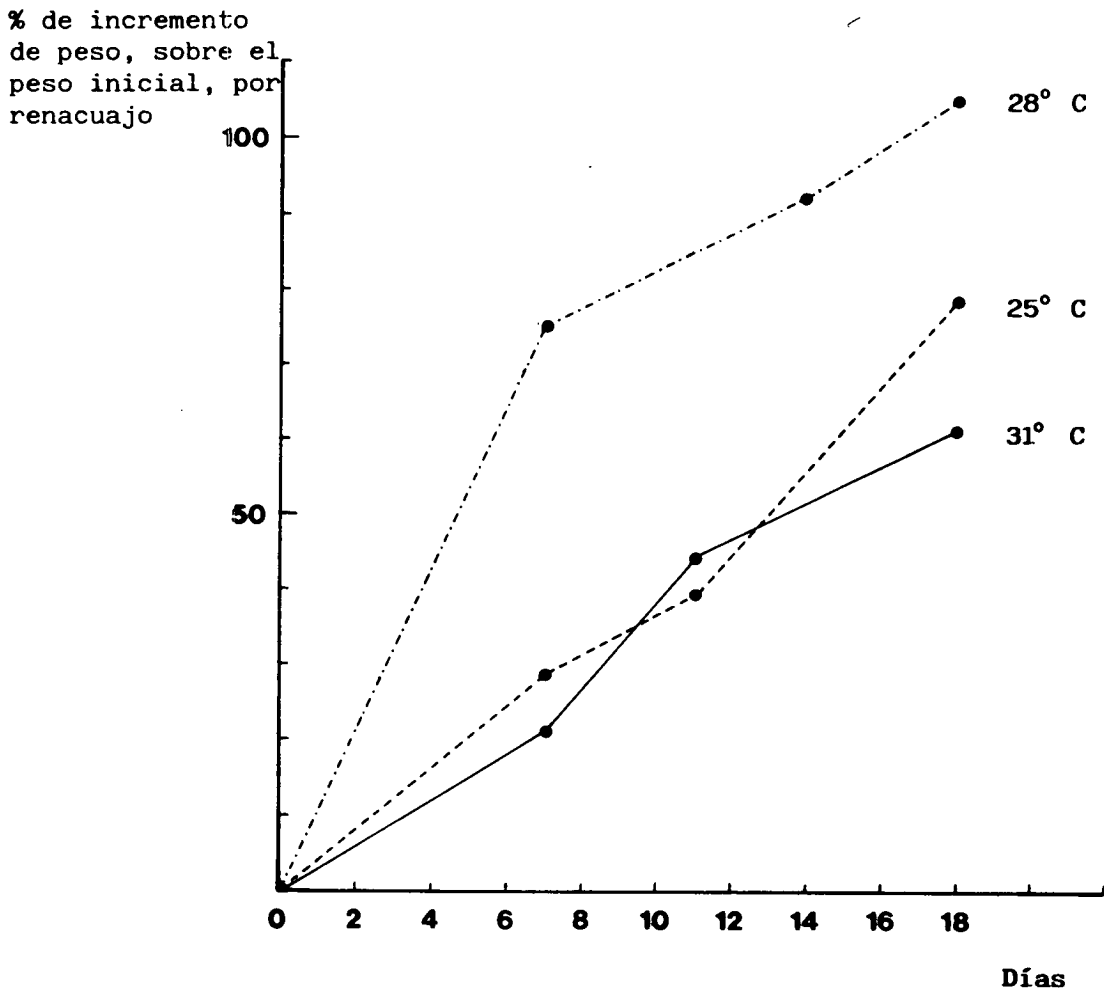


Figura 8.- Pelobates cultripes. Porcentaje de incremento de peso sobre el peso medio inicial de cada renacuajo a 25, 28 y 31°C.

Tabla 1.- Peso medio (mg) por renacuajo y porcentaje de incremento sobre el peso inicial en renacuajos de Pelobates cultripes criados en el laboratorio a tres temperaturas distintas.

25 ° C				28 ° C			31 ° C		
Día	n	Peso medio por renacuajo (mg)	% Δpeso	n	Peso medio por renacuajo (mg)	% Δpeso	n	Peso medio por renacuajo (mg)	% Δpeso
0	27	614.07	0.00	26	659.23	0.00	28	593.57	0.00
7	27	792.96	29.13	23	1154.35	75.11	28	713.21	20.16
11	27	857.41	39.62	--	-----	---	27	857.41	44.45
14	--	---	--	23	1268.26	92.38	--	--	--
18	27	1100.37	79.19	23	1350.00	104.78	26	958.85	61.54

### 3.1.2. Pelobates cultripes. EDAD A QUE SE ALCANZA CADA ESTADIO DE DESARROLLO DEL PERIODO LARVARIO A TEMPERATURA OPTIMA

En la tabla 2 se reseña la edad media en que Pelobates cultripes alcanza cada estadio de Gosner (1960) cuando la temperatura del agua se mantiene constante a 28°C. A dicha temperatura la duración media del periodo larvario -entendiendo como tal el comprendido entre los estadios 25 y 46- es de 33,33 días. Los valores extremos registrados en renacuajos procedentes de la misma puesta fueron de 30 y 36 días. La edad a que se alcanza cada estadio se utilizará posteriormente en la elaboración de los índices de osificación de la especie a lo largo del desarrollo.

En la tabla 3 se muestran las duraciones medias de cada estadio de desarrollo (Gosner, 1960) a temperatura óptima. Es de destacar la enorme variación entre unos y otros. Algunos como el 25, 32, 33 y 39 transcurren en menos de un día; mientras el 36 y 37 duran tres o más de cuatro días, respectivamente.

La figura 9 presenta el porcentaje de tiempo del desarrollo larvario que emplea cada estadio. A temperatura óptima, Pelobates cultripes permanece casi el 14% del tiempo en el estadio 37; cuando la temperatura del agua se mantiene constante, este estadio es, con diferencia, el más largo de todos.

Tabla 2.- Pelobates cultripes. A temperatura óptima de crecimiento, edad media a que se alcanza cada estadio de desarrollo (Gosner, 1960) del periodo larvario.

Estadio Gosner	Edad media (días)	Edad mínima (días)	Edad máxima (días)
23	0	0	0
26	1.00	1	1
27	2.00	2	2
28	3.50	3	4
29	4.75	4	6
30	6.50	5	8
31	8.00	6	10
32	9.62	8	12
33	10.37	9	13
34	11.25	10	14
35	12.25	11	15
36	13.75	12	17
37	16.75	14	21
38	21.25	18	24
39	23.87	20	26
40	24.75	21	27
41	25.75	22	28
42	27.75	24	30
43	29.00	26	31
44	31.00	27	34
45	32.33	29	35
46	33.33	30	36

Tabla 3.- Pelobates cultripes. A 28°C, duración media de cada estadio de Gosner (1960) y porcentaje de tiempo del desarrollo larvario que emplea cada estadio.

Estadio Gosner	Duración media (días)	Duración mínima (días)	Duración máxima (días)	% de tiempo sobre la duración total del desarrollo larvario
25	<1	-	-	-
26	1.00	1	1	3.09
27	1.50	1	2	4.64
28	1.25	1	2	3.87
29	1.75	1	2	5.41
30	1.50	1	2	4.64
31	1.62	0.5	2	5.01
32	0.75	0.5	1	2.32
33	0.88	0.5	1	2.72
34	1.00	1	1	3.09
35	1.50	1	2	4.64
36	3.00	2	4	9.28
37	4.50	3	6	13.92
38	2.62	2	3	8.10
39	0.88	0.5	1	2.72
40	1.00	1	1	3.09
41	2.00	2	2	6.19
42	1.25	1	2	3.87
43	2.00	1	3	6.19
44	1.33	1	2	4.11
45	1.00	1	1	3.09

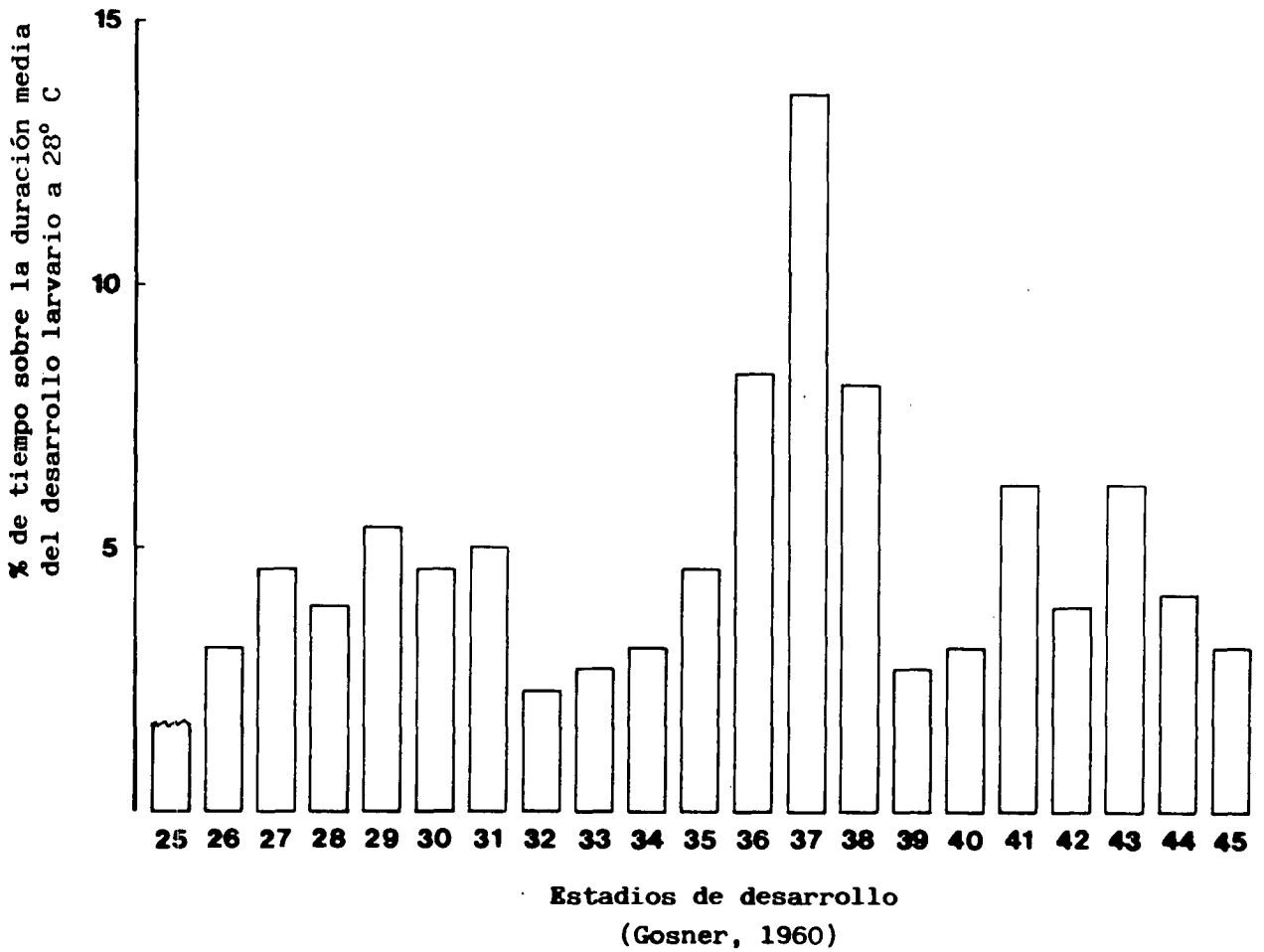


Figura 9.- Pelobates cultripes. A temperatura óptima, porcentaje de tiempo que emplea cada estadio de Gosner (1960) del total del desarrollo larvario.

### 3. 1. 3. TALLA EN CADA ESTADIO DE DESARROLLO DE Pelobates cultripes Y Pelodytes punctatus

La tabla 4 muestra los estadísticos básicos, a cada estadio de Gosner (1960), de la longitud cabeza + cuerpo (LCC) de Pelobates cultripes a lo largo de su desarrollo larvario. Todos los renacuajos fueron colectados en la misma charca (San Agustín de Guadalix, Madrid) entre los años 1984 y 1986. La LCC máxima se alcanza en el estadio 39 y es ligeramente superior a 30 mm. Se observa una disminución progresiva de esta variable durante los estadios 39 - 41 y la primera mitad de la metamorfosis (estadios 42 y 43). En nuestra muestra alcanza su valor mínimo en el estadio 44, en el cual el acortamiento medio de la longitud cabeza + cuerpo respecto al estadio 39 es del 23.88%.

La fuerte disminución de talla a lo largo de las últimas fases del desarrollo larvario de los Pelobates cultripes procedentes del campo nos obligó a efectuar comprobaciones en el laboratorio. Medimos diariamente ocho renacuajos hermanos, cuatro criados a 28°C y cuatro a temperatura ambiente. Desde su valor máximo, los primeros experimentaron una disminución de LCC del 22.03%, por término medio, y los segundos del 22.37%. Sus curvas de crecimiento se representan en la figura 10.

Buena parte de la reducción de LCC se explica por la reabsorción de la pieza cloacal durante los estadios 40 y 41. Otra parte, no cuantificada, se debe a la aproximación de unas vértebras a otras y al acortamiento de la cabeza que hemos detectado en los ejemplares teñidos y transparentados entre los estadios 41 y 43.

Es probable que esta disminución de los espacios intervertebrales sea causada por el aumento de la concentración de hormonas tiroideas durante la metamorfosis. Según Houdry & Beaumont (1985), entre otras muchas acciones, estas hormonas provocan disminución de volumen por deshidratación y fragmentación en ciertas fibras musculares. Hasta nuestro conocimiento no ha llegado ningún trabajo que mencione la aproximación que experimentan las vértebras de anuros durante la metamorfosis, por lo que sugerimos que se debiera continuar en el futuro con este tipo de investigación.

Tabla 4.- Pelobates cultripes. Renacuajos colectados en el campo. Estadísticos básicos de la longitud cabeza + cuerpo (mm) a cada estadio de Gosner (1960).

Estadio Gosner	n	$\bar{x}$ (mm)	s (mm)	valor mínimo (mm)	valor máximo (mm)
25	1	5.67	-	-	-
26	1	7.78	-	-	-
27	1	13.76	-	-	-
28	1	12.68	-	-	-
29	1	14.56	-	-	-
30	9	15.53	1.31	13.67	17.56
31	10	18.84	3.09	11.51	22.00
32	10	20.71	1.95	16.60	23.03
33	10	21.39	2.22	16.58	24.49
34	10	23.86	2.03	19.56	26.55
35	10	24.66	2.99	19.78	28.68
36	10	27.83	3.57	21.80	31.95
37	9	29.12	2.64	25.68	34.01
38	8	28.94	2.56	26.55	32.91
39	9	30.36	2.36	27.33	35.00
40	8	28.85	2.62	25.55	33.56
41	10	25.19	1.33	23.19	27.90
42	10	23.94	1.49	21.89	26.89
43	9	23.19	0.86	22.67	25.58
44	10	23.11	0.57	22.24	24.01
45	10	25.78	2.22	21.58	28.30
46	10	24.07	1.97	21.46	28.75
1ª sem. postm.	9	25.15	1.34	22.54	27.14
2ª sem. postm.	1	28.57	-	-	-

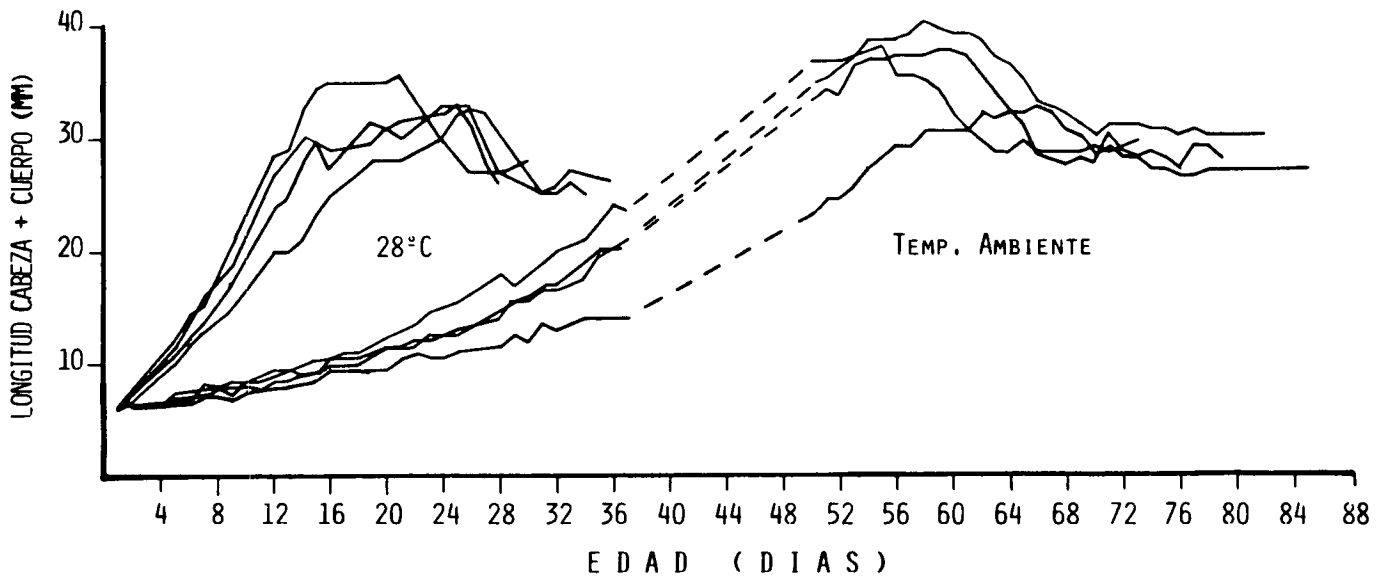


Figura 10.- Pelobates cultripes. Crecimiento en longitud cabeza + cuerpo (mm) de ocho renacuajos entre los estadios de desarrollo (Gosner, 1960) 25 y 46. Cuatro fueron criados a temperatura óptima -28°C- y cuatro a temperatura ambiente.

El tamaño medio de los P. cultripes al fin de la metamorfosis en la localidad estudiada fue de 24.07 mm, y los valores extremos registrados 21.46 y 28.75 mm.

Desafortunadamente, la imposibilidad de localizar una charca de reproducción de Pelodytes punctatus suficientemente cerca de nuestro domicilio para muestrear con la asiduidad necesaria, nos obligó a utilizar en nuestros estudios renacuajos criados en el laboratorio. En la tabla 5 se presentan los estadísticos básicos de la LCC de esta especie a cada estadio de Gosner (1960). Nuevamente la talla máxima (17.06 mm) se alcanza en el estadio 39, y durante la metamorfosis el cuerpo sufre una reducción progresiva de tamaño del 15.13%, que alcanza su mínimo en el estadio 44. A partir de este estadio los metamórficos comienzan a alimentarse de presas animales vivas (gusanos de harina que les eran ofrecidos diariamente).

El tamaño medio al fin de la metamorfosis fue de 13.77 mm, con valor mínimo registrado de 11.94 mm y máximo de 15.57 mm.

En la figura 11 se comparan los valores medios, intervalos de confianza al 95%, y rango de LCC de Pelobates cultripes y Pelodytes punctatus. Estos datos se utilizarán posteriormente en la elaboración de las trayectorias ontogenéticas de ambas especies, en el capítulo dedicado al desarrollo del sistema esquelético.

Tabla 5.- Pelodytes punctatus. Renacuajos criados en el laboratorio. Estadísticos básicos de la longitud cabeza + cuerpo (mm) a cada estadio de Gosner (1960).

Estadio Gosner	n	$\bar{x}$ (mm)	s (mm)	valor mínimo (mm)	valor máximo (mm)
25					
26	5	5.52	0.32	4.99	5.98
27	4	6.98	0.51	6.31	7.56
28	6	8.26	0.80	6.93	9.62
29	6	8.82	0.31	8.45	9.29
30	6	9.13	0.46	8.33	9.91
31	6	10.11	0.76	9.00	11.50
32	6	10.43	0.92	8.62	11.49
33	8	11.94	0.57	10.81	12.68
34	10	12.43	1.31	9.95	14.97
35	9	13.33	1.32	11.07	15.73
36	9	14.47	1.01	13.01	16.03
37	11	15.06	1.09	13.23	17.01
38	11	16.14	2.14	12.80	20.77
39	4	17.06	1.59	14.53	18.86
40	4	17.04	1.16	15.11	18.18
41	9	15.44	1.56	13.16	18.17
42	5	15.66	0.83	14.51	17.08
43	8	15.20	1.94	13.20	19.49
44	10	13.63	1.20	11.66	15.13
45	7	14.16	1.98	11.38	17.61
46	5	13.77	1.23	11.94	15.57
2ª sem. postm.	10	16.30	1.17	15.00	19.00

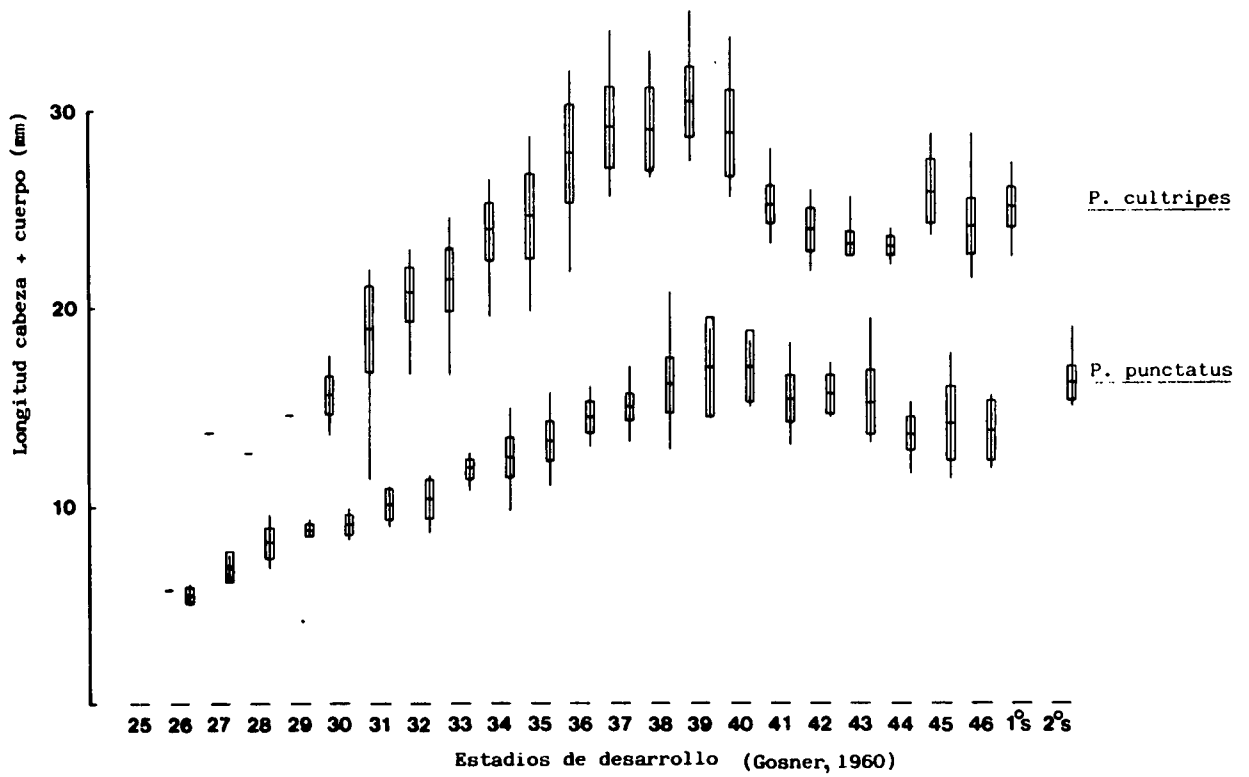


Figura 11.- Pelobates cultripes y Pelodytes punctatus. Valores medios, intervalos de confianza y rango de la longitud cabeza + cuerpo (LCC) en mm, a cada estadio de Gosner (1960).

3. 1. 4. ESTRUCTURA POR SEXOS Y EDADES DE LAS POBLACIONES  
POSTMETAMÓRFICAS DEL GENERO Pelobates ANALIZADAS

3.1.4.1. Pelobates cultripes

De esta especie hemos estudiado dos poblaciones: una procedente de las estribaciones de la sierra norte de Madrid, colectada a lo largo de todo el año en las carreteras y charcas alrededor de las localidades de El Berrueco (925 m sobre el nivel del mar) y San Agustín de Guadalix (684 m s.n.m.), y otra, capturada únicamente en la época de reproducción, de Porto Covo (Portugal) (<100 m s.n.m.) en la región del Bajo Alentejo. La figura 12 muestra la situación geográfica de ambas localidades.

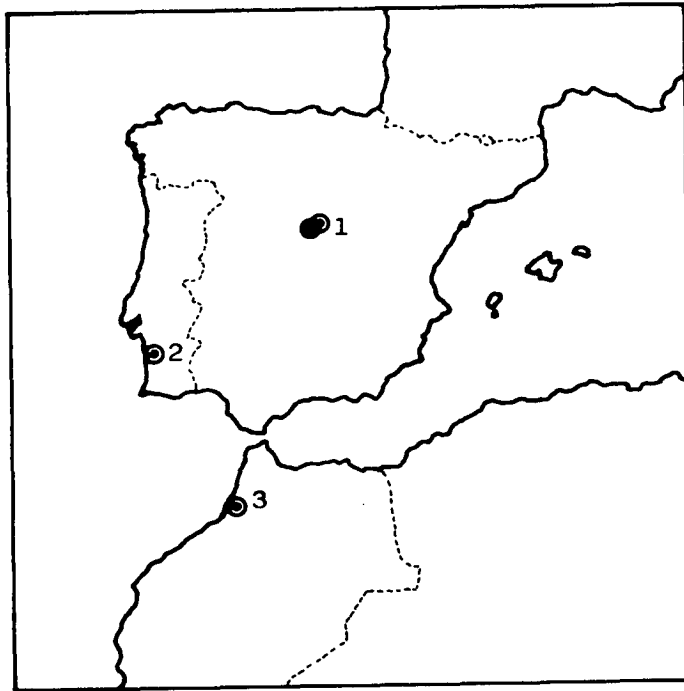


Figura 12.- Situación geográfica de las principales localidades de muestreo de Pelobates cultripes y P. varaldii. 1, El Berrueco y San Agustín de Guadalix (Madrid, España). 2, Porto Covo (Bajo Alentejo, Portugal). 3, Bosque de la Mamora (Kenitra, Marruecos).

La población de Madrid estaba compuesta de 41 individuos. De ellos, 10 eran sapitos recién metamorfoseados, 2 juveniles y el resto adultos: 15 machos y 14 hembras.

La edad de los juveniles y adultos se determinó por métodos esqueletocronológicos. En la figura 13 se aprecia la estructura por sexos y edades del material analizado.

La edad media de los machos fue 7.73 años y la de las hembras 6.79 años. La diferencia entre las edades medias de ambos sexos no resultó significativa (test de la U de Mann-Witney:  $n_1 = 15$ ;  $n_2 = 14$ ;  $U = 120$ ;  $P = 0.5052$ ).

La edad máxima detectada que alcanza esta especie en libertad es de 12 años (un macho). La hembra más vieja tenía 11 años. En su conjunto, la población capturada se reveló muy longeva: el 58% de los ejemplares capturados (18 individuos) tenía ocho o más años.

De la población de Porto Covo se determinó la edad de 15 ejemplares, todos adultos (11 machos y 4 hembras). El histograma de frecuencias se presenta en la figura 14.

La edad media de los machos fue 4.64 años y la de las hembras 4.50. La probabilidad de que ambas muestras pertenecieran a la misma población resultó igual a 1 (test de la U de Mann-Witney:  $n_1 = 11$ ;  $n_2 = 4$ ;  $U = 22$ ;  $P = 1.0000$ ). Por tanto, en esta localidad tampoco hay diferencias entre las edades medias de ambos sexos.

El individuo más viejo de la población portuguesa tenía 7 años, y la edad mejor representada fue la de cinco años.

Las diferencias de longevidad entre ambas poblaciones de P. cultripes son importantes. La desigualdad registrada entre las edades máximas de Madrid y Porto Covo fue de cinco años más a favor de la primera localidad. La edad media de la población adulta madrileña (excluidos los dos juveniles de un año) fue 7.28 años y la de la portuguesa 4.60 años. Las diferencias entre las

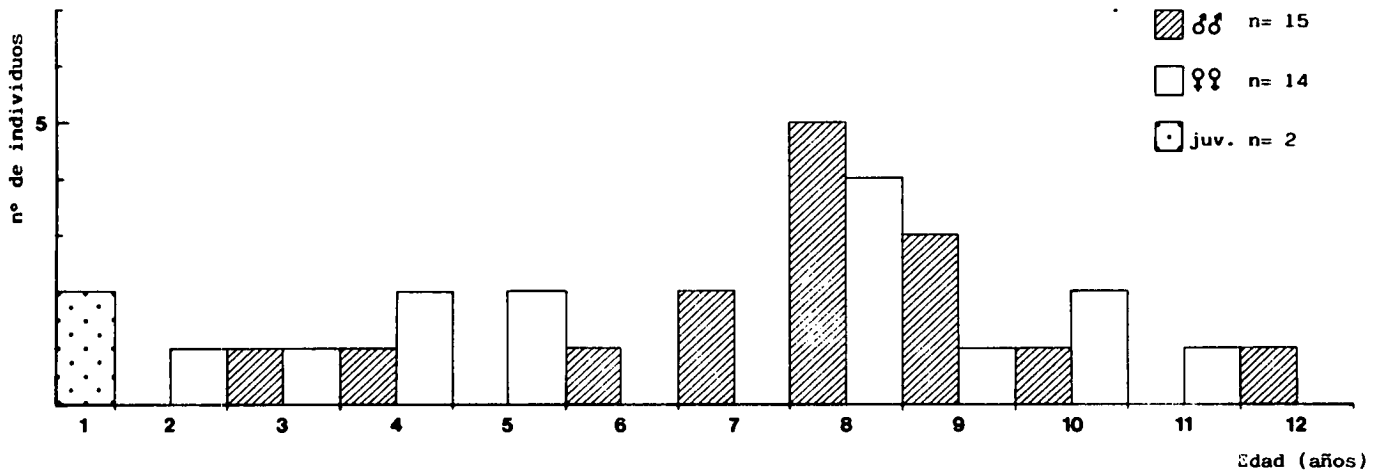


Figura 13.- Pelobates cultripipes (Madrid). Histogramas de distribución por clases de edad de ambos sexos.

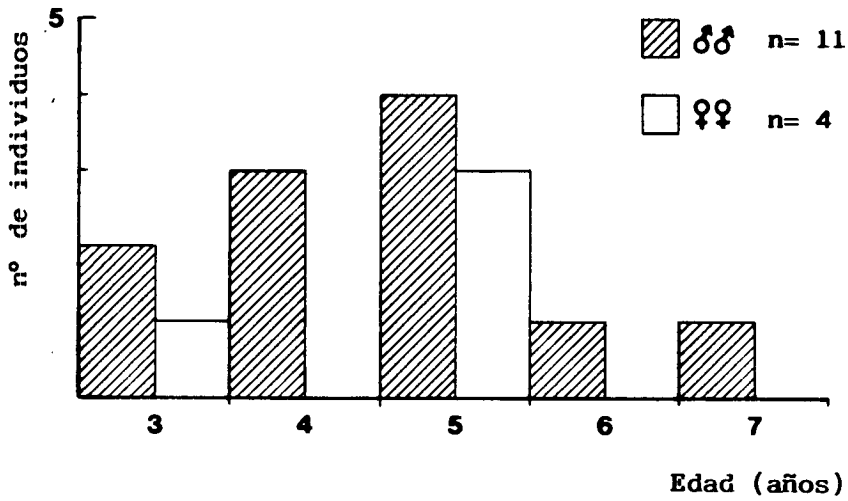


Figura 14.- Pelobates cultripipes (Porto Covo). Histogramas de distribución por clases de edad de ambos sexos.

medias de ambas poblaciones resultaron muy altamente significativas (test de la U de Mann-Witney:  $n_1 = 29$ ;  $n_2 = 15$ ;  $U = 348$ ;  $P = 0.0011$ ).

En la población de Madrid hemos podido constatar que la madurez sexual se alcanza durante el segundo periodo de hibernación. Es imposible determinar el sexo en individuos de un año cumplido, y la asignación a uno de los dos grupos no ofrece ninguna duda en los sapos de dos años. Este resultado coincide con lo que cabía esperar de la lectura del patrón de líneas de detención del crecimiento (ver lámina I A y I D): a partir de la 2ª línea, la proximidad entre ellas aumenta considerablemente, reflejando la ralentización del crecimiento que los vertebrados experimentan al alcanzar la madurez sexual.

Los patrones de líneas son distintos en ambas poblaciones. En la lámina I mostramos una selección de cortes de fémur de la población de Madrid:

A) Individuo juvenil de un año de edad. El fémur muestra una importante reabsorción de hueso alrededor de la médula que afecta parcialmente a la 1ª línea de detención del crecimiento; carece de hueso endosteal.

B) Macho de 6 años en que la 1ª línea ha desaparecido completamente por reabsorción; las 4 siguientes son dobles, y la 6ª no aparece porque fue capturado al reiniciar su periodo de actividad (la cantidad de hueso periférico después de la 5ª línea, añadido a su fecha de captura -al principio de la estación reproductora; por tanto, recién despertado- nos obliga a considerar que tiene un año más, ya que la osteogénesis se inicia después de que la actividad se ha reanudado (Smirina, 1972).

C) Hembra de 11 años. Primera línea reabsorbida; la mayoría de las restantes líneas dobles. Hueso endosteal con líneas de detención del crecimiento bien marcadas.

D) Macho de 8 años -la edad más abundante en la población-. Primera línea parcialmente reabsorbida; 3ª, 4ª y 7ª líneas dobles en la mayor parte de su recorrido. Crecimiento importante entre la 1ª y la 2ª líneas.

Las características distintivas de la población madrileña son las siguientes:

- Las líneas de detención del crecimiento están muy bien marcadas, reflejando un clima estacional contrastado.

- El porcentaje de individuos en que la determinación de la edad resultó difícil fue muy alto (51.61%). En el 32.26% puede haber error en un año y en el 19.35% en dos años. Esto es debido fundamentalmente a tres factores: desaparición completa de la 1ª línea; proximidad entre las últimas líneas -debido a la gran longevidad-, y sobre todo, existencia de dobles ciclos de actividad sólo algunos años. Ver detalles en la tabla 6.

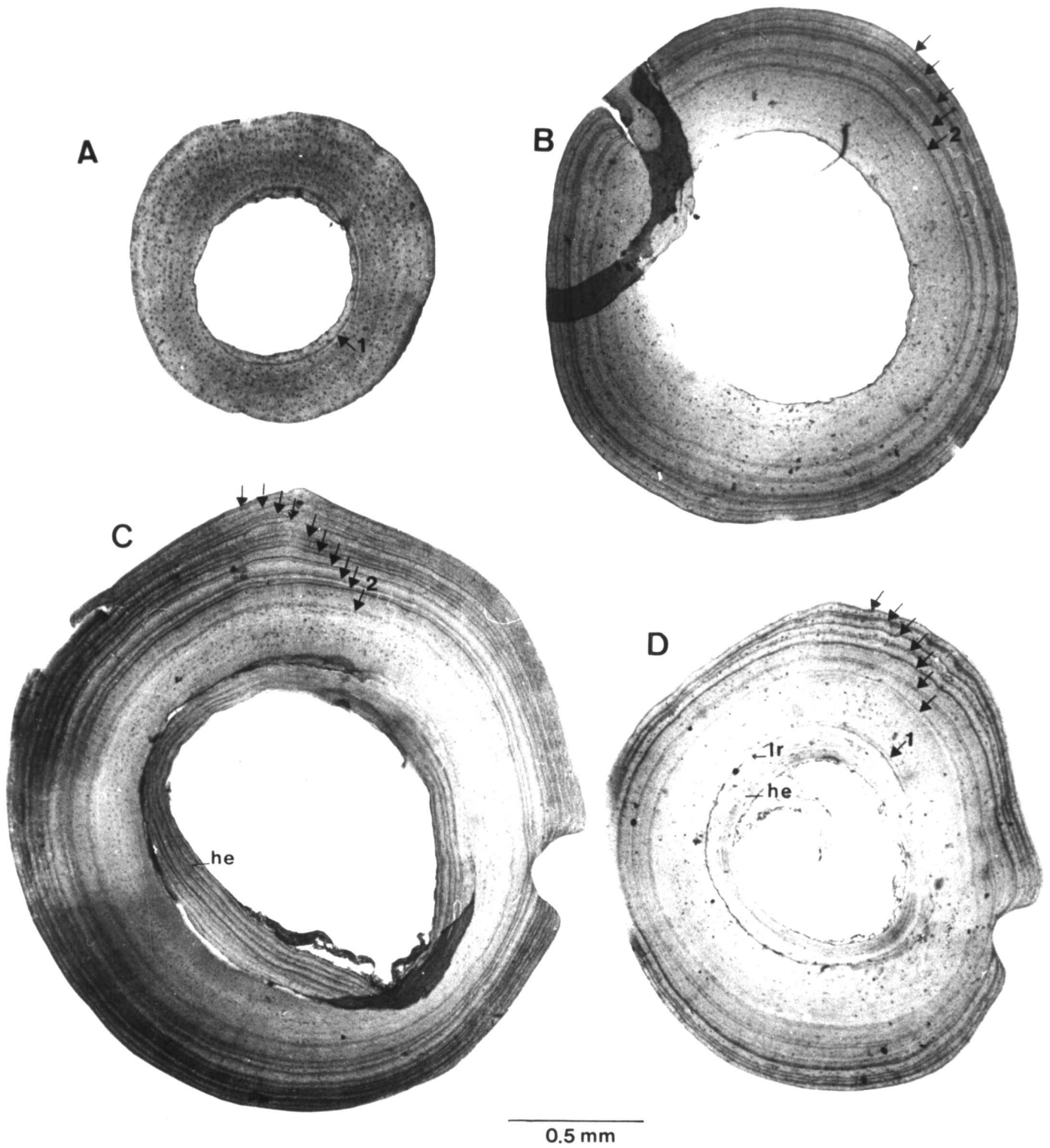


Lámina I.- Pelobates cultripes (Madrid). Cortes transversales de diáfisis de fémur teñidos con hematoxilina de Ehrlich. A, juvenil de un año y tres meses. B, macho de seis años. C, hembra de once años. D, macho de ocho años. he, hueso endosteal; lr, línea de reabsorción, 1, 1ª línea de detención del crecimiento, 2, 2ª línea de detención del crecimiento.

Tabla 6.- Pelobates cultripes. Porcentaje de individuos de dos poblaciones (Madrid y Porto Covo) presentando distintos tipos de dificultades a la hora de determinar el número exacto de líneas hematoxinófilas presentes.

Localidad	N	% de indiv. de determinación edad difícil		% de individuos con la 1ª línea completamente reabsorbida	% de individuos presentando líneas dobles		
		16 (51.61%)			27 (87.10%)		
Madrid	31	error en 1 año	error en 2 años	10 (32.26%)	100% líneas dobles	> 50% líneas dobles	< 50% líneas dobles
		10 (32.26%)	6 (19.35%)		6 (19.25%)	6 (19.25%)	15 (48.39%)
		3 (20.00%)			9 (60.00%)		
Porto Covo	15	error en 1 año	error en 2 años	2 (13.33%)	100% líneas dobles	>50% líneas dobles	< 50% líneas dobles
		3 (20.00%)	0 (0.00%)		4 (26.67%)	2 (13.33%)	3 (20.00%)

- La reabsorción endosteal es importante; tiene lugar entre el fin de la metamorfosis y la madurez sexual (2º año. Ver en lámina I el individuo A de un año y tres meses de edad). Normalmente acarrea la destrucción parcial de la 1ª línea, que desaparece completamente en el 32.26% de los ejemplares estudiados. Ver lámina I B.

- El porcentaje de individuos presentando líneas dobles es muy alto (87.10%): El 19.25% presentaba todas las líneas dobles (lámina I B); otro 19.22% presentaba más del 50% de las líneas dobles (lámina I C), y el restante 48.39% presentaba menos de la mitad de las líneas desdobladas (lámina I D). Consultar tabla 6.

- Más de la tercera parte de la población (35.48%) mostraba un gran crecimiento entre el primer año y el segundo.

- El hueso endosteal alcanza un espesor importante (lámina I B y I D) y su reconstrucción comienza al alcanzar la madurez sexual. Las líneas de detención del crecimiento se marcan bien en él, pero su número es ligeramente inferior al que se cuenta en el hueso de origen pericondral.

La lámina II presenta una selección de cortes de diáfisis de fémur pertenecientes a la población de Porto Covo:

A) Individuo recién metamorfoseado, que sufrió un breve periodo de estivación en nuestro laboratorio; el hueso pericondral apenas ha sufrido reabsorción y la reconstrucción endosteal no ha comenzado.

B) Macho de tres años. El borde interno del hueso ha sufrido una destrucción parcial, ya que la 1ª línea se muestra incompleta; sin embargo, la reconstrucción endosteal que le sigue es todavía muy débil y no afecta a la totalidad del perímetro de la cavidad medular.

C) Macho de 5 años -la edad mejor representada en esta población-. El hueso endosteal rodea completamente la cavidad medular. En el proceso de preparación se ha desprendido ligeramente de su posición original: la línea de fractura se corresponde con la de reabsorción. La 4ª línea es doble en su

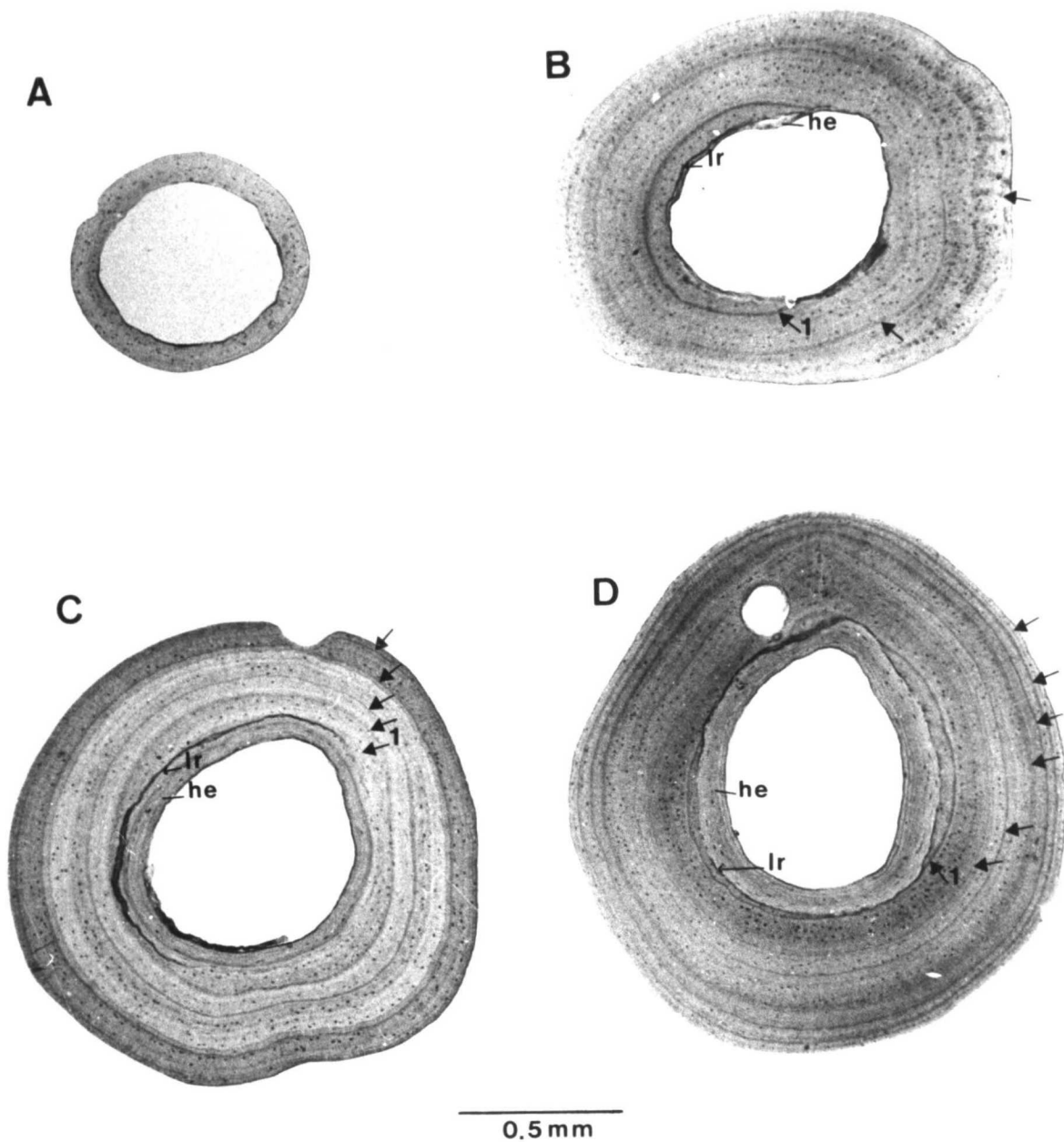


Lámina II.- Pelobates cultripes (Porto Covo). Cortes transversales de diáfisis de fémur teñidos con hematoxilina de Ehrlich. A, individuo recién metamorfoseado; breve estivación en laboratorio. B, macho de tres años. C, macho de cinco años. D, macho de siete años. he, hueso endosteal; lr, línea de reabsorción; 1, 1ª línea de detención del crecimiento.

totalidad.

D) Macho de 7 años. El grosor de la corteza periférica después de la 6ª línea y la fecha de su captura -al inicio del periodo reproductor- nos indican que tiene un año más que líneas; la 7ª línea no se hubiera podido apreciar hasta dos o tres semanas más tarde, tiempo que tarda en reanudarse el crecimiento óseo después de un periodo de reposo (Smirina, 1986).

Las características de la población portuguesa son las siguientes:

- Líneas medianamente marcadas que indican un clima menos contrastado que el de la región de Madrid.
- La determinación de la edad resultó difícil en el el 20% de los individuos, pudiendo existir en ellos un error de un año en la edad asignada.
- La primera línea se había reabsorbido completamente en el 13.33% de los individuos.
- El 60% de los ejemplares presentaba líneas dobles. El 26.67% tenía dobles todas las líneas; el 13.33% más de la mitad, y el restante 20.00% menos de la mitad. Ver detalles sobre el número de individuos en la tabla 6.
- El crecimiento es semejante de unos años a otros.
- La reconstrucción endosteal es importante; se presenta en todos los individuos adultos y está ausente en los recién metamorfoseados. En el hueso de origen endocondral se cuentan menos líneas que en el hueso pericondral.

### 3.1.4.2. Pelobates varaldii

Hemos estudiado una población procedente de la localidad tipo de la especie, el bosque de La Mamora (Kenitra, Marruecos) (100 m s.n.m. Ver situación geográfica en la figura 12). Los ejemplares fueron colectados en dos noches consecutivas el 29 de febrero y el 1 de marzo de 1984, después de la época de reproducción. En las charcas había renacuajos en el estadio 30 de la tabla de Gosner (1960) y la mayoría de las hembras carecían de óvulos desarrollados.

Se cortaron los fémures de 39 individuos: 20 machos y 19 hembras. El histograma de frecuencias por clases de edad de ambos sexos se presenta en la figura 15. Un examen de la figura nos indica que:

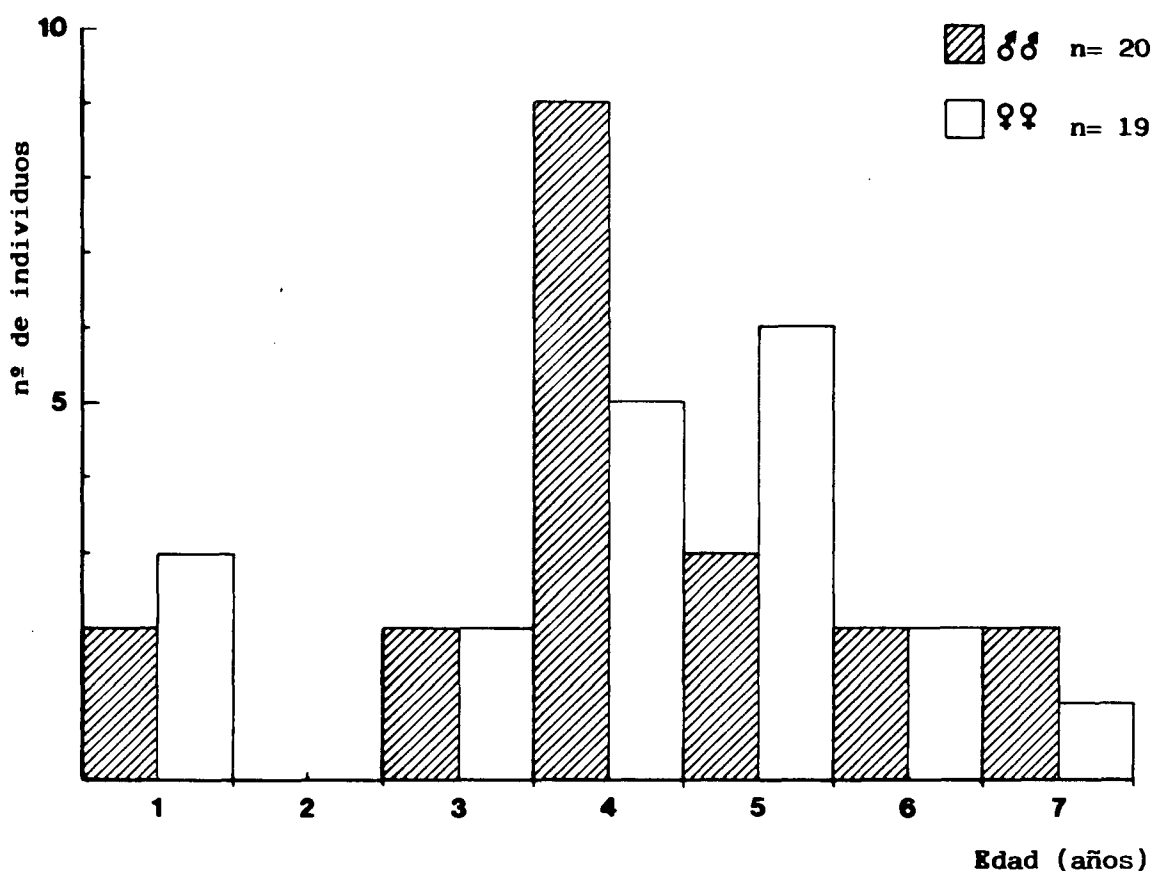


Figura 15.- Pelobates varaldii. Histogramas de distribución por clases de edad de ambos sexos.

- Los ejemplares de un año han alcanzado la madurez sexual y pueden ser clasificados en uno de los dos grupos.
- No hay individuos de dos años.
- Las edades mejor representadas son los cuatro y cinco años.
- La edad máxima que alcanza la especie en libertad es de siete años en ambos sexos.

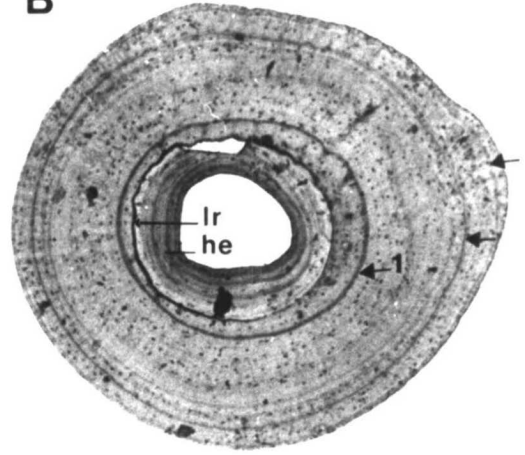
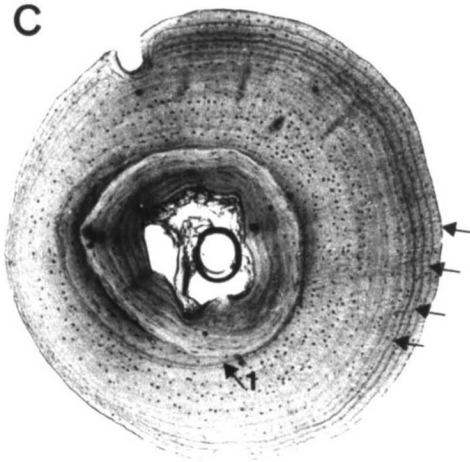
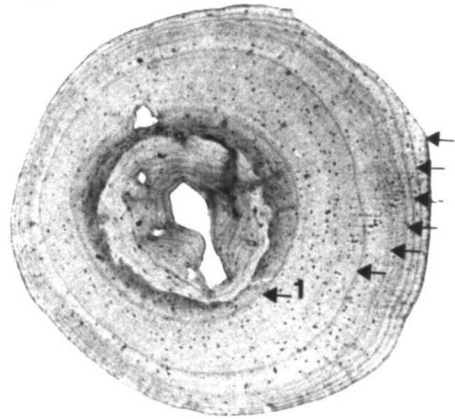
La edad media de los machos fue 4.25 años y la de las hembras 4.10 años. Las diferencias entre ambas medias no son en absoluto significativas (test de la U de Man-Witney;  $n_1 = 20$ ;  $n_2 = 19$ ;  $U = 188.5$ ;  $P = 0.9653$ ).

Es posible que la ausencia de individuos de dos años se deba a la sequía de la temporada 81-82 que podría haber impedido la reproducción de la especie en el área.

En la lámina III pueden observarse cortes de diáfisis de fémur de P. varaldii:

A) Hembra de un año. La primera línea está completa y rodea concéntricamente la cavidad medular. Esto indica que el hueso pericondral apenas ha sufrido reabsorción -la reabsorción normalmente es más intensa en un lado y esto desplaza ligeramente del centro a la cavidad medular. El hueso que se formó durante la fase de renacuajo se conserva; se distingue porque está más vascularizado, indicando con ello un crecimiento más rápido (Castanet, 1982). La reconstrucción endosteal es importante y aparentemente comienza antes del primer periodo de reposo.

B) Hembra de tres años. Primera línea completa. Conserva parcialmente el hueso pericondral fuertemente vascularizado característico de la fase larvaria. Tercera línea muy próxima al borde externo. Crecimiento importante entre el primer año y el segundo.

**A****B****C****D**


---

 0.5 mm

Lámina III.- Pelobates varaldii. Cortes transversales de diáfisis de fémur teñidos con hematoxilina de Ehrlich. A, hembra de un año. B, hembra de tres años. C, hembra de cinco años. D, macho de siete años. he, hueso endosteal; lr, línea de reabsorción; 1, 1ª línea de detención del crecimiento.

C) Hembra de cinco años. Primera línea parcialmente reabsorbida. La quinta línea no se aprecia, pero la cantidad de corteza periférica después de la cuarta nos obliga a considerar que tiene un año más. Crecimiento importante entre el primer año y el segundo.

D) Macho de siete años. Primera línea completa; tercera y cuarta parcialmente dobles; séptima línea muy próxima al borde externo. Crecimiento importante entre primer y segundo año.

Las características histológicas de la población de P. varaldii son las siguientes:

- La determinación de la edad resultó difícil en el 15.38% de los cortes estudiados. En el 10.26% puede haber un error de un año en la determinación y en el 5.13% de dos años. El factor de confusión fundamental es la poca intensidad con que se tiñen algunas líneas. Esto hace que ciertas líneas se consideren en un conteo y se ignoren en el siguiente, provocando diferencias en los resultados.

- La primera línea se encontraba presente -total o parcialmente- en los 39 individuos estudiados.

- Muy pocos individuos presentaban algunas líneas dobles - siempre menos del 50%. Ver lámina III D-. Esta circunstancia no es motivo de dificultad a la hora de establecer el número de líneas en esta población.

- La totalidad de los ejemplares mostraba un crecimiento importante entre el primer año y el segundo.

- El hueso endosteal alcanza un espesor considerable, dejando un espacio muy pequeño para la cavidad medular en los individuos más viejos (lámina III D). Su reconstrucción comienza poco después del fin de la metamorfosis y antes del primer periodo de reposo; esto evita que la primera línea sea reabsorbida en su totalidad.

La edad media de P. varaldii en libertad es de 4.18 años. Las

diferencias de longevidad media no son significativas si los comparamos con la población de P. cultripes de Porto Covo capturada a nivel del mar (test de la U de Mann-Witney;  $n_1 = 39$ ;  $n_2 = 15$ ;  $U = 252$ ;  $P = 0.4196$ ), pero si lo son, y al máximo nivel de significación, con la población adulta de P. cultripes de Madrid (test de la U de Mann-Witney  $n_1 = 39$ ;  $n_2 = 29$ ;  $U = 933$ ;  $P = 0.0000$ ).

También hay diferencias en la edad a que se alcanza la madurez sexual: un año en P. varaldii; dos años en P. cultripes (Madrid).

### 3.1.4.3. Pelobates fuscus y P. syriacus

Hemos estudiado diez P. fuscus adultos procedentes de distintas localidades centroeuropeas, por tanto no podemos considerarlos una población.

En uno de los ejemplares macho, no encontramos líneas, a pesar de que había alcanzado la madurez sexual. En los restantes se determinó la edad sin problemas. El histograma de frecuencias por clases de edad y sexo se muestra en la figura 16.

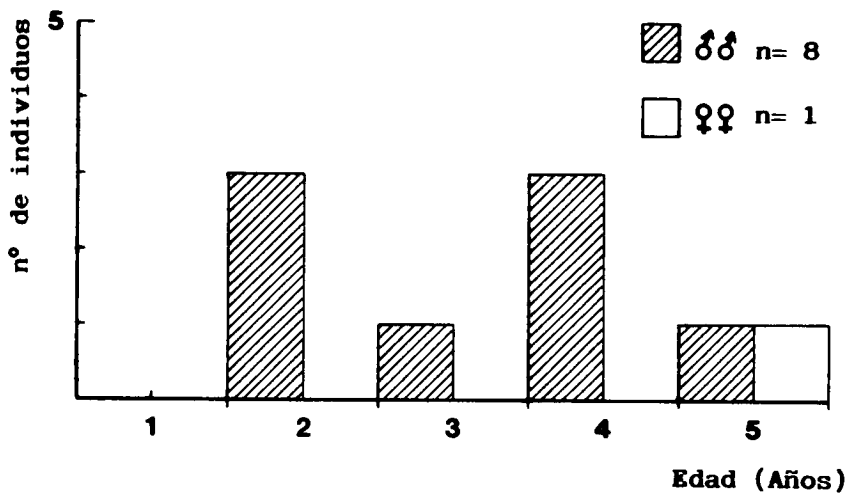


Figura 16.- Pelobates fuscus. Distribución por sexos y clases de edad de los ejemplares analizados.

La edad máxima registrada fue cinco años, tanto en machos como en hembras, y la mínima dos años.

Histológicamente, la intensidad con que se tiñen las líneas varía muchísimo de unos individuos a otros. Esta característica es coherente con la distinta procedencia geográfica de los ejemplares. No hemos encontrado líneas desdobladas. Existe hueso endosteal a los dos años de edad. A primera vista no parece que se haya reabsorbido la primera línea; por el contrario, el hueso pericondral más interno muestra la vascularización abundante característica del hueso que crece a gran velocidad en la etapa larvaria. A falta de cortes de individuos juveniles y recién metamorfoseados no se puede aseverar nada más.

De Pelobates syriacus pudimos conseguir dos ejemplares en un intercambio con el Museo de Historia Natural de Bulgaria. Uno de ellos era un juvenil que no había sufrido todavía ningún periodo de reposo y el otro una hembra de cuatro años con las líneas de detención del crecimiento muy marcadas y la primera línea completa.

La edad de cada individuo nos servirá en el capítulo siguiente para establecer distintas clases en la población postmetamórfica. Con ello facilitaremos la descripción del proceso de osificación del esqueleto en la etapa adulta.

### 3.1.5. TAMAÑO DE LOS EJEMPLARES ADULTOS

#### 3.1.5.1. Dimorfismo sexual en Pelobates cultripes y P. varaldii

En P. cultripes y P. varaldii no hay diferencias significativas de tamaño entre machos y hembras.

En los P. cultripes de Madrid la longitud media cabeza + cuerpo (LCC) de los machos fue 79.87 mm y la de las hembras 79.57 mm. La probabilidad de que las medias de ambas muestras procedieran de la misma población fue muy alta (test de la t de Student para varianzas separadas;  $t = 0.8$ ; grados de libertad = 20.9;  $P = 0.9342$ ).

En los P. varaldii la LCC media de los machos fue 56.48 mm y la de las hembras 58.21 mm. La diferencia entre ambas medias tampoco resultó significativa (test de la t de Student para varianzas separadas;  $t = -0.89$ ; g.d.l. = 32.7;  $P = 0.3822$ ).

Se tomaron además otras doce medidas de caracteres morfológicos externos, descritas en el apartado 2.5.2. Los estadísticos básicos de machos y hembras de la población de P. cultripes madrileña se muestran en la tabla 7 y los de la población de P. varaldii en la tabla 8. Ninguna de las diferencias entre machos y hembras en los valores medios de las doce variables resultaron significativas, ni en P. cultripes ni en P. varaldii. Consultar la tabla 9.

Podemos concluir que en ambas especies no hay ningún carácter morfométrico externo que permita distinguir con fiabilidad machos de hembras.

Tabla 7.- Pelobates cultripes (Madrid). Estadísticos básicos de trece variables morfométricas. A, machos; B, hembras.

A).- MACHOS

Variable	n	$\bar{x}$ (mm)	s (mm)	valor mínimo (mm)	valor máximo (mm)
LCC	15	79.87	6.82	60.00	87.00
AC	15	28.70	2.09	22.50	31.15
MA	15	48.97	4.89	34.50	54.55
MP	15	104.34	9.25	75.00	112.35
F	15	35.00	3.46	25.00	38.30
TIB	15	31.08	3.16	21.50	34.40
PIE	15	51.95	4.35	37.50	56.20
ID	15	8.88	1.07	6.80	10.90
DN	15	5.04	.36	4.50	5.65
NO	15	6.47	.52	5.60	7.40
DO	15	9.86	.96	7.00	10.90
TML	15	6.73	.65	4.86	7.85
TMA	15	3.25	.39	2.26	3.80

B).- HEMBRAS

Variable	n	$\bar{x}$ (mm)	s (mm)	valor mínimo (mm)	valor máximo (mm)
LCC	14	79.57	11.45	57.00	101.00
AC	14	28.31	3.24	22.00	35.10
MA	14	45.73	6.41	33.00	55.45
MP	14	100.30	12.51	77.00	124.80
F	14	34.90	4.70	27.50	44.35
TIB	14	29.41	4.21	22.80	37.95
PIE	14	48.54	6.14	36.00	58.85
ID	12	9.22	1.00	7.65	10.95
DN	14	4.96	.71	3.80	6.20
NO	14	6.63	.81	5.50	8.50
DO	14	9.41	1.39	6.50	11.35
TML	14	6.48	.96	4.15	7.66
TMA	14	2.96	.67	1.80	4.06

Tabla 8.- Pelobates varaldii. Estadísticos básicos de trece variables morfológicas. A, machos; B, hembras.

A).- MACHOS

Variable	n	$\bar{x}$ (mm)	s (mm)	valor mínimo (mm)	valor máximo (mm)
LCC	21	56.48	5.11	44.00	63.00
AC	21	20.90	1.78	16.45	23.20
MA	21	29.58	3.00	20.95	33.00
MP	21	71.19	6.79	51.70	77.85
F	21	24.09	2.26	18.00	26.75
TIB	21	21.06	1.97	15.85	23.35
PIE	21	34.96	3.52	25.05	39.30
ID	21	6.19	.69	4.45	7.20
DN	21	3.35	.52	2.15	4.40
NO	21	4.73	.66	3.10	5.85
DO	21	7.68	.53	6.35	8.40
TML	20	3.85	.39	3.08	4.54
TMA	20	1.14	.22	.51	1.50

B).- HEMBRAS

Variable	n	$\bar{x}$ (mm)	s (mm)	valor mínimo (mm)	valor máximo (mm)
LCC	19	58.21	7.01	44.00	67.00
AC	19	21.74	2.40	16.70	25.65
MA	19	29.77	4.20	20.90	34.55
MP	19	73.35	9.92	52.70	89.00
F	19	24.97	3.26	18.05	29.35
TIB	19	21.67	2.88	14.85	24.85
PIE	19	35.46	4.66	25.00	41.30
ID	19	6.63	.85	5.05	8.35
DN	19	3.42	.54	2.50	4.90
NO	19	4.95	.70	3.35	6.10
DO	19	7.89	.73	5.95	8.75
TML	18	3.90	.51	2.97	4.55
TMA	18	1.27	.25	.85	1.75

Tabla 9.- Resultados del test de la t de Student para varianzas separadas al comparar los valores medios de trece variables morfométricas en machos y hembras. A, Pelobates cultripes (Madrid). B, Pelobates varaldii. Ninguna de las diferencias entre medias resultó significativa.

A).- Pelobates cultripes (Madrid)

Variable	t	Probabilidad	Grados libertad
LCC	0.8	0.9342	20.9
AC	0.38	0.7109	21.9
MA	1.52	0.1408	24.3
MP	0.98	0.3363	23.9
F	0.06	0.9505	23.8
TIB	1.20	0.2404	24.1
PIE	1.72	0.0989	23.3
ID	-0.86	0.4002	24.3
DN	0.37	0.7130	18.9
NO	-0.62	0.5406	21.9
DO	1.00	0.3256	22.8
TML	0.81	0.4275	22.7
TMA	1.44	0.1635	20.7

B).- Pelobates varaldii

Variable	t	Probabilidad	Grados libertad
LCC	-0.89	0.3822	32.7
AC	-1.25	0.2202	33.0
MA	-0.16	0.8730	32.3
MP	-0.80	0.4319	31.4
F	-0.99	0.3320	31.7
TIB	-0.78	0.4418	31.4
PIE	-0.38	0.7061	33.4
ID	-1.81	0.0793	34.5
DN	-0.38	0.7067	37.2
NO	-1.01	0.3209	37.1
DO	-1.05	0.3025	32.4
TML	-0.30	0.7631	31.7
TMA	-1.73	0.0919	33.7

### 3.1.5.2. Diferencias morfométricas intraespecíficas en P. cultripes

La LCC media de los P. cultripes de Madrid fue 79.72 mm y la de la población de Porto Covo 71.75 mm. Las diferencias de talla entre ambas poblaciones resultaron ser altamente significativas (test de la t de Student para varianzas separadas;  $t = 3.31$ ; g.d.l. = 39.1;  $P = 0.0020$ ).

En la figura 17 se representa el histograma de frecuencias por clases de tamaño de las poblaciones adultas de P. cultripes de Madrid y de Porto Covo.

Las diferencias entre los valores medios de las doce medidas restantes resultaron altamente significativas (AC, TIB, PIE) o muy altamente significativas (MA, MP, F, IO, DN, NO, TML y TMA), exceptuando el diámetro del ojo (DO). La tabla 10 muestra los estadísticos básicos de las trece medidas en ambas poblaciones y la tabla 11 los resultados del test de la t de Student para varianzas separadas entre los valores medios de las variables.

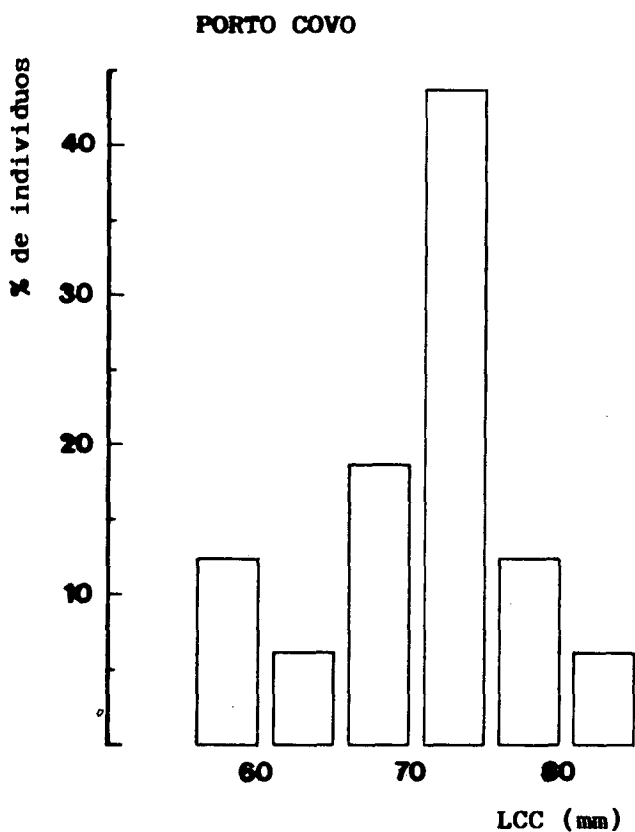
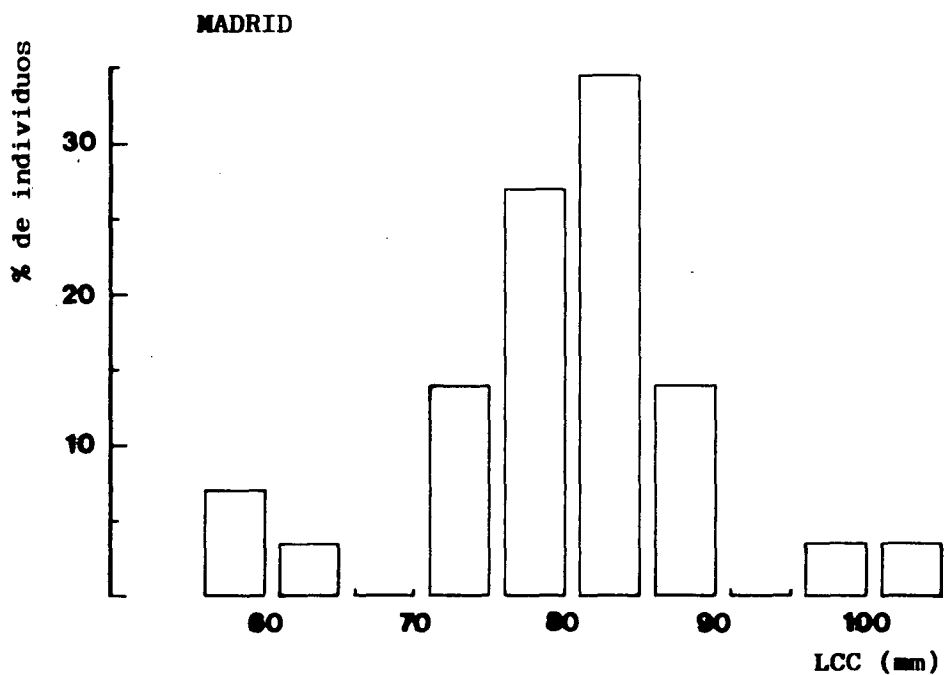


Figura 17.- Pelobates cultripes. Distribución de frecuencias por clases de tamaño de los adultos de dos poblaciones ibéricas capturadas a distinta altitud.

Tabla 10.- Pelobates cultripes. Estadísticos básicos de trece variables biométricas, en dos poblaciones capturadas a distinta altitud (Madrid y Porto Covo).

A).- Población de Madrid

Variable	n	$\bar{x}$ (mm)	s (mm)	valor mínimo (mm)	valor máximo (mm)
LCC	29	79.72	9.18	57.00	101.00
AC	29	28.51	2.66	22.00	35.10
MA	29	47.40	5.81	33.00	55.45
MP	29	102.39	10.94	75.00	124.80
F	29	34.95	4.03	25.00	44.35
TIB	29	30.27	3.73	21.50	37.95
PIE	29	50.30	5.48	36.00	58.85
IO	27	9.03	1.03	6.80	10.95
DN	29	5.00	0.55	3.80	6.20
NO	29	6.55	0.67	5.50	8.50
DO	29	9.64	1.19	6.50	11.35
TML	29	6.61	0.81	4.15	7.85
TMA	29	3.11	0.56	1.80	4.06

B).- Población de Porto Covo

Variable	n	$\bar{x}$ (mm)	s (mm)	valor mínimo (mm)	valor máximo (mm)
LCC	16	71.75	6.81	59.00	84.00
AC	16	26.02	2.16	21.85	29.45
MA	16	40.96	4.01	33.10	47.50
MP	16	92.61	7.15	77.50	100.00
F	16	31.10	2.30	26.85	34.15
TIB	16	27.23	2.39	21.95	30.70
PIE	16	45.26	4.07	35.60	50.45
IO	16	7.13	0.71	5.90	8.05
DN	16	3.64	0.41	3.00	4.45
NO	16	5.60	0.53	4.65	6.25
DO	16	9.27	0.47	8.50	10.00
TML	15	5.36	0.74	4.05	6.48
TMA	14	1.87	0.39	1.29	2.51

Tabla 11.- Resultados del test de la t de Student para varianzas separadas al comparar los valores medios de trece variables morfométricas en dos poblaciones de P. cultripes capturadas a distinta altitud.

Variable	t	Probabilidad	Grados libertad
LCC	3.31	0.0020 **	39.1
AC	3.40	0.0016 **	36.8
MA	4.38	0.0001 ***	40.6
MP	3.62	0.0008 ***	41.6
F	4.08	0.0002 ***	42.9
TIB	3.32	0.0019 **	41.9
PIE	3.51	0.0012 **	39.0
IO	7.16	0.0000 ***	40.0
DN	9.40	0.0000 ***	38.7
ND	5.21	0.0000 ***	37.3
DD	1.48	0.1457	40.0
TML	5.13	0.0000 ***	30.9
TMA	8.42	0.0000 ***	35.4

\*\*\* muy altamente significativa (al 99.9%)

\*\* muy significativa (al 99%)

\* significativa (al 95%)

### 3.1.5.3. Tamaño medio de los adultos de las especies estudiadas

De la familia Pelobatidae hemos medido ejemplares de los tres géneros: Pelobates, Scaphiopus y Spea.

Del género Pelobates tenemos datos de todas las especies. El tamaño medio, indicado por la longitud cabeza + cuerpo (LCC) de los adultos de las dos poblaciones de P. cultripes utilizados en la elaboración de esta tesis fue 79.72 mm (n = 29) y 71.75 mm (n = 16); el de P. varaldii, 57.24 mm (n = 41); el de P. fuscus, 50.56 mm (n = 18), y por último, el de P. syriacus, 68.50 mm (n = 10).

De las especies americanas conocemos el tamaño medio de una de cada género: 53.60 mm Spea multiplicatus (n = 10) y 62.44 mm Scaphiopus couchii (n = 9).

De la familia Megophryidae sólo tenemos la LCC media de 10 Megophrys montana (78.90 mm) y un Leptobrachium hasseltii (58.00 mm).

De la familia Pelodytidae conocemos las tallas medias de los dos componentes de la misma: Pelodytes punctatus (30.59 mm; n = 29) y P. caucasicus (45.00 mm; n = 3).

Los estadísticos básicos de la longitud cabeza + cuerpo de las especies mencionadas se presentan en la tabla 12.

Tabla 12.- Estadísticos básicos de la longitud cabeza + cuerpo (mm) en los adultos de las familias Pelobatidae, Pelodytidae y Megophryidae.

Familia Pelobatidae

	n	$\bar{x}$ (mm)	s (mm)	valor mínimo (mm)	valor máximo (mm)
<u>P. cultripes</u> (Madrid)	29	79.72	9.18	57.00	101.00
<u>P. cultripes</u> (Porto Covo)	16	71.75	6.81	59.00	84.00
<u>P. varaldii</u>	41	57.24	6.01	44.00	67.00
<u>P. fuscus</u>	18	50.56	4.38	44.00	60.00
<u>P. siryacus</u>	10	68.50	5.62	61.00	79.00
<u>S. couchii</u>	9	62.44	3.95	57.00	70.00
<u>S. multiplictus</u>	10	53.60	1.80	50.00	56.00

Familia Megophryidae

	n	$\bar{x}$ (mm)	s (mm)	valor mínimo (mm)	valor máximo (mm)
<u>M. montana</u>	10	78.90	6.70	69.00	90.00
<u>L. hasseltii</u>	1	58.00	--	--	--

Familia Pelodytidae

	n	$\bar{x}$ (mm)	s (mm)	valor mínimo (mm)	valor máximo (mm)
<u>P. punctatus</u>	29	30.59	4.32	23.50	45.00
<u>P. caucasicus</u>	3	45.00	2.45	42.00	48.00

### 3. 1. 6. RELACION ENTRE EDAD Y TAMAÑO en Pelobates cultripes Y P. varaldii

En P. cultripes el tamaño deja de estar correlacionado positivamente con la edad dos años después de alcanzar la madurez sexual. En P. varaldii, un año después.

En los P. cultripes juveniles y adultos de la población de Madrid, el coeficiente de correlación de Spearman ( $r_s$ ) entre la edad y LCC es 6.8710 ( $n = 31$ ;  $S = -29144.96$ ;  $P \ll 0.001$ ), y por tanto, la relación entre ambas variables es positiva y muy altamente significativa.

La madurez sexual se alcanza a los dos años. El coeficiente de correlación entre la edad y el tamaño calculado con los ejemplares de dos años o más es:  $r_s = 0.4592$ ;  $n = 29$ ;  $S = 2195.65$ ;  $P < 0.01$ . Vemos que ambas variables siguen estando altamente correlacionadas.

Si sólo utilizamos para el cálculo de nuestro coeficiente los individuos de tres años o más ( $r_s = 0.4112$ ;  $n = 28$ ;  $S = 2151.47$ ;  $P < 0.05$ ), la correlación es significativa sólo al 95%.

Y cuando utilizamos los ejemplares de más de tres años ( $r_s = 0.2747$ ;  $n = 26$ ;  $S = 2121.50$ ;  $P > 0.05$ ), deja de existir una relación positiva entre la edad y el tamaño.

Por consiguiente, podemos concluir que los sapos de espuelas de esta localidad finalizan su crecimiento en longitud a los cuatro años. El diagrama de dispersión de la edad y el tamaño de los P. cultripes de Madrid de la figura 18, apoya gráficamente nuestros resultados.

En la población de P. cultripes de Porto Covo, la correlación entre edad y tamaño es muy significativa utilizando toda la muestra ( $n = 15$ ; edad mínima = 3 años); significativa para los mayores de tres años, y deja de existir relación entre la edad y el tamaño a partir de los cuatro años. La tabla 13 presenta los distintos coeficientes de correlación y el nivel de significación, y la figura 19, el diagrama de dispersión de ambas variables.

Tabla 13.- Coeficientes de correlación de Spearman ( $r_s$ ) entre la edad (nº de años) y el tamaño (en mm de LCC) en los sapos de espuelas, Pelobates cultripes, de dos poblaciones ibéricas.

A).- Madrid

Edad	n	$r_s$	S	P
juveniles y adultos	31	6.8710	-29144.9	<< 0.001***
más de 1 año	29	0.4592	2195.65	< 0.01**
más de 2 años	28	0.4112	2151.47	< 0.05*
más de 3 años	26	0.2747	2121.50	> 0.05
más de 4 años	23	0.0909	1840.02	>> 0.10

B).- Porto Covo

Edad	n	$r_s$	S	P
más de 2 años	15	0.6175	214.2	< 0.01**
más de 3 años	12	0.5368	132.47	< 0.05*
más de 4 años	9	0.3912	73.06	> 0.05

\*\*\* muy altamente significativa (al 99.9%)

\*\* muy significativa (al 99%)

\* significativa (al 95%)

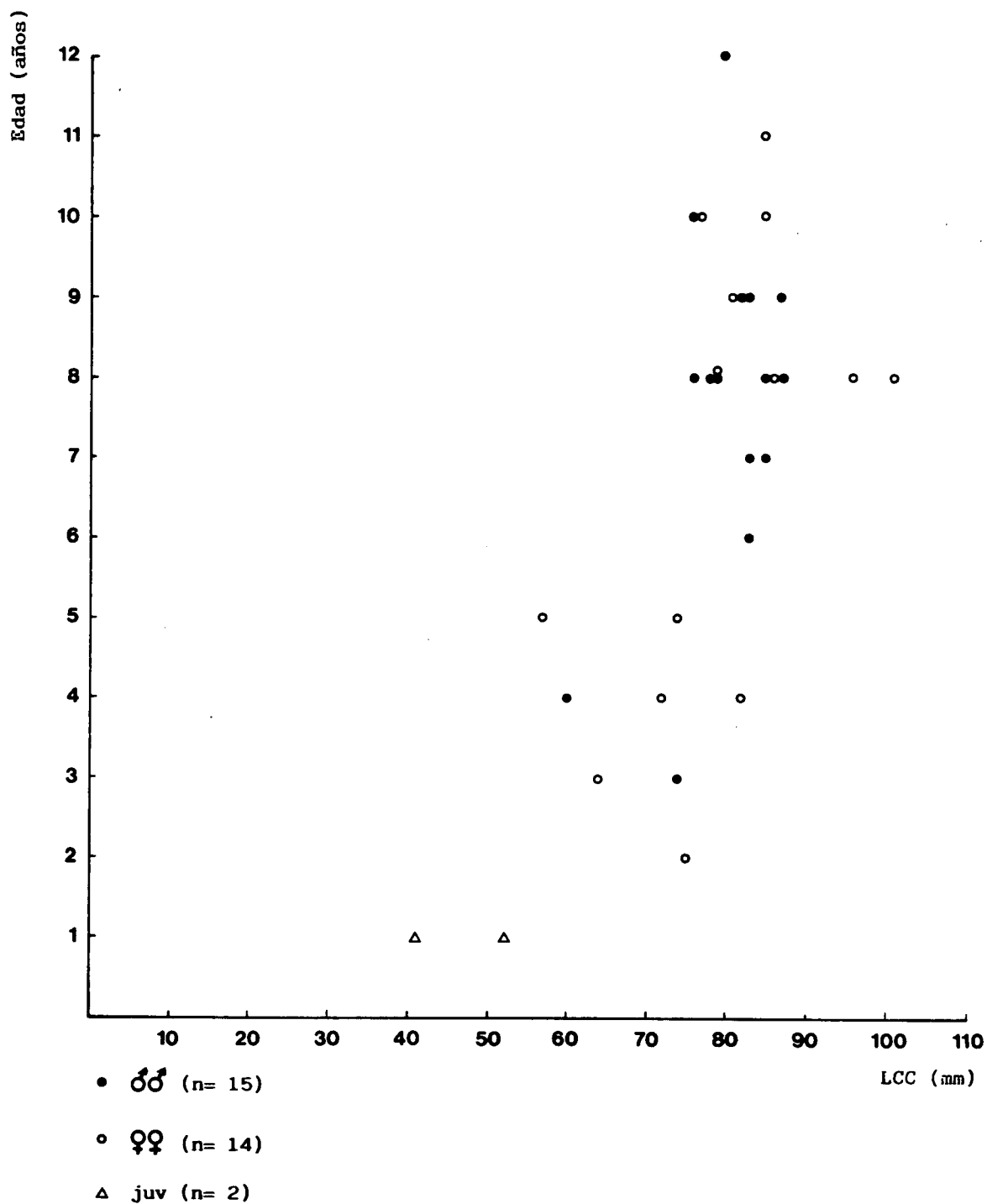


Figura 18.- Pelobates cultripipes (Madrid). Diagrama de dispersión para la edad y el tamaño (LCC) de juveniles y adultos.

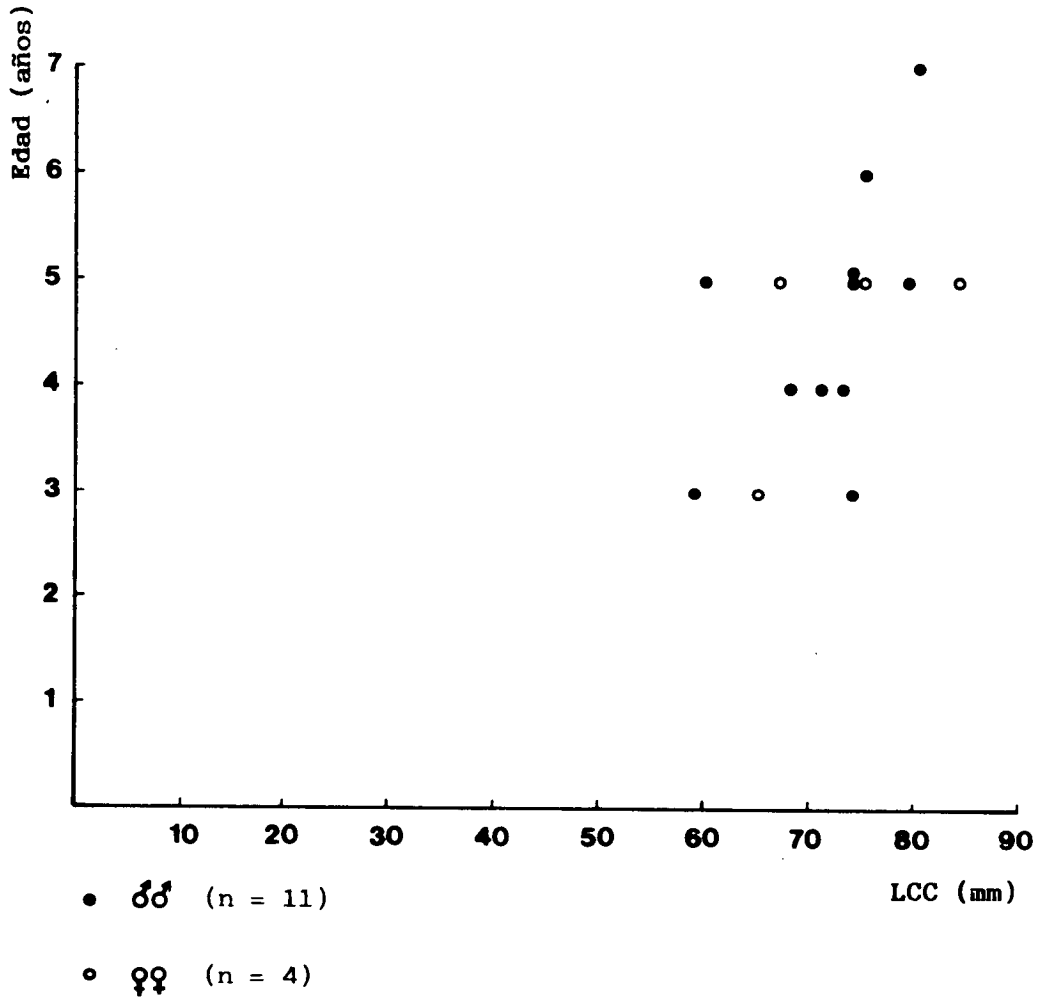


Figura 19.- Pelobates cultripes (Porto Covo). Diagrama de dispersión para la edad y el tamaño de los sapos adultos.

En Pelobates varaldii la madurez sexual se alcanza al cumplir un año, el tamaño medio de estos ejemplares es 45.00 mm (n = 5), muy inferior al tamaño medio de los ejemplares de esta especie de dos o más años (59.18 mm; n = 34). Incluyendo los sapos de un año, la correlación entre edad y LCC es positiva y significativa ( $r_s = 0.3602$ ; n = 39;  $P < 0.05$ ), pero la relación entre ambas variables desaparece a partir de los dos años ( $r_s = 0.0192$ ; n = 34;  $P >> 0.10$ ). La figura 20 muestra el diagrama de dispersión de la edad y el tamaño en P. varaldii.

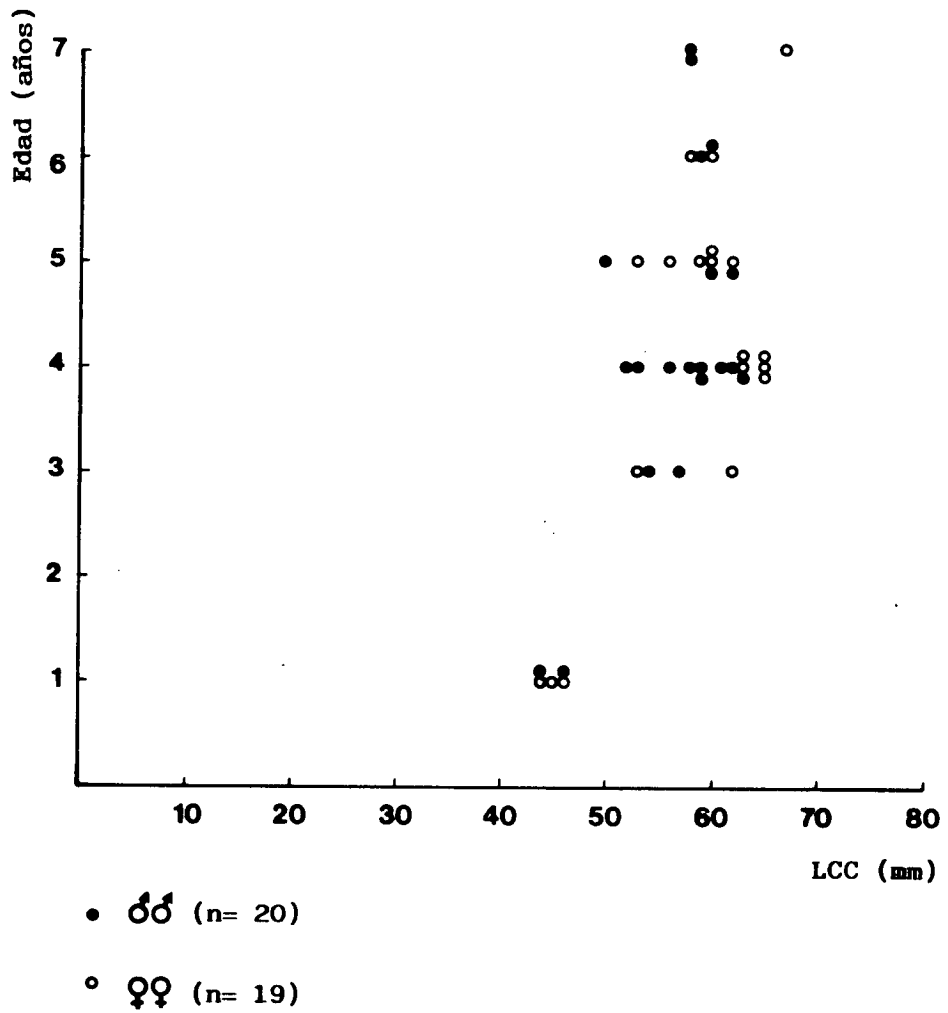


Figura 20.- Pelobates varaldii. Diagrama de dispersión para la edad y el tamaño.

### 3.2. DESARROLLO DE LOS SISTEMAS ESQUELETICOS DE Pelobates cultripes Y Pelodytes punctatus

#### 3.2.1. CRANEO

##### 3.2.1.1. Descripción del cráneo adulto de Pelobates cultripes

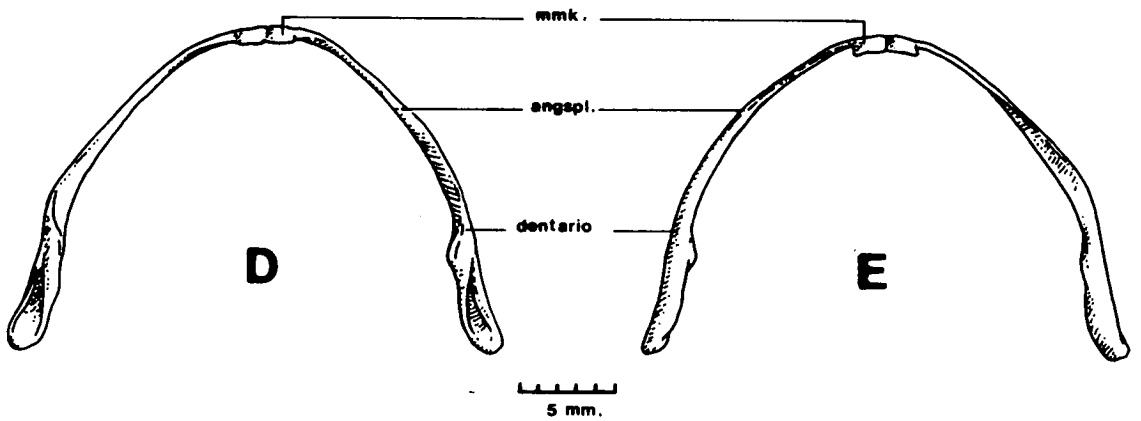
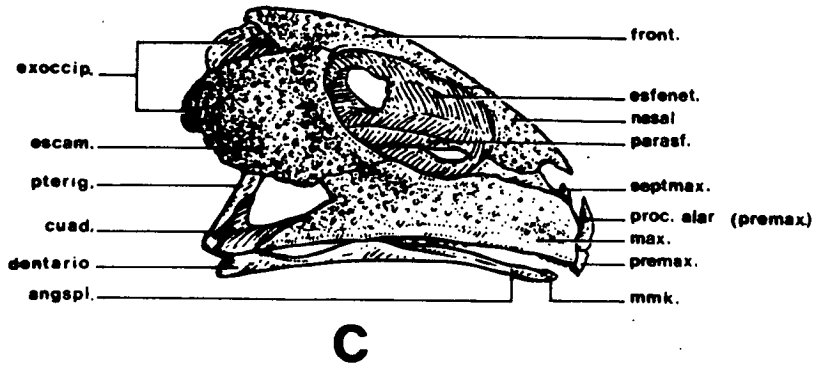
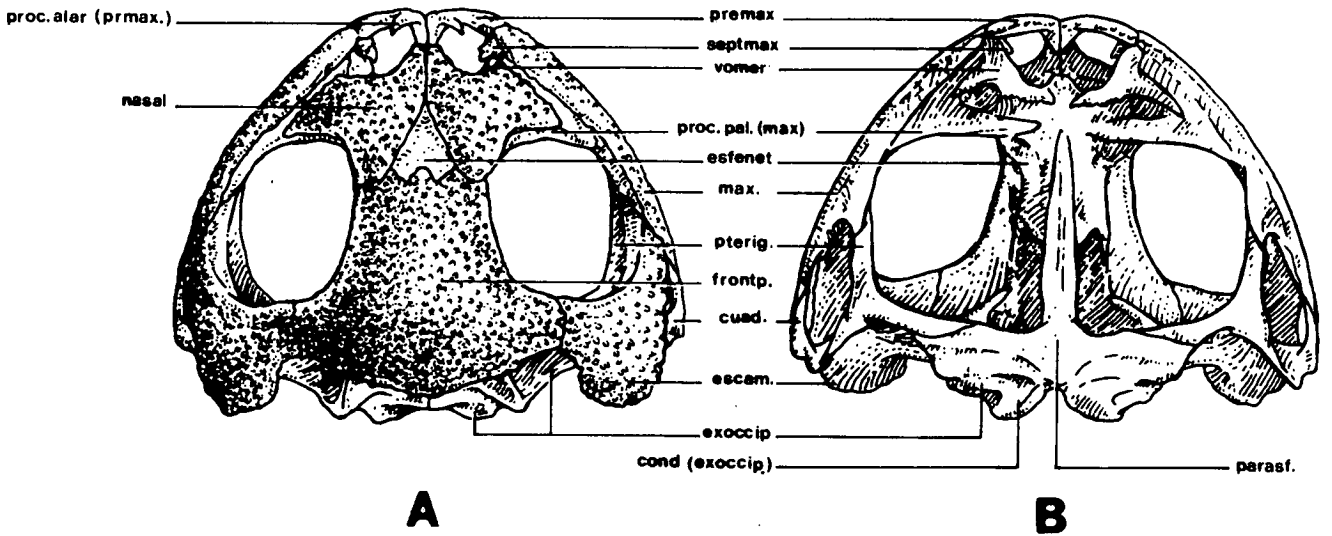
Está constituido por doce huesos pares, bilateralmente simétricos, y tres huesos mediales. La morfología normal, posición anatómica y nombre de cada uno de ellos se presenta en las figuras 21 y 22. En las descripciones utilizaremos la nomenclatura de Trueb (1973), Rocek (1980, 1988) y Lebedkina (1986).

##### 3.2.1.2. Secuencia de osificación del cráneo de Pelobates cultripes

En P. cultripes la secuencia de aparición de los quince huesos es la siguiente: paraesfenoides, frontoparietal, prooticooccipital, septomaxilar, premaxilar, nasal y maxilar; escamoso, vómer, anguloesplénial y dentario; pterigoideo, esfenetmoides, cuadradoyugal y proceso posteromedial del hioides.

La mayoría de estos huesos surgen a partir de un solo centro de osificación, con las siguientes excepciones: el frontoparietal, prooticooccipital, escamoso y dentario se forman al fusionarse dos o más centros de osificación independientes, que en otras especies constituyen dos o más huesos distintos; y además, en el premaxilar, maxilar y vómer, cada diente comienza a osificar autónomamente. Por ello, vamos a proceder a una descripción de los acontecimientos más importantes en el desarrollo de cada hueso y del momento en que se producen.

**Paraesfenoides.**- Hueso de membrana, medial, plano y en forma de T, que protege ventralmente la región ótica y orbitotemporal del encéfalo y llega hasta el extremo posterior del esfenetmoides. Ver fig. 21.



M. MERINO

Figura 21.- Cráneo de *Pelobates cultripes*. A, norma dorsal; B, norma ventral; C, norma lateral; D, mandíbula inferior en norma dorsal; E, mandíbula inferior en norma ventral.

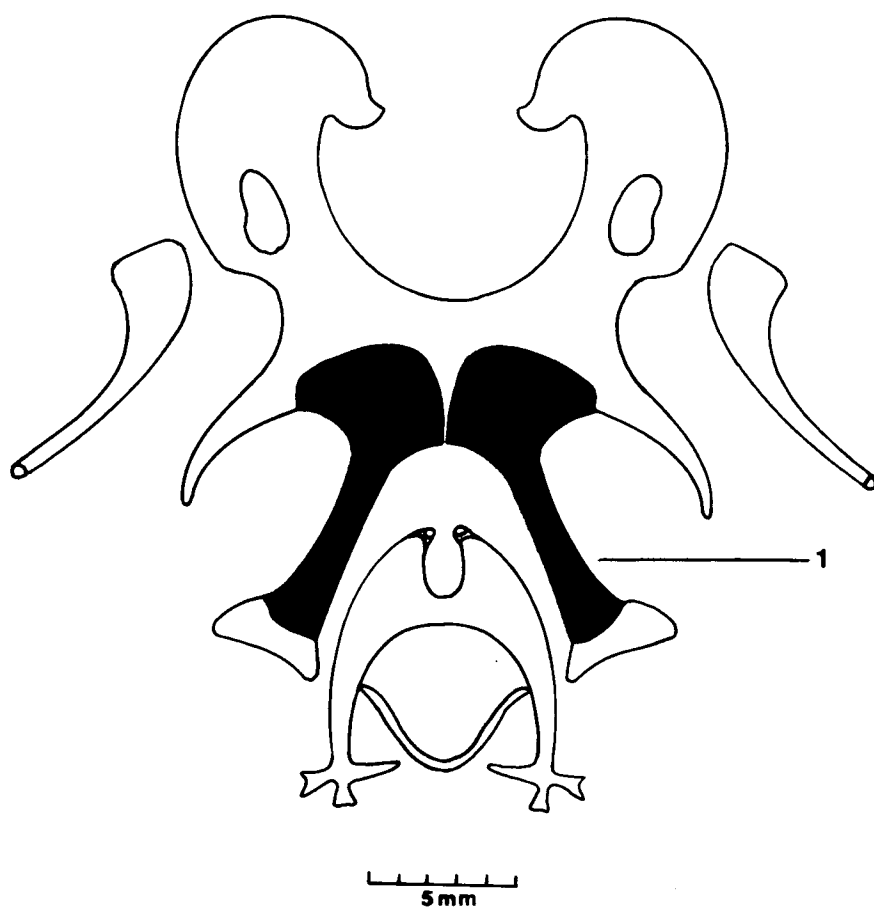


Figura 22.- Esqueleto de la laringe e hioides de *Pelobates cultripes* en norma ventral. En negro, el hueso; en blanco, el cartilago. 1, proceso posteromedial del hioides.

Es el primero en comenzar a osificar en el estadio 34 (fig. 23 A). Desde el primer momento presenta su forma definitiva, ganando espesor a lo largo del desarrollo larvario.

**Frontoparietal.-** Hueso plano, de origen dérmico, que cierra la caja craneana dorsalmente, con ornamentación en su cara externa constituida por tubérculos individualizados

Se forma al fusionarse cinco elementos distintos: dos corresponden a los frontoparietales y son los primeros en aparecer en el estadio 36 (fig. 23 B); dos a los extraescapulares laterales (homología establecida por Roček, 1988), que aparecen en el estadio 40, y uno al extraescapular medial (Roček, 1988) que también se observa a partir del mismo estadio (fig. 23 C). La fusión de todos los elementos se inicia en el estadio 41 (fig. 23 D), comenzando a tocarse los frontales con el extraescapular medial; seguidamente se incorporan al complejo los extraescapulares laterales. La fusión había comenzado en todos los renacuajos de estadio 42 estudiados (fig. 23 E).

La fusión de los dos frontales en su línea media se produce en P. cultripes durante su primer año de vida terrestre. Los ejemplares recién metamorfoseados de una y dos semanas de edad presentan una discontinuidad alargada y amplia entre ambos elementos (fig 25 D) y en los individuos de un año de edad estudiados, el margen anterior del hueso presentaba todavía una pequeña hendidura medial. La cronología de estos sucesos se reseña en las tablas 14 y 15, y se resume en la tabla 16.

La ornamentación externa del frontoparietal comienza a manifestarse en el estadio 39. En tinción con alizarina aparece como un reticulado rojo más intenso superpuesto a la osificación basal principal. Al fin de la metamorfosis la cara dorsal del hueso presenta rugosidades apreciables y al finalizar el primer año ya posee tubérculos individualizados, que van ganando altura por aposición de capas sucesivas de tejido óseo todos los años. En corte sagital del frontoparietal (lámina IV) se aprecian dos capas óseas principales y paralelas, conectadas por numerosos tabiques; de ellas, la capa externa es la que genera la ornamentación y en los tubérculos se aprecian las líneas de detención del crecimiento anuales. Durante la morfogénesis el patrón

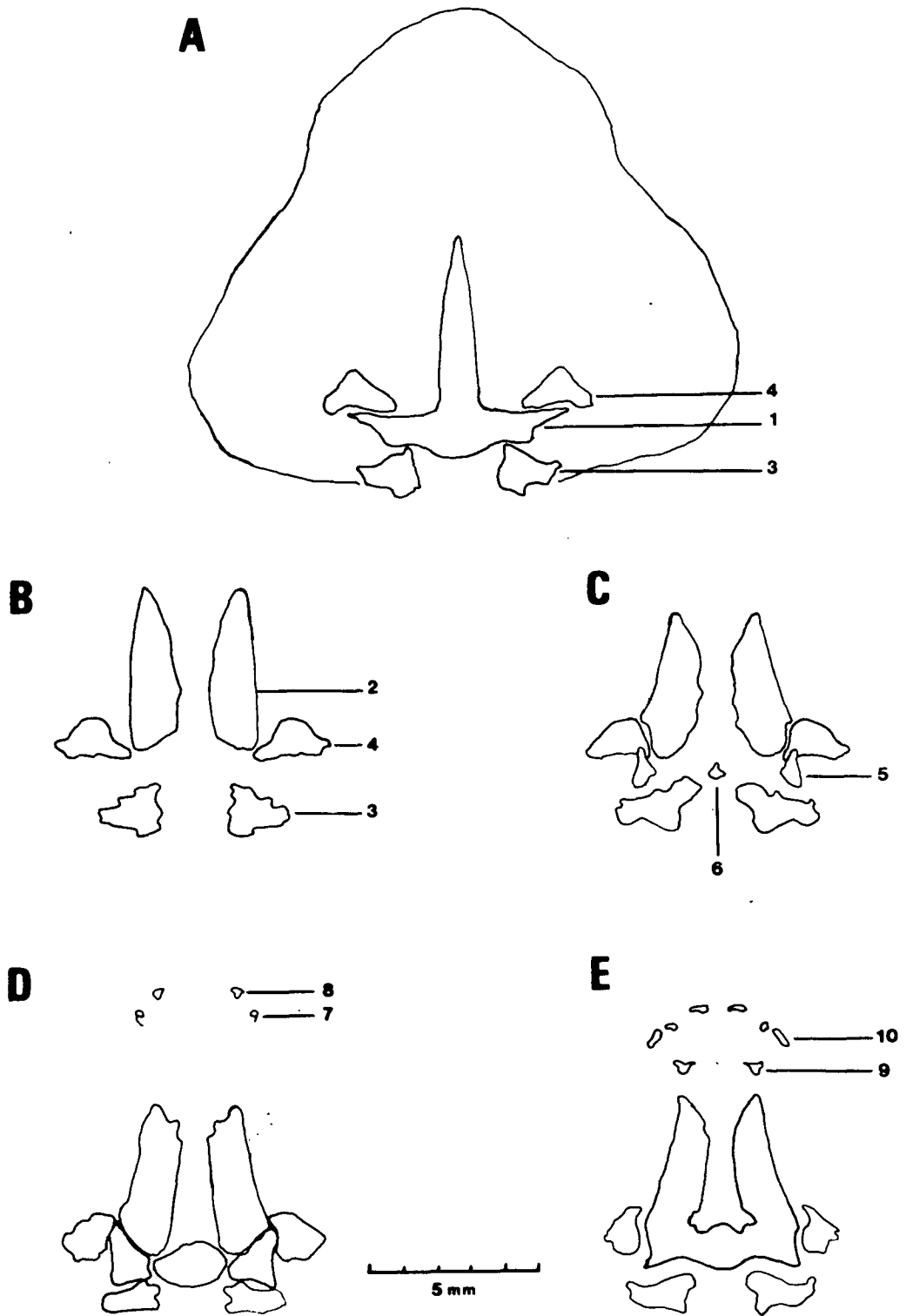


Figura 23.- Osificación del cráneo de *Pelobates cultripes*. A, renacuajo de estadio 39 en norma ventral. En norma dorsal: B, estadio 39; C, estadio 41; D, estadio 42, y E, estadio 43. 1, paraesfenoides; 2, frontoparietal; 3, exoccipital; 4, proótico; 5, extraescapular lateral; 6, extraescapular medial; 7, septomaxilar; 8, premaxilar; 9, nasal, y 10, maxilar.

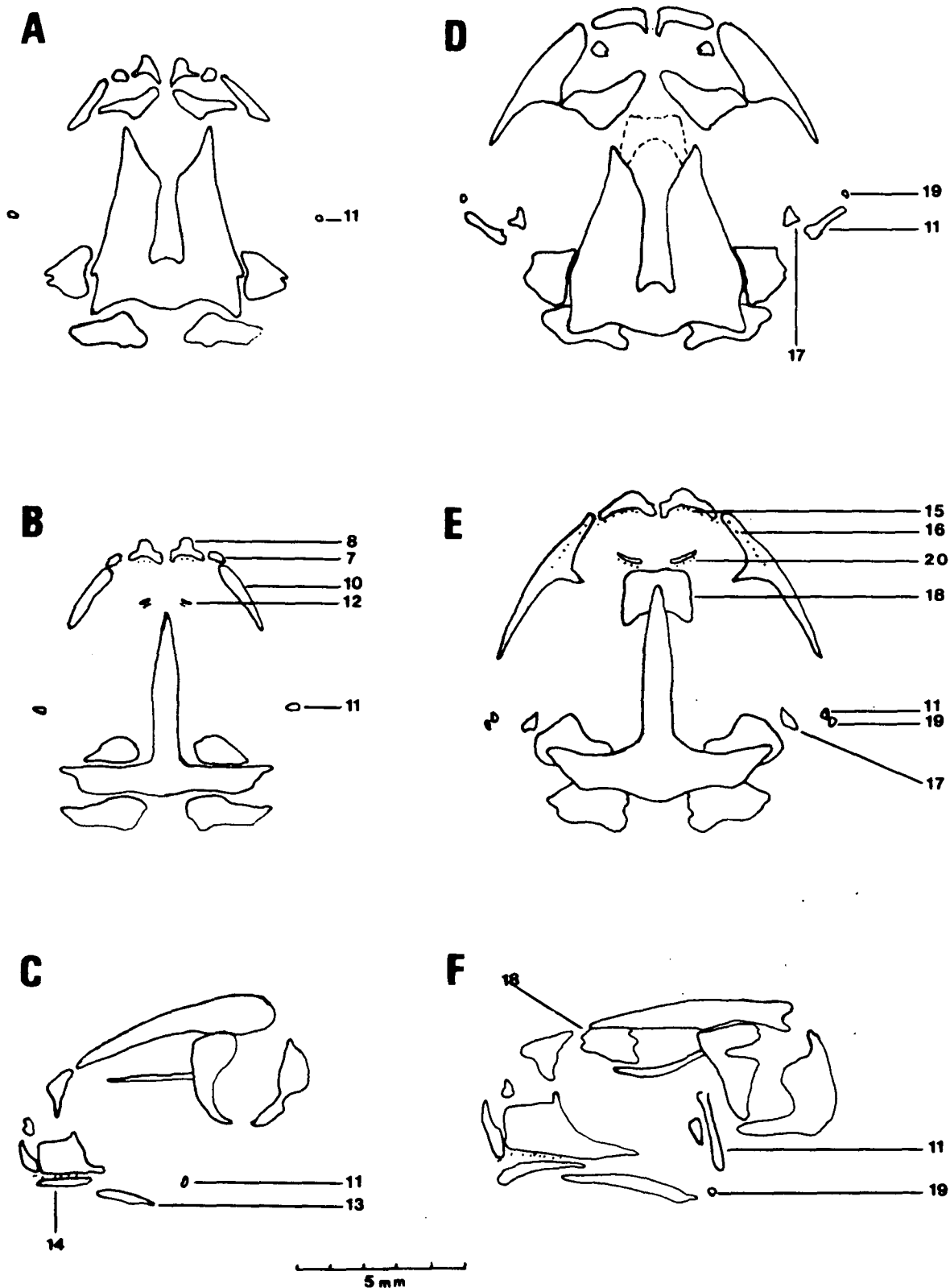


Figura 24.- Osificación del cráneo de *Pelobates cultripes* (continuación). A, B y C, estadio 44 en normas dorsal, ventral y lateral, respectivamente; D, E y F, estadio 45 en normas dorsal, ventral y lateral, respectivamente. 7, septomaxilar; 8, premaxilar; 10, maxilar; 11, preopercular; 12, vómer; 13, anguloesplénico; 14, dentario; 15, dientes de los premaxilares; 16, dientes de los maxilares; 17, pterigoideo; 18, esfenotmoides; 19, cuadradoyugal, y 20, dientes de los vómeres.

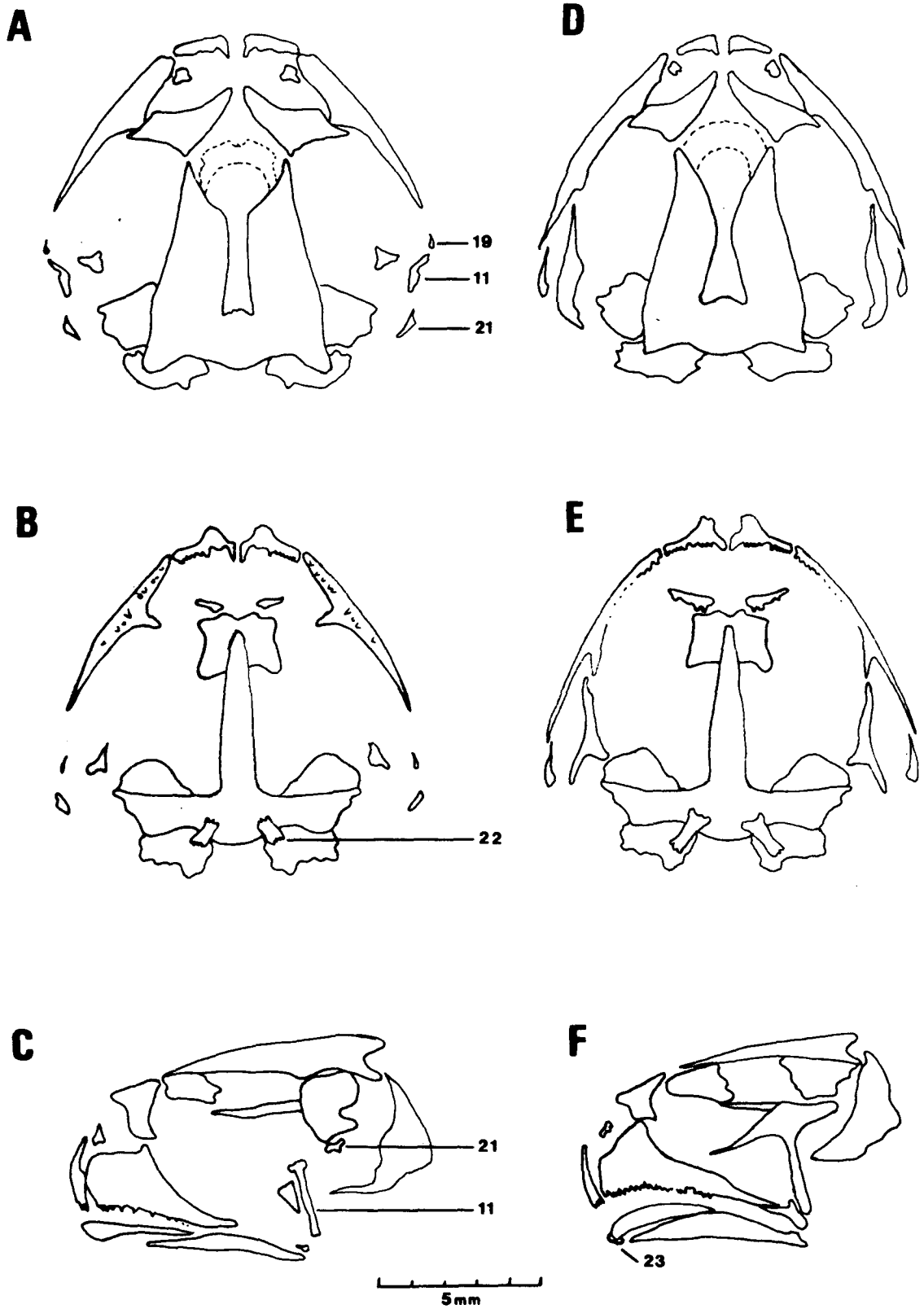


Figura 25.- Osificación del cráneo de Pelobates cultripes (continuación). A, B y C, estadio 46 en normas dorsal, ventral y lateral, respectivamente; D, E y F, primera semana postmetamórfica en normas dorsal, ventral y lateral, respectivamente. 11, preopercular; 19, cuadradoyugal; 21, escamoso; 22, proceso posteromedial del hioides, y 23, mentomeckeliano.

Tabla 14.- Pelobates cultripes. Para cada centro de osificación, porcentaje de individuos de cada estadio de desarrollo (Gosner, 1960) en que se ha iniciado la mineralización. Se indica el número de ejemplares estudiados por estadio.

Estadios Gosner	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	1ª s. 2ª s.	
nº ejempl.exam.	0	1	1	1	1	10	10	10	10	10	10	10	9	8	10	10	7	8	10	10	10	10	9	1

Centros de osificación	Porcentaje de individuos presentando osificación																									
Paraesfenoides	20	10	30	60	90	90	100																			
Frontoparietales								50	100																	
Exoccipitales								30	100																	
Proóticos										22	100	90	100													
Extraescapulares laterales														20	70	100										
Extraescapular medial															50	71	100									
Septomaxilares																14	75	100								
Premaxilares																14	75	90	100							
Nasales																		70	100							
Maxilares																			70	100						
Preoperculares																			30	80	100					
Vómeres																			20	70	100					
Anguloespleniales																			20	50	100					
Dentarios																			20	50	100					
Dientes en Premaxilares																				50	100					
Dientes en Maxilares																				50	100					
Pterigoideos																			10	30	100					
Esfenotmoides																				40	90	100				
Dientes en Vómeres																					80	90	100			
Cuadradoyugales																					60	90	100			
Escamosos																						60	100			
Procesos posteromediales del Hioides																					20	50	100			
Mentomeckelianos																								22	100	

Tabla 15.- Pelobates cultripes. Para cada estadio de desarrollo (Gosner, 1960), porcentaje de individuos en que la fusión de dos o más centros de osificación ha comenzado.

Estadios Gosner	40	41	42	43	44	45	46	1 <sup>a</sup> sem.	1er año
nº ejempl. exam.	10	7	8	10	10	10	10	9	2
Fusiones en el cráneo		Porcentaje de individuos en que la fusión ha comenzado							
Frontoparietales + Extraescapular medial		29%	25%						
Frontoescap. medial + Extraescaps.lats.	10%	14	75%	100%					
Dientes + Maxilares						40%	90%	100%	
Dientes + Premaxilares							50%	100%	
Dientes + Vómeres							20%	100%	
Preoperculares + Escamosos							20%	100%	
Proóticos + Exoccipitales								0	100%
Frontales en su línea media								0	100%

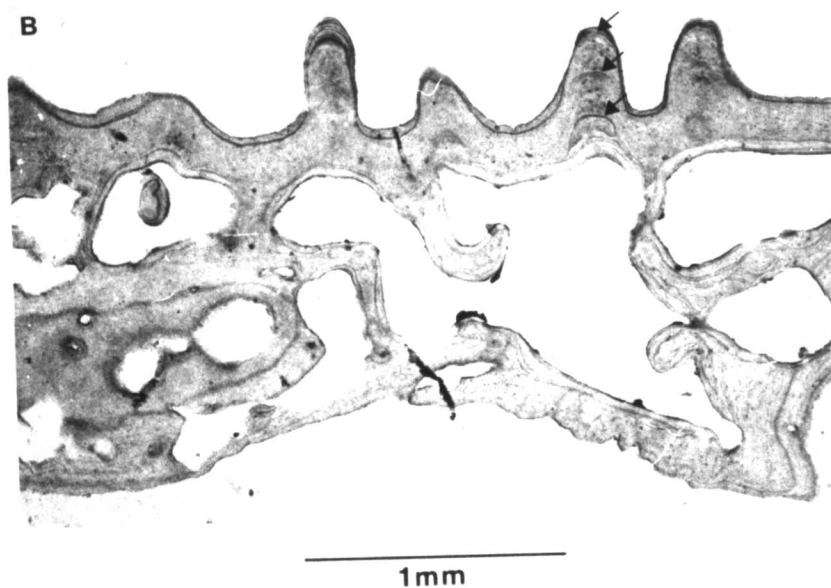
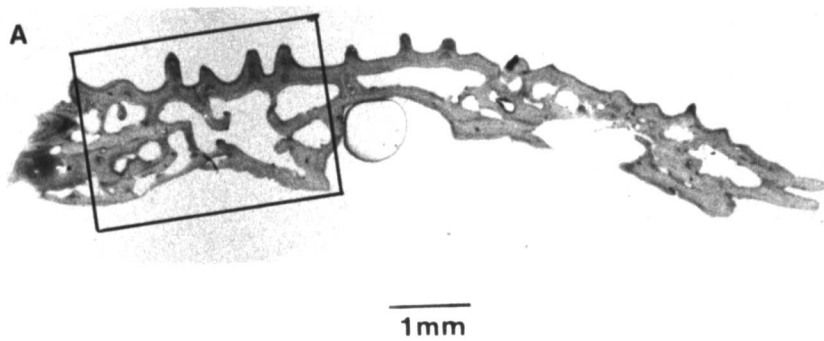


Lámina IV.- Pelobates cultripes. A, corte sagital de un frontoparietal en su línea media. B, detalle del anterior, mostrando la simetría de tres líneas de detención del crecimiento (señaladas con flechas). Tinción con hematoxilina de Ehrlich.

de tubérculos de la zona central del hueso no sufre remodelación, como puede deducirse de la simetría de las líneas.

**Prooticooccipitales.**- Huesos pares, de origen endocondral que protegen completamente la región ótica. Forma muy irregular (fig. 21). Están cubiertos parcialmente por el frontoparietal y articulan con el atlas mediante dos cóndilos, uno en cada elemento de la pareja.

Cada uno proviene de la fusión de dos elementos: exoccipital y proótico. El primer centro de osificación que aparece corresponde al exoccipital, en el estadio 37. El segundo aparece en el estadio 38, correspondiendo al proótico de otras especies (fig. 23 A y B). La fusión se produce una vez que la metamorfosis ha concluido y antes del primer año de vida terrestre.

**Septomaxilares.**- Huesos de membrana, pares, de pequeño tamaño y complicada estructura, situados en el interior de las cápsulas olfativas; comienzan a osificar en el estadio 42 (fig. 23 D).

**Premaxilares.**- Huesos de membrana, pares, limitan la parte anterior del endocráneo. Inician su osificación en el estadio 42, en la pars facialis (fig. 23 D). Poseen dientes de tipo pleurodonto en su parte ventral, que comienzan a osificar en el estadio 44 a partir de centros individualizados (fig. 24 C) y en el estadio 46 ya se han fusionado algunos con el hueso (fig. 25 C).

**Nasales.**- Huesos pares de origen dérmico, cuyas partes medias cubren el tectum nasi, mientras que las laterales cubren la pared postnasal. Su cara dorsal es ligeramente convexa y posee ornamentación tubercular del mismo tipo que la del frontoparietal.

Comienzan a osificar en el estadio 43 con su forma definitiva (fig. 23 E), tifiéndose ligeramente antes el área del proceso posterior. La ornamentación sigue las mismas pautas en su aparición que la del frontoparietal.

**Maxilares.**- Huesos pares de origen dérmico, ornamentados. Comienzan a osificar a la vez que los nasales, en el estadio 43, en el área de la futura

lámina anterior (fig. 23 E). No alcanzan su forma definitiva hasta la primera semana postmetamórfica.

Portadores de dientes que constituyen las zonas antero-laterales y laterales del arco dental. Estos comienzan a osificar en el estadio 44, cada uno a partir de un centro de osificación distinto (fig. 24 C), apareciendo primero los situados en la lámina anterior del maxilar; ya en el estadio 45 se observa un diente anclado en el hueso y colocado siempre a un tercio de su extremo anterior (fig. 24 F).

El proceso palatino comienza a observarse en el estadio 44 como una prolongación de la maxilla hacia el interior del cráneo (fig. 24 E), sin que se haya podido observar un centro de osificación independiente para él.

**Escamosos.-** Huesos pares de origen complejo que surgen a partir de dos centros de osificación. Su cara externa se halla ornamentada con tubérculos.

El primer centro en aparecer lo hace en el estadio 44, alrededor de la pars cuadrata palatoquadrati cartilaginosa y originará el proceso posterolateral del hueso y la parte anterior de la lámina (fig. 24 A - F), siguiendo a Lebedkina (1986) lo llamamos preopercular. El segundo centro de osificación surge en el estadio 46 sobre la crista parotica y constituirá el ramo parótico del hueso adulto y la parte posterior de la lámina (fig. 25 A - C), de acuerdo con Lebedkina (1986) este centro sería homólogo del escamoso de los restantes vertebrados. Los dos centros se fusionan en la primera semana después de terminar la metamorfosis, adquiriendo el hueso una forma que se aproxima a la adulta (fig. 25 D - F), posteriormente el borde que limita con el frontoparietal se ampliará a lo largo del crecimiento. El escamoso y el frontoparietal son los dos huesos que más modifican su contorno durante el primer año de vida terrestre.

**Vómeres.-** Huesos pares de origen dérmico, situados en el paladar y portadores de dientes.

Comienzan a osificar en el estadio 44, apareciendo primero el torus dentigerus (fig. 24 B); en el estadio 45 comienza la osificación de los

dientes, cada uno a partir de un centro independiente (fig. 24 E), y en la primera semana postmetamórfica se fusionan con el hueso, iniciando el proceso los dientes situados más próximos al eje sagital (fig. 25 E).

**Anguloespleniales.**- Huesos pares, dermales, alargados con ligera forma de S en norma dorsal y situados en la mandíbula inferior.

Comienzan a osificar en el estadio 44 por su extremo posterior (fig. 24 C), y alcanzan su forma definitiva al finalizar la metamorfosis (fig. 25 C).

**Dentarios.**- Huesos pares, alargados y considerablemente delgados, de origen dérmico, situados en el arco mandibular inferior. Cada elemento del par contacta con su simétrico en la sínfisis medial y se juntan con los anguloespleniales a lo largo de su superficie exterior, cubriendo el cartílago de Meckel lateralmente.

Siguen un desarrollo paralelo al de los anguloespleniales: comienzan a osificar en el estadio 44 por su extremo anterior (fig. 24 C) y al finalizar la metamorfosis tienen su forma definitiva (fig. 25 C); una semana después el mentomeckeliano comienza a osificar (fig. 25 F). Es éste un centro de osificación par de origen cartilaginoso que desde que aparece se halla fusionado sinostóticamente con el dentario, constituyendo ambos una sola pieza.

**Pterigoideos.**- Huesos pares de origen dérmico, situados en la parte posterior del cráneo, contactan con el paraesfenoides, los cuadradoyugales y escamosos. Tienen forma triangular y cada uno de sus tres vértices se alarga en un ramo.

Su zona central es la primera en aparecer en el estadio 45 (fig. 24 D - F); luego la osificación se va extendiendo hacia los ramos interior y posterior, y la última área en osificar es la correspondiente al ramo maxilar, que presenta señales de mineralización en la primera semana postmetamórfica (fig. 25 E).

**Esfenetmoides.**- Hueso único de origen endocondral, situado en el

interior de la caja craneana, cubierto dorsalmente por el frontoparietal y los nasales; ventralmente limita con el paraesfenoides, los vómeres y los procesos palatinos de los maxilares. Su forma es rectangular, con tres procesos en su parte anterior.

Comienza a osificar en el estadio 45 a partir de dos centros de osificación en la parte anterior del encéfalo, justo a los lados de los forámenes para la salida de los nervios olfativos (fig. 24 D - F). No alcanza su forma definitiva hasta la madurez sexual que es cuando los tres procesos anteriores se observan osificados.

**Cuadradoyugales.**- Huesos pares. Tradicionalmente se les adjudica un origen doble, cartilaginoso y de membrana (Kemp & Hoyt, 1969; Roček, 1980, y referencias en ambos). Se sitúan en los extremos lateroposteriores del cráneo; limitan con los maxilares, escamosos y pterigoideos, y articulan con los angulares de la mandíbula inferior.

En los individuos examinados de estadio 45 aparece un centro de osificación entre el extremo inferior del proceso posterolateral del escamoso y el maxilar (fig. 24 F). En la primera semana postmetamórfica la osificación ha invadido la parte distal cartilaginosa de la pars cuadrata palatoquadrati que constituye la superficie de articulación de este hueso con la mandíbula inferior, sin que se haya observado un centro de osificación independiente en esta invasión (fig. 25 A - F).

**Procesos posteromediales del hioides.**- Huesos pares de origen endocondral; pertenecen a los elementos viscerales libres del endocráneo (fig. 22).

Comienzan a osificar en el estadio 46, presentando su forma definitiva en la primera semana postmetamórfica (fig. 25 B y E). El comienzo de su osificación señala el fin de la metamorfosis en el cráneo.

Al terminar la metamorfosis, en el estadio 46 de la tabla de Gosner (1960), la osificación ha comenzado en todos los huesos del cráneo, pero éstos no alcanzan una forma parecida a la adulta hasta una semana después.

Tabla 16.- Secuencia en que inician su osificación los distintos elementos del cráneo de Pelobates cultripes, cronología de las fusiones de dos o más centros, estadio de desarrollo en que se inicia cada suceso - considerando como tal el primero a partir del cual al menos el 50% de los ejemplares presenta el hecho- y, por último, edad media a que comienza y termina cada estadio en renacuajos criados a temperatura óptima.

Elementos del cráneo	Fusiones	Est.Gosner	Edad (días) a 20°C
Paraesfenoides		34	11.25-12.25
Frontoparietales		36	13.75-16.75
Exoccipitales		37	16.75-21.25
Proóticos		38	16.75-23.87
Extraescapulares laterales		40	24.75-25.75
Extraescapular medial		"	
Septonaxilares	Frontopar. + Extraescp. m. +	42	27.75-29.00
Premaxilares	Extraescaps. lats.	"	
Nasales		43	29.00-31.00
Maxilares		"	
Preoperculares		44	31.00-32.33
Vómeres		"	
Anguloespieniales		"	
Dentarios		"	
Dientes de los premaxilares		"	
Dientes de los maxilares		"	
Pterigoideos		45	32.33-33.33
Esfenotmoides		"	
Dientes de los vómeres		"	
Cuadradoyugales		"	
Escamosos	Dientes + Maxilares	46	33.33
Proc. posteromed. hioides	Dientes + Premaxilares	"	
	Dientes + Vómeres		1ª sem. postm.
	Preoperculares + Escamosos		"
Mentomeckelianos	Mentomeckelianos + Dentarios (nunca se observan separados)		2ª sem. postm.
	Proóticos + Exoccipitales		1er año
	Frontales en su línea media		"

La tabla 16 resume la cronología del comienzo de la osificación en los veintitrés centros distintos del cráneo de P. cultripes y el momento del desarrollo en que algunos de ellos se fusionan constituyendo un cráneo adulto de quince elementos individualizados. Se considera "estadio de inicio" de la osificación de un elemento, o de la fusión de dos de ellos, el primero a partir del cual al menos el 50% de los ejemplares estudiados presenta el hecho. En las tablas 14 y 15 se relacionan los porcentajes detallados y el número de individuos estudiados de cada estadio.

La secuencia en que comienza la osificación de los veintitrés elementos es la siguiente: paraesfenoides, frontoparietales, exoccipitales, proóticos, extraescapulares laterales, extraescapular medial; septomaxilares, premaxilares, nasales y maxilares, preoperculares, vómeres, anguloespleniales y dentarios, dientes de los premaxilares y dientes de los maxilares; más tarde, pterigoideos, esfenetmoides, cuadradoyugales, dientes de los vómeres, escamosos y procesos posteromediales del hoides, y finalmente, mentomeckelianos.

La primera fusión que se produce es la de los frontoparietales con el extraescapular medial, seguida de la fusión de esta nueva pieza con los extraescapulares laterales; luego se fusionan los primeros dientes de los maxilares con el hueso que los soporta, los dientes de los premaxilares con los mismos y los dientes de los vómeres hacen lo propio; del mismo modo, poco después de aparecer el preopercular se fusiona con el escamoso; más adelante, el mentomeckeliano comienza a osificar sin que se aprecie nunca separado del dentario, y finalmente, los proóticos y exoccipitales por un lado y los frontales en su línea media por otro, se fusionan ya bien entrada la fase terrestre y antes de cumplir el primer año. Ver tabla 16.

Es sorprendente la escasa variabilidad observada en la secuencia de osificación. De los 176 ejemplares estudiados, sólo dos de ellos presentan una alteración de la secuencia modal descrita: en un ejemplar de estadio 43 los pterigoideos habían comenzado a osificar sin que la mineralización se hubiera iniciado en los dientes de los premaxilares y maxilares, y en otro de estadio 44 la osificación del esfenetmoides había comenzado sin que lo hubiera hecho la de los pterigoideos. Por tanto, podemos afirmar que la secuencia de

osificación craneana de P. cultripes está muy bien definida.

No podemos decir lo mismo del estadio de desarrollo en que se inicia la osificación de cada hueso, lo normal es que tenga que transcurrir un lapso de dos estadios desde que un centro de osificación aparece en un pequeño porcentaje de individuos hasta que está presente en el 100 % de los individuos de estadios posteriores, como puede verse en la tabla 14 y en la figura 26. El paraesfenoides, proótico y premaxilar son los huesos con mayor rango de posibilidades en cuanto a su momento de aparición. Pertenecen a las primeras etapas de la secuencia. Los dos primeros osifican en la fase prometamórfica, mientras que el premaxilar lo hace al iniciarse la metamorfosis.

En nuestra especie el proceso de inicio de la osificación en los veintitrés centros que totalizan quince huesos desarticulados distintos, a temperatura de crecimiento óptima, dura en total 29 días. El paraesfenoides comienza su osificación en el estadio 34, a los once días de edad; veintidós días después, al fin de la metamorfosis, han aparecido los quince huesos del complemento craneal, sólo falta por aparecer en el dentario su centro de osificación de origen endocondral, el mentomeckeliano, que iniciará su mineralización entre la primera y la segunda semana de vida terrestre. Los detalles de la edad a cada estadio se relacionan en la tabla 16.

En casi ningún estadio es posible prever el número exacto de centros de osificación que va a haber presentes. El rango de posibilidades es especialmente amplio durante la metamorfosis, donde hemos encontrado desde individuos de estadio 43 con siete centros de osificación hasta individuos con dieciseis, y ejemplares de estadio 44 que poseían entre once y dieciocho centros. El estadio mejor definido resultó ser el 38, pues la osificación había comenzado en los cuatro primeros huesos de la secuencia en los diez renacuajos estudiados.

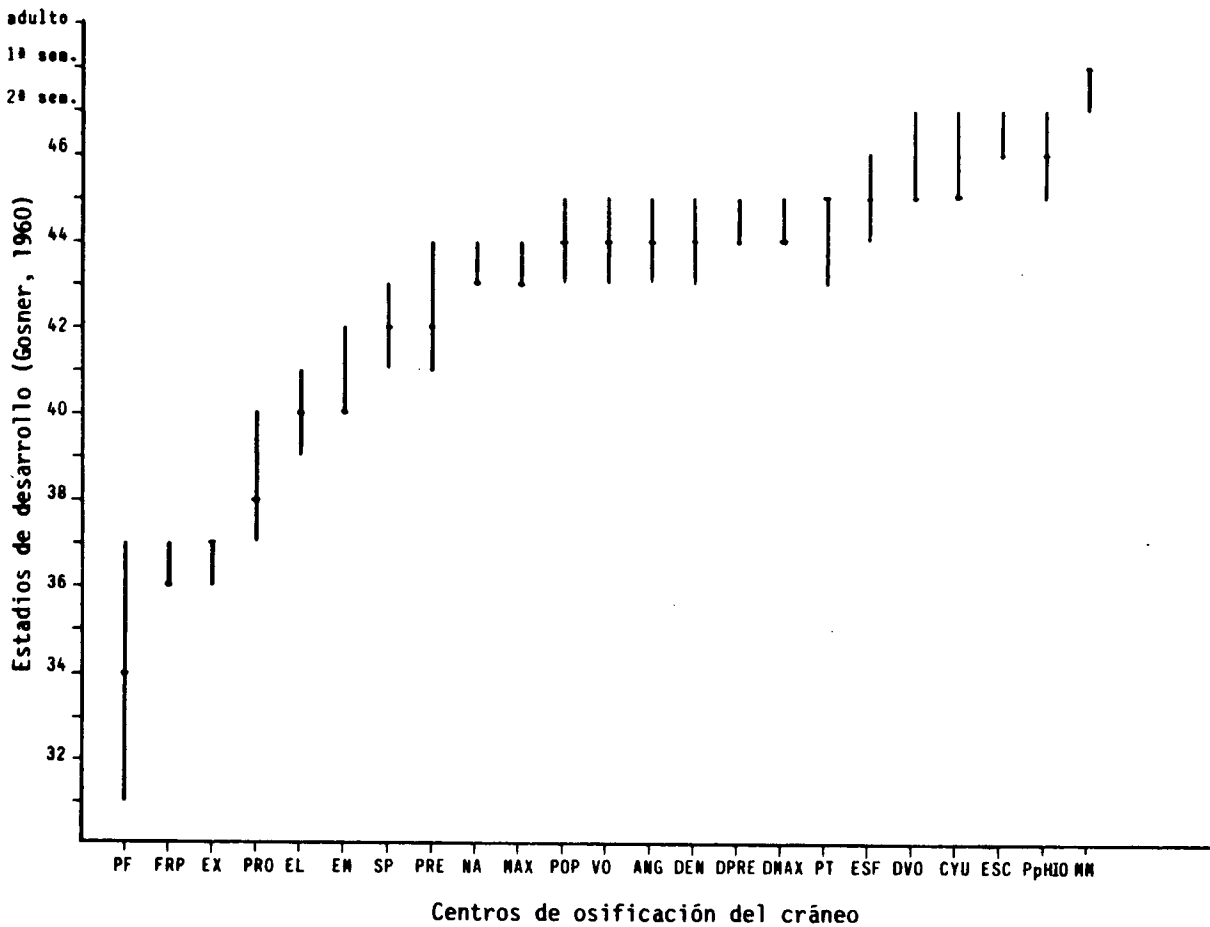


Figura 26.- Pelobates cultripes. Para cada centro de osificación del cráneo, estadios de desarrollo entre los que comienza su osificación. Las barras horizontales señalan el estadio a partir del cual más del 50% de los renacuajos examinados presenta osificación. ANG, anguloesplénial; CYU, cuadradoyugal; DEN, dentario; DMAX, dientes del maxilar; DPRE, dientes del premaxilar; DVO, dientes del vómer; EL, extraescapular lateral; EM, extraescapular medial; ESC, escamoso; ESF, esfenetmoides; EX, exoccipital; FRP, frontoparietal; MAX, maxilar; MM, mentomeckeliano; NA, nasal; PF, paraesfenoides; P.p. HIO, proceso posteromedial del hioides; PRE, premaxilar; PT, pterigoideo; PRO, proótico; SP, septomaxilar, y VO, vómer.

### 3.2.1.3. Comparación con Pelodytes punctatus y otras especies de Anuros

Se puede realizar desde cuatro puntos de vista:

- Número de huesos del esqueleto adulto.
- Número de centros de osificación en el desarrollo de cada hueso.
- Secuencia de osificación.
- Duración del inicio de la osificación.

En cuanto al número de huesos del esqueleto adulto, contamos con datos de 18 especies, recopilados por Trueb (1985). Resumimos aquí el complemento óseo que esta autora encontró en las especies revisadas; los huesos señalados con un asterisco faltan en algunas.

<b>Huesos premetamórficos:</b>	Paraesfenoides Frontoparietal Exoccipital
<b>Huesos metamórficos:</b>	Septomaxilar Premaxilar Maxilar Anguloesplénial Dentario Nasal Proótico
<b>Huesos del fin de la metamorfosis:</b>	Cuadradoyugal* Palatino* Pterigoideo Vómer* Mentomeckeliano
<b>Huesos postmetamórficos:</b>	Esfenotmoides Columella* Interfrontal*

De este conjunto básico de 18 huesos, en Pelobates cultripes faltan tres: el palatino, la columella y el interfrontal; en Pelodytes punctatus sólo faltan el palatino y el interfrontal. En ambas especies el exoccipital y el proótico se hallan fusionados (proóticooccipital), y el menctomeckeliano y el dentario también.

Hemos realizado cuidadosas observaciones del proceso palatino del maxilar en renacuajos de P. cultripes de las últimas etapas metamórficas y las primeras postmetamórficas -el número de ejemplares examinados se detalla en la tabla 14- y no hemos podido detectar ese centro de osificación; tampoco lo hemos hallado en una muestra variada -pero menos numerosa- de P. varaldii criados en laboratorio, ni en Pelodytes punctatus. De P. syriacus sólo podemos decir que carecen de palatino libre tanto los individuos postmetamórficos como los adultos. Rocek (1980) dice que en P. fuscus osifica a partir de un centro independiente que se fusiona con el maxilar rápidamente y lo considera homólogo del palatino libre de otras especies. El trabajo de Rocek carece de ilustración gráfica en este punto y el centro de osificación que menciona no ha podido detectarse ni en P. cultripes ni en P. varaldii.

De las especies más emparentadas con Pelobates se sabe que carecen de palatino: Megophrys maior y Scaphiopus holbrookii (Ramaswami, 1935) y Pelodytes punctatus (Parker, 1881, y esta tesis), es decir, se ha estudiado una especie de cada uno de los tres grandes grupos de Pelobátidos en sentido amplio, por tanto, su ausencia puede considerarse una característica del grupo.

De las restantes especies sin palatino libre, podemos señalar a todos los Archaeobatrachia -anuros considerados antiguos- en que se ha estudiado el tema: Ascaphus truei, Bombina orientalis, Rhinophrynus dorsalis, Xenopus laevis, X. borealis y X. tropicalis (en Trueb, 1985).

En P. cultripes no hemos encontrado un centro de osificación atribuible a la columella. Cannatella (1985) tampoco la encuentra, no obstante duda de su ausencia y considera que puede haberla perdido en el proceso de preparación del esqueleto desarticulado. En P. fuscus y P. syriacus no hemos encontrado columella en ninguno de los ejemplares estudiados. Rocek (1980) no la menciona en P. fuscus; sin embargo Cannatella (1985) dice que existe, aunque

reducida en sus proporciones típicas, tanto en P. fuscus como en P. syriacus. En la única especie del género en que hemos detectado una columella bien desarrollada es en P. varaldii, y podemos precisar que inicia su osificación una semana después del fin de la metamorfosis.

De las especies que se consideran más próximas filogenéticamente al género Pelobates, la columella se halla presente en Pelodytes punctatus (esta tesis) y en todas las especies de los géneros Scaphiopus y Spea; en Megophrys aceras, M. montana y Leptobrachium hasseltii (Cannatella, 1985). De las especies de anuros consideradas primitivas, carecen de ella: Ascaphus truei, Bombina orientalis y Rhinophrynus dorsalis (en Trueb, 1985); Leiopelma hochstetteri, Bombina maxima, B. bombina y B. variegata (Cannatella, 1985). Se encuentra presente en todos los Pípidos (Xenopus, Hymenochirus y Pipa), y en Alytes obstetricans, Barbourula busuangensis y Discoglossus pictus (Cannatella, 1985).

-----

En cuanto al número de centros de osificación a lo largo del desarrollo, la información se halla muy dispersa en la literatura. Tradicionalmente se ha considerado la observación de centros de osificación separados en el desarrollo y su fusión subsiguiente como la evidencia más decisiva de la fusión de dos huesos a lo largo de la evolución de un taxon (Griffiths, 1954).

Repasaremos lo que se sabe de cada hueso en las distintas especies, siempre que se hallan detectado diferencias respecto a lo descrito aquí para Pelobates cultripes.

**Frontoparietal.-** El tipo de desarrollo descrito en esta tesis para P. cultripes que implica la fusión de cinco centros de osificación: dos pares y uno medial, hemos podido comprobarlo también en P. varaldii criados en nuestro laboratorio; era conocido ya en P. fuscus y P. syriacus (Rocek, 1980 y 1988), y según este autor en P. fuscus se conocía este hecho desde antiguo (Severtzoff, 1891). Por tanto, este tipo de desarrollo tan peculiar se da en todas las especies del género Pelobates, y como veremos a continuación, en ninguna otra de las estudiadas hasta la fecha.

Entre las especies que se suponen más estrechamente emparentadas con nuestro género, conocemos el desarrollo del frontoparietal en cuatro de ellas: Scaphiopus hammondi (Eaton, 1939), Megophrys boettgeri y Leptobrachium hasseltii (Griffiths, 1954), y Pelodytes punctatus (Griffiths, 1954; esta tesis), y en todas surge a partir de un sólo centro de osificación par.

De las restantes familias consideradas primitivas, se han estudiado: Ascaphus truei (Altig, 1969a); Discoglossus pictus, Alytes obstetricans y Xenopus tropicalis, (Griffiths, 1954), encontrándose en todas ellas un sólo centro de osificación en cada frontoparietal.

Sin embargo, hay una gran variabilidad en dos géneros de Anuros modernos: Rana y Bufo.

Del género Rana se han estudiado en total 15 especies, encontrándose dos centros de osificación en diez de ellas: R. catesbiana, R. delalandi, R. esculenta, R. iberica, R. mascarensis, R. pleskei, R. rugosa, R. temporaria, R. tigrina (Griffiths, 1954) y R. pipiens (Kemp & Hoyt, 1969), y un solo centro en R. clamitans (Eaton, 1939), R. nicobarensis (Griffiths, 1954); R. aurora, R. cascadae y R. pretiosa (Altig, 1969b).

Del género Bufo se han estudiado ocho especies, presentando B. calamita y B. carens (Griffiths, 1954) dos centros de osificación en cada frontoparietal, y B. californicus (Eaton, 1939); B. bufo, B. marinus, B. penangensis, B. regularis (Griffiths, 1954) y B. boreas (Gaudin, 1978) un sólo centro.

Del género Hyla, se han estudiado dos especies y en las dos había un sólo centro de osificación: H. regilla (Eaton, 1939; Gaudin, 1973) e H. dominicensis (Griffiths, 1954).

A la vista de esta revisión, dentro de un mismo género (ej. Rana, Bufo), de anuros considerados modernos (Neobatrachia), algunas especies han perdido los parietales, mientras que otras los han retenido, según la interpretación de Eaton (1942) y Sedra (1949); mientras que para Griffiths (1954), los parietales no se han perdido, sino que se han fusionado con los frontales en

las especies en que los fontoparietales presentan un solo centro de osificación.

Sin embargo, el mismo Griffiths (1954), después de estudiar este tema en veintinueve especies, señala que incluso en renacuajos criados en las uniformes condiciones del laboratorio, el tamaño resultó ser una guía muy poco fidedigna para determinar con antelación el estado de osificación craneal. Por tanto, podría ser que la cantidad y variedad de ejemplares utilizados en estos trabajos -que no se especifica en material y métodos, pues son publicaciones relativamente antiguas- fuera insuficiente para detectar procesos que, como éstos, transcurren muy deprisa durante el desarrollo.

No obstante, una ontogenia del frontoparietal tan especial como la del género Pelobates, no se ha descrito para ningún otro anuro actual. Rocek (1980) le da una gran importancia filogenética, pero no nos pronunciamos sobre este aspecto pues los géneros Rana y Bufo presentan gran variabilidad.

**Exoccipitales.**- Hemos visto que en P. cultripes comienzan a osificar a partir de un solo centro de osificación cada uno. Lo mismo sucede en Pelodytes punctatus (datos propios) y en Bufo boreas (Gaudin, 1978); mientras que Kemp & Hoyt (1969) describen en Rana pipiens dos centros de osificación que se fusionan poco después de su aparición.

**Proóticos.**- En P. cultripes y Pelodytes punctatus la osificación comienza a partir de un solo centro. Sin embargo, Kemp & Hoyt (1969) describen tres centros en Rana pipiens y Altig (1969a) detecta también tres centros de osificación en Ascaphus truei.

Los proóticos se fusionan con los exoccipitales en algunas especies. En P. cultripes nosotros hemos visto que la fusión ya se había producido en los individuos de un año de edad. En Pelodytes punctatus, dos semanas después del fin de la metamorfosis ambos huesos se encuentran separados, mientras que los encontramos fusionados en los veintinueve adultos que hemos estudiado. En Ascaphus truei (Altig, 1969a) y Pseudacris nigrita triseriata (Stokely & List, 1954), los autores dicen que la fusión tiene lugar en el adulto. No existen datos de otras especies.

**Premaxilares.**- Hemos visto que en P. cultripes primero osifica la pars facialis y luego la pars dentalis. Rocek (1980) describe un desarrollo inverso en el premaxilar de P. fuscus; en cambio, la secuencia de acontecimientos en Pelodytes punctatus, y la descrita en Ascaphus truei (Altig, 1969a), Hyla regilla (Gaudin, 1973) y Rana pipiens (Kemp & Hoyt, 1969) coincide con la expuesta por nosotros.

**Maxilares.**- En nuestra descripción, el proceso palatino del maxilar osifica como una prolongación del mismo, mientras que en P. fuscus, Rocek (1980) dice que dicho proceso osifica a partir de un centro independiente que se fusiona con el maxilar poco después de su aparición, y considera este centro homólogo al palatino libre de otras especies. Pelodytes punctatus tampoco presenta un centro de osificación independiente en el proceso palatino.

**Escamosos.**- Los dos centros de osificación descritos en el desarrollo del escamoso de P. cultripes eran conocidos ya en P. fuscus (Rocek, 1980). Este autor en su revisión del tema encuentra que el doble origen de este hueso en P. fuscus fue descrito por Reinbach (1939). También se había mencionado en algunos Ránidos y Bufónidos (Sedra, 1949); en Bufonidae y Atelopodidae (Griffiths, 1954b) y en Bufo viridis, B. marinus, Rana temporaria, R. esculenta y Pelobates fuscus (Lebedkina, 1986).

Ningún autor americano menciona este doble origen del escamoso. Kemp & Hoyt (1969) describen el desarrollo de este hueso en Rana pipiens a partir de un solo centro de osificación situado en la pars cuadrata palatoquadrati; sin embargo, en la figura 21 c de dicho trabajo se aprecia un segundo centro de osificación sobre la crista parotica que los autores no mencionan en sus descripciones. Gaudin (1973) describe también un solo centro de osificación en Hyla regilla. El mismo Gaudin (1978) examinó el desarrollo de 725 Bufo boreas y ni menciona ni discute el segundo centro de osificación del escamoso, que aparece en otros bufónidos sobre la crista parotica.

Según Lebedkina (1986) solo los Discoglósidos de los géneros Bombina y Alytes desarrollan sus escamosos a partir de un centro de osificación único situado sobre el palatocadrado. Nosotros hemos observado este mismo tipo de

origen del escamoso en Pelodytes punctatus.

**Vómeres.**- Surgen a partir de un solo centro en P. cultripes y Pelodytes punctatus (datos propios), Rana pipiens (Kemp & Hoyt, 1969), e Hyla regilla (Gaudin, 1973) y a partir de dos centros en Pseudacris nigrita triseriata (Stokely & List, 1954). Los dientes que porta este hueso osifican a partir de un centro cada uno. Los autores citados no indican este hecho.

**Pterigoideos.**- Surgen a partir de un centro de osificación en P. cultripes y Pelodytes punctatus (esta tesis), y Pseudacris nigrita triseriata (Stokely & List, 1954); a partir de dos centros en Rana pipiens (Kemp & Hoyt, 1969), y a partir de tres centros, uno en cada rama del hueso, en Hyla regilla (Gaudin, 1973).

**Esfenetmoides.**- Osifica a partir de dos centros en P. cultripes (este tesis) y en Bufo boreas (Gaudin, 1978); a partir de cuatro centros en Hyla regilla (Gaudin, 1973), y como no osifica hasta después de la metamorfosis, no se sabe a partir de cuantos centros en Rana pipiens. En Osteopilus septentrionalis sobre el hueso de origen endocondral se produce una osificación de tipo dérmico en la cara del esfenetmoides expuesta al exterior, entre los frontales y los nasales (Trueb, 1966).

**Columella.**- Este hueso no existe en Pelobates cultripes. Osifica a partir de un solo centro en la primera semana después del fin de la metamorfosis en Pelobates varaldii. En Pelodytes punctatus existe este hueso bien desarrollado en el adulto, pero no había comenzado su osificación en los sapitos de dos semanas de edad estudiados. No hay datos sobre el número de centros de osificación de este hueso en las restantes especies, debido a que su mineralización se produce después de que la metamorfosis ha concluido.

Hay confusión en cuanto al número de centros en los huesos de origen endocondral: exoccipitales, proóticos y esfenetmoides, principalmente porque los autores no proporcionan dibujos o fotos que muestren los distintos centros; en cambio, la diferencia en el número de centros en los huesos de origen dermal: frontales, maxilares, escamosos, vómeres y pterigoideos, está mucho mejor documentada gráficamente en las distintas especies y no hay

ninguna duda de que es real. Su importancia filogenética está aún sin determinar.

Después de la revisión realizada, podemos concluir que el número de centros de osificación en el cráneo es superior al número de huesos, en las diez especies en las que su proceso de osificación se conoce con más detalle: Ascaphus truei (Altig, 1969a); Bombina orientalis, (Hanken & Hall, 1984); Bufo boreas (Gaudin, 1978); Hyla regilla (Gaudin, 1973); Pelobates cultripes y Pelobates varaldii (esta tesis); Pelobates fuscus (Rocek, 1980); Pelodytes punctatus (este tesis); Pseudacris nigrita triseriata (Stokely & List, 1954), y Rana pipiens (Kemp & Hoyt, 1969).

-----

En cuanto a la secuencia de osificación, la de Pelobates varaldii es casi igual a la de P. cultripes. La única diferencia detectada es la existencia de un centro de osificación adicional en P. varaldii. Este centro corresponde a la columella y es el último del cráneo en iniciar su osificación, después del mentomeckeliano, en la primera semana postmetamórfica.

Le sigue en similitud la secuencia de osificación de Pelodytes punctatus, especie con la que se le considera estrechamente emparentado. Ver tabla 17 y figura 27. Las únicas diferencias se deben a que en Pelodytes el escamoso y el vómer inician su osificación después que el anguloesplénial y el dentario, mientras que en Pelobates la inician inmediatamente antes, y que la secuencia en Pelodytes posee dos elementos más: la columella y el parahioides.

A falta de conocimientos sobre la secuencia del anfibio ancestral que utilizaríamos como punto de partida para realizar comparaciones, nos serviremos de la síntesis elaborada por Trueb (1985). Esta autora selecciona los patrones de osificación comunes a las 18 especies de las que se conoce su secuencia, aunque en la mayoría de manera incompleta. Su resumen, que se expone en el apartado anterior, separa los huesos del cráneo, sin incluir el hioides, en cuatro grupos. Hasta la fecha ningún autor, excepto en esta tesis, ha detallado la secuencia de aparición de todos los centros. Respecto a lo considerado común, Pelobates cultripes presenta las siguientes diferencias:

Tabla 17.- Secuencia de osificación, número de ejemplares estudiados y estadio de Gosner (entre paréntesis) en que se inicia la osificación en cada hueso en el 50% de los ejemplares examinados de Pelodytes punctatus y Pelobates cultripes (esta tesis), Rana pipiens (Kemp & Hoyt, 1969), Bombina orientalis (Hanken & Hall, 1984), Bufo boreas (Gaudin, 1978), Hyla regilla (Gaudin, 1973) y Ascaphus truei (Altig, 1969).

<u>Pelodytes punctatus</u> (n = 159)	<u>Pelobates cultripes</u> (n = 176)	<u>Rana pipiens</u> (n = 232)	<u>Bombina orientalis</u> (n = 137)
Paraesfenoides (34)	Paraesfenoides (34)	Paraesfenoides (32)	Frontoparietal (37)
Frontoparietal (36)	Frontoparietal (36)	Exoccipital (34)	Exoccipital (37)
Exoccipital (37)	Exoccipital (37)	Frontoparietal (36)	Paraesfenoides (38)
Proótico (38)	Proótico (38)	Proótico (40)	Septomaxilar (41)
Septomaxilar (43)	Septomaxilar (42)	Premaxilar (41)	Premaxilar (43)
Premaxilar (43)	Premaxilar (42)	Maxilar (42)	Vómer (43)
Maxilar (44)	Nasal (43)	Septomaxilar (42)	Nasal (43)
Nasal (44)	Maxilar (43)	Nasal (43)	Maxilar (44)
Anguloesplénial (4)	Escamoso (44)	Dentario (43)	Anguloesplénial (45)
Dentario (45)	Vómer (44)	Anguloesplénial (43)	Dentario (45)
Escamoso (45)	Anguloesplénial (44)	Escamoso (43)	Escamoso (45)
Vómer (46)	Dentario (44)	Pterigoideo (44)	Cuadradoyugal (46)
Pterigoideo (46)	Pterigoideo (45)	Vómer (45)	Pterigoideo (46)
Esfenetmoides (46)	Esfenetmoides (45)	Mentomeckeliano (45)	Proótico (46)
Pr.pm.hiodes (2ªsem.)	Cuadradoyugal (45)	Cuadradoyugal (45)	Interfrontal (46)
Parahiodes (2ªsem.)	Pr.pm.hiodes (46)	Palatino (45)	Esfenetmoides (postm.)
Cuadradoyugal (2ªsem.)	Mentomeckeliano(2ªsem.)	Columella (45)	Mentomeckeliano (postm.)
Mentomeckeliano (2ªsem.)		Pr.pm.hiodes (46)	No figura el hioides
Columella (adulto)		Esfenetmoides (postm.)	

Tabla 17.- (Continuación).

Bufo boreas (n = 156)	Hyla regilla (n = 190)	Ascaphus truei (n = 32)
Exoccipital (36)	Paraesfenoides (31)	Paraesfenoides (34)
Paraesfenoides (37)	Frontoparietal (35)	Frontoparietal (37)
Frontoparietal (38)	Exoccipital (37)	Exoccipital (37)
Proótico (41)	Proótico (37)	Septomaxilar (42)
Premaxilar (41)	Vómer (41)	Premaxilar (42)
Escamoso (41)	Premaxilar (42)	Escamoso (42)
Septomaxilar (42)	Septomaxilar (42)	Proótico (42)
Maxilar (42)	Maxilar (42)	Anguloesplénial (42)
Anguloesplénial (42)	Nasal (42)	Dentario (42)
Nasal (42)	Escamoso (42)	Maxilar (46)
Dentario (42)	Pterigoideo (43)	Vómer (46)
Pterigoideo (43)	Anguloesplénial (4)	Pterigoideo (46)
Vómer (postm. Lcc = 10-19 mm)	Dentario (43)	Esfenetmoides (46)
Mentomeckeliano (Lcc = 10-19 mm)	Mentomeckeliano (Lcc=10-15mm)	Mentomeckeliano (46)
Palatino (Lcc = 10-19 mm)	Cuadradoyugal (Lcc=10-15mm)	Nasal (46)
Cuadradoyugal (Lcc = 10-19 mm)	Palatino (Lcc = 10-15 mm)	No figura el hioides
Columella (Lcc = 20-29 mm)	Columella (Lcc = 10-15 mm)	
Esfenetmoides (adulto)	Esfenetmoides (Lcc = 10-15 mm)	
No figura el hioides	No figura el hioides	

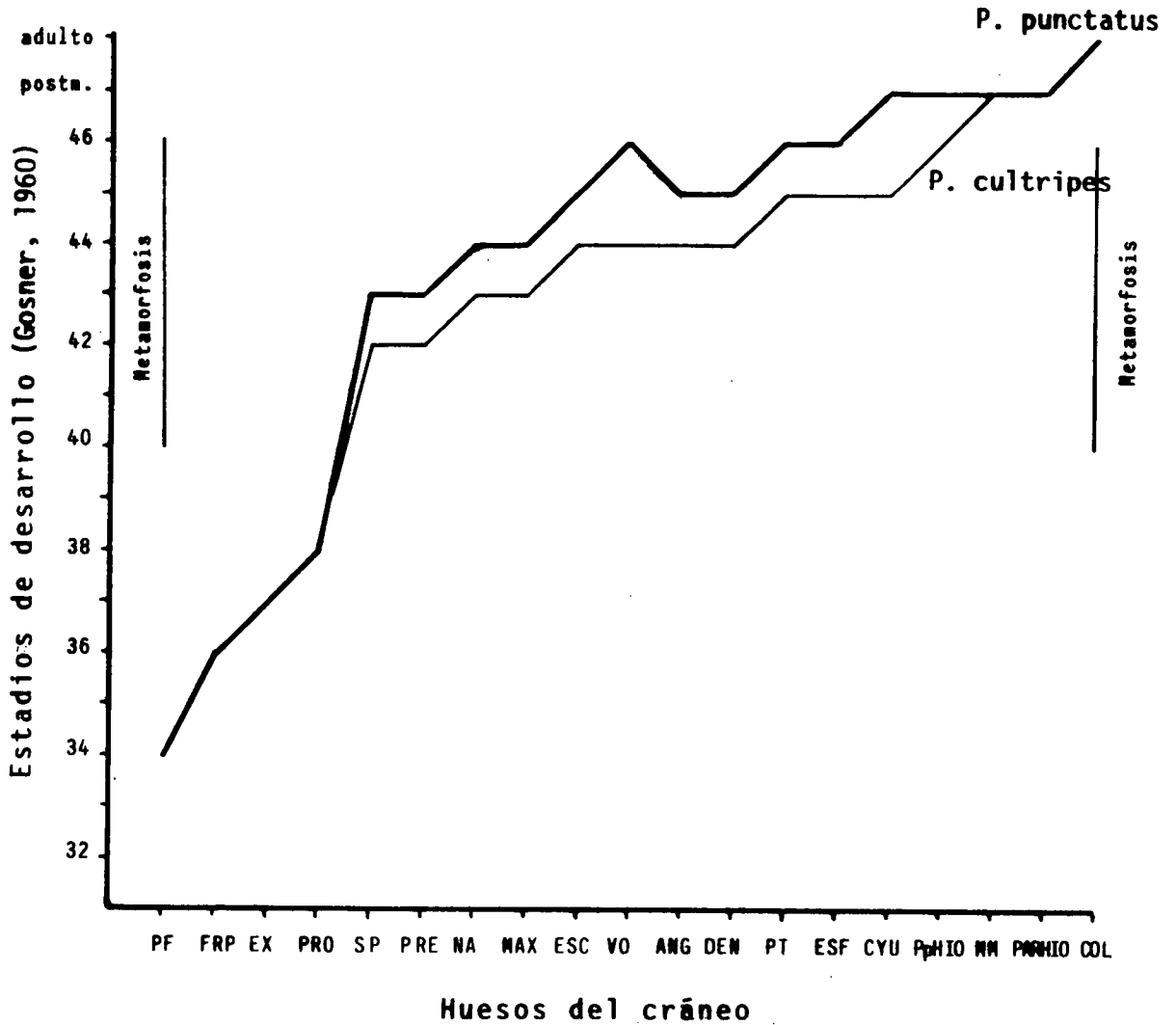


Figura 27.- Secuencia de osificación y estadio de comienzo de la mineralización de cada hueso del cráneo en el 50% de los ejemplares de *Pelodytes punctatus* (trazo grueso), comparada con la de *Pelobates cultripes* (trazo fino). COL, columella, y PARHIO, parahioides. Resto de las abreviaturas como en la figura 26.

- El proótico comienza a osificar en la fase premetamórfica. Lo común es que osifique al principio de la metamorfosis (Ascaphus truei, Bufo boreas y Rana pipiens) o hacia el fin de la misma (Bombina orientalis). Ver tabla 17 y figuras 28 - 32.

- Los mentomeckelianos inician su osificación en la primera o segunda semana postmetamórfica. Mientras que en Rana pipiens y Ascaphus truei (figs. 28 y 32) el inicio tiene lugar en los últimos estadios metamórficos.

- El esfenetmoides osifica en las últimas etapas de la metamorfosis, cuando en la mayoría de las especies (Bombina orientalis, Bufo boreas, Hyla regilla y Rana pipiens) este hueso retrasa el comienzo de su mineralización hasta después de concluida la misma (figs. 28 - 31).

La secuencia de osificación, en las especies en que se ha estudiado su variabilidad: Bombina orientalis, Bufo boreas y Rana pipiens, está tan bien determinada como en P. cultripes. En B. orientalis, Hanken & Hall (1984) detectaron ligeras alteraciones de la secuencia en la aparición de un hueso en cuatro de los 137 renacuajos de laboratorio que estudiaron. En Bufo boreas, Gaudin (1978), después de estudiar 723 ejemplares, afirma encontrar en los criados en laboratorio un retraso importante en el comienzo de la osificación en todos los huesos, pero no describe alteraciones de la secuencia; y, finalmente, Kemp & Hoyt (1969) consiguieron alterar la secuencia de aparición de los primeros huesos en Rana pipiens, administrando tiroxina a renacuajos en estadios de desarrollo premetamórficos, provocando el comienzo de la osificación en los premaxilares, septomaxilares y maxilares, sin que hubieran osificado previamente los proóticos, y en los dos individuos en que la administración de la hormona se realizó en los estadios de desarrollo más tempranos, tampoco había comenzado a osificar el paraesfenoides.

La detección de dos alteraciones de la secuencia modal en P. cultripes colectados en el campo se suma a las ya conocidas en Bombina orientalis y Rana pipiens criadas en laboratorio, y añade una evidencia más a la hipótesis emitida por Hanken & Hall (1984) de que la secuencia representa un conjunto de sucesos esencialmente independientes -formación de centros de osificación discretos-, que tienen lugar en un orden prescrito provocado por una variación

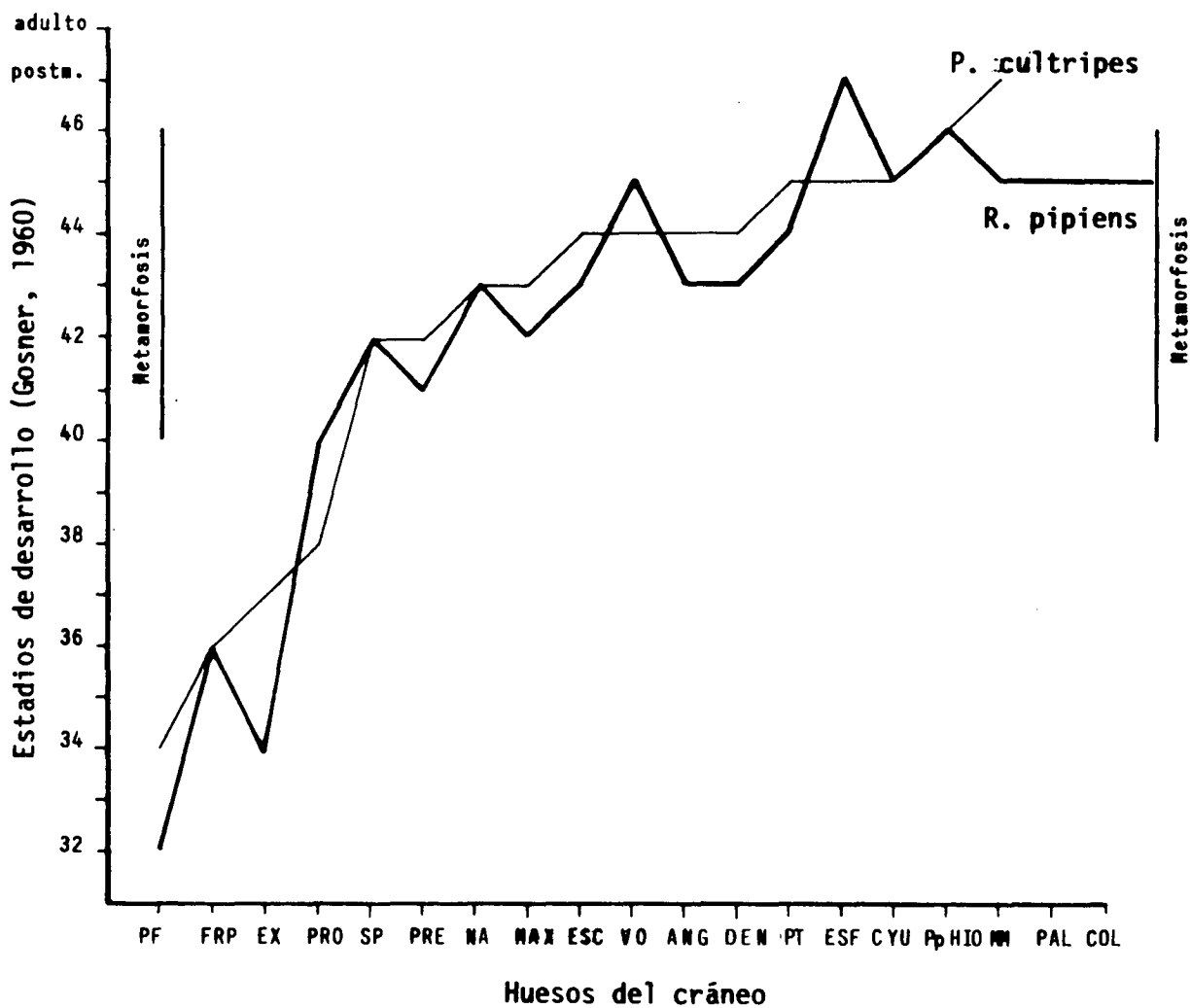


Figura 28.- Secuencia de osificación y estadio de comienzo de la mineralización de cada hueso del cráneo en el 50% de los ejemplares de Rana pipiens (Kemp & Hoyt, 1969; trazo grueso), comparada con la de Pelobates cultripes (trazo fino). PAL, palatino; resto de las abreviaturas como en las figuras 26 y 27.

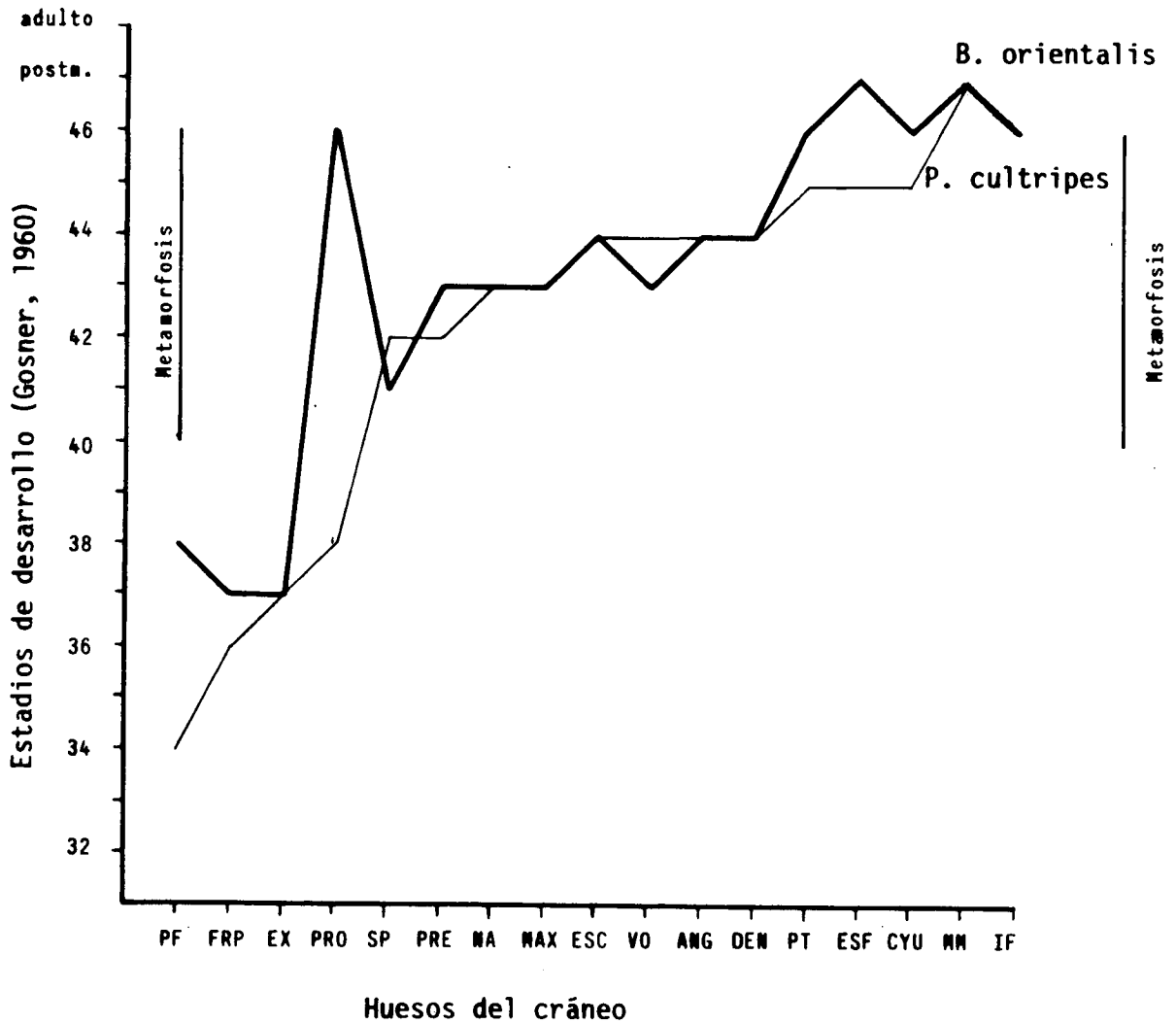


Figura 29.- Secuencia de osificación y estadio de comienzo de la mineralización de cada hueso del cráneo en el 50% de los ejemplares de Bombina orientalis (Hanken & Hall, 1984; trazo grueso), comparada con la de Pelobates cultripes (trazo fino). IF, interfrontal; resto de las abreviaturas como en las figuras 26 y 27. No se representa el hioides.

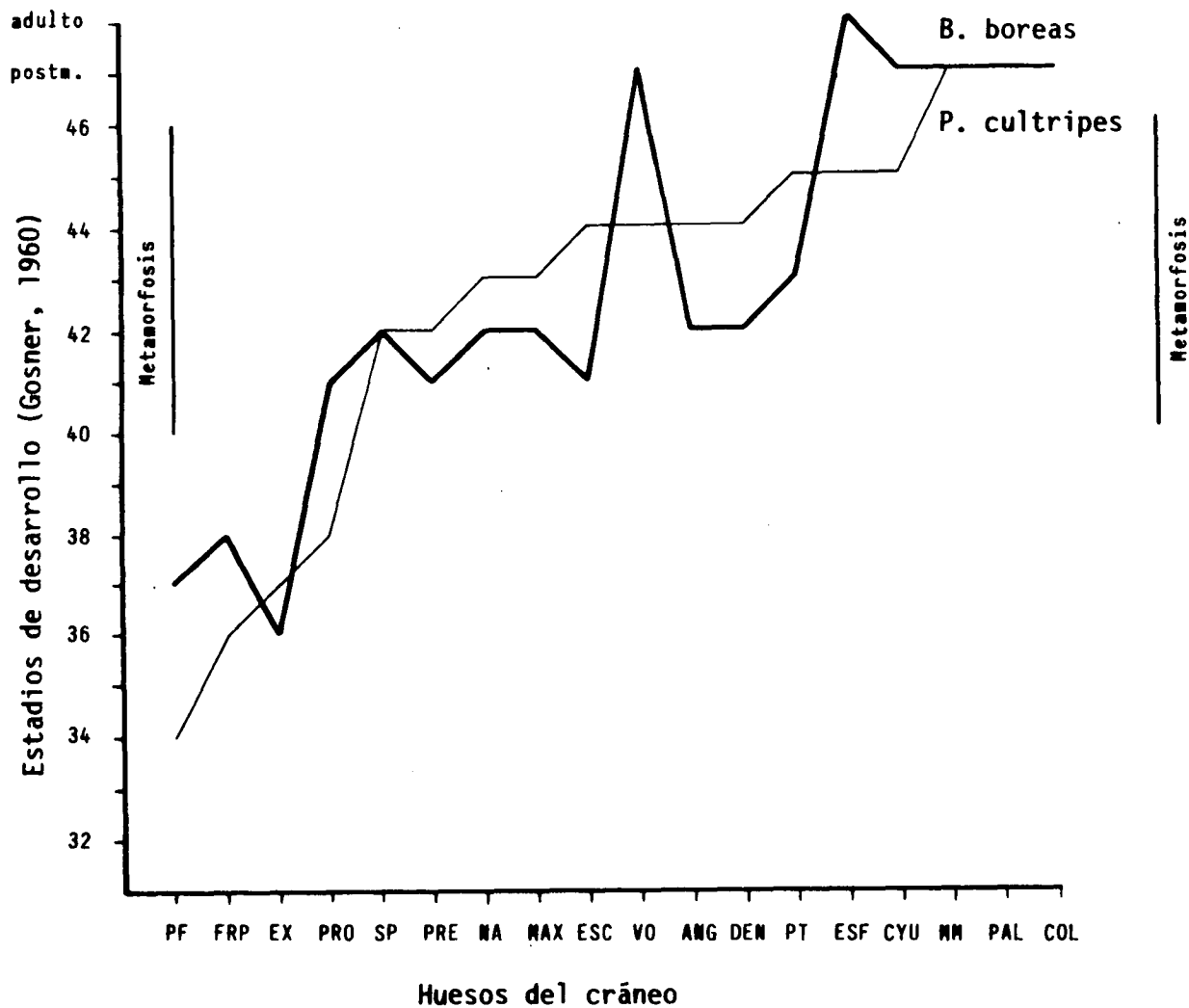


Figura 30.- Secuencia de osificación y estadio de comienzo de la mineralización de cada hueso del cráneo en el 50% de los ejemplares de *Bufo boreas* (Gaudin, 1978; trazo grueso), comparada con la de *Pelobates cultripes* (trazo fino). Abreviaturas como en las figuras 26, 27 y 28. No se representa el hioides.

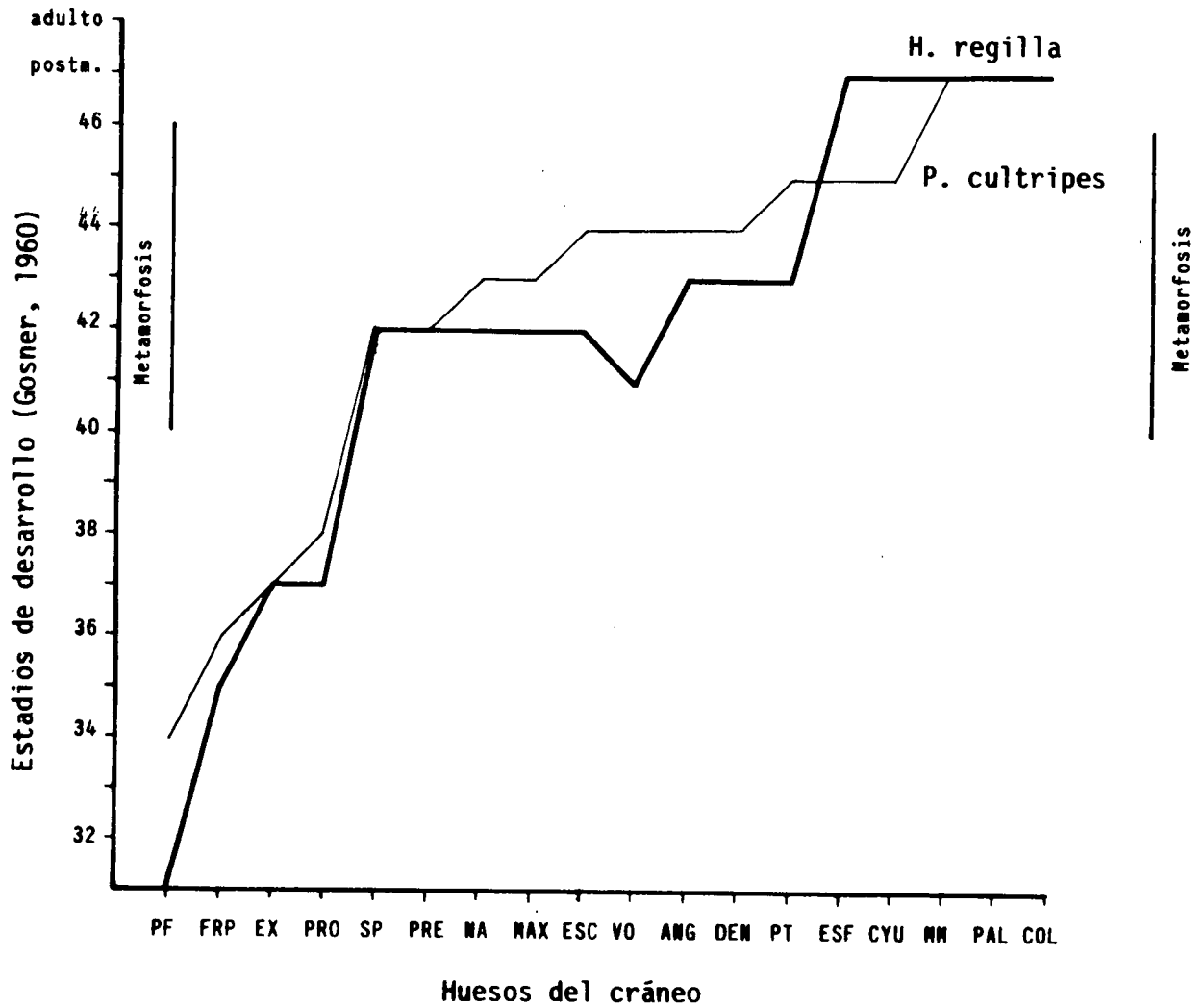


Figura 31.- Secuencia de osificación y estadio de comienzo de la mineralización de cada hueso del cráneo de *Hyla regilla* (Gaudin, 1973; trazo grueso)), comparada con la de *Pelobates cultripes* (trazo fino). Abreviaturas como en las figuras 26 y 27. No se representa el hioides.

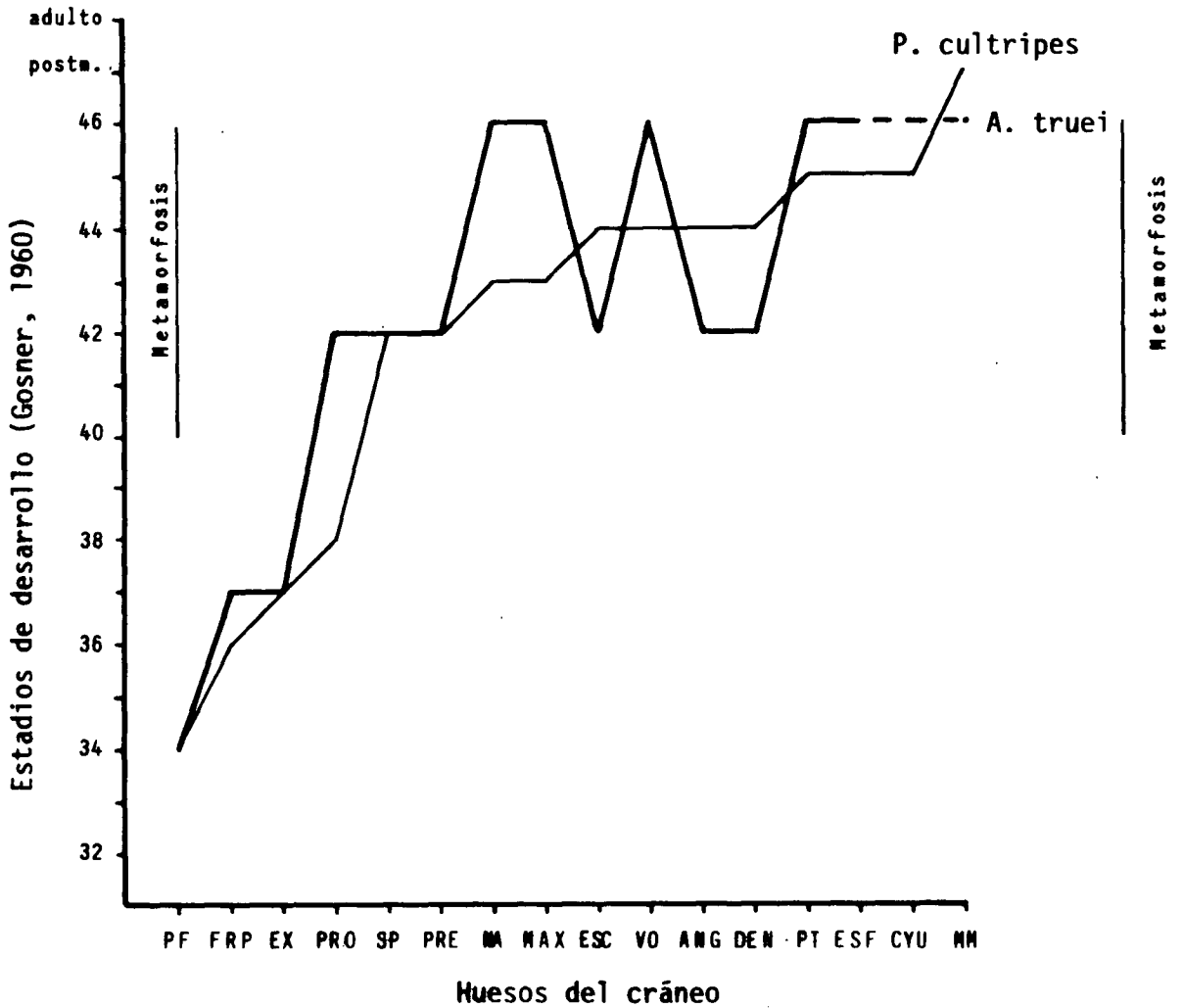


Figura 32.- Secuencia de osificación y estadio de comienzo de la mineralización de cada hueso del cráneo de Ascaphus truei (Altig, 1969a; trazo grueso)), comparada con la de Pelobates cultripes (trazo fino). Abreviaturas como en las figuras 26 y 27. No se representa el hioides.

intracraneal de ciertos parámetros del desarrollo, como puede ser el umbral de respuesta de los enclaves osteogénicos a los niveles de hormona tiroidea circulante; frente a la hipótesis alternativa de que la formación de un centro es dependiente de otra osificación previa y es una precondition para la aparición de los centros subsiguientes.

-----

En cuanto a la duración del proceso de inicio de la osificación -entendiendo como tal el lapso de tiempo que transcurre desde la aparición del primer centro de osificación hasta la aparición del último, a temperatura óptima de desarrollo-, no hay datos de duración real para ninguna especie, excepto los que se proporcionan en esta tesis para Pelobates cultripes. Este parámetro es fundamental para dilucidar la intervención de procesos de heterocronía en las variaciones que se detectan de unas especies a otras.

A falta de datos sobre los días que dura el proceso, tendremos que comparar unas especies con otras basándonos en el estado de su osificación en cada estadio de Gosner (1960).

Al igual que en P. cultripes, en Pelodytes punctatus el proceso se inicia en el estadio 34 en que comienza a osificar el paraesfenoides y termina en un momento no precisado de la fase postmetamórfica en que osifica la columella. La duración en días no la conocemos, pues no se ha determinado experimentalmente. Lo que sí podemos deducir es que la edad a que alcanza el estadio 34 es inferior a la de P. cultripes, porque su longitud media en ese estadio es LCC = 11.94 mm, mientras que la de P. cultripes es LCC = 23.86 mm, y sabemos, por los datos de campo de Díaz Paniagua (1987), que el ritmo de crecimiento en longitud de las larvas de ambas especies en el campo es similar. Por tanto, Pelodytes punctatus sufre una aceleración general de su desarrollo cuando lo comparamos con P. cultripes. Aunque la secuencia de aparición de los huesos en ambas especies es muy semejante, el estadio de inicio de la osificación está algo retrasado en la mayoría de los huesos de Pelodytes; achacamos el hecho a que los ejemplares de esta especie han sido criados en laboratorio. Ver figura 27.

En Rana pipiens criadas en laboratorio (Kempt & Hoyt, 1969), el proceso abarca desde el estadio 32 hasta después de la metamorfosis, sin precisar cuando osifica el esfenetmoides. El tamaño de ambas especies al fin de la metamorfosis es el mismo: 25.40 mm de media para Rana pipiens (Taylor & Kollros, 1946) y 25.49 mm para los Pelobates cultripes (datos de campo propios); si consideramos que ambas especies se desarrollan a un ritmo parecido, el proceso de osificación se inicia ligeramente antes en R. pipiens. Por otro lado, el momento de osificación de cada hueso es bastante parecido y sólo hay pequeñas alteraciones de secuencia. Ver figura 28.

En Bombina orientalis (Hanken & Hall, 1984), la osificación se inicia en el estadio 37 a una longitud de cabeza + cuerpo igual a 18.30 mm, algo mayor que la de Pelodytes punctatus en ese momento (LCC = 15.07 mm), y termina después de la metamorfosis. Figura 29.

En Bufo boreas (Gaudin, 1978), la osificación dura desde el estadio 35 hasta después de la metamorfosis. Su tamaño al fin de la misma es de unos 10 mm (Gaudin, 1978), siendo el renacuajo menor y de desarrollo más rápido de todas las especies reseñadas. Ver figura 30.

En Hyla regilla (Gaudin, 1973), la osificación se inicia en el estadio 31, y al fin de la metamorfosis quedan todavía sin mineralizar cinco huesos. Su tamaño al concluir la metamorfosis oscila entre 10 y 15 mm (Gaudin, 1973). Ver figura 31.

Dado que el proceso de desarrollo es altamente dependiente de la temperatura, para comparar unas especies con otras tendríamos que determinar experimentalmente la temperatura óptima de desarrollo, para seguidamente calcular, a esa temperatura, la duración en días u horas de cada estadio de Gosner. Sólo en esas circunstancias serían comparables realmente los datos de duración. Como por otro lado, hemos comprobado que el proceso de osificación se retrasa de manera significativa en los renacuajos criados en el laboratorio, aún cuando la densidad de renacuajos por litro es baja y la comida abundante y variada (ya señaló Gaudin (1978) esta dificultad en Bufo boreas y Altig (1969b) en el género Rana), estaríamos obligados a utilizar en nuestras comparaciones interespecíficas ejemplares colectados en el campo.

Este segundo problema no es pequeño, pues indefectiblemente, al menos en renacuajos que como Pelobates alcanzan gran tamaño en su vida larvaria, las sales cálcicas disueltas en el agua urbana son insuficientes para que los ejemplares las acumulen en su sistema endolinfático en cantidad equiparable a la que consiguen los renacuajos colectados en el campo. Esto es así debido a que las larvas toman los iones necesarios principalmente a través de las branquias (70%), y el resto a nivel tegumentario (25%) e intestinal (5%); a lo largo del climax metamórfico los aportes cálcicos del exterior disminuyen porque las branquias se reabsorben y, a partir del periodo juvenil, el intestino se convierte en el órgano principal de absorción de calcio (Houdry & Beaumont, 1985).

A falta de datos de la duración del proceso en días, y visto que en ninguna especie termina al fin de la metamorfosis, sino que en ese momento quedan uno o más huesos sin iniciar su osificación, hemos utilizado el tamaño medio en cada estadio como un índice de la duración del desarrollo de cada especie (hemos asumido que a mayor tamaño, el desarrollo es más largo a temperatura óptima de crecimiento). Con los datos de longitud cabeza + cuerpo y con el número de centros que han iniciado su osificación en cada estadio (ver tabla 18) hemos elaborado las trayectorias ontogenéticas de las tres especies de las que conocemos todos esos datos: Pelobates cultripes y Pelodytes punctatus (esta tesis) y Bombina orientalis (Hanken & Hall, 1984). La representación gráfica se muestra en la figura 33. Hemos prescindido de los centros de osificación correspondientes a los dientes y al hioides, pues carecíamos de estos datos en B. orientalis.

Como puede verse en la figura, la trayectoria de Pelobates durante el desarrollo larvario es la más larga de las tres; al fin de la metamorfosis posee 18 centros de 19, mientras que Bombina posee 15 de 17 y Pelodytes 14 de 17.

La mayor longitud de la trayectoria de Pelobates en la fase acuática de su vida, se debe a que son seis los centros que osifican en el periodo prometamórfico, frente a tres en Bombina y cuatro en Pelodytes, y a que el tamaño que alcanza la larva es mucho mayor que en las otras dos especies. Como contraste, su trayectoria postmetamórfica finaliza muy pronto, en la

segunda semana (LCC = 28.57 mm), antes de alcanzar las dimensiones máximas de LCC del periodo larvario; no podemos decir lo mismo de Pelodytes, que a ese mismo tamaño postmetamórfico ha conseguido iniciar la osificación en dos huesos más, pero la columella (centro número 17) sólo la hemos encontrado en individuos de más de un año, ya maduros sexualmente (tamaño mínimo de LCC = 23.5 mm). No tenemos datos de cuando y a que longitud cabeza + cuerpo osifican los dos últimos huesos de Bombina orientalis, aunque sabemos que ambos están presentes en todos los ejemplares adultos.

Aparentemente, la evolución del cráneo en las especies estudiadas hasta el momento ha implicado cambios en la secuencia de aparición de los diferentes huesos, en la duración de los procesos de osificación y en el número de huesos y centros de osificación que llegan a aparecer.

En cuanto a los huesos que están variablemente presentes según las especies: columella, palatino, cuadradoyugal, interfrontal, vómer y parahioides, todos ellos aparecen normalmente hacia el fin de la metamorfosis ó después de la misma, y su ausencia puede ser el resultado de cambios heterocrónicos en el programa ontogenético.

No podemos decir lo mismo de la variación en el número de centros de osificación, ya que su número difiere sobre todo en los huesos dermales que comienzan a osificar durante la prometamorfosis, como los frontoparietales; la metamorfosis, como los escamosos, o hacia el fin de la metamorfosis, como los pterigoideos y vómeres. Todos estos huesos tienen en común que su forma es muy variable de unas especies a otras; además, excepto el vómer, los otros tres están presentes siempre en todas las especies. Sobre todo, la existencia de distinto número de centros de osificación en frontales y escamosos se explica difícilmente por la actuación de procesos heterocrónicos, ya que surgen en las primeras etapas del desarrollo o de la metamorfosis, y parece plausible atribuirles cierta importancia filogenética.

Nuestros resultados sugieren que cuanto más cerca está filogenéticamente una especie de otra, más parecidas son sus secuencias de osificación; según se desprende de la similitud entre las secuencias de los dos Pelobates estudiados y entre ambas y la de Pelodytes.

Tabla 18.- Longitud media en cada estadio de Gosner (1960) y número de centros de osificación presentes en el cráneo de Pelodytes punctatus (esta tesis), Bombina orientalis (Hanken & Hall, 1984) y Pelobates cultripes (esta tesis). Prescindimos de los centros de osificación de los dientes de premaxilares, maxilares y vómeres y de los del aparato hioideo, porque carecemos de esos datos en B. orientalis.

Tabla 18.-

Estadios Gosner	<u>Pelodytes punctatus</u>		<u>Bombina orientalis</u>		<u>Pelobates cultripes</u>	
	Lcc (mm)	nº centros	Lcc (mm)	nº centros	Lcc (mm)	nº centros
33	11.94	0			21.39	0
34	12.43	1			23.86	1
36	14.47	2	17.20	0	27.83	2
37	15.06	3	18.10	2	29.12	3
38	16.14	4	17.80	3	28.94	4
40					28.85	6
41			17.05	4		
42					23.94	8
43	15.20	6	15.90	7	23.19	10
44	13.63	8	15.50	8	23.11	14
45	14.16	11	15.60	11	25.78	18
46	13.77	14	16.80	15		
1ª sea.	16.30	16	---	?	28.57	19
tamaño mín.adulto	23.50	17	---	17	57.00	19
tamaño máx.adulto	45.00	17	---	17	101.00	19

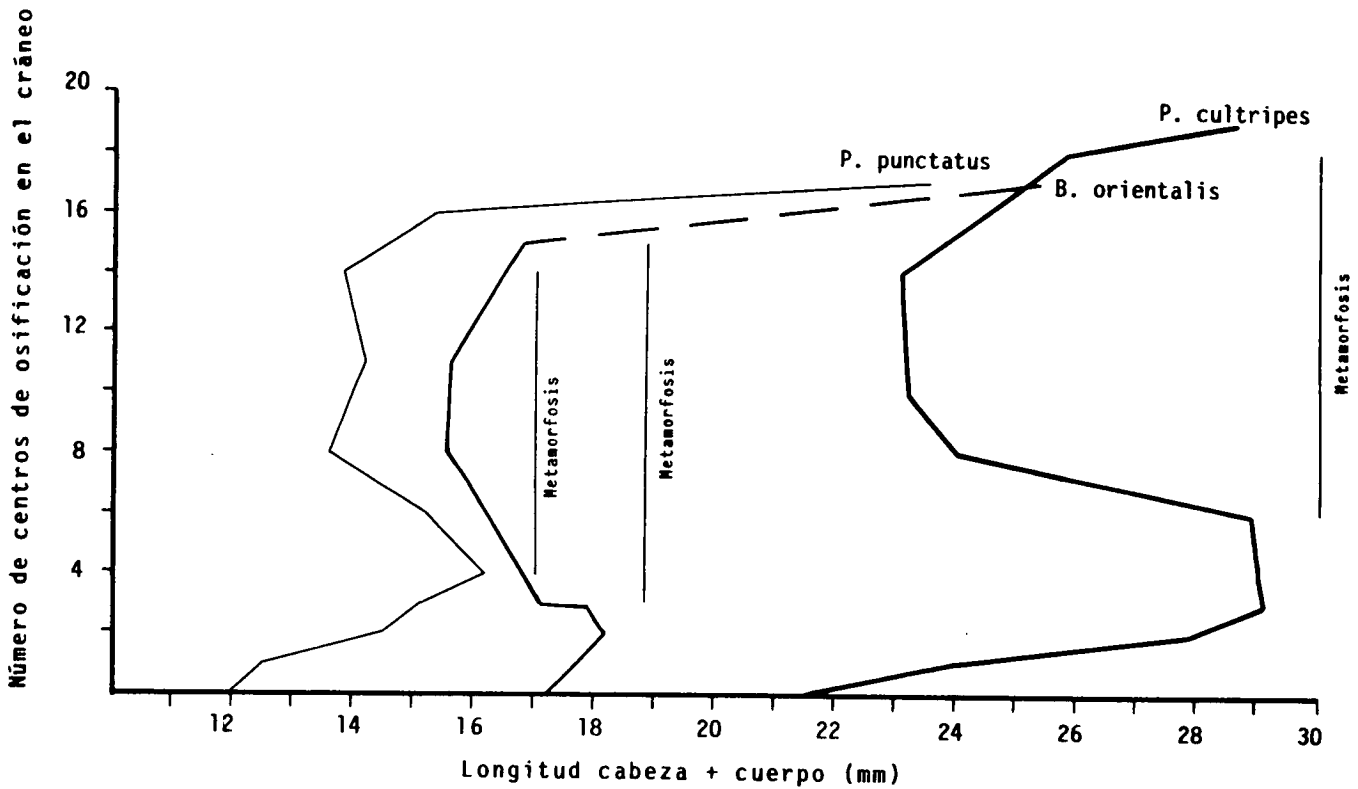


Figura 33.- Trayectorias ontogénicas de Pelodytes punctatus (trazo fino), Bombina orientalis (trazo medio) y Pelobates cultripes (trazo grueso). No se han considerado los centros de osificación correspondientes a los dientes de premaxilares, maxilares y vómeres, ni los del aparato hioideo. Se dividen las trayectorias en tres tramos: prometamórfico, metamórfico y postmetamórfico.

### 3.2.2. COLUMNA VERTEBRAL

#### 3.2.2.1. Descripción de la columna adulta de Pelobates cultripes

La columna vertebral de Pelobates cultripes está constituida por nueve vértebras y el urostilo. Sus caracteres típicos, extraídos de la diagnosis de la familia Pelobatidae (Lynch, 1973) ligeramente modificada, son: 1) ocho vértebras presacras. 2) Atlas no fusionado con la segunda vértebra. 3) Sacro no fusionado con el urostilo\*. 4) Centra vertebrales procélicos; cóndilos libres en subadultos\*. 5) Diapófisis sacras ampliamente dilatadas. 6) Ausencia de procesos transversos en el urostilo. 7) Procesos transversos de las vértebras presacras anteriores (2ª, 3ª y 4ª) alargados. 8) Apófisis transversas de las vértebras presacras posteriores (5ª, 6ª, 7ª y 8ª) cortas. 9) Articulación sacro-coccígea monocondilar. 10) Arcos neurales imbricados. Los dos caracteres señalados con asterisco son los que se han modificado. En la figura 34 se representa una columna con las vértebras desarticuladas en normas dorsal y ventral.

#### 3.2.2.2. Desarrollo de la columna vertebral de Pelobates cultripes

Después de un cuidadoso examen de 174 renacuajos de los estadios 26 a 46 de la tabla de Gosner, podemos afirmar que el desarrollo de los centra vertebrales es de tipo epicordal. Este modelo implica la condricificación y osificación únicamente de la zona dorsal de la vaina fibrosa que rodea la notocorda (Mookerjee, 1931 y 1936).

Desde el punto de vista ontogenético, el atlas y las vértebras 2ª, 3ª, 4ª y sacra (9ª) de Pelobates están constituidas por tres piezas que surgen a partir de seis centros de osificación distintos: un par corresponde al arco neural, un par al centrum y un par al cóndilo. Los procesos transversos de las vértebras 2ª, 3ª, 4ª y sacra se diferencian a partir de su arco neural.

Las vértebras 5ª, 6ª, 7ª y 8ª están constituidas por cuatro partes que

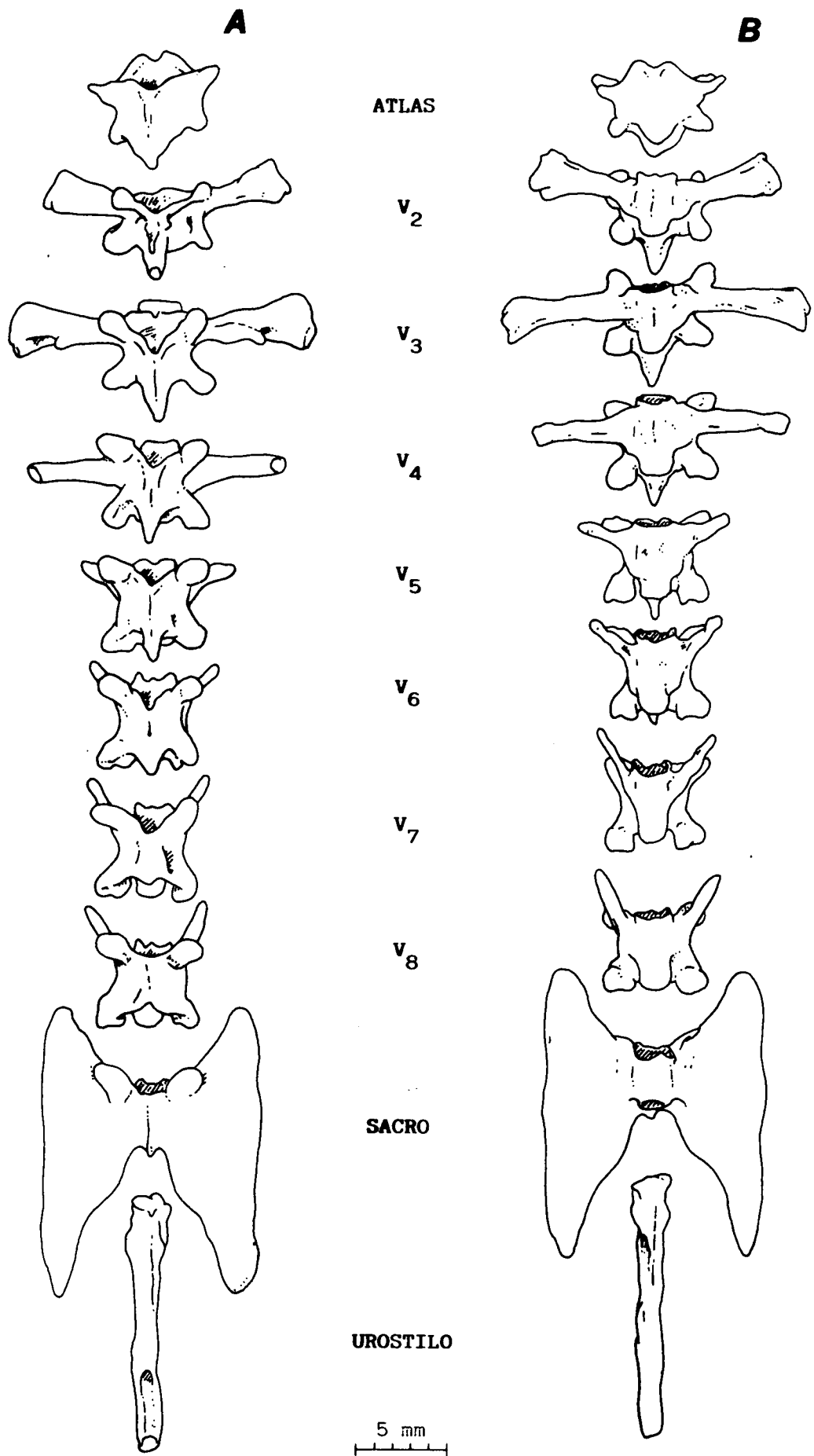


Figura 34.- Columna vertebral de Pelobates cultripes. A, norma dorsal; B, norma ventral.

surgen a partir de ocho centros de osificación: dos del arco neural, dos del centrum, dos del cóndilo y dos de las apófisis transversas.

El urostilo surge a partir de nueve centros: seis de los arcos neurales 10º, 11º y 12º (ver lámina VI A); dos del centrum de la vértebra 10ª, y uno medial -el hipocordio-, situado debajo de la notocorda, alargado y contrapuesto a todos los anteriores.

Cargados de sales cálcicas, los sacos paravertebrales del sistema endolinfático alcanzan su máximo desarrollo en el estadio 41, en el cual penetran hasta el urostilo a ambos lados del cordón nervioso central.

En la figura 35 se señalan, en norma ventral, las partes de la 2ª vértebra. En el estadio 43 (fig. 35 A) las zonas de distinta procedencia ontogenética todavía están separadas; al fin de la metamorfosis se fusiona el centrum con el arco neural. Durante el primer año (fig. 35 C) se une el cóndilo con el centrum, y finalmente, en el adulto (fig. 35 D), desaparece cualquier sutura que pudiera revelar el origen individualizado de las distintas partes.

### **3.2.2.3. Secuencia de osificación de la columna vertebral de Pelobates cultripes**

En cada vértebra, primero aparece el par de centros de osificación que origina el arco neural. Varios días después -cinco a temperatura óptima- osifican los dos centros cuya fusión dará lugar al centrum vertebral. Dos semanas más tarde, hacia la mitad del período metamórfico mineraliza el par de centros que producirá el cóndilo (ver lámina V D). Finalmente, y sólo en las vértebras 5ª, 6ª, 7ª y 8ª, se distinguen un par de centros, uno a cada lado de la vértebra, que rápidamente se fusionan con el arco neural y que pertenecen a las apófisis transversas (ver lámina V B).

Tanto el comienzo de la osificación de los arcos neurales, como el de los centra e hipocordio sigue una secuencia de aparición cefalo-caudal. En cambio, los cóndilos aparecen primero en las vértebras centrales (5ª y 6ª) y

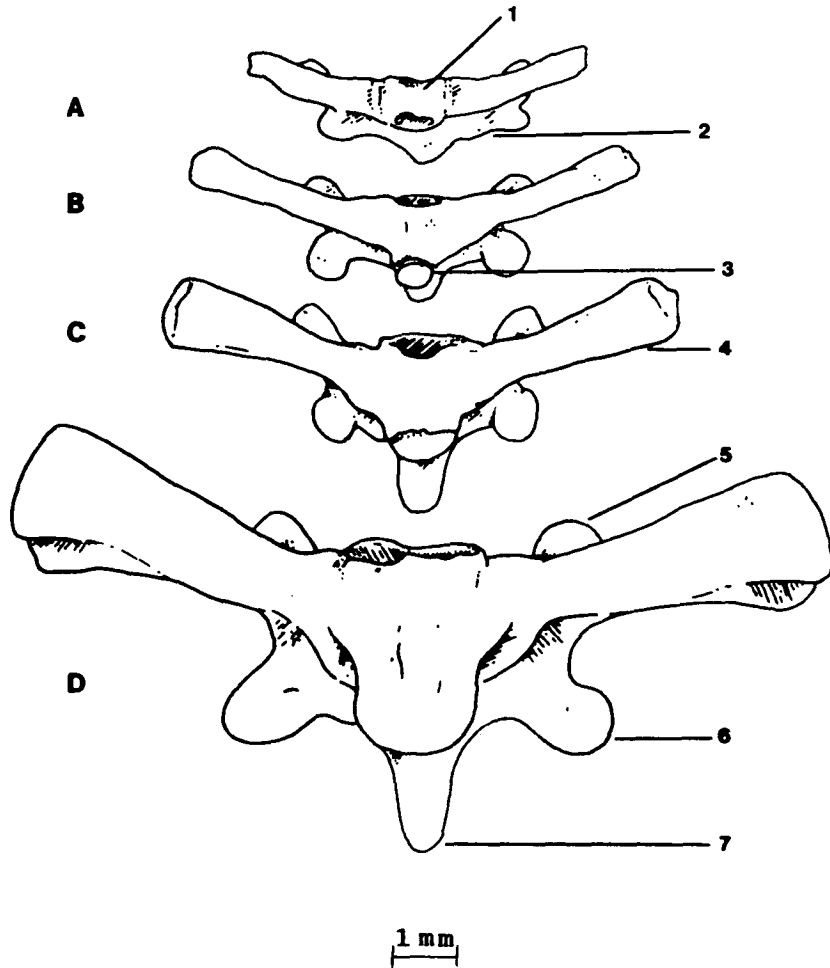


Figura 35.- Pelobates cultripes. En norma ventral, denominación de las partes de la 2ª vértebra, y ontogenia de la fusión del centrum con el arco neural (A y B) y del cóndilo con el centrum (B, C y D). A, renacuajo de estadio 43; B, postmetamórfico de un año; C, postmetamórfico de un año y tres meses; D, adulto de cinco años. 1, centrum; 2, arco neural; 3, cóndilo; 4, apófisis transversa; 5, prezigapófisis; 6, postzigapófisis, y 7, neurapófisis.

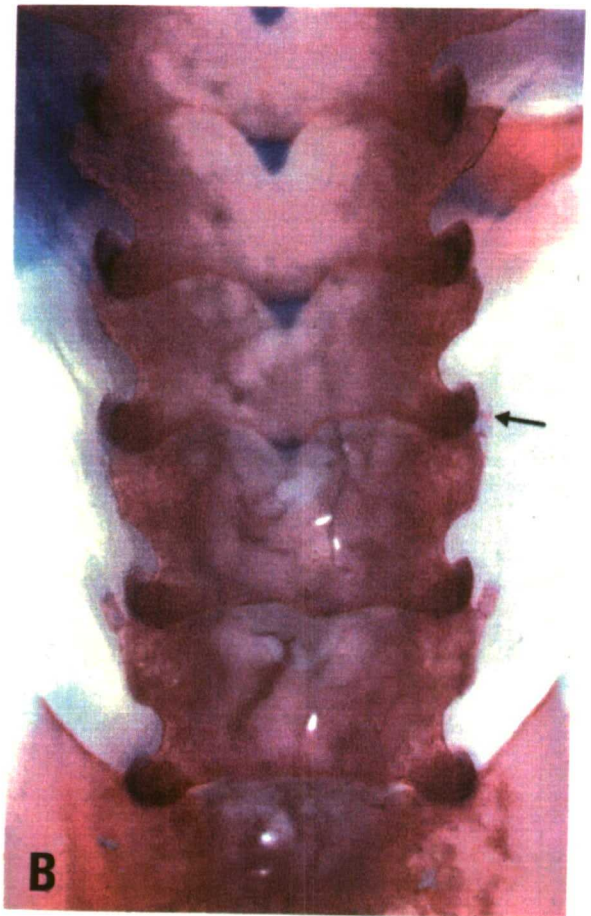
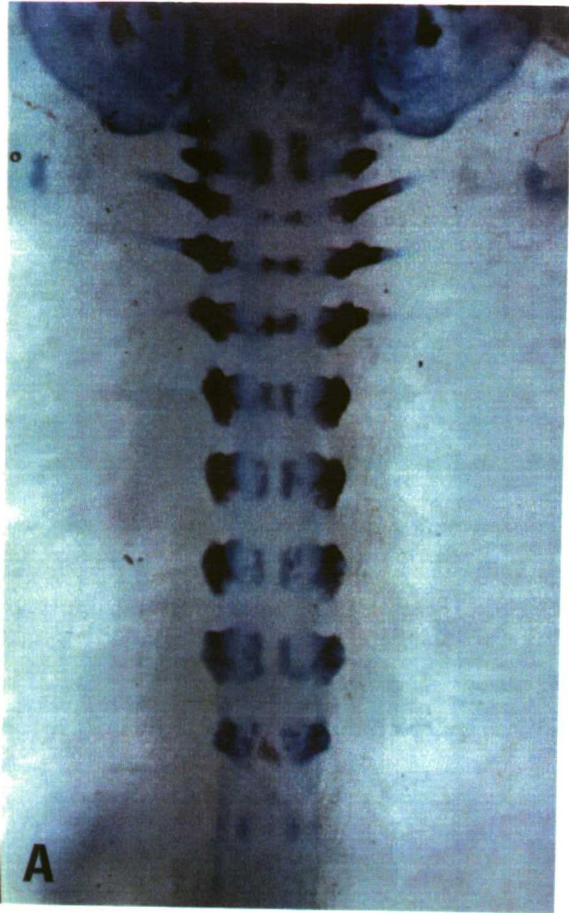
Lámina V.- Osificación de la columna vertebral. En azul, el cartílago; en rojo, el hueso.

A, Pelodytes punctatus; estadio 36 (Gosner, 1960) en norma dorsal. Se aprecian claramente los pares de centros de osificación que constituirán cada centrum, y los pares que darán lugar a los arcos neurales.

B, Pelobates cultripes; estadio 45 (Gosner, 1960) en norma dorsal. La flecha señala el centro de osificación que originará la apófisis transversa derecha de la séptima vértebra.

C, Pelodytes punctatus; estadio 46 (Gosner, 1960) en norma ventral. Los centra se muestran combados anteroposteriormente desde el estadio 43, produciendo vértebras procélicas ya antes del fin de la metamorfosis. Se observa el esbozo de articulación bicondilar entre el sacro y el urostilo.

D, Pelobates cultripes; estadio 45 (Gosner, 1960) en norma ventral. Los cóndilos osifican independientemente de los centra y a partir de dos centros de osificación (según señala la flecha); al fin de la metamorfosis los sapitos poseen vértebras anficélicas y cóndilos libres entre ellas.



luego siguen en su mineralización dos direcciones simultáneamente: cefálica por un lado y caudal por otro. La osificación de los procesos transversos sigue una secuencia caudo-cefálica, apareciendo primero los de la 8ª y 7ª vértebras y por último los de la 5ª y 6ª.

El estadio de Gosner y la edad -a 28°C- en que se inicia la osificación de cada uno de los 36 elementos de la columna vertebral de Pelobates cultripes se detalla en la tabla 19. Hemos considerado estadio de inicio el primero a partir del cual al menos el 50% de los ejemplares estudiados presentaba osificación. Estos porcentajes se desglosan en la tabla 20.

Los 35 elementos pares y uno impar se fusionan a lo largo del desarrollo larvario y postmetamórfico produciendo una columna de 10 elementos libres. La fusión de los pares que constituyen cada centra sucede poco después de su aparición, siguiendo una secuencia cefalo-caudal desde la 2ª vértebra hasta la 10ª, retrasándose la fusión de los dos elementos del centrum del atlas hasta después de que se hayan fusionado los de la 8ª vértebra. El cierre dorsal de las dos piezas simétricas que forman cada arco neural comienza en la 8ª vértebra en el estadio 40 y continua en ambas direcciones: cefálica y caudal, a un ritmo variable de unos individuos a otros; al comienzo del climax metamórfico -estadio 42- sólo el arco neural del atlas y el de las vértebras 11ª y 12ª del urostilo continúan abiertos dorsalmente (ver lámina VI A). La fusión de los dos centros que constituyen cada cóndilo se produce poco después de su aparición y en la misma secuencia (ver lámina V D). La fusión de los arcos neurales con sus correspondientes centra se inicia en el estadio 42; la de las vértebras 10ª, 11ª y 12ª con el hipocordio se produce en el estadio 46 e indica el fin de los cambios metamórficos en la columna vertebral. La fusión de las apófisis transversas de las vértebras 8ª, 7ª, 6ª y 5ª con sus arcos neurales correspondientes tiene lugar en la primera semana después de la metamorfosis. Finalmente, la fusión de cada cóndilo con su vértebra se produce entre el primer y el segundo año (ver figura 35). En la tabla 21 se presenta una relación de la edad y el estadio de desarrollo a que se producen todos estos acontecimientos, y en la tabla 22 los porcentajes detallados de cada suceso en la muestra examinada.

Es importante destacar que no se han detectado excepciones en la

Tabla 19.- Secuencia de osificación de la columna vertebral de Pelobates cultripes, estadio de desarrollo (Gosner, 1960) y edad -a 28º C- a que se produce cada acontecimiento.

Estadios de Gosner	Edad (días)	Arcos neurales	Centra	Cóndilos	Procesos transversos
36	13.75-16.75	Atlas, V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , V <sub>4</sub> ,			
37	16.75-21.25	V <sub>5</sub> , V <sub>6</sub> , V <sub>7</sub> , V <sub>8</sub> , Sacro	Atlas, V <sub>2</sub> , V <sub>3</sub> , V <sub>4</sub> , V <sub>5</sub>		
38	21.25-23.87	V <sub>10</sub>	V <sub>6</sub> , V <sub>7</sub> , V <sub>8</sub> , Sacro		
39	23.87-24.75		Hipocordio		
40	24.75-25.75	V <sub>11</sub>	V <sub>10</sub>		
41	25.75-27.75				
42	27.75-29.00				
43	29.00-31.00			V <sub>5</sub> , V <sub>6</sub> , V <sub>4</sub> , V <sub>7</sub>	
44	31.00-32.33			V <sub>3</sub> , V <sub>8</sub> , V <sub>2</sub>	
45	32.33-33.33	V <sub>12</sub>		Atlas	V <sub>8</sub> , V <sub>7</sub>
46	33.33				V <sub>5</sub> , V <sub>6</sub>
1ª semana	33.33-40.33			Sacro	

Tabla 20.- Pelobates cultripes. Para cada estadio de Gosner y para cada centro de osificación, porcentaje de los individuos estudiados en que la osificación ha comenzado.

ESTADIO GOSNER	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	1ª s.		
Nº indiv. estudiados	1	1	1	1	10	10	10	10	10	10	10	8	8	10	9	7	8	10	10	10	10	10		
-----																								
ATLAS																								
Arco Neural							10	20	10	10	50	100												
Centrum												75	100											
Cóndilo																		20	70	100				
2ª VERTEBRA																								
Arco Neural							10	20	0	10	50	100												
Centrum												75	100											
Cóndilo																		40	80	90	100			
3ª VERTEBRA																								
Arco Neural								20	0	10	50	100												
Centrum												75	100											
Cóndilo																		12	40	100				
4ª VERTEBRA																								
Arco Neural											50	87	100											
Centrum												62	100											
Cóndilo																		25	60	100				
5ª VERTEBRA																								
Arco Neural											40	87	100											
Centrum												50	100											
Cóndilo																		12	60	100				
Apófisis transversas																					30	60	100	
6ª VERTEBRA																								
Arco Neural											40	87	100											
Centrum												37	100											
Cóndilo																		25	60	100				
Apófisis transversas																					10	50	100	
7ª VERTEBRA																								
Arco Neural											30	87	100											
Centrum												25	100											
Cóndilo																		60	100					
Apófisis transversas																					50	70	100	
8ª VERTEBRA																								
Arco Neural											20	75	100											
Centrum												25	100											
Cóndilo																		40	100					
Apófisis transversas																					10	60	80	100
SACRO																								
Arco Neural												50	100											
Centrum												12	62	100										
Cóndilo																		10	10	0	30	80		
UROSTILO																								
Arco Neural V													37	80	100									
Hipocordio													12	100										
Centrum V																		40	67	100				
Arco Neural V																		40	56	100				
Arco Neural V																		11	0	25	10	30	50	

Tabla 21.- Fusiones de centros de osificación en el desarrollo de la columna vertebral de Pelobates cultripes y estadio de Gosner (1960) a que se produce cada acontecimiento.

Estadios de Gosner	Cierre dorsal de los arcos neurales	Fusión del par de centros de osificación que constituye cada centrum	Fusión del par que constituye cada cóndilo	Otras fusiones
37		$V_2, V_3, V_4$		
38		$V_5, V_6, V_7, V_8$ , Atlas, Sacro		
39				
40	$V_8, V_7$ , Sacro			
41				
42	$V_5, V_4, V_3, V_2, V_{10}$	$V_{10}$		Centra + Arcos neurales
43			$V_5, V_6, V_4$	
44	Atlas		$V_7, V_3, V_8, V_2$	
45				
46				$V_{10} + V_{11} + V_{12} +$ Hipocordio
1ª sem.	$V_{11}$		Atlas, Sacro	Apófisis transversas + Vértebras
1er año				Cóndilos + Vértebras

Tabla 22.- Pelobates cultripes. Para cada estadio de Gosner, porcentaje de individuos que presentan las fusiones de pares de centros de osificación indicadas.

ESTADIO GOSNER	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	1ª s.
Nº de indiv. estudiados	10	10	10	8	8	10	9	7	8	10	10	10	10	10
<b>ATLAS</b>														
Inicio cierre dorsal arco neural									12	30	60	80	100	
Fusión del par del centrum				25	87	90	100							
Fusión del par del cóndilo													20	100
<b>2ª VERTEBRA</b>														
Arco Neural comienza a cerrarse dorsalmente							11	0	50	100	90	100		
Par del centrum fusionado				62	100									
Par del cóndilo fusionado									40	60	50	70	100	
<b>3ª VERTEBRA</b>														
Arco Neural comienza a cerrarse dorsalmente							22	43	62	100				
Par del centrum fusionado				62	100									
Par del cóndilo fusionado									12	40	100			
<b>4ª VERTEBRA</b>														
Arco Neural comienza a cerrarse dorsalmente							22	43	87	100				
Par del centrum fusionado				50	100									
Par del cóndilo fusionado								25	60	100				
<b>5ª VERTEBRA</b>														
Arco Neural comienza a cerrarse dorsalmente							44	29	87	100				
Par del centrum fusionado				37	100									
Par del cóndilo fusionado									12	60	100			
<b>6ª VERTEBRA</b>														
Arco Neural comienza a cerrarse dorsalmente							44	57	87	100				
Par del centrum fusionado				37	100									
Par del cóndilo fusionado									25	60	100			
<b>7ª VERTEBRA</b>														
Arco Neural comienza a cerrarse dorsalmente							56	57	87	100				
Par del centrum fusionado				25	100									
Par del cóndilo fusionado										40	100			
<b>8ª VERTEBRA</b>														
Arco Neural comienza a cerrarse dorsalmente							56	57	87	100				
Par del centrum fusionado				25	100									
Par del cóndilo fusionado										40	100	100	90	100
<b>SACRO</b>														
Arco Neural comienza a cerrarse dorsalmente							56	43	87	100				
Par del centrum fusionado				62	100									
Par del cóndilo fusionado										10	10	0	20	50
<b>UROSTILO</b>														
Arco Neural V comienza a fusionarse dorsalmente							29	50	70	70	40	70	100	
Par del centrum V fusionado							30	33	29	100	90	100		
Arcos Neurales V ,V y V fusionados											30	40	60	100
Arcos Neurales V ,V y V fusionados al hipocordio													60	100

secuencia de osificación expuesta.

La duración del proceso de inicio de la osificación en P. cultripes, desde la aparición del primer centro (a los 13,75 días) hasta la aparición del último (a los 40,33 días) es de 24,58 días a temperatura óptima de crecimiento. Al concluir la metamorfosis (a los 33,33 días), en la columna vertebral sólo queda un centro sin iniciar la fase de mineralización.

El proceso de fusiones se inicia a los 16,75 días y se prolonga hasta el final del primer año de actividad terrestre.

#### **3.2.2.4. Malformaciones de la columna vertebral de Pelobates cultripes**

De las 64 columnas vertebrales de Pelobates cultripes juveniles y adultos examinadas, 19 (29.69%) presentaban una o más anomalías. Hemos comprobado que algunas malformaciones de los procesos transversos y las variaciones en el número de vértebras se detectan en los renacuajos a partir del estadio 38. Por consiguiente, hemos incrementado nuestra muestra con 82 larvas colectadas en el campo entre los estadios 38 y 46, siete de las cuales (8.54%) presentaban algún tipo de malformación.

Dentro de los 10 caracteres diagnósticos de la especie, se han detectado anomalías en los siguientes:

1) **Variación en el número de vértebras presacras.** Se han encontrado divergencias en ambas direcciones: el número de vértebras se incrementa a nueve (1.22% en renacuajos) porque el sacro se desplaza a la vértebra 10ª (ver lámina VI B), o decrece a siete (2.44% en renacuajos y 12.5% en juveniles y adultos) porque el atlas se fusiona con la 2ª vértebra (en siete adultos) o porque la 8ª vértebra desarrolla diapófisis sacras asimétricas (en dos renacuajos y un adulto. Lámina VI C).

2) **Atlas fusionado con la segunda vértebra.** Se presenta en el 10.94% de los adultos. Esta anomalía no puede detectarse en renacuajos porque la fusión de los cóndilos con su centrum tiene lugar durante el primer año de vida

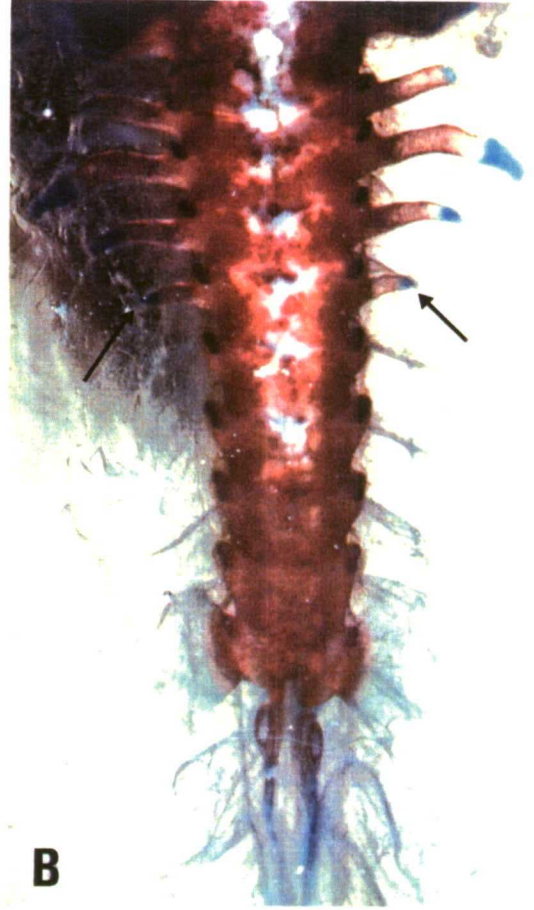
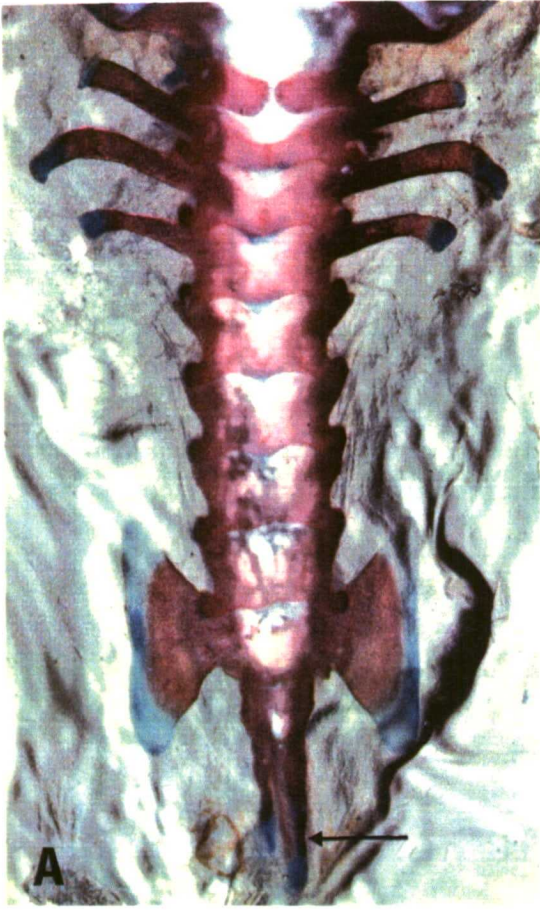
Lámina VI.- Malformaciones de la columna vertebral de renacuajos de Pelobates cultripes. En azul, el cartílago; en rojo, el hueso.

A, columna vertebral normal en norma dorsal (estadio 45); la flecha señala el arco neural de la duodécima vértebra. En blanco, el carbonato cálcico almacenado en los sacos paravertebrales del sistema endolinfático.

B, nueve vértebras presacras y procesos transversos anormales en  $V_8$  (estadio 42).

C, siete vértebras presacras y sacro asimétrico afectando a  $V_8$  y  $V_9$  (estadio 43).

D, sacro asimétrico afectando a  $V_9$  y  $V_{10}$ , y procesos transversos anormales y asimétricos en  $V_8$  (estadio 44).



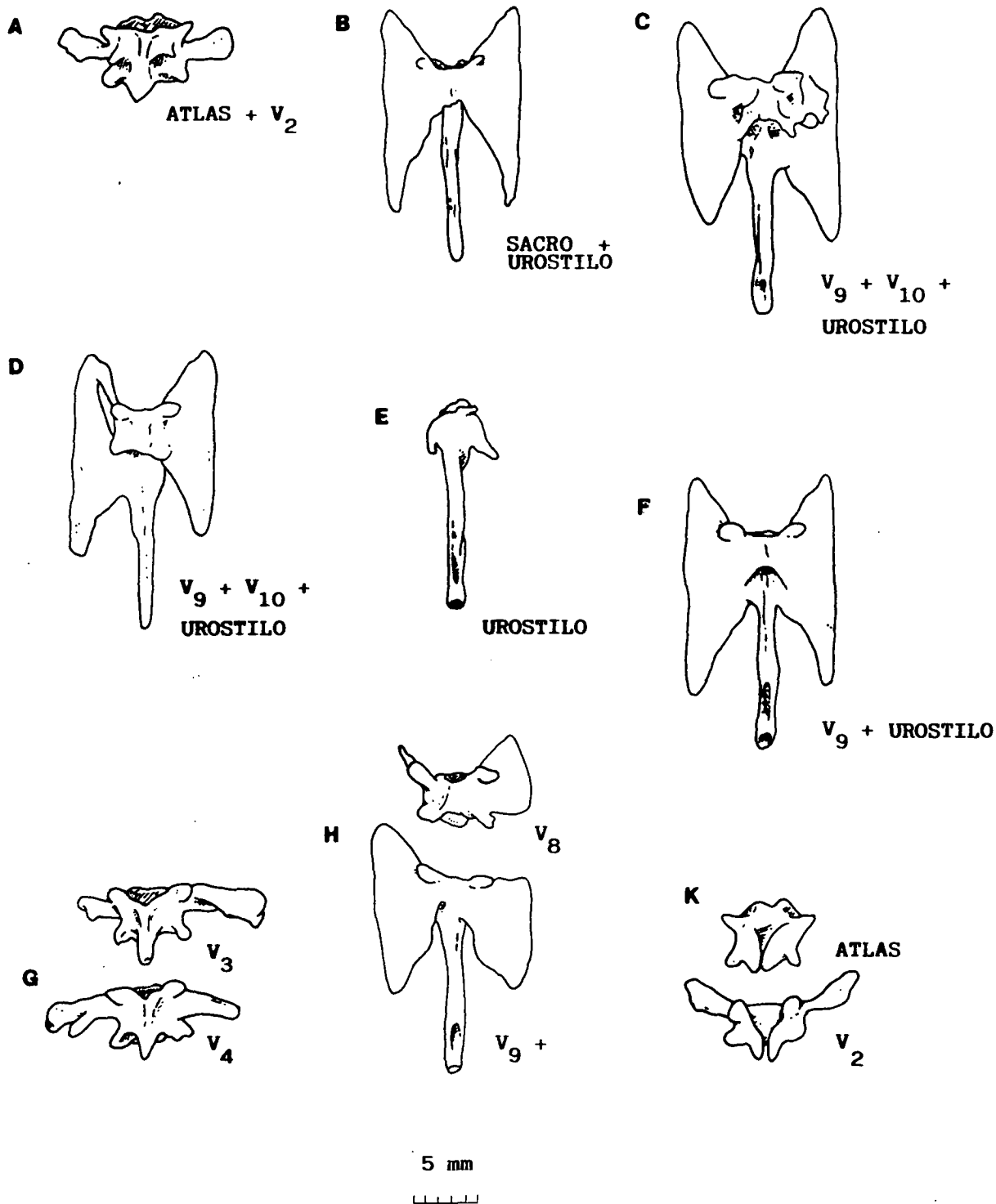


Figura 36.- Pelobates cultripes. En norma dorsal, tipos de malformaciones de la columna vertebral detectadas en adultos. A, fusión del atlas y la 2ª vértebra. B, fusión del sacro y el urostilo. C y D, anomalías de las diapófisis sacras. E y F, presencia de procesos transversos en el urostilo. G, procesos transversos anormales en las vértebras presacras anteriores. H, procesos transversos anormales en las vértebras presacras posteriores. K, arcos neurales abiertos dorsalmente.

terrestre. Fig. 36 A.

3) **Sacro fusionado con el urostilo.** Su porcentaje en la población adulta es muy alto: 17.19%. No puede detectarse en renacuajos por la misma razón que en el caso anterior. Ver fig. 36 B, C, D, F y H.

4) **Centra vertebrales anficélicos.** Es la condición normal en renacuajos metamórficos (100%) y en juveniles (99.67%). Todos los adultos poseen centra de tipo procélico (ver fig. 35 A-D).

5) **Anomalías en las diapófisis sacras.** Se detecta en el 7.32% de los renacuajos y en el 7.81% de los juveniles y adultos. Es un fenómeno caracterizado por gran diversidad; en todos los casos el sacro es asimétrico y lo constituyen, total o parcialmente, dos vértebras: pueden ser la 8ª y 9ª (observado en dos renacuajos y un adulto. Lámina VI C y fig. 36 H), o la 9ª y la 10ª (en 4 renacuajos y 4 adultos. Lámina VI D y fig. 36 C y D). Los adultos con cualquier tipo de malformación que afecte a la simetría del sacro presentan, además, el urostilo fusionado con él.

6) **Presencia de procesos transversos en el urostilo.** Afecta al 4.69% de la población postmetamórfica (fig. 36 E). En un ejemplar el urostilo anormal estaba fusionado con el sacro (fig. 36 F). La anomalía no puede detectarse en renacuajos porque un urostilo, en sentido estricto, no existe hasta el estadio 46 en que los arcos neurales 10ª, 11ª y 12ª se fusionan con el hipocordio (ver tablas 21 y 22); a esto hay que añadir que la osificación de las apófisis transversas de las vértebras postsacras, si las hubiera, tendría que iniciarse en la primera semana postmetamórfica, al mismo tiempo que la de las vértebras presacras posteriores.

7) **Procesos transversos anormales en las vértebras presacras anteriores.** Se han encontrado en el 2.44% de los renacuajos y el 3.12% de los postmetamórficos. Se ha observado un grado de asimetría importante en un renacuajo (asociado a una asimetría del sacro. Lámina VI D) y en dos adultos (en uno de ellos afectaba a las vértebras 3ª y 4ª y el sacro también era asimétrico. Ver figura 36 G). En el otro renacuajo, la 5ª vértebra había desarrollado procesos transversos alargados y simétricos, semejantes a los de

la 4ª, asociado con el desplazamiento del sacro a la 10ª vértebra (lámina VI B).

8) **Procesos transversos anormales en las vértebras presacras posteriores.** Se han detectado diapófisis sacras asimétricas en la 8ª vértebra en dos renacuajos (2.44%) y un adulto (1.56%); en todos los casos se consideró que esta vértebra formaba parte del sacro. Ver lámina VI C y fig. 36 H.

9) **Articulación sacro-coccígea bicondilar.** No se ha detectado en adultos, y en ningún caso podría detectarse en renacuajos. No puede descartarse su aparición pues el cóndilo de articulación se forma por la fusión de dos centros de osificación; si esta fusión no se produjera, tendríamos una articulación bicondilar. A pesar de que se detecta claramente un cóndilo libre entre sacro y urostilo en la primera semana postmetamórfica (ver tablas 19-22), esta pieza no alcanza un tamaño semejante al de los cóndilos de las vértebras presacras; en los adultos la superficie de articulación del centrum del sacro aparece ligeramente cóncava -en vez de convexa- y sólo en la zona dorsal presenta una minúscula protuberancia que corresponde al cóndilo sin desarrollar.

10) **Arcos neurales abiertos dorsalmente.** Se ha detectado un adulto (1.56%) con los arcos neurales del atlas y de la 2ª vértebra sin cerrar dorsalmente (fig. 36 K). La anomalía no puede observarse en renacuajos, pues el cierre dorsal de los arcos neurales de las vértebras anteriores tiene lugar hacia el final de la metamorfosis, en el estadio 44 (ver tabla 21).

De los individuos con malformaciones, tal como las hemos descrito, tres renacuajos (42.86%) y seis adultos (31.58%) presentaban una; dos renacuajos (28.57%) y nueve adultos (47.37%) presentaban dos; otros dos renacuajos (28.57%) y tres adultos (15.79%) presentaban tres, y finalmente, un adulto (5.26%) presentaba cinco.

En resumen, el 30% de los juveniles y adultos presenta algún tipo de anomalía en su columna vertebral. Las más comunes son las fusiones de elementos en los segmentos anteriores (atlas con 2ª vértebra) y/o posteriores (sacro con urostilo) de la columna.

Tabla 23.- Tipos de anomalías de la columna vertebral y frecuencia de las mismas en los dos ciclos vitales de Pelobates cultripes.

	Renacuajos (n= 82)	Juveniles y adultos (n= 64)
	-----	-----
	a) 9 vért. presacras.....	1 (1.22%) ..... 0 (0%)
1) Variación en el nº de vértebras presacras .....	b) atlas + V <sub>2</sub> ..... no se detecta.....	7 (10.94%)
	7 vért.presacras	c) sacro asim. en V <sub>8</sub> 2 (2.44%) ..... 1 (1.56%)
2) Atlas + V <sub>2</sub> .....	no se detecta.....	7 (10.94%)
3) Sacro fusionado con urostilo .....	no se detecta.....	11 (17.19%)
4) Anomalías en las diapófisis sacras .....	a) 8ª y 9ª vért..... 2 (2.44%) ..... 1 (1.56%)	b) 9ª y 10ª vért..... 4 (4.88%) ..... 4 (6.25%)
5) Presencia de procesos transversos en urostilo .....	no se detecta.....	3 (4.69%)
6) Procesos transversos anormales en las vért. presacras anteriores .....	2 (2.44%) ..... 2 (3.12%)	
7) Procesos transversos anormales en las vért. presacras posteriores .....	2 (2.44%) ..... 1 (1.56%)	
8) Articulación sacro-coccígea bicondilar .....	no se detecta.....	0 (0%)
9) Arcos neurales abiertos dorsalmente (Atlas y 2ª vért.) .....	no se detecta.....	1 (1.56%)

En la muestra estudiada sólo las vértebras 6ª y 7ª no han registrado irregularidades.

Las malformaciones de tipo 1a, 1c, 5, 7 y 8 de la tabla 23 se detectan tanto en renacuajos como en adultos. Según se muestra en dicha tabla, los porcentajes en ambos ciclos vitales de P. cultripes son similares. Por tanto, podemos deducir que las anomalías de los procesos transversos de las vértebras, sean presacras o sean asimetrías de las diapófisis sacras, no parecen afectar a la viabilidad de los individuos.

### 3.2.2.5. Comparación con Pelodytes punctatus y las restantes especies de Anuros

Vamos a realizar el análisis deteniéndonos en los cinco puntos que nos parecen más importantes:

- Número de elementos de la columna.
- Número de centros de osificación.
- Secuencia de osificación.
- Duración del proceso de inicio de la osificación.
- Porcentaje de malformaciones en las poblaciones.

En Pelobates cultripes la columna vertebral está constituida por diez elementos: nueve vértebras (ocho presacras y una sacra) y el urostilo. Este patrón es el más común en los anuros. Sobre este patrón adulto, las variaciones más importantes en cuanto al número de elementos son:

- La posesión de diez vértebras (nueve de ellas presacras), circunstancia que se da en las dos familias consideradas más primitivas: Ascaphidae y Leiopelmatidae (Griffiths, 1963; Cannatella, 1985). No podemos dejar de señalar que, como anomalía, se han detectado nueve vértebras presacras completas en dos de las familias más antiguas: Pelobatidae (1.22% de los renacuajos de P. cultripes estudiados para la elaboración de esta tesis y un adulto de Spea intermontanus reseñado por Kluge en 1966) y Discoglossidae (0.41% de los 813 ejemplares de Bombina variegata examinados por Madej, 1965). Las restantes

familias de anuros presentan ocho vértebras presacras o menos (Kluge & Farris, 1969; Lynch, 1973; Cannatella, 1985) y hasta la fecha no se ha detectado en ninguna especie ni un solo ejemplar con el número de vértebras presacras incrementado a nueve.

- La posesión de menos de nueve vértebras implica casi siempre alguna anomalía, normalmente la fusión del atlas con la segunda vértebra (10.94% en la población postmetamórfica de P. cultripes) o de la octava con el sacro (ver tabla 23). Pípidos, Bufónidos y la extinguida familia Palaeobatrachidae, sin embargo, se salen de la norma, y este tipo de fusiones se ha fijado evolutivamente en los géneros Hymenochirus y Pipa de la primera familia (Cannatella, 1985), y Oreophrynella, entre otros, en la segunda (Kluge & Farris, 1969; Lynch, 1973). Sólo se conoce una verdadera reducción a siete vértebras presacras por adelantamiento del sacro en cuatro géneros de Bufónidos: Laurentophryne, Mertensophryne, Nectophryne y Pelophryne (Tihen, 1960b y 1965) y en los extinguidos Paleobatrácidos (Spinár, 1972).

- La fusión del sacro y el urostilo precisamente era un carácter diagnóstico de la familia Pelobatidae hasta la revisión realizada en esta tesis: en dicha familia todas las especies, excepto P. cultripes y P. varaldii, presentan sinostosis sacro-urostilar. De las restantes familias, los Pípidos y algunos Megófridos, Microhílidos y Bufónidos (Lynch, 1973) presentan fusión; en las demás la articulación del sacro y el urostilo es de tipo sincondrótico (sin cavidad sinovial) en Ascaphus y Leiopelma (Cannatella, 1985); monocondilar en Barbourula y Bombina, y bicondilar en las restantes especies de anuros (Lynch (1973) y Cannatella (1985), erróneamente, describen la articulación de Pelodytes como monocondilar. Ver lámina V C.

- La presencia de costillas libres en la 2ª, 3ª y 4ª vértebras es la condición considerada primitiva por todos los autores. En las familias actuales sólo las presentan los Ascáfidos, Leiopelmátidos y Discoglósidos. Los Pípidos desarrollan costillas independientes al final de la metamorfosis, pero se fusionan con los procesos transversos durante el desarrollo postmetamórfico y no se detectan en los adultos. Las restantes familias, incluidas Pelobatidae, Pelodytidae y Megophryidae, no presentan costillas libres.

-----

En cuanto al número de centros de osificación, en P. cultripes se han detectado 36: 35 pares y uno impar. Presentan centros de osificación bien diferenciados las siguientes partes de las vértebras: arcos neurales, centra, cóndilos y apófisis transversas (sólo vértebras 5ª-8ª); además, hemos de considerar los diversos centros de osificación del urostilo.

Cada arco neural se forma al osificar el par de elementos cartilagosos que lo origina. Estos elementos aparecen dorsolaterales a la notocorda, uno a cada lado del tubo neural, crecen rodeándolo y finalmente se encuentran por encima del mismo en su línea media. El desarrollo de los arcos neurales de Pelodytes punctatus es semejante al de P. cultripes. No hay diferencias en cuanto al número de centros de osificación de cada arco neural entre Pelobates y las restantes especies en las que se ha estudiado el desarrollo de los mismos con detalle: Rana temporaria, "Bombinator igneus" (= Bombina bombina) y Bufo melanostictus (Mookerjee, 1931); Xenopus laevis (Mookerjee, 1931; Smit, 1953 y 1956); Racophorus maculatus, Microhyla rubra y Rana afgana (Mookerjee & Das, 1939).

En P. cultripes, cada centrum proviene de la fusión de dos centros de osificación situados entre la base de cada hemiarco neural y el dorso de la notocorda. Del mismo modo se originan los centra en Pelodytes punctatus (ver lámina V A) y en Xenopus laevis (según se infiere de las fotografías 21a y 21b del trabajo de Bernasconi, 1951). Estas tres especies tienen en común que el desarrollo de sus centra es de tipo epicordal. En la literatura no hemos encontrado detalles de cómo se inicia la osificación de los centra, ni en los de desarrollo epicordal ni en los de desarrollo pericordal (condrificación y posterior osificación alrededor de la notocorda, según definición de Mookerjee, 1931 y 1936).

Tenemos datos suficientes para adelantar que la osificación de los centra en las especies con desarrollo vertebral de tipo epicordal se inicia a partir de dos centros de osificación simétricos. Estos centros se fusionan después de su aparición, más o menos rápidamente según las especies. Hemos observado que la fusión se produce más deprisa en Pelobates cultripes que en Pelodytes punctatus (ver centrum de la segunda vértebra en la lámina V A). En cambio, y a pesar de la detallada descripción del desarrollo de tipo

pericordal que Mookerjee (1931) realiza sobre Rana temporaria, este autor no relata con detalle el inicio de la osificación de los centra. Afortunadamente, Sedra & Moursi (1958) indican que en Bufo regularis la osificación de los centra es pericordal y se inicia en dos puntos dorsales a la notocorda, en la base de los arcos neurales; y posteriormente dicha osificación se extiende alrededor de la notocorda.

En las especies que se suponen estrechamente relacionadas con Pelobates cultripes, el desarrollo de los centra es de tipo epicordal en P. varaldii (observaciones propias) y P. fuscus (Emelianoff, 1925); Scaphiopus holbrookii (Kluge & Farris, 1969), S. couchii y S. hurterii (Cannatella, 1985). Por el contrario, el desarrollo es de tipo pericordal en: Spea bombifrons y S. intermontanus (Kluge & Farris, 1969; Cannatella, 1985); Spea hammondii y S. multiplicatus (Cannatella, 1985); Leptobrachium hasseltii y Megophrys montana (Kluge & Farris, 1969), y Megophrys major (fotos 2 y 5 en Griffiths, 1963).

Los cóndilos, en P. cultripes, osifican a partir de dos centros que se fusionan rápidamente. Posteriormente, en la etapa subadulta, estos cóndilos que se hallan libres se fusionan con la vértebra situada delante, dando lugar a vértebras procélicas en los adultos. En P. punctatus la vértebra procélica se alcanza por un proceso morfogenético distinto: no hay centros de osificación en el cóndilo. Durante la metamorfosis, a partir del estadio 43, los centra son diferentes en su extremo cefálico y caudal, mostrando la pieza osificada una ligera concavidad en su parte anterior y cierta convexidad en la posterior; diferencias que se acentúan al fin de la metamorfosis: los recién metamorfoseados presentan vértebras claramente procélicas (comparar las láminas V C y V D). Los Pelobates de la misma edad e incluso los individuos de un año, poseen vértebras anficélicas y entre ellas cóndilos sueltos, condición que sólo se conocía en Megophryidae (Ramaswami, 1933; Lynch, 1973) y Myobatrachidae (Lynch, 1973; Trueb, 1973). A los grupos anteriores hemos de añadir el género Scaphiopus, pues al desarticular los esqueletos de los S. couchii adultos de menor tamaño se nos han desprendido los cóndilos de algunas vértebras espontáneamente.

Las especies de las familias Pelobatidae, Megophryidae y Myobatrachidae son las únicas, entre todos los anuros, con cóndilos libres en algún momento

de su vida. En nuestra opinión las vértebras procélicas de Pelobates y Pelodytes no pueden considerarse homólogas, puesto que difieren en su desarrollo.

En P. cultripes los procesos transversos de las vértebras 2ª, 3ª, 4ª y sacra osifican como una prolongación del hemiarco neural de cada lado. En este aspecto nuestras observaciones coinciden con las realizadas por Emelianoff (1925) sobre P. fuscus. En cambio, las apófisis de las vértebras 5ª, 6ª, 7ª y 8ª osifican a partir de centros independientes situados en la mitad proximal de cada apófisis, los cuales se fusionan rápidamente con el arco neural (ver lámina V B). Esta última observación es nueva en el desarrollo de los anuros. Hemos hallado una breve referencia al proceso de condricación y osificación independiente que sufren las apófisis transversas de las vértebras presacras posteriores en el desarrollo de Xenopus laevis (Smit, 1953, 1956), sin ningún comentario sobre su posible importancia evolutiva; los autores que han trabajado posteriormente en el desarrollo de la columna vertebral de anuros no mencionan el tema. La importancia de la osificación independiente de las apófisis transversas radica en la posibilidad de relacionarlas con costillas; puesto que, por analogía con el fósil de esta línea evolutiva más antiguo que se conoce (Triadobatrachus massinoti, del Triásico inferior de Madagascar), se supone que los antepasados de los anuros actuales poseían costillas en todas sus vértebras.

El número de arcos neurales que entran a formar parte del urostilo en las especies actuales es poco variable, nosotros hemos encontrado tres en Pelobates cultripes (ver lámina VI A) y P. varaldii, y dos en Pelodytes punctatus (lámina V C). Se han descrito dos arcos neurales en el urostilo de Rana temporaria, Bufo melanostictus (Mookerjee, 1931), Bufo americanus e Hyla chrysoscelis (Branham & List, 1979); y tres arcos neurales en Xenopus laevis (Smit, 1953, 1956; Branham & List, 1979), Ascaphus truei (Dijk, 1960), Pseudacris triseriata y Rana pipiens (Branham & List, 1979).

El caso de Megophrys major merece una reseña especial. Su urostilo es proporcionalmente muy largo y presenta una cresta dorsal bien desarrollada que llega casi hasta el final de su extremo posterior. Según Griffiths (1956) posee diecisiete vértebras caudales osificadas en estadios larvarios

tempranos, que se reabsorben en la metamorfosis. En las fotos 2 y 5 de Griffiths (1963) se cuentan sin dificultad 11 piezas osificadas detrás del sacro en un renacuajo de M. major inmediatamente antes del inicio de la metamorfosis, según deducimos del grado de osificación de su cráneo y falanges. No obstante, el autor indica en el texto que son cuatro las vértebras que se incorporan al urostilo. De confirmarse esto último nos encontraríamos ante un ejemplo de reabsorción de piezas osificadas. En cualquier caso, creemos que el estudio del desarrollo del esqueleto en los Megófridos puede añadir nuevos e interesantes datos a lo conocido hasta la fecha.

Es posible que exista una relación positiva entre el número de arcos neurales que constituyen el urostilo y la longitud relativa de su cresta dorsal.

En P. cultripes, además de los arcos neurales de las vértebras 10ª, 11ª y 12ª, osifica y forma parte del urostilo el centrum de la 10ª vértebra. No se ha observado inicio de osificación en el área de los centra en el urostilo de Pelodytes.

-----

En cuanto a la secuencia de osificación, la de Pelodytes punctatus es prácticamente la misma que la de Pelobates cultripes, como puede verse en la figura 37 y en la tabla 24. Las diferencias más notables se deben a la ausencia en Pelodytes de los centros que en Pelobates aparecen al final del desarrollo. Las discrepancias en el momento de inicio de la osificación en los centros homólogos son pequeñas; en la mayoría Pelodytes resulta más precoz, con un estadio de Gosner de ventaja, y esto a pesar de que los ejemplares se criaron en el laboratorio.

De la secuencia de osificación de la columna vertebral en otras especies de anuros no hemos encontrado más que datos parciales de Rana pipiens (Kemp & Hoyt, 1969) y Xenopus laevis (Smit, 1956). En la primera especie, las vértebras comienzan a osificar, en dirección cefalo-caudal, en el estadio IX de la tabla de Taylor & Kollros (1946) equivalente al estadio 34 de Gosner, y el urostilo en el estadio XII (37 de Gosner). En Xenopus laevis

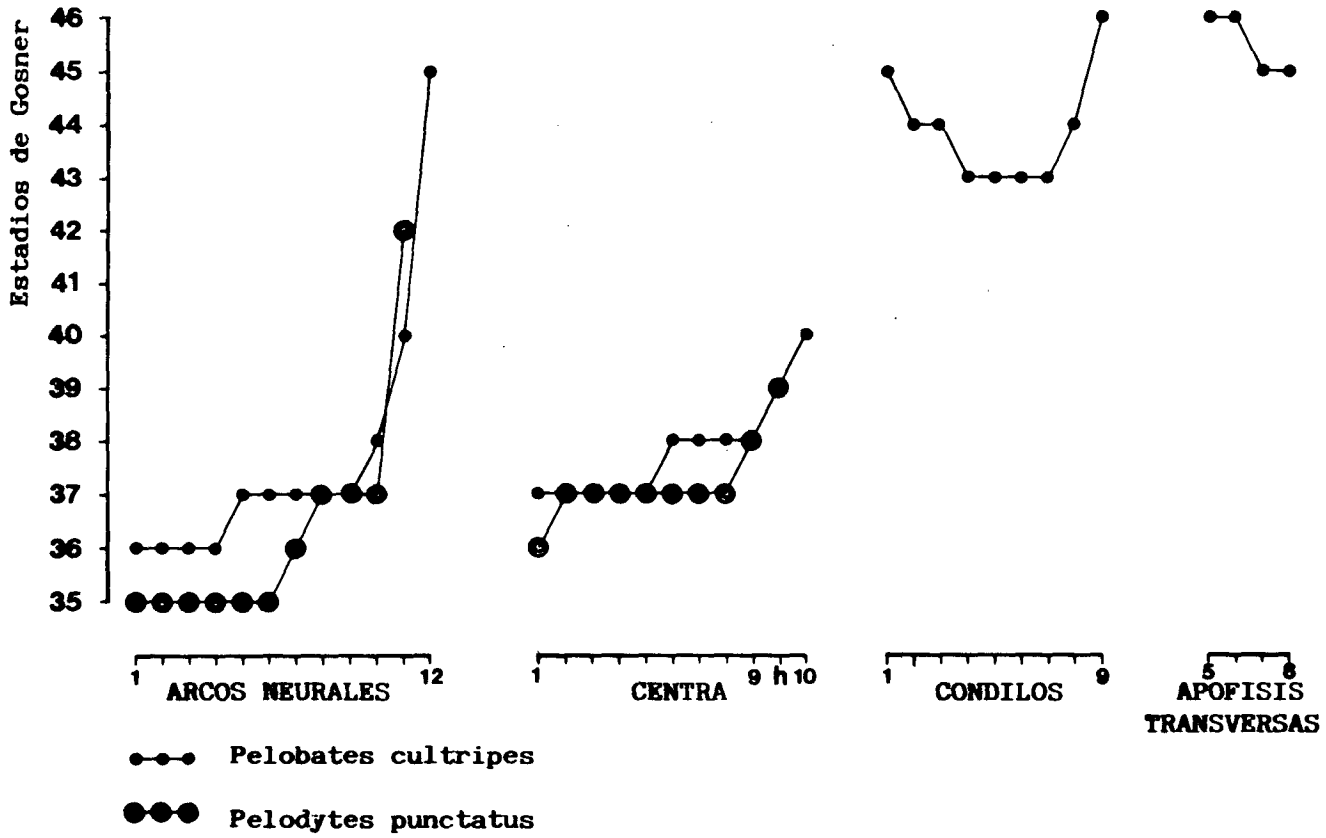


Figura 37.- Representación gráfica de las secuencias de osificación de las columnas vertebrales de Pelobates cultripes y Pelodytes punctatus. h, hipocordio.

Tabla 24.- Secuencias de osificación de la columna vertebral de Pelobates cultripes y Pelodytes punctatus (esta tesis), Xenopus laevis (Smit, 1956) y Rana pipiens (Kemp & Hoyt, 1969).

Pelobates cultripes		Pelodytes punctatus		Xenopus laevis		Rana pipiens	
Centro osif.	Est.Gosner	Centro osif.	Est.Gosner	Centro osif.	Est.Gosner	Centro osif.	Est.Gosner
Arco Neural Atlas	36	Arco Neural Atlas	35	Arco Neural Atlas	34	Arco Neural Atlas	34
Arco Neural V <sub>2</sub>	36	Arco Neural V <sub>2</sub>	35				
Arco Neural V <sub>3</sub>	36	Arco Neural V <sub>3</sub>	35				
Arco Neural V <sub>4</sub>	36	Arco Neural V <sub>4</sub>	35				
Arco Neural V <sub>5</sub>	37	Arco Neural V <sub>5</sub>	35				
Arco Neural V <sub>6</sub>	37	Arco Neural V <sub>6</sub>	35				
Arco Neural V <sub>7</sub>	37	Arco Neural V <sub>7</sub>	36				
Arco Neural V <sub>8</sub>	37	Centrum Atlas	36	Centrum Atlas	37		
Centrum Atlas	37	Centrum V <sub>2</sub>	37				
Centrum V <sub>2</sub>	37	Centrum V <sub>3</sub>	37				
Centrum V <sub>3</sub>	37	Centrum V <sub>4</sub>	37				
Centrum V <sub>4</sub>	37	Centrum V <sub>5</sub>	37				
Arco Neural sacro	37	Centrum V <sub>6</sub>	37				
Centrum V <sub>5</sub>	37	Arco Neural V <sub>8</sub>	37				
Centrum V <sub>6</sub>	38	Centrum V <sub>7</sub>	37				
Centrum V <sub>7</sub>	38	Centrum V <sub>8</sub>	37				
Centrum V <sub>8</sub>	38	Arco Neural sacro	37				
Arco Neural V <sub>10</sub>	38	Arco Neural V <sub>10</sub>	37			Urostilo	37
Centrum sacro	38	Centrum sacro	38	Costillas V <sub>2</sub> -V <sub>4</sub>	41		
Hipocordio	39	Hipocordio	39	Hipocordio	42		
Centrum V <sub>10</sub>	40	Arco Neural V <sub>11</sub>	42				
Arco Neural V <sub>11</sub>	40						
Cóndilo V <sub>5</sub>	43						
Cóndilo V <sub>6</sub>	43						
Cóndilo V <sub>4</sub>	43						
Cóndilo V <sub>7</sub>	43						
Cóndilo V <sub>3</sub>	44						
Cóndilo V <sub>8</sub>	44						
Cóndilo V <sub>2</sub>	44						
Cóndilo Atlas	45						
Arco Neural V <sub>12</sub>	45						
Apófisis transv. V <sub>8</sub>	45			Procesos transv. V <sub>5</sub> -V <sub>8</sub>	44		
Apófisis transv. V <sub>7</sub>	45						
Apófisis transv. V <sub>5</sub>	46						
Apófisis transv. V <sub>6</sub>	46						
Cóndilo sacro	1 <sup>a</sup> sem.post.						

la osificación de los arcos neurales comienza en el atlas en el estadio 54 de la tabla de Nieuwkoop & Faber (1956) (estadio 34 de Gosner), los centra en el 56 (37 de Gosner); las costillas de las vértebras 2ª-4ª en el 58 (41 de Gosner); el hipocordio en el 60 (42 de Gosner), y los procesos transversos de las vértebras 5ª-8ª en el 64 (44 de Gosner). Consultar la tabla 24. A pesar de la escasez de datos, lo poco que se conoce de otras especies coincide plenamente con la secuencia de osificación de P. cultripes descrita en esta tesis.

-----

En P. cultripes el tiempo que transcurre desde que aparece el primer centro de osificación en la columna hasta que surge el último es de 24,5 días a temperatura óptima, y en cuanto a etapas del desarrollo, abarca desde el estadio 36 al 46 de la tabla de Gosner. No tenemos datos de duración de Pelodytes punctatus, aunque en esta especie el lapso proporcional de tiempo es menor y la osificación se inicia antes: el proceso transcurre entre los estadios 35 y 42.

Las trayectorias ontogenéticas del desarrollo de la columna vertebral de ambas especies, elaboradas con la misma metodología que las del cráneo (ver tabla 25), se muestran en la figura 38. Nuevamente la longitud de la trayectoria de Pelobates es sensiblemente mayor debido, fundamentalmente, a que su columna posee más elementos.

-----

En cuanto al porcentaje de individuos con malformaciones en la columna vertebral, en Pelobates cultripes llega al 30% de los 64 ejemplares estudiados (Talavera, 1987); en Pelodytes punctatus es del 12.19% (41 individuos estudiados. Ver figura 39); en Pelobates fuscus es del 10.77% sobre 65 individuos (Adolphi, 1895); en Bombina variegata del 10.70% sobre 813 ejemplares (Madej, 1965); en Bombina bombina del 10.45% sobre 555 ejemplares (Madej, 1965) y porcentajes menores en los géneros Scaphiopus y Spea. Ver tabla 26.

Destaca el alto porcentaje de anomalías en P. cultripes, comparado con los porcentajes en las demás especies. Las anomalías se deben

Tabla 25.- Para cada estadio de Gosner, longitud media cabeza + cuerpo (LCC) y número de centros que han iniciado su osificación en la columna vertebral de Pelobates cultripes y Pelodytes punctatus.

Estadio Gosner	Pelodytes punctatus		Pelobates cultripes	
	Lcc (mm)	Nº centros	Lcc (mm)	Nº centros
34	12.43	0		
35	13.33	6	24.66	0
36	14.47	8	27.83	4
37	15.06	18	29.12	14
38	16.14	19	28.94	19
39	17.06	20	30.36	20
40			28.85	22
41				
42	15.66	21		
43			23.19	26
44			23.11	29
45			25.78	33
46			24.07	35
1ª sem.			25.49	36

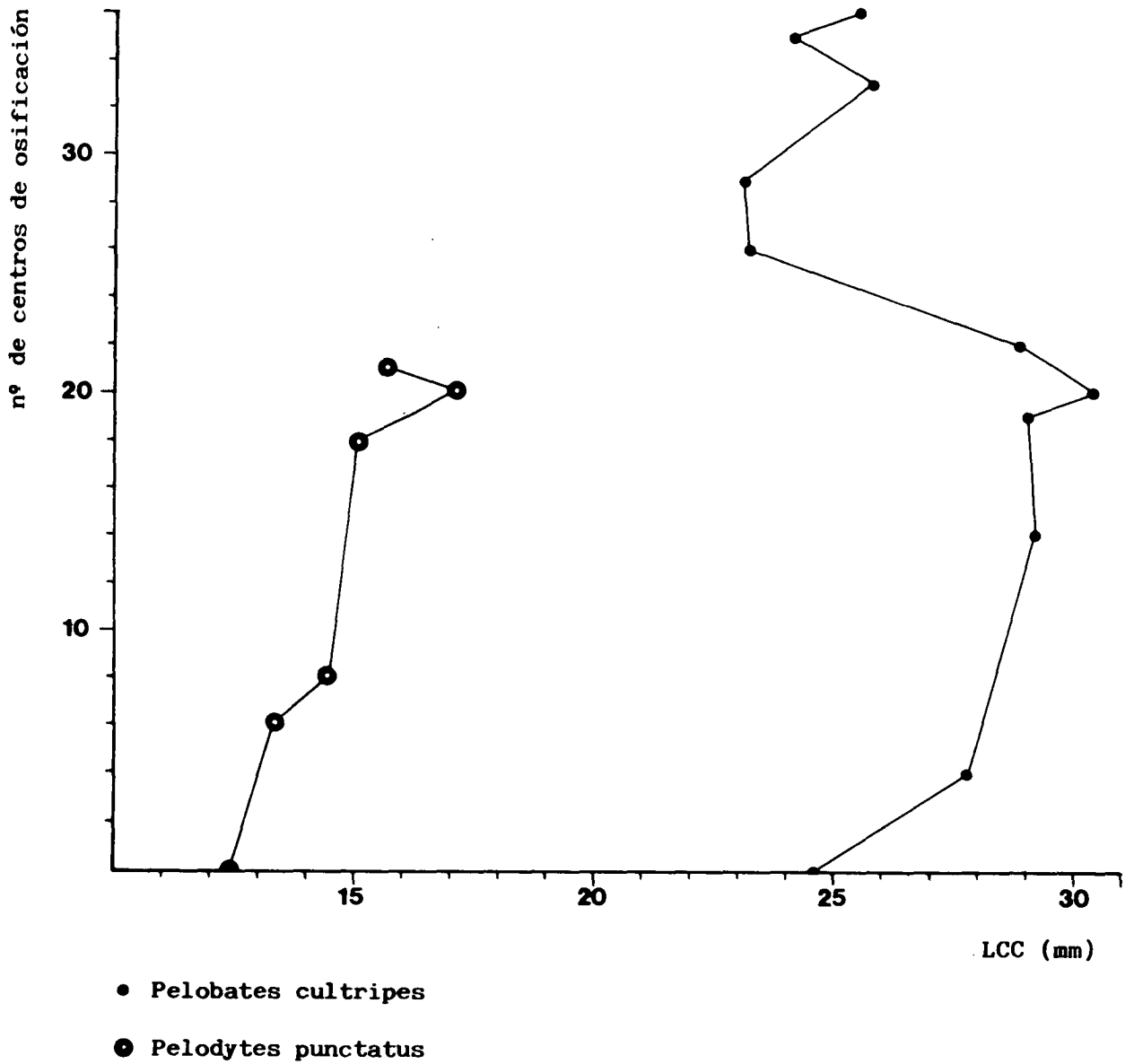


Figura 38.- Trayectorias ontogenéticas del proceso de osificación de las columnas vertebrales de Pelobates cultripes y Pelodytes punctatus.

Tabla 26.- Para las especies señaladas, autor que realizó el trabajo, número de individuos estudiados y porcentaje de ejemplares presentando anomalías en su columna vertebral.

	Nº ejempl. estudiados	% de ejempl. con anomalías en la columna	% de ejempl. con anomalías en el sacro y/o urostilo	% de ejempl. con asimetrías en el sacro
Pelobates cultripes (juveniles y adultos) Talavera (1987)	64	29.69	20.31	7.81
Pelobates cultripes (renacuajos) Talavera (1987)	82	8.54	-	7.32
Pelobates fuscus Adolphi (1895)	65		10.77	
Scaphiopus couchii Kluge (1966)	89	3.37	2.45	
Spea hammondii Kluge (1966)	20	5.00	5.00	
Spea bombifrons Kluge (1966)	34	2.94	2.94	
Pelodytes punctatus Esta tesis	41	12.19	7.32	4.88
Bombina variegata Madej (1965)	813	10.70	10.58	6.76
Bombina bombina Madej (1965)	555	10.45	10.45	5.77

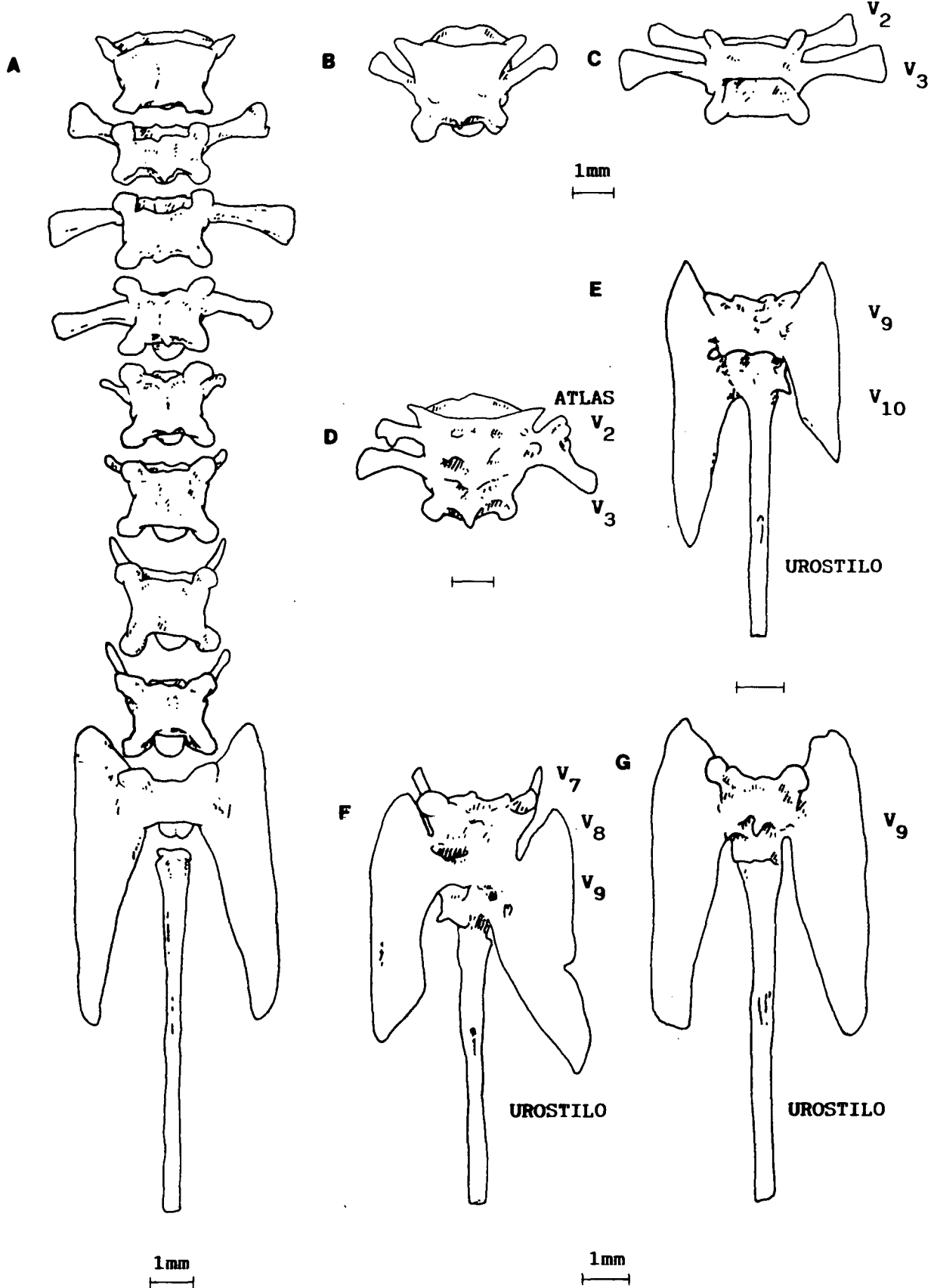


Figura 39.- Pelodytes punctatus. A, en norma dorsal, columna vertebral normal. Malformaciones detectadas en adultos: B, fusión del atlas y la 2ª vértebra; C, fusión de las vértebras 2ª y 3ª; D, fusión del atlas, 2ª y 3ª vértebras (este individuo presentaba además la anomalía "F" en el sacro); E, sacro asimétrico constituido por la fusión de dos vértebras (9ª y 10ª) y el urostilo; F, sacro asimétrico constituido por la fusión de tres vértebras (7ª, 8ª y 9ª) y el urostilo; G, sacro normal (V<sub>9</sub>) fusionado con una vértebra postsacra completamente desarrollada (V<sub>10</sub>) y con el urostilo.

fundamentalmente a fusiones de elementos en el segmento anterior y/o posterior de la columna (ver tabla 23 y figura 36 A-H).

Si sólo nos fijamos en las malformaciones que afectan al sacro y/o urostilo, el porcentaje es del 20.31% en P. cultripes, del 10.77% en P. fuscus y del 7.32% en Pelodytes punctatus; las cifras son menores en las restantes especies. Y si atendemos al porcentaje de ejemplares con asimetrías en el sacro -que siempre implican la participación en el mismo de dos vértebras-, encontramos afectados al 7.81% de los renacuajos y al 7.32% de los adultos de P. cultripes, al 6.76% de las Bombina variegata, al 5.77% de las B. bombina y al 4.88% de los Pelodytes punctatus. Nuevamente la especie P. cultripes presenta los porcentajes más altos de malformaciones, y además, se da la circunstancia de que las asimetrías del sacro no parecen afectar a la viabilidad de los individuos, pues su porcentaje es semejante en renacuajos y en adultos.

Resaltamos estos resultados porque ya Zweifel (1956) encontró que la frecuencia de anomalías en el sacro era mayor en los Pelobátidos fósiles del Terciario de Norteamérica que en las formas actuales (géneros Scaphiopus y Spea), y Tihen (1960) postuló que los primeros pelobátidos, y específicamente los progenitores del complejo Scaphiopus-Spea, habrían exhibido una variación vertebral considerable. Si aceptamos que las especies ancestrales de anuros debían presentar gran variabilidad en los caracteres de su columna vertebral, y dado que la proporción de P. cultripes con alguna anomalía rebasa con mucho los porcentajes conocidos en cualquier otro taxon actual, esta peculiaridad parece una buena evidencia de la condición primitiva de Pelobates cultripes.

### 3.2.3. MIEMBRO ANTERIOR Y CINTURA ESCAPULAR

#### 3.2.3.1. Descripción del miembro anterior y de la cintura escapular adulta de Pelobates cultripes

El miembro anterior de Pelobates cultripes está constituido por dos huesos largos, diez elementos carpales, cuatro metacarpianos y diez falanges, cuya fórmula es: 2, 2, 3, 3.

La cintura escapular se compone de un hueso ventral medial, el esternón, y cuatro piezas oseas pares: escápula y cleitro (dorsales), y clavícula y coracoides (ventrales). Es de tipo arcífero, según definición de Griffiths (1963). Este tipo se caracteriza porque los cartílagos epicoracoides son relativamente anchos; en su parte anterior se encuentran unidos por un discreto puente precoracoides y en su parte posterior permanecen libres, solapándose uno sobre otro medialmente. Al mismo tiempo, clavículas y coracoides forman entre sí ángulos divergentes.

En la figura 40 se muestra la morfología adulta, posición anatómica y denominación de los huesos del miembro anterior y cintura de P. cultripes. En la cintura escapular utilizamos la nomenclatura de Griffiths (1963); en el carpo adulto, la de Howes & Ridewood (1888) modificada, y en el desarrollo del carpo, la de Holgrem (1933).

#### 3.2.3.2. Secuencia de osificación del miembro anterior y cintura escapular de Pelobates cultripes

La secuencia de osificación de los 31 huesos (30 pares y uno medial) del miembro anterior y cintura escapular de P. cultripes la dividimos en tres etapas, para mayor claridad en la exposición:

En la primera, de los siete elementos del brazo y la cintura escapular, seis comienzan su osificación entre los estadios 38 y 39 de la tabla de Gosner (1960), en el siguiente orden: húmero, escápula, ulna y radio, cleitro,

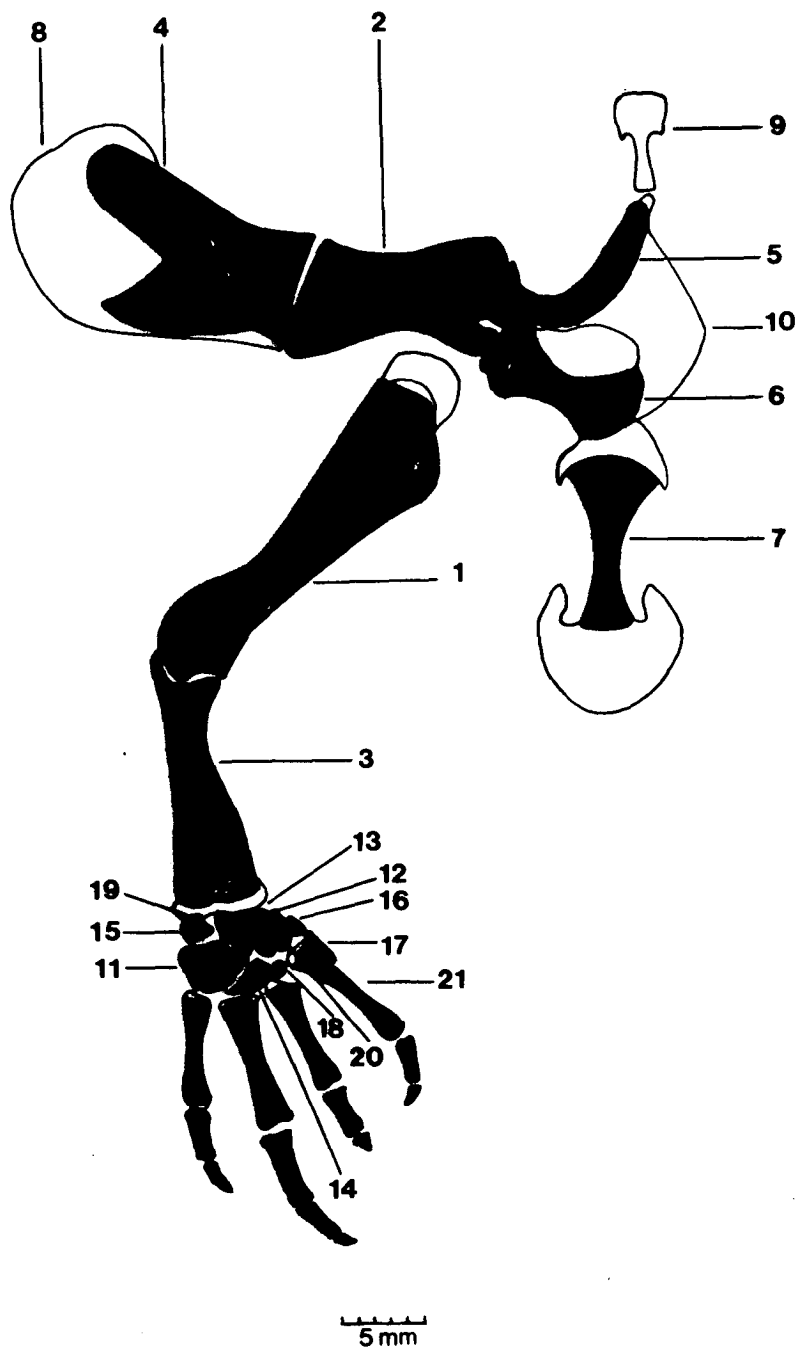


Figura 40.- Morfología, posición anatómica y denominación de los huesos del miembro anterior y cintura escapular de *Pelobates cultripes*. En negro, el hueso; en blanco, el cartilago. 1, húmero; 2, escápula; 3, radioulna; 4, cleitro; 5, clavícula; 6, coracoides; 7, esternón; 8, supraescápula; 9, omoesternón; 10, cartilago epicoracoideo; 11, postaxialcentral; 12, preaxialcentral; 13, radial; 14, carpal 3; 15, ulnar; 16, prepollex 1; 17, prepollex 2; 18, carpal 2; 19, subulnar; 20, carpal 1, y 21, metacarpiano del dedo I.

clavícula y coracoides; mientras que el último elemento, el esternón, osifica en la primera semana después de la metamorfosis. A continuación, describimos los detalles del desarrollo más interesantes:

- El húmero es el primer elemento en condricar en el estadio 31 (figura 41 A). Y el primero en osificar en el estadio 38.

- La radioulna se constituye por la fusión de dos elementos que condrican por separado durante el desarrollo (figura 41 A - E). El radio y la ulna comienzan a osificar al mismo tiempo (estadio 38; figura 42 A ), pero independientemente, y es a lo largo de este proceso cuando se produce la fusión de las zonas osificadas de las dos piezas, aumentando la longitud fusionada a la par que la osificación avanza. Ver lámina VII.

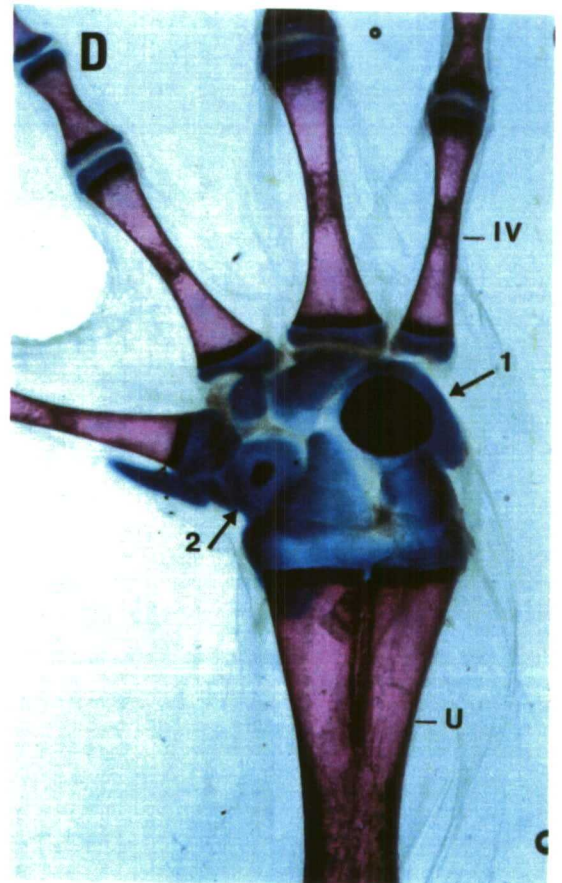
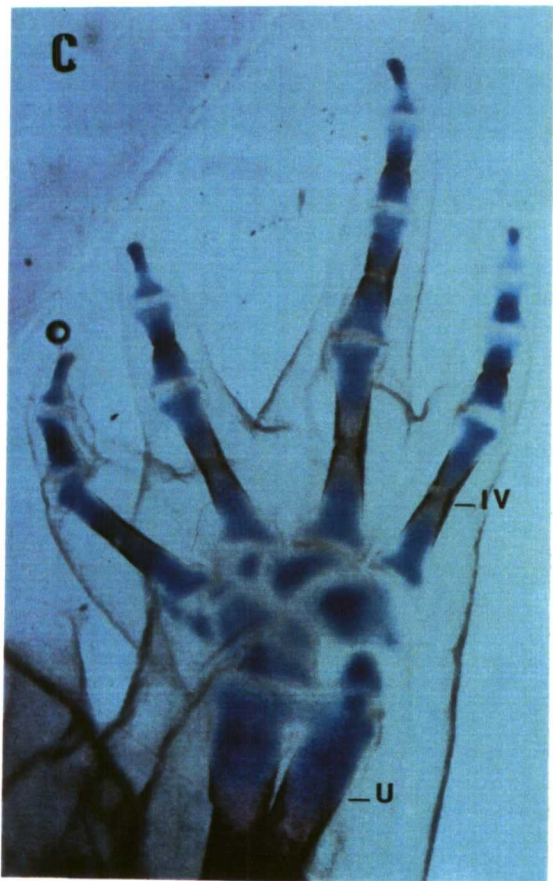
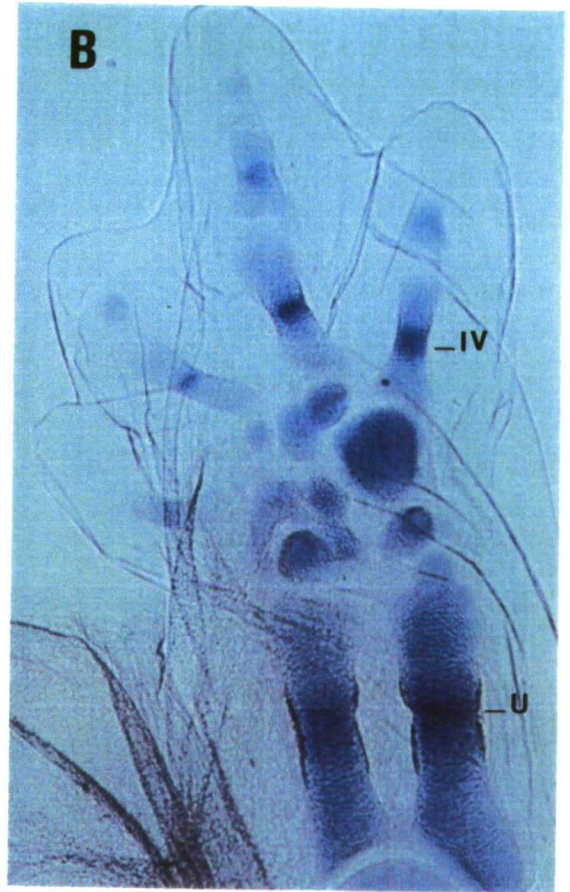
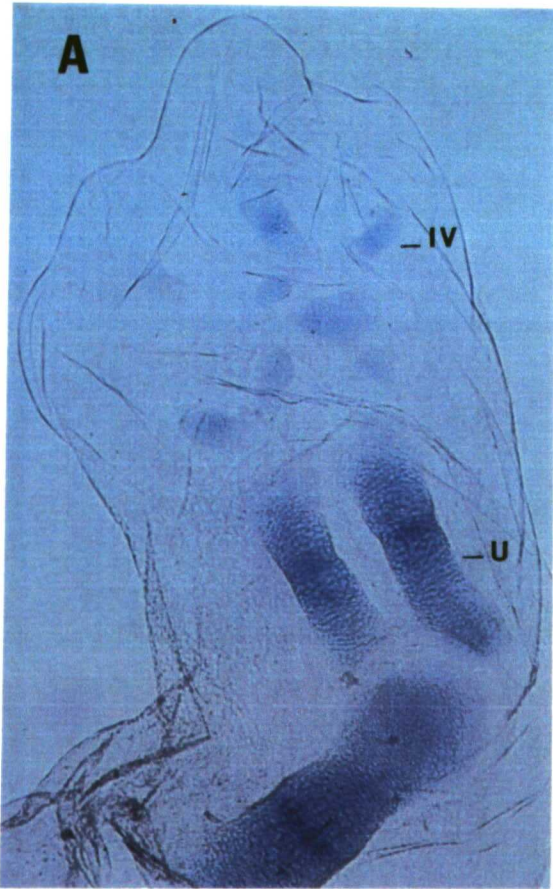
- La escápula y el cleitro provienen de la misma pieza cartilaginosa que aparece en el estadio 32 (figura 41 A - D) y comienza a osificar en dos puntos distintos en el estadio 38. El primero dará lugar a la escápula y el segundo al cleitro; ambos centros de osificación no llegan a ponerse en contacto y el dique cartilaginoso que los separa no funciona como una articulación.

- Los dos rudimentos cartilagos que se prolongan desde la cavidad glenoidea ventralmente, se acaban uniendo medialmente en el estadio 38. La osificación alrededor del rudimento más anterior dará lugar a la clavícula, en el estadio 38, y la del elemento posterior al coracoides, en el estadio 39. El área cartilaginosa que une los dos huesos medialmente permanece sin osificar toda la vida y recibe el nombre de cartilago epicoracoideo. Ver figura 40.

- El elemento prezonal (omocosternón) y el postzonal (esternón), condrican independientemente durante la metamorfosis, en los estadios 45 y 43, respectivamente. En P. cultripes, el primero de ellos nunca llega a osificar y el segundo lo hace en la primera semana después de concluir la metamorfosis.

Con las peculiaridades señaladas, los huesos del brazo y cintura escapular de P. cultripes comienzan su osificación en la misma secuencia en que comenzaron a condricar. El estadio de Gosner en que se produce cada acontecimiento se reseña en la tabla 27. En la tabla 28 se detalla el

Lámina VII.- Desarrollo del carpo de Pelobates cultripes. En azul, el cartílago; en rojo, el hueso. **A**, estadio 36; **B**, estadio 37; **C**, estadio 39; **D**, estadio 46. U, ulna; IV, cuarto metacarpiano; 1, primer centro de osificación del carpo (= postaxialcentral); 2, segundo centro de osificación del carpo (= preaxialcentral).



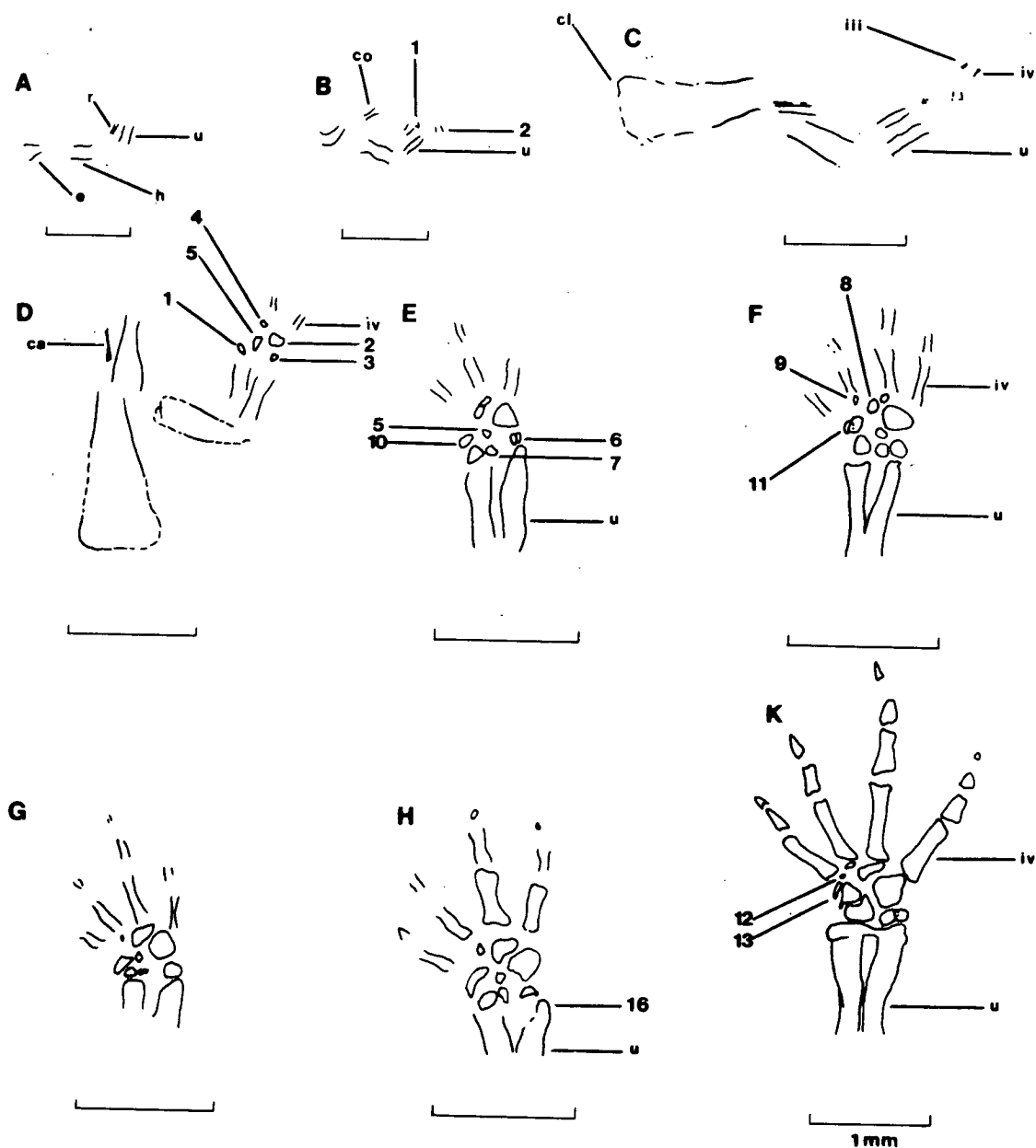


Figura 41.- Secuencia de condricación del miembro anterior y cintura escapular de *Pelobates cultripes*, entre los estadios 35 y 38. A y B, estadio 35; C y D, estadio 36; E, F, G y H, estadio 37; K, estadio 38. ca, clavícula; cl, cleitro; co, coracoides; e, escápula; h, húmero; r, radio; u, ulna; iv, cuarto metacarpiano; iii, tercer metacarpiano. 1, radial; 2, central 4; 3, ulnar; 4, carpal 3; 5, central 1; 6, pisiforme; 7, intermedio; 8, central 3; 9, carpal 2; 10, central 2; 11, elemento Y; 12, carpal 1; 13, prepollex 1, y 16, subulnar.

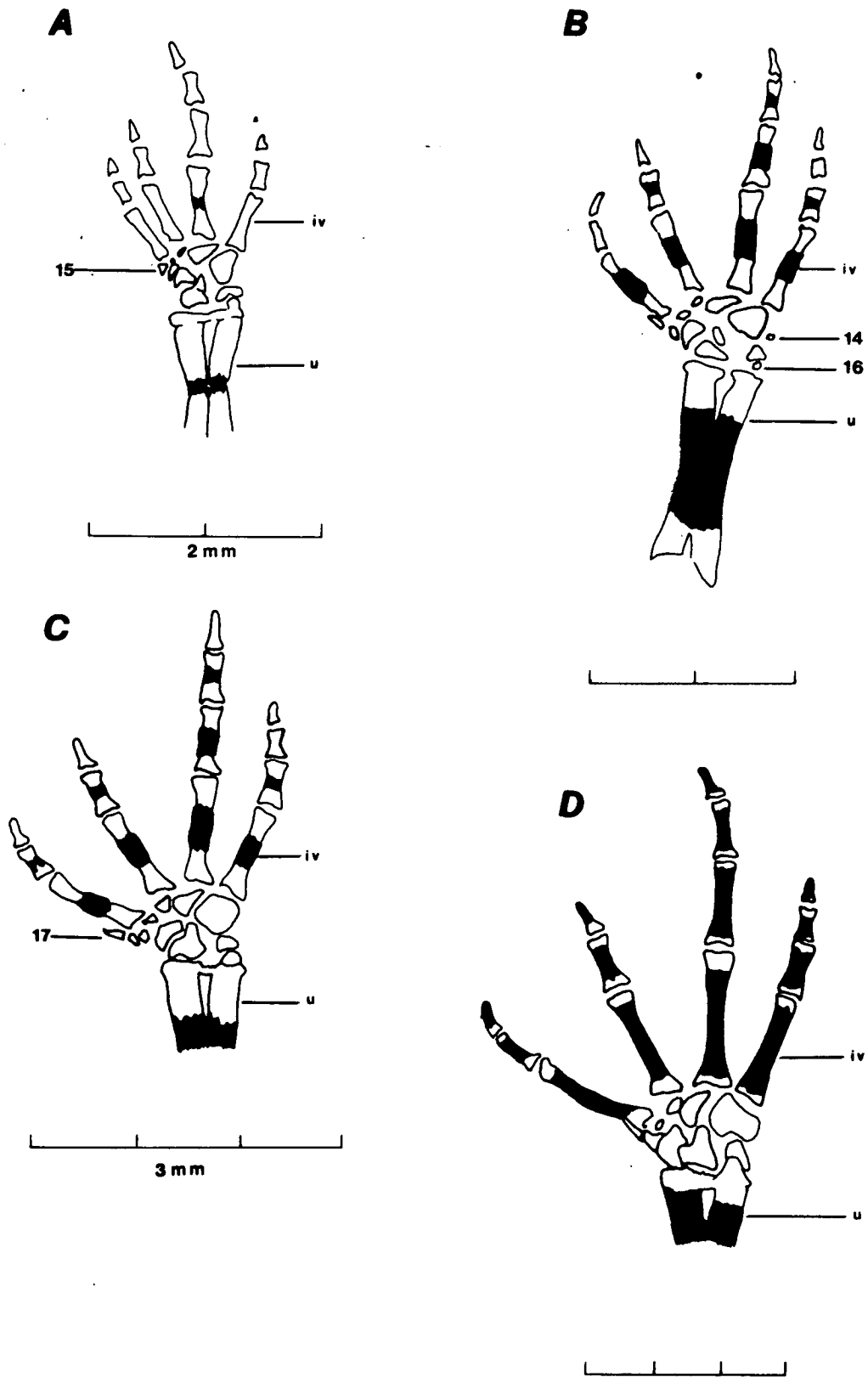


Figura 42.- Pelobates cultripes. Aparición y fusión de los elementos del carpo, y secuencia de osificación de metacarpianos y falanges, entre los estadios 38 y 42. En blanco, el cartilago; en negro, el hueso. A, estadio 38; B, estadio 39; C, estadio 40, y D, estadio 42. 14, carpal 5; 15, prepollex 2; 17, prepollex 3. Restantes abreviaturas como en la figura 41.

Tabla 27.- Pelobates cultripes. Secuencia de condricación y de osificación del brazo y cintura escapular, señalando el estadio de desarrollo (Gosner, 1960) en que se produce cada acontecimiento.

SECUENCIA DE CONDRIFICACION			SECUENCIA DE OSIFICACION	
Nº de orden	Elemento	Est. Gosner	Hueso	Est. Gosner
10	Húmero	31	Húmero	38
20	Escápula-Cleitro	32	Escápula	38
30	Ulna	33	Ulna	38
40	Radio	33	Radio	38
50	Coracoides	36	Cleitro	38
60	Clavícula	36 (final)	Clavícula	38
70	Esternón	43	Coracoides	39
80	Omoesternón	45	Esternón	1ª semana post.



porcentaje de individuos que presentaba osificación, para cada estadio de desarrollo y para cada hueso.

La segunda etapa de la osificación del miembro anterior está constituida por la mineralización de metacarpianos y falanges. El proceso se inicia en los catorce huesos entre los estadios 39 y 41. Durante la metamorfosis no se produce ninguna novedad digna de ser reseñada; en los huesos aumenta el porcentaje de diáfisis osificada, a la vez que se produce crecimiento en longitud.

La secuencia de condricación de los huesos de los dedos es prácticamente la misma que la de osificación. El primer elemento en condricar y posteriormente en osificar es el metacarpiano del tercer dedo (III), seguido del metacarpiano IV, inmediatamente después aparece el metacarpiano II y la primera falange del tercer dedo (III.1); en una secuencia radial que tiene por eje principal este dedo, aparecen los restantes metacarpianos y falanges. En la tabla 29 se relacionan por orden de condricación y osificación todos los huesos. Los elementos ligados con una llave inician su osificación a la vez. En la figura 41 se han dibujado los rudimentos cartilagosos que aparecen sucesivamente entre los estadios de desarrollo 35 y 38, y en la figura 42 las piezas que van iniciando su osificación entre los estadios 39 y 41.

La tercera etapa comprende la osificación de los diez huesos del carpo. Se inicia en el estadio 46, al finalizar la metamorfosis, y se prolonga hasta bien entrada la edad adulta.

Nombramos los huesos del carpo de Pelobates cultripes igual que Howes & Ridewood (1988), pero los carpalia los numeramos del 1 al 3, en vez del 2 al 4, y describimos por primera vez un hueso nuevo en el carpo: el subulnar. Ver figura 40.

La secuencia en que osifican es la siguiente: postaxialcentral, preaxialcentral, radial, carpal 3, ulnar, prepollex 1, prepollex 2, carpal 2, subulnar y carpal 1.

Tabla 29.- Pelobates cultripes. Secuencia de condrificación y de osificación de los metacarpianos y falanges, y estadio de desarrollo (Gosner, 1960) en que se produce cada acontecimiento.

SECUENCIA DE CONDRIFICACION		SECUENCIA DE OSIFICACION	
	Estadio Gosner		Estadio Gosner
	-----		-----
Metacarpiano III	36	Metacarpiano III	39
Metacarpiano IV	36	Metacarpiano IV	39
Metacarpiano II	37	Falange III.1	40
Falange III.1	37	Metacarpiano II	40
Metacarpiano I	37	Metacarpiano I	40
Falange IV.1	37	Falange II.1	40
Falange II.1	37	Falange IV.1	40
Falange III.2	37	Falange III.2	40
Falange IV.2	37	Falange IV.2	41
Falange I.1	37	Falange I.1	41
Falange III.3	38	Falange III.3	41
Falange II.2	38	Falange II.2	41
Falange I.2	38	Falange IV.3	41
Falange IV.3	38	Falange I.2	41

La ontogenia de cada hueso del carpo es complicada y aunque todos osifican a partir de un solo centro, seis de ellos provienen de la fusión de dos o más esbozos cartilagosos.

- El postaxialcentral, es el primero en osificar (estadio 46; figura 43 A) y el segundo elemento en condricar. El rudimento principal y de mayor tamaño corresponde al central 4 de Holgrem (1933) y aparece en el estadio 36 (figura 41 B y C, y lámina VII A). El otro esbozo cartilaginoso que lo constituye fue denominado carpal 5 por Emery (1894) y aparece en el estadio 38 (figura 42 B y lámina VII C). Ambos se unen entre los estadios 40 y 41 (figura 42 D).
  
- El preaxialcentral, es el segundo elemento en osificar en la primera semana después de la metamorfosis (figura 43 B). Proviene de la fusión de dos piezas cartilagosas, una dorsal y otra ventral: los elementos Y y C<sub>2</sub> de Schmalhausen (1907) y Holgrem (1933). Las dos condensaciones aparecen en el estadio 37 y se fusionan en el 38. Ver figura 41 F y G, y lámina VII B.
  
- El radial es el tercer hueso en osificar (1ª semana postmetamórfica; figura 43 C), procede de la fusión de tres elementos cartilagosos. El radial, que aparece el primero (est. 35; figura 41 B), el central 1 (est. 36; figura 41 D y lámina VII A), y el intermedio (est. 37; figura 41 E y lámina VII B)). Normalmente, se fusiona el intermedio con el radial en el estadio 38 (figura 42 B y lámina VII C) y después a este complejo se incorpora el central en el estadio 39 (figura 42 C y lámina VII D); sin embargo, hemos encontrado ejemplares en el estadio 38 en que la fusión de los tres elementos ya se había producido (figura 41 K y 42 A).
  
- El carpal 3 osifica en cuarto lugar (1ª semana postmetamórfica; figura 43 D). Condricar a partir de dos esbozos cartilagosos; el primero (carpal 3) aparece en el estadio 36 (figura 41 D y lámina VII A) y el segundo en el estadio 37 (central 3; figura 41 F y lámina VII B), fusionándose ambos rápidamente en ese mismo estadio (figura 41 G). Prueba de la rapidez con que se produce la fusión es que de nueve carpos en ese estadio examinados sólo en uno se encontraban ambos elementos separados.
  
- El ulnar osifica en quinto lugar en la segunda semana postmetamórfica

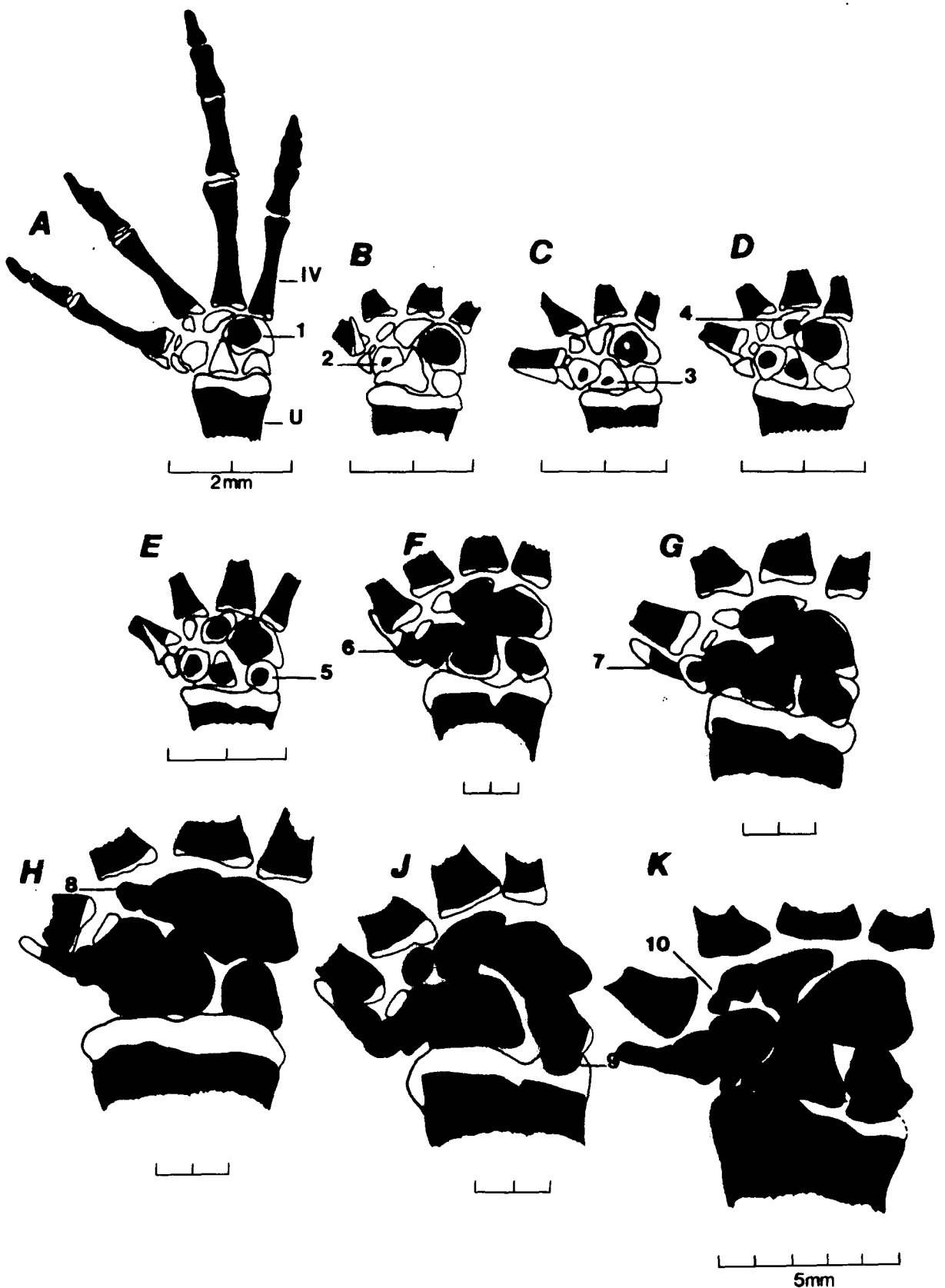


Figura 43.- Pelobates cultripes. Secuencia de osificación de los huesos del carpo. En blanco, el cartilago; en negro, el hueso. A, estadio 46; B, C y D, primera semana postmetamórfica; E, segunda semana postmetamórfica; F, G, H, J y K, adultos. U, ulna; IV, cuarto metacarpiano; 1, postaxialcentral; 2, preaxialcentral; 3, radial; 4, carpal 3; 5, ulnar; 6, prepollex 1; 7, prepollex 2; 8, carpal 2; 9, subulnar, y 10, carpal 1.

(figura 43 E) y proviene de la fusión de dos elementos cartilagosos completamente superpuestos: uno que aparece en el estadio 36 en la cara dorsal, llamado ulnar (figura 41 D y lámina VII A), y otro que aparece en el estadio 37 en la cara ventral y que Emery (1894) llamó pisiforme (figura 41 E y lámina VII B). Ambos se fusionan en el estadio 39 (figura 42 B y lámina VII C).

Estos cinco elementos forman el cuerpo principal del carpo. Inician su osificación entre el fin de la metamorfosis y los 10 días siguientes. Sólo se han detectado dos alteraciones de la secuencia descrita, después de examinar 10 P. cultripes de estadio 45, 10 de estadio 46, 9 de una semana de edad, uno de dos semanas, dos de dos meses (estos criados en el laboratorio), dos de un año y 45 adultos. En un renacuajo de estadio 45 estaba osificando el radial en una mano, sin que hubieran iniciado su osificación ni el postaxial central ni el preaxialcentral que lo preceden en la secuencia; mientras que en la otra mano no había comenzado la osificación en ningún hueso. En un recién metamorfoseado la osificación había comenzado en el postaxialcentral, el radial y el ulnar, habiéndose "saltado" el preaxialcentral y el carpal 3.

En los cinco huesos restantes, la secuencia de osificación sufre también ligeras alteraciones respecto a la de condricación. Condrican en el siguiente orden: carpal 2, carpal 1 y prepollex 1 (estadio 37; figura 41 F y K, y lámina VII B)); prepollex 2 y subulnar (estadio 38; figura 42 A y B, y lámina VII C) y prepollex 3 (estadio 40; figura 42 C). Este último se fusiona con el prepollex 2 en el estadio 41. Las cinco piezas inician su osificación después de la madurez sexual, en un orden ligeramente alterado: prepollex 1, prepollex 2, carpal 2, subulnar y carpal 1. Ver figura 43 F - K.

Hemos encontrado un individuo en que esta secuencia estaba alterada; el subulnar había comenzado su osificación, sin que se hubiera iniciado la del carpal 2.

En la tabla 30 se resume la secuencia y el estadio de desarrollo en que condrican y osifican los elementos del carpo. Es importante resaltar que ambas secuencias no coinciden. Además, durante el proceso de condricación, las piezas del carpo condrican unas antes, otras a la vez y otras

Tabla 30.- Pelobates cultripes. Secuencia de condricación y de osificación del carpo y estadio de desarrollo (Gosner, 1960) en que se produce cada acontecimiento.

SECUENCIA DE CONDRIFICACION	Estadio de Gosner	SECUENCIA DE OSIFICACION	Edad
Radial	35	Postaxialcentral	Estadio 46
Central 4	35	Preaxialcentral	1ª sem. post.
Ulnar	35	Radial	1ª sem. post.
Carpal 3	36	Carpal 3	1ª sem. post.
Central 1	36	Ulnar	2ª sem. post.
Pisiforme	37		
Intermedio	37	Prepollex 1	adulto
Central 3	37	Prepollex 2	"
Carpal 2	37	Carpal 2	"
Central 2	37	Subulnar	"
Elemento Y	37	Carpal 1	"
Carpal 1	37		
Prepollex 1	37		
Carpal 5	38		
Prepollex 2	38		
Subulnar	38		
Prepollex 3	40		

FUSIONES	Estadio de Gosner
Central 3 + Carpal 3	37
Central 2 + Elemento Y	38
Radial + Intermedio + Central 1	39
Ulnar + Pisiforme	39
Central 4 + Carpal 5	41
Prepollex 2 + Prepollex 3	41
Subulnar + Epífisis Radioulna	41

inmediatamente después (ej. carpal 1) que los metacarpianos que sostienen; sin embargo, a la hora de osificar se retrasan muchísimo respecto a ellos.

Hay dimorfismo sexual en el inicio de la osificación del segundo grupo de huesos del carpo. En los machos osifican antes que en las hembras. En la población de Madrid, las diferencias entre ambos sexos en las distribuciones del número de elementos osificados en el carpo han resultado altamente significativas (test de la U de Mann-Witney:  $n_1 = 15$ ;  $n_2 = 14$ ;  $U = 151.00$ ;  $P = 0.01$ ); los histogramas correspondientes se presentan en la figura 44. Sólo hemos encontrado un macho de pequeño tamaño (LCC = 60 mm) y cuatro años de edad, al que todavía faltaban por osificar los tres últimos huesos; otro macho de tres años, pero de mayor tamaño (LCC = 74 mm) tenía ya todos los huesos osificados.

En machos no hay correlación significativa entre edad y número de elementos osificados ( $r_s = 0.3797$ ;  $n = 15$ ;  $S = 347.37$ ;  $P > 0.05$ ); y tampoco la hay entre LCC y número de huesos ( $r_s = 0.4357$ ;  $n = 15$ ;  $S = 316.01$ ;  $P > 0.05$ ). Ver figuras 45 y 46.

En las hembras existe correlación muy altamente significativa en ambos supuestos, siendo mayor el coeficiente de correlación entre el número de elementos osificados del carpo y el tamaño ( $r_s = 0.8137$ ;  $n = 14$ ;  $S = 84.77$ ;  $P < 0.001$ ) que entre éste número y la edad ( $r_s = 0.7458$ ;  $n = 14$ ;  $S = 115.66$ ;  $P < 0.001$ ). Ver figuras 45 y 46.

En la población portuguesa, todos los machos estudiados ( $n = 11$ ) tenían todas las piezas del carpo osificadas, aún el más joven (3 años) y de menor tamaño (LCC = 59 mm). Dado el escaso número de hembras ( $n = 4$ ), los resultados no se pueden elaborar estadísticamente, pero a la más pequeña (LCC = 65 mm) y más joven (3 años) le faltaban dos elementos por osificar.

En P. cultripes, el inicio de la osificación en la cintura escapular, húmero y radioulna emplea 19 días a temperatura óptima de crecimiento, entre los estadios 38 (21.25 días) y el fin de la 1ª semana postmetamórfica (40.33 días).

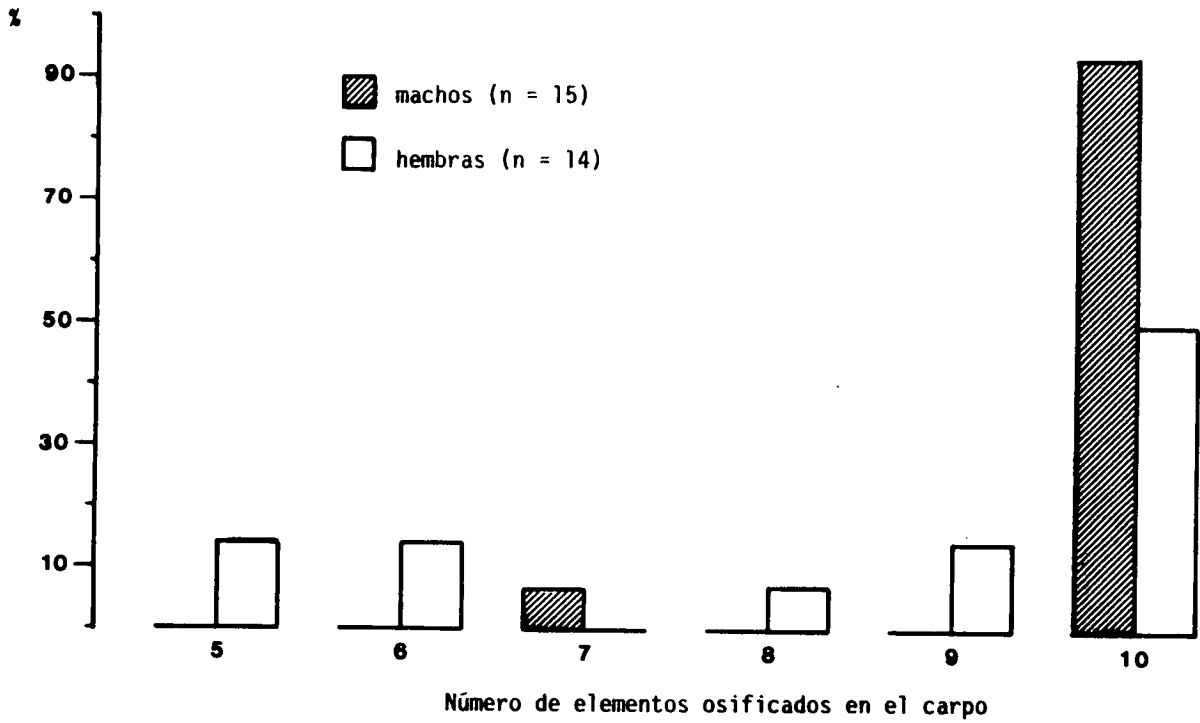


Figura 44.- Histograma de frecuencias del número de elementos osificados en el carpo, en los Pelobates cultripes adultos de la población de Madrid.

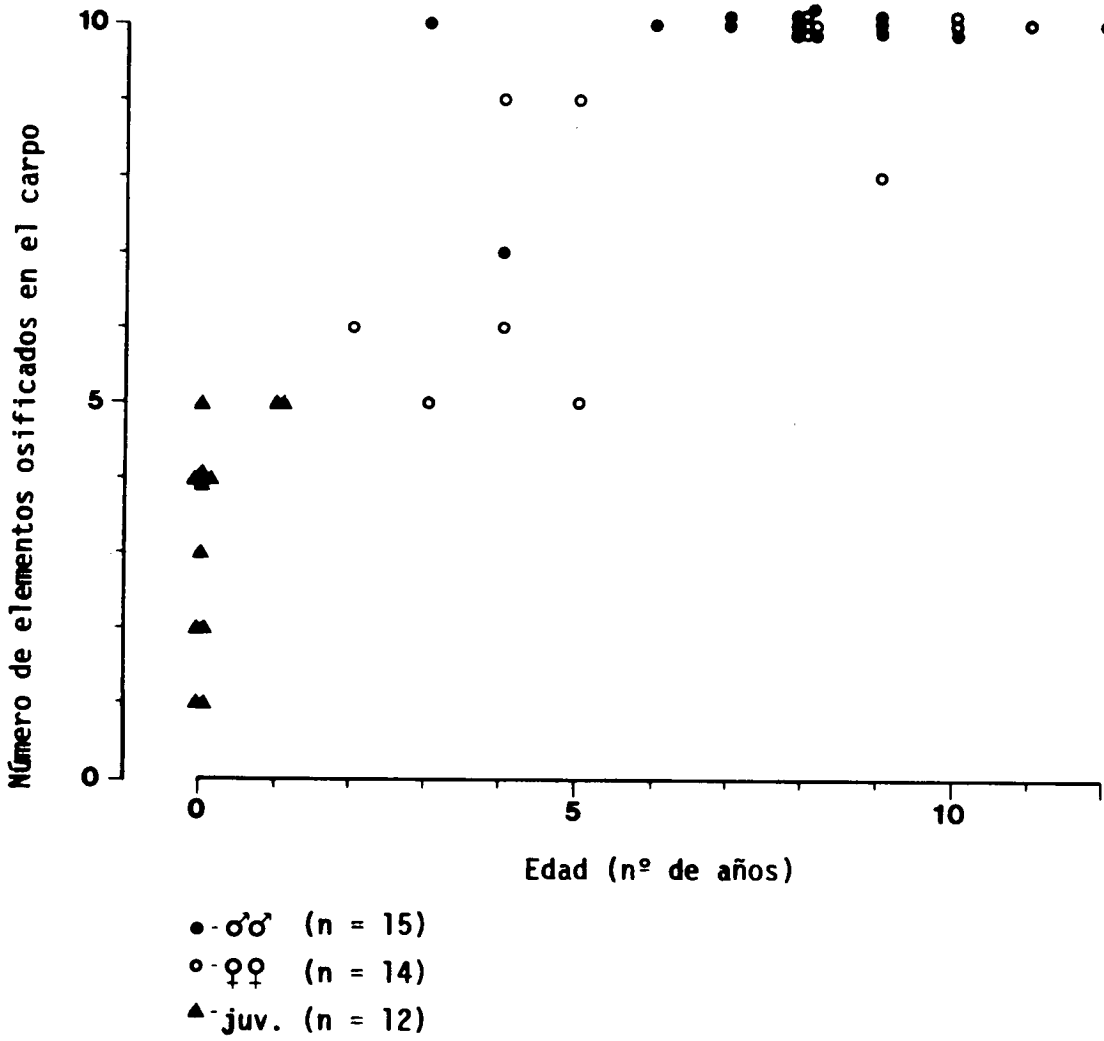


Figura 45.- Pelobates cultripes. Número de elementos del cuerpo osificados en relación con la edad, en la población de Madrid.

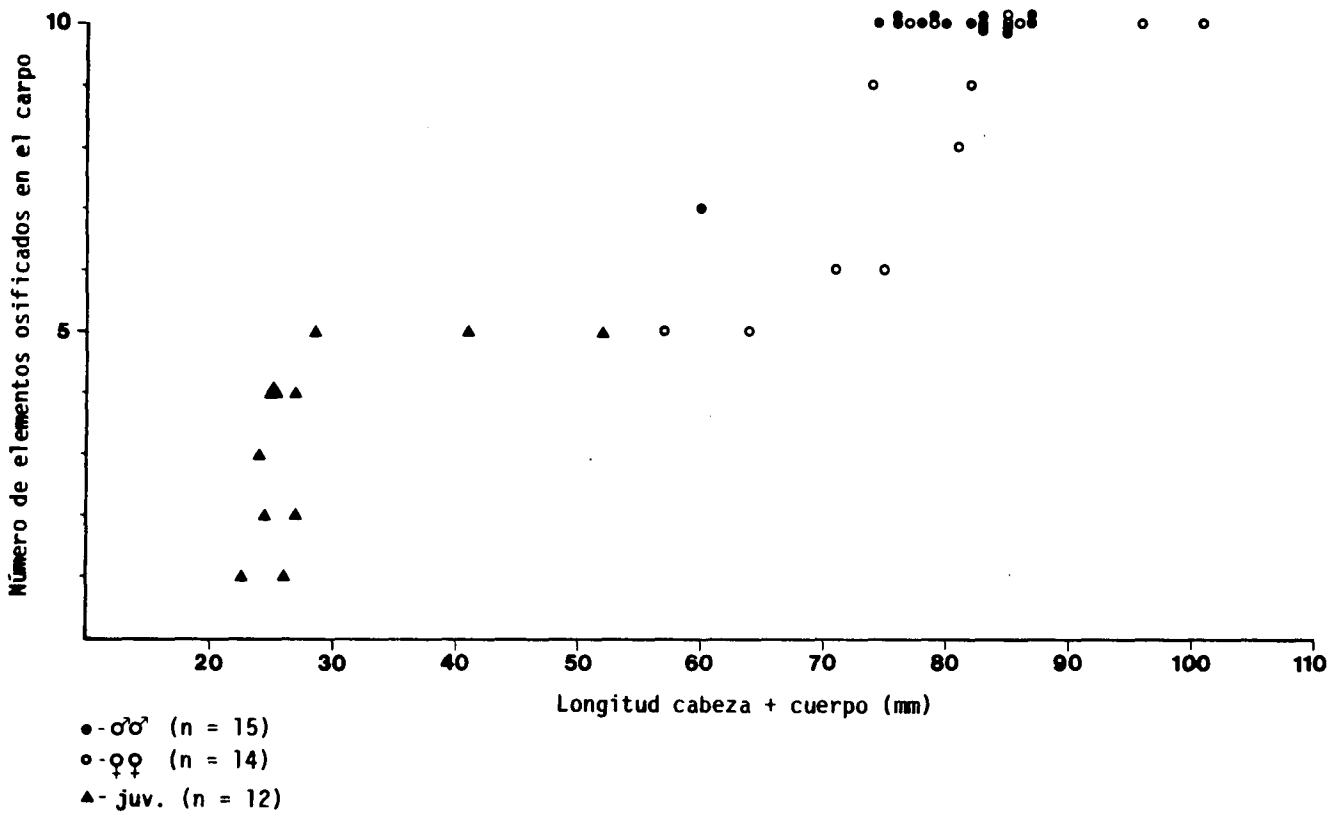


Figura 46.- Pelobates cultripipes. Número de elementos del cuerpo osificados en relación con el tamaño (LCC), en la población de Madrid.

Tabla 31.- Pelobates cultripes. Número de elementos osificados en el carpo en relación con el tamaño (LCC) y con la edad en juveniles y adultos de la población de Madrid.

Nº elementos osificados en el carpo	Juveniles		Adultos			
	LCC	Edad	Machos		Hembras	
	LCC	Edad	LCC	Edad	LCC	Edad
5	41	1			57	5
5	52	1			64	3
6					72	4
6					75	2
7			60	4		
8					81	9
9					74	5
9					82	4
10			74	3	77	10
			76	8	79	8
			76	10	85	10
			78	8	85	11
			79	8	86	8
			80	12	96	8
			82	9	101	8
			83	6		
			83	7		
			83	9		
			85	7		
			85	8		
			87	8		
			87	9		

La osificación se inicia en metacarpianos y falanges entre los estadios 39 (23.87 días de edad a 28° C) y fin del 41 (27.75 días); empleando el proceso, por término medio, 3.88 días.

Los cinco huesos principales del carpo: postaxialcentral, preaxialcentral, carpal 3, radial y ulnar osifican entre el fin de la metamorfosis (estadio 46) y los diez días siguientes. Y los cinco huesos periféricos (prepollex 1, prepollex 2, carpal 2, subulnar y carpal 1) comienzan a osificar después de la madurez sexual. En los machos, la osificación se ha iniciado en todos ellos a los tres años de edad, si se ha alcanzado el tamaño crítico de 74 mm; mientras que en las hembras el proceso se alarga hasta los 8 o 10 años de edad, como puede verse en la tabla 31.

Tenemos que resaltar que en todos los ejemplares de P. cultripes examinados los elementos del carpo fueron diez, sin que se haya registrado ni una sola fusión o alteración del patrón básico. Por tanto, la variabilidad en cuanto al número de elementos del carpo de P. cultripes, hasta el momento, es inexistente, concentrándose las diferencias en el estado de osificación de los mismos.

### 3.2.3.2. Comparación con Pelodytes punctatus y otras especies de Anuros

Vamos a comparar los tres segmentos en que hemos dividido la cintura escapular y el miembro anterior por separado, atendiendo a las siguientes características:

Número de elementos en el adulto.

Número de centros de condricación y/o osificación.

Secuencia de osificación.

Duración del proceso de inicio de la osificación.

Frecuencia de malformaciones.

### Cintura escapular y brazo

En Pelobates cultripes, la cintura escapular consta de nueve huesos: cuatro pares y uno medial. El mismo número de elementos se halla presente en las otras tres especies del género.

Los otros dos géneros vivientes de la familia Pelobatidae, Scaphiopus y Spea, se caracterizan por la ausencia de osificación en el esternón, que permanece cartilaginoso toda la vida.

Tanto Leptobranchium hasseltii como Megophrys montana poseen esternón óseo. Y lo mismo podemos decir de Pelodytes punctatus y P. caucasicus.

En cuanto al número de centros de osificación de la cintura escapular, húmero, radio y ulna, no hemos observado ninguna diferencia en Pelodytes punctatus respecto a Pelobates cultripes.

En cambio, detectamos dos alteraciones en la secuencia en que se produce el inicio de la osificación. En Pelodytes, la escápula se retrasa hasta después de que el radio y la ulna han comenzado su mineralización, y el coracoides inicia su osificación antes de que lo hagan el cleitro y la clavícula. En la literatura, sólo existen datos parciales de la secuencia de osificación de dos especies: Xenopus laevis y Rana pipiens. Van Pletzen (1956) señala que el coracoides, el húmero y la radioulna comienzan a osificar en el estadio 56 de la tabla normal de Xenopus (37 de la de Gosner), y la escápula, el cleitro y la clavícula en el 58 (41 de Gosner). Frente a la secuencia patrón de P. cultripes, destaca el gran adelanto en la osificación del coracoides y el considerable retraso de la escápula. Kemp & Hoyt (1969) indican que en Rana pipiens el húmero comienza a osificar en el estadio XI (36 de Gosner) de su tabla normal; la escápula inicia su osificación después del radio y la ulna, y el cleitro después del coracoides y la clavícula. Los detalles de la comparación de secuencias entre las cuatro especies se pueden consultar en la tabla 32.

En cuanto a la duración del inicio de la osificación, en P. cultripes los elementos pares de este segmento osifican entre los estadios 38 y 39,

Tabla 32.- Secuencias de osificación y estadios de desarrollo (Gosner, 1960) en que se inicia la mineralización del brazo y cintura escapular en Pelobates cultripes y Pelodytes punctatus (esta tesis), Xenopus laevis (van Pletzen, 1956) y Rana pipiens (Kemp & Hoyt, 1969). Entre paréntesis, estadios de desarrollo de las tablas normales de Xenopus laevis (Niewkoop & Faber, 1956) y Rana pipiens (Taylor & Kollros, 1946).

<u>Pelobates cultripes</u>		<u>Pelodytes punctatus</u>		<u>Xenopus laevis</u>		<u>Rana pipiens</u>	
n = 177		n = 159				n = 162	
Húmero	38	Húmero	37	Húmero	37 (= 56)	Húmero	36 (= XI)
Escápula	38	Radio	37	Coracoides	37 "	Radio	37 (= XII)
Ulna	38	Ulna	37	Radio	37 "	Ulna	37 "
Radio	38	Escápula	38	Ulna	37 "	Escápula	38 (= XIII)
Cleitro	38	Coracoides	38	Escápula	41 (= 58)	Coracoides	38 "
Clavícula	38	Cleitro	38	Cleitro	41 "	Clavícula	39 (= XIV)
Coracoides	39	Clavícula	38	Clavícula	41 "	Cleitro	39 "
Esternón	19 sem.	Esternón	1er mes	Esternón	no osifica	Esternón	46 (= XXV)
Omoesternón no osif.		Omoesternón	no osif.	Omoesternón	"	Omoesternón	46 "

empleando en el proceso 3.5 días, que se incrementan a 19 si incluimos la osificación del esternón. En Pelodytes punctatus la osificación de los elementos pares se inicia antes, entre los estadios 37 y 38, y termina más tarde, aproximadamente un mes después de la metamorfosis (a las dos semanas de concluida ésta, sólo el 20% de los ejemplares examinados presentaba el esternón osificado). En Xenopus laevis (van Pletzen, 1956), el proceso transcurre entre los estadios 37 y 41 (56 y 58 de la tabla normal de Xenopus), ya que en este género el esternón permanece cartilaginoso en el adulto (Cannatella, 1985). En Rana pipiens (Kemp & Hoyt, 1969), la mineralización de los nueve huesos de la cintura escapular y brazo se inicia entre los estadios 36 y 46 (XI y XXV de la tabla normal de R. pipiens).

#### **Metacarpianos y falanges**

En P. cultripes, la mano consta de cuatro dedos, con las siguientes falanges: 2, 2, 3, 3; por tanto, junto con los metacarpianos, suman 14 huesos. El mismo número de elementos se encuentra en todas las especies de las familias Pelobatidae, Pelodytidae y Megophryidae. Y ésta es la fórmula general en la mayoría de las especies de Anuros, salvando algunos Hílicos, Microhílicos y Racofóridos con falanges intercalares antes de la última de cada dedo (Lynch, 1973).

Tanto los metacarpianos como las falanges osifican a partir de un sólo centro situado en la parte media de la diáfisis, exceptuando las falanges terminales que comienzan a osificar por su extremo distal. No hay centros de osificación secundarios en las epífisis. Sin embargo, Leptobrachium hasseltii mostraba los cartílagos epifisarios de todos sus huesos largos, incluidas las falanges, fuertemente calcificados (ver figura 49 B y C). En Pelodytes punctatus, los metacarpianos y falanges osifican a partir de un solo centro, igual que en P. cultripes; en Pelodytes, los machos adultos muestran excrescencias óseas en la diáfisis del metacarpiano del primer dedo, a veces también en las epífisis, y ya más raramente algunos ejemplares las presentaban también en la diáfisis del metacarpiano del segundo dedo. Estos refuerzos parece ser que ayudan a la inserción de la musculatura adicional que caracteriza los miembros anteriores de los machos de muchas especies de

anuros (Trueb, 1973).

En cuanto a la secuencia de osificación, Pelodytes punctatus presenta dos alteraciones respecto al modelo seguido por Pelobates cultripes: la primera falange del dedo IV osifica antes que los metacarpianos II y I, y la primera falange del dedo II osifica antes que el metacarpiano del dedo I. Consultar la tabla 33. Las falanges terminales osifican en la misma secuencia en ambas especies. No existen datos de la secuencia de osificación de los dedos de ninguna otra especie de anuro, exceptuando la indicación de Kemp & Hoyt (1969) sobre Rana pipiens. Dichos autores señalan que la mineralización de sus metacarpianos se inicia en el estadio XIII (38 de Gosner) y la de sus falanges en el estadio XIV (39 de Gosner).

La duración media del proceso en P. cultripes es de 3.88 días a 28° C, entre los estadios 39 y 41. En Pelodytes punctatus el proceso se inicia igualmente en el estadio 39, pero en nuestros renacuajos de laboratorio finaliza mucho más tarde, en el estadio 45; sin embargo, el único renacuajo de estadio 41 criado en el campo que hemos podido estudiar, presentaba señales de osificación en todas las falanges excepto en las terminales. Esto nos hace suponer que en condiciones naturales, en Pelodytes, al igual que en Pelobates, la osificación se debe haber iniciado en todas las falanges al alcanzar el climax metamórfico. En Xenopus laevis, van Pletzen (1956) afirma que todos los metacarpianos y falanges han iniciado su osificación en el estadio 58 (41 de Gosner).

### Carpo

El carpo de P. cultripes está constituido por diez huesos. Diez huesos presentan también P. varaldii, P. fuscus y P. syriacus (figura 47 A, B, C y D). Scaphiopus couchii presenta once huesos, el elemento adicional corresponde a la 3ª falange del prepollex, que incluía un pequeño centro de osificación en su base en cuatro de los nueve individuos examinados; el subulnar se encontraba osificado en cinco ejemplares (figura 47 E). Ni el prepollex 3 ni el subulnar se han detectado en los diez Spea multiplicatus examinados (figura 47 F).

Tabla 33.- Secuencia de osificación y estadio de desarrollo (Gosner, 1960) en que se inicia la mineralización de los metacarpianos y las falanges de Pelobates cultripes y Pelodytes punctatus (esta tesis) y Rana pipiens (Kemp & Hoyt, 1969). El asterisco señala los huesos que alteran su orden de osificación respecto a la secuencia patrón de Pelobates cultripes. Entre paréntesis, estadios de desarrollo de la tabla normal de Rana pipiens (Taylor & Kollros, 1946).

<u>Pelobates cultripes</u>		<u>Pelodytes punctatus</u>		<u>Rana pipiens</u>	
-----		-----		-----	
n = 177		n = 159			
Metacarpiano III	39	Metacarpiano III	39	Metacarpianos	38 (= XIII)
Metacarpiano IV	39	Metacarpiano IV	39	Falanges	39 (= XIV)
Falange III.1	40	Falange III.1	41		
Metacarpiano II	40	*Falange IV.1	41		
Metacarpiano I	40	Metacarpiano II	41		
Falange II.1	40	*Falange II.1	41		
Falange IV.1	40	Metacarpiano I	41		
Falange III.2	40	Falange III.2	41		
Falange IV.2	41	Falange IV.2	42		
Falange I.1	41	Falange I.1	44		
Falange III.3	41	Falange III.2	44		
Falange II.2	41	Falange II.2	44		
Falange IV.3	41	Falange IV.3	44		
Falange I.2	41	Falange I.2	45		

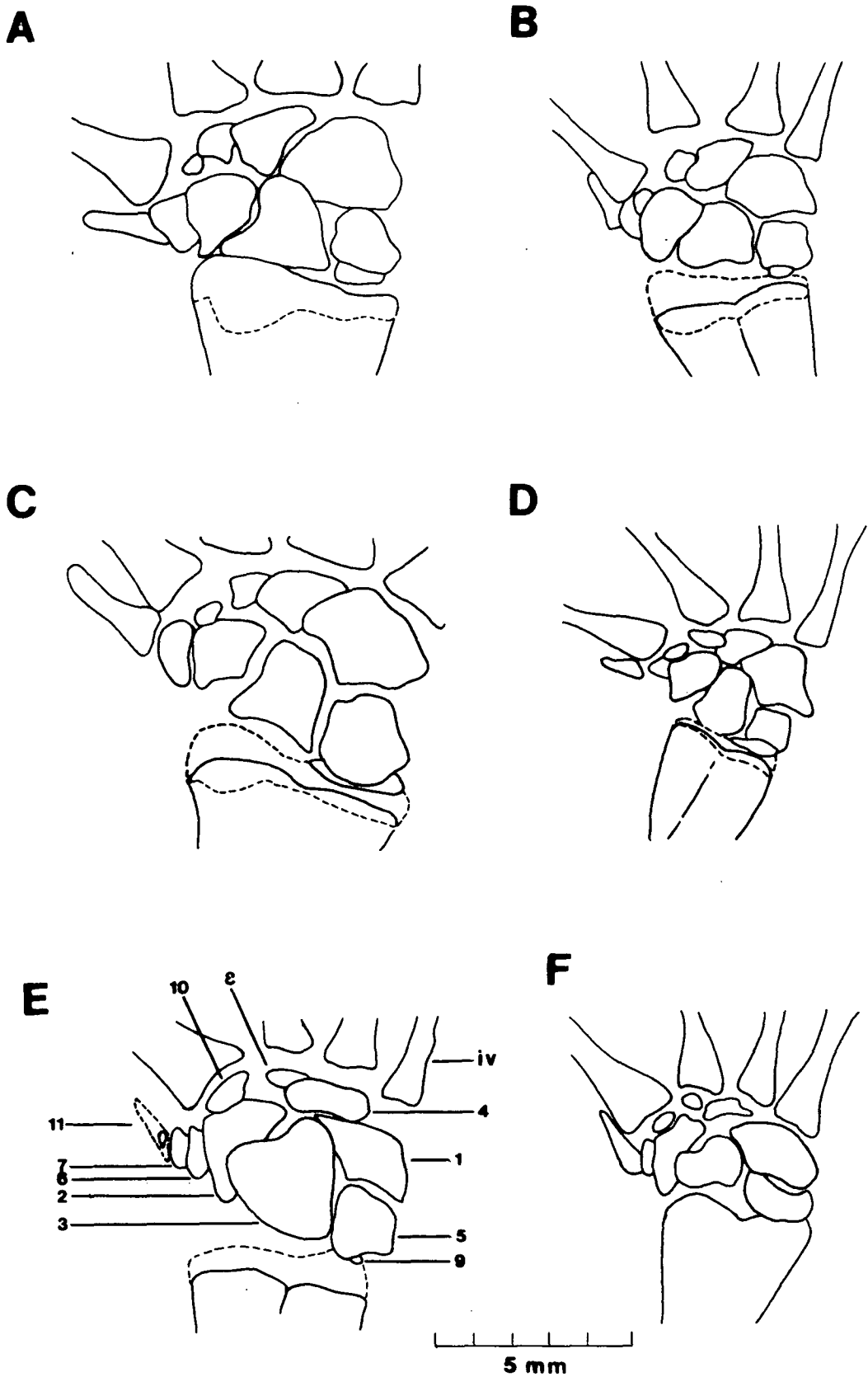


Figura 47.- Composición del carpo adulto en la familia Pelobatidae. en norma dorsal: A, Pelobates cultripes; B, P. varaldii; C, P. syriacus; D, P. fuscus; E, Scaphiopus couchii; F, Spea multiplicatus. Línea continua, hueso; línea discontinua, cartílago. iv, cuarto metacarpiano; 1, postaxialcentral; 2, preaxialcentral; 3, radial; 4, carpal 3; 5, ulnar; 6, prepollex 1; 7, prepollex 2; 8, carpal 2; 9, subulnar; 10, carpal 1, y 11, prepollex 3.

De la familia Pelodytidae hemos estudiado el carpo de las dos especies que la constituyen. Tanto Pelodytes punctatus como P. caucasicus muestran nueve huesos en su carpo, para cuya denominación conservamos parcialmente la de Howes & Ridewood (1898). Los huesos son: hamatum, preaxialcentral, radial ulnar, prepollex 1, prepollex 2, carpal 2, carpal 1 y subulnar. No hemos encontrado la tercera falange del prepollex que muestran las ilustraciones de Howes & Ridewood (1898). Nosotros consideramos la osificación que hemos llamado subulnar un verdadero hueso del carpo, homólogo al correspondiente de P. cultripes. La figura 48 presenta un dibujo de los carpos de ambos Pelodytes.

De la familia Megophryidae hemos estudiado el carpo de Megophrys montana y de Leptobrachium hasseltii. El de la primera especie está constituido por nueve huesos, a los que se añade un décimo elemento cartilaginoso en la base del metacarpiano IV. Carece de subulnar. Ver figura 49 A.

El carpo de Leptobrachium difiere de los de las restantes especies descritas hasta la fecha. Posee trece elementos. De ellos tres pertenecen al prepollex. Entre el postaxialcentral y el cuarto metacarpiano aparece un pequeño hueso que hemos denominado carpal 4. Entre el postaxialcentral, el preaxialcentral y el tercer metacarpiano hay dos huesos, en vez de uno como en Pelobates; para el menor de ellos, incluido casi en la epífisis del metacarpiano del tercer dedo, hemos conservado el nombre de carpal 3, y al de mayor tamaño lo hemos denominado central 3, como a la pieza cartilaginosa que en Pelobates aparece en la misma posición durante el desarrollo del carpo y que posteriormente se fusiona con el carpal 3. Por último, en la palma de la mano, incluido entre los tendones que la cruzan y sin articular con ningún hueso del carpo, se encuentra un elemento osificado que hemos considerado un hueso sesamoideo. No hemos podido dilucidar si el hueso subulnar existe, ya que la epífisis distal de la radioulna se halla fuertemente calcificada en esta especie, impidiendo la observación. En la figura 49 B y C se muestra el carpo de L. hasseltii en normas dorsal y ventral.

Howes & Ridewood (1898), que estudiaron 60 especies de anuros pertenecientes a 37 géneros, describieron diez tipos de carpo entre los anuros

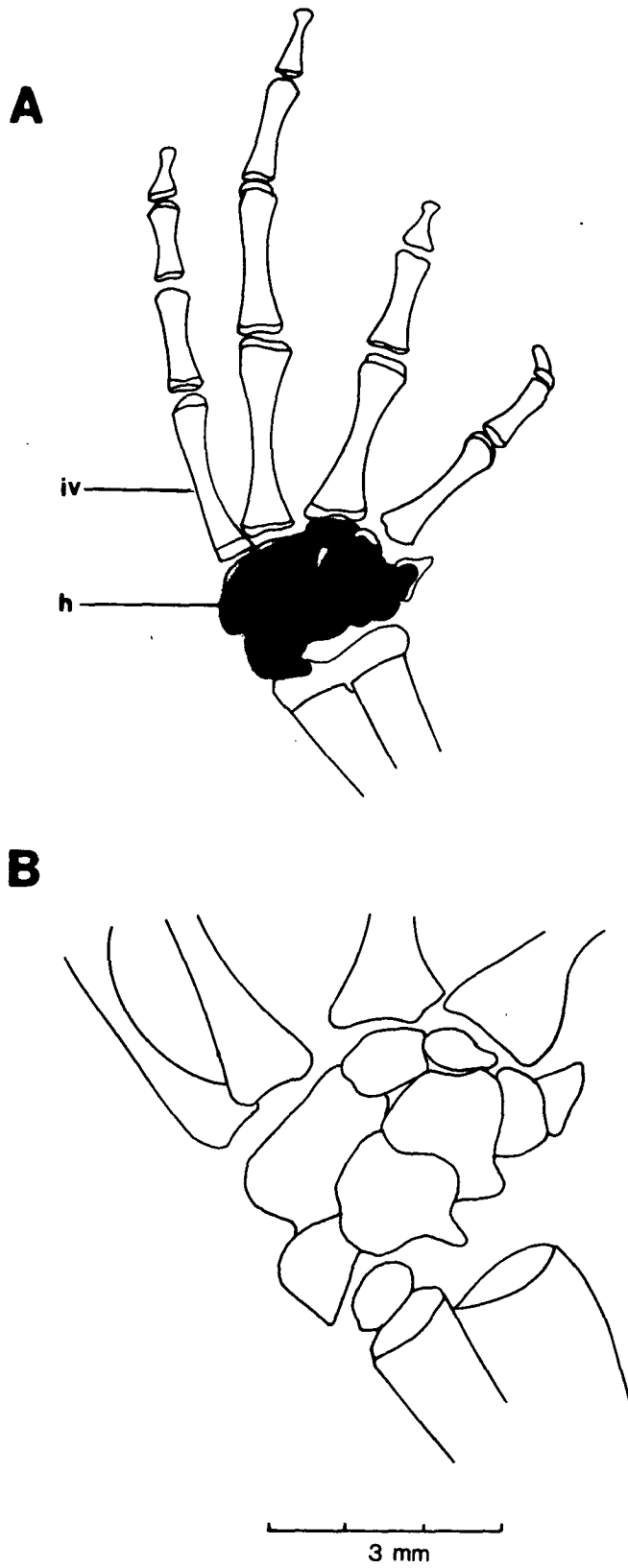


Figura 48.- Composición del carpo adulto en la familia Pelodytidae. En norma dorsal: A, Pelodytes punctatus; B, P. caucasicus. iv, cuarto metacarpiano; h, hamatum.

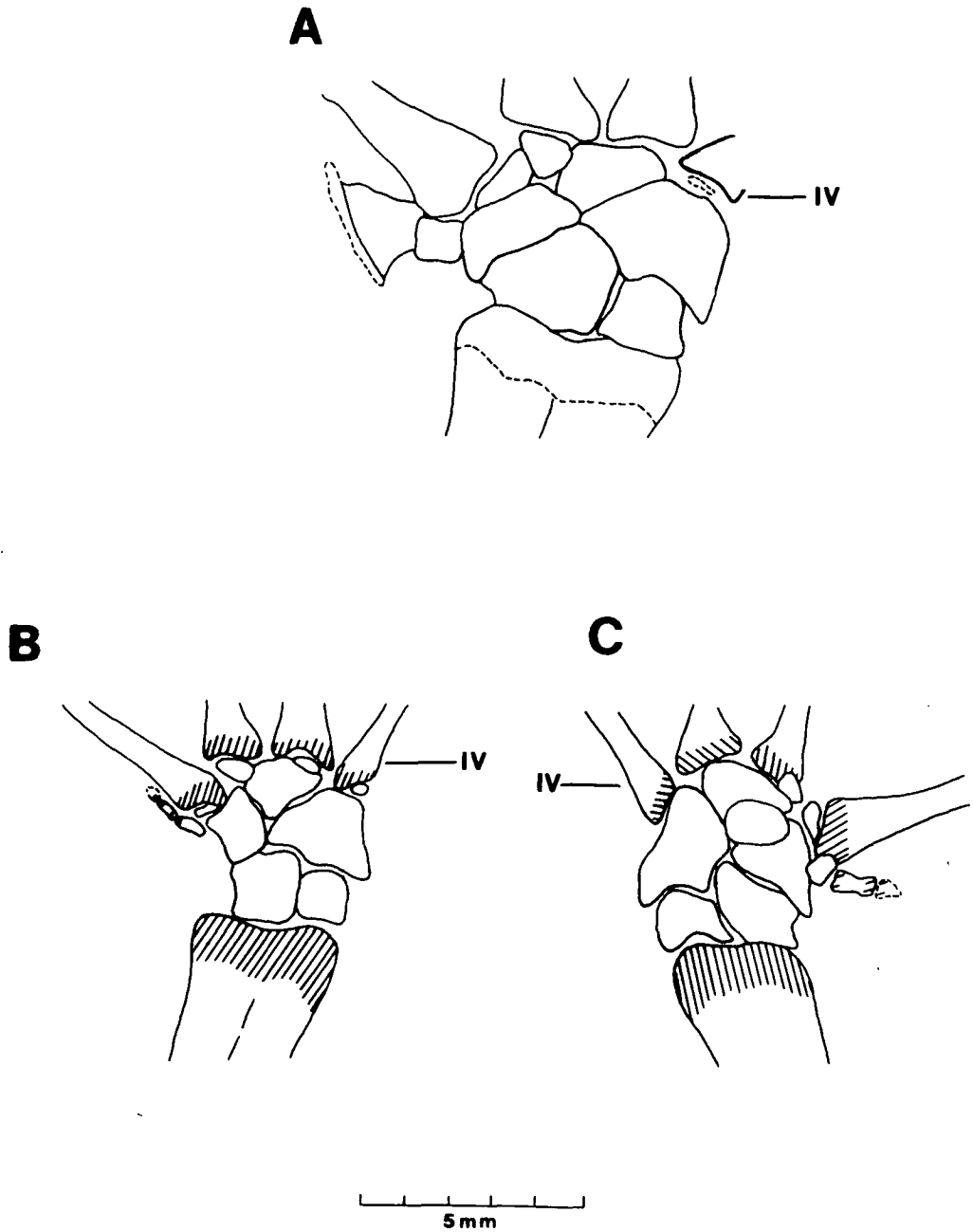


Figura 49.- Composición del carpo adulto en la familia Megophryidae. En norma dorsal: A, *Megophrys montana*; B, *Leptobrachium hasseltii*. En norma ventral: C, *Leptobrachium hasseltii*. Línea continua, hueso; línea discontinua, cartilago; rayas, cartilago calcificado. IV, cuarto metacarpiano.

actuales, y hasta la fecha no se habían encontrado más variaciones. Reproducimos las ilustraciones originales en la figura 50. Si prescindimos de las variaciones en el número de elementos provocadas por el distinto número de falanges en el prepollex (las cinco señaladas con un asterisco en la figura 50), nos quedamos con que estos autores describieron cinco modelos distintos de carpo. A ellos hay que añadir ahora los de Pelobates y Pelodytes, debido a la presencia en ellos del subulnar - osificación descrita por Howes & Ridewood en el siglo pasado, pero a la que no dieron importancia por considerarla perteneciente a la epífisis de la radioulna. Nosotros hemos puesto de manifiesto en nuestro estudio que este elemento tiene existencia independiente en una etapa del desarrollo (estadios 39 y 40. Ver lámina VII C) y que su osificación es de tipo endocondral, igual que la de los restantes elementos del carpo. Finalmente, hemos de incorporar el modelo de carpo de Leptobrachium, el único anuro actual descrito hasta el momento con todos los elementos carpales independientes de los centrales. Hemos de añadir que entre las especies fósiles se han descrito cuatro cuyos carpos presentaban libre el carpal 4, a saber: Palaeobatrachus grandipes (Spinar, 1972; Jarosova, 1973), de la extinguida familia Palaeobatrachidae, y Cordicephalus gracilis, C. longicostatus y Thoraciliacus rostriceps (Nevo, 1968), de la familia Pipidae.

-----

En cuanto al número de centros de condricación, a lo largo del desarrollo del carpo de Pelobates cultripes hemos descrito diecisiete, que luego se fusionan entre sí, dando lugar finalmente a diez centros de osificación distintos.

En Pelodytes punctatus hemos detectado catorce centros de condricación independientes, cuya fusión ulterior origina nueve huesos. La secuencia y estadio de desarrollo en que aparecen se reseña en la tabla 34. En esta especie, el intermedio, el central 3 y el carpal 5 no condrican; el subulnar sólo aparece claramente individualizado en un ejemplar de estadio 41, en los demás renacuajos estudiados es una yema que no llega a desprenderse completamente de la epífisis distal de la radioulna. En cambio, hemos detectado un carpal 1 accesorio, completamente ventral al carpal 1 típico, en ambas manos de un renacuajo de estadio 38 y un central 3 en un renacuajo de

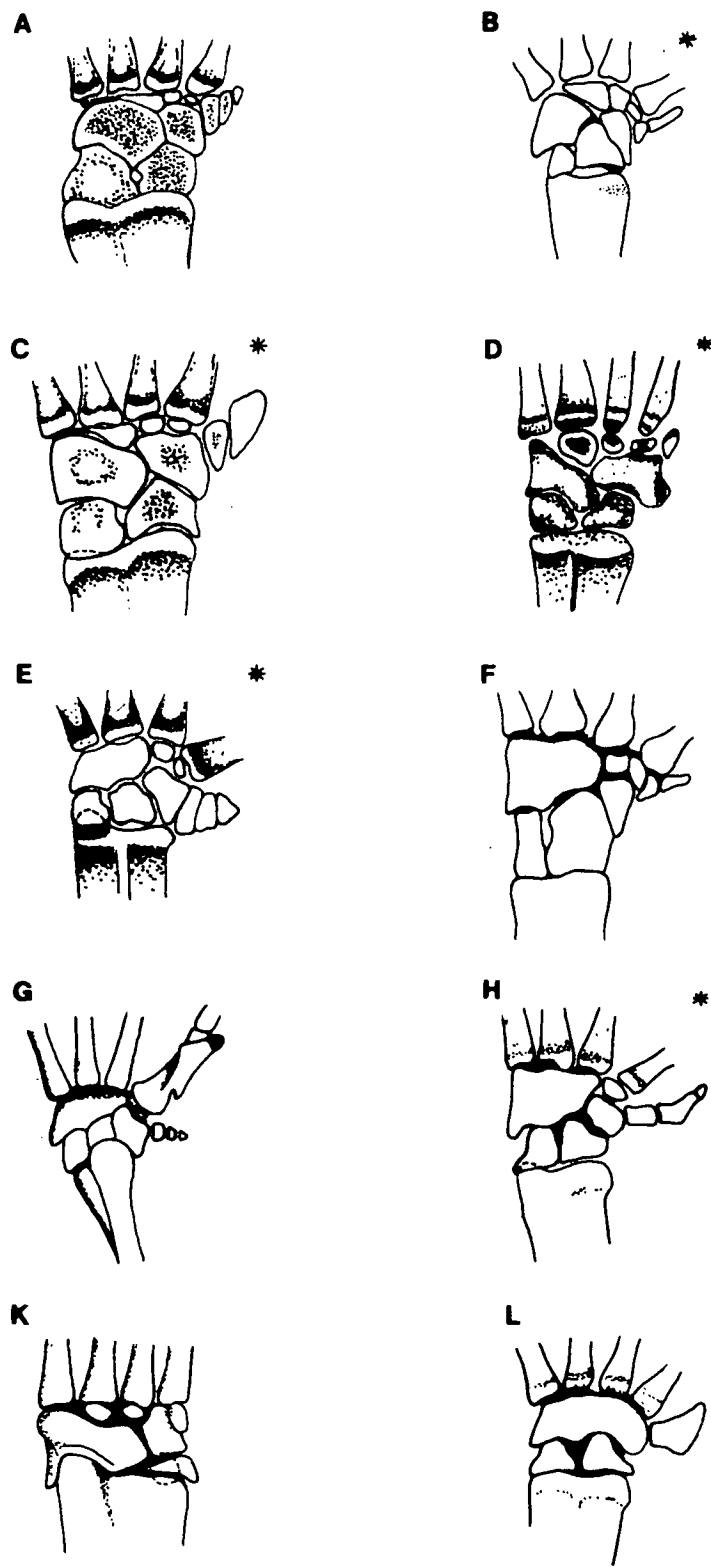


Figura 50.- Reproducción de los tipos de carpo descritos por Howes & Ridewood (1898). Los cinco tipos señalados con un asterisco indican variedades debidas, exclusivamente, al distinto número de falanges en el prepollex. A, "Bombinator igneus" (= Bombina bombina); B, Pelobates fuscus; C, Discoglossus pictus; D, Xenopus laevis; E, Pelodytes punctatus; F, Pseudophryne briboni; G, Leptodactylus pentadactylus; H, Hyla caerulea; K, Pipa americana, y L, Rhombophryne testudo.

Tabla 34.- Secuencia de condricación del carpo de Pelobates cultripes y Pelodytes punctatus, y estadio de desarrollo (Gosner, 1960) en que se produce cada acontecimiento.

Pelobates cultripes

Pelodytes punctatus

Elementos cartilaginosos	Estadio
Radial .....	35
Central 4 .....	35
Ulnar .....	35
Carpal 3 .....	36
Central 1.....	36
Pisiforme.....	37
Intermedio .....	37
Central 3 .....	37
Carpal 2 .....	37
Central 2 .....	37
Elemento Y .....	37
Carpal 1 .....	37
Prepollex 1 .....	37
Carpal 5 .....	38
Prepollex 2 .....	38
Subulnar .....	38
Prepollex 3 .....	40

Elementos cartilaginosos	Estadio
Ulnar .....	34
Carpal 3.....	34
Radial .....	34
Central 1 .....	35
Central 4 .....	35
Pisiforme .....	36
Central 2 .....	36
Carpal 2 .....	37
Elemento Y .....	37
Carpal 1 .....	38
Prepollex 1 .....	38
Prepollex 2 .....	39
Prepollex 3 .....	41
Subulnar .....	38-41

Fusiones	Estadio
Central 3 + Carpal 3 .....	37
Central 2 + Elemento Y .....	38
Radial + Intermedio + Central 1	39
Ulnar + Pisiforme .....	39
Central 4 + Carpal 5 .....	41
Prepollex 2 + Prepollex 3 .....	41
Subulnar + Epífisis radioulna .	41

Fusiones	Estadio
Ulnar + Pisiforme .....	37
Radial + Central 1.....	37
Central 4 + Carpal 3 .....	37
Central 2 + Elemento Y .....	38
Subulnar + Epífisis .....	41

estadio 37. La interpretación de estas excepciones no es fácil. En el caso del carpal 1 accesorio creo que debemos considerar la posibilidad de un origen doble de dicho elemento, eventualidad que en mi opinión también debe extenderse al carpal 2, aunque, de momento, no disponemos de evidencias concluyentes al respecto.

El desarrollo del carpo de Pelobates fuscus despertó gran interés a finales del siglo pasado y principios de éste, desde el trabajo de Emery en 1894, pasando por el de Schmalhausen (1907), hasta el de Holgrem (1933). Cada autor añade elementos nuevos en su descripción, que coinciden con los detectados por nosotros en P. cultripes, faltando de sus descripciones sólo el prepollex 3 y el subulnar. Dado que el subulnar tiene existencia independiente en los adultos de P. fuscus (figura 47 D), y que junto con el prepollex 3 son los dos últimos elementos en aparecer en la condricación del carpo de P. cultripes, suponemos que su ausencia de las descripciones de los autores anteriores se debe a que éstos no estudiaron material de los estadios más avanzados del desarrollo (38-41 de la tabla de Gosner). Nuestra suposición se basa en que todas las figuras que presentan son de estadios anteriores.

No existen otras descripciones del desarrollo del carpo de miembros de las familias Pelobatidae, Pelodytidae y Megophryidae. Sería deseable, muy especialmente, el estudio del desarrollo del carpo de Leptobranchium hasseltii.

Lo más importante que se conoce del desarrollo del carpo de las restantes especies de anuros lo resume Holgrem (1933), detallando el desarrollo en Xenopus laevis (Pipidae), Telmatobius jelskii (Leptodactylidae), Rana temporaria (Ranidae), Bombinator igneus (= Bombina bombina) (Discoglossidae) y Bufo bufo (Bufonidae). El establecimiento de homologías entre los elementos cartilagosos presentes en el carpo de estas especies y los de Pelobates y Pelodytes exige el estudio de material abundante de dichas especies; y además, abordar el problema del desarrollo del carpo en anuros y su posible importancia filogenética sin ideas preconcebidas sobre el número de elementos cartilagosos proximales, centrales y distales que han de hallarse presentes. Estas ideas, heredadas del modelo de desarrollo del carpo de los tetrápodos propuesto por Holgrem en 1933, y que, inevitablemente, los investigadores posteriores han intentado justificar (p.e: Jarosova, 1973;

Saint-Aubain, 1981), dificultan la comprensión del número de centros de condricación realmente independientes que cada autor observó.

La duración del proceso del condricación del carpo de Pelobates cultripes a temperatura óptima es de 13.5 días (entre los estadios 35 y 40) y en Pelodytes punctatus transcurre entre los estadios 34 y 41 de la tabla de Gosner.

En Pelobates cultripes, P. varaldii y Pelodytes punctatus sólo hay un centro de osificación por cada hueso del carpo. No sabemos como transcurre el proceso en las demás especies, pero, hasta la fecha, no hay motivos para esperar más de un centro de osificación por hueso.

-----

En cuanto a la secuencia de osificación del carpo, hemos dividido la de Pelobates cultripes en dos fases. La primera, afecta a los huesos que hemos llamado centrales y se desarrolla en los diez días posteriores a la metamorfosis, en el siguiente orden: postaxialcentral, preaxialcentral, radial, carpal 3 y ulnar. La segunda, que hemos denominado de los huesos periféricos, se inicia después de alcanzada la madurez sexual y comprende el prepollex 1, prepollex 2, carpal 2, subulnar y carpal 1. A primera vista, parece que los huesos osifican por orden de tamaño.

De P. varaldii hemos estudiado los carpos de dos recién metamorfoseados, cinco adultos de un año (dos machos y tres hembras) y 30 adultos de más de un año (16 machos y 14 hembras). Aunque suponemos que la secuencia de osificación del bloque central es igual que la de P. cultripes, sólo podemos afirmar con seguridad que el postaxialcentral es el primer hueso en iniciar la osificación y que de los huesos periféricos el último en osificar es el carpal 1, el penúltimo el subulnar, el antepenúltimo el carpal 2 y los primeros ambas falanges del prepollex. Al igual que en P. cultripes, en P. varaldii existe dimorfismo sexual en el estado de osificación de los elementos del carpo periférico. En los individuos de un año cumplido (n = 5), tanto los machos como las hembras tenían los cinco elementos en estado cartilaginoso todavía. En todos los machos de más de dos años de edad (n = 16) los cinco elementos habían iniciado su osificación. Y de las 14 hembras

de más de dos años sólo en dos de ellas, una de 4 años (LCC = 65 mm) y otra de 5 (LCC = 53 mm) faltaban por osificar en la primera tres huesos y en la segunda uno; sin embargo, las correlaciones en las hembras de dos o más años entre el número de elementos osificados del carpo y la edad a partir de los dos años ( $r_s = 0.0954$ ;  $S = 411.59$ ;  $n = 14$ ;  $P \gg 0.10$ ) y entre el número de huesos y LCC ( $r_s = 0.0109$ ;  $S = 450.04$ ;  $n = 14$ ;  $P \gg 0.10$ ) no resultaron significativas. Aunque son altamente significativas en ambos supuestos y en ambos sexos si se incluyen los individuos de un año. Ver tabla 35.

En la figura 51 se presenta el diagrama de dispersión del estado de osificación del carpo de 37 P. varaldii frente a la edad, y en la figura 52 frente al tamaño.

En la figura 53 se compara el estado de osificación de los recién metamorfoseados, juveniles y hembras de P. cultripes y P. varaldii en relación con su tamaño. La representación gráfica muestra con claridad que, a igualdad de tamaño, la osificación del carpo de P. varaldii está mucho más avanzada que la de P. cultripes. Lo mismo sucede entre ambas especies cuando se comparan hembras de la misma edad, como se refleja en la figura 54. Esto está ligado al alcance de la madurez sexual en P. varaldii a menor edad y menor tamaño. Esta especie, respecto a P. cultripes, muestra mayor osificación del carpo y disminución en el grado de osificación del cráneo.

De la secuencia de osificación del carpo de P. fuscus nada podemos decir, puesto que los 7 machos estudiados presentaban el proceso finalizado. De P. syriacus, la única hembra examinada tenía ya los diez huesos, y el juvenil de pocos meses -no había sufrido todavía su primer periodo de reposo- presentaba osificados los cinco huesos centrales y el prepollex 2.

Nada podemos avanzar tampoco de la secuencia de osificación en Scaphiopus couchii ( $n = 9$ ), Spea multiplicatus ( $n = 10$ ), Megophrys montana ( $n = 10$ ) y Leptobrachium hasseltii ( $n = 1$ ), ya que todos los ejemplares estudiados eran machos y habían completado el proceso.

En cuanto a la secuencia de osificación de Pelodytes punctatus, ninguno de los once sapitos de dos semanas de edad estudiados presentaba osificación

Tabla 35.- 'Pelobates varaldii. Coeficientes de correlación de Spearman ( $r_s$ ) entre el número de elementos osificados en el carpo y la edad, y entre dicho número y el tamaño.

	EDAD (nº de años)		Tamaño (LCC en mm)	
MACHOS	$r_s = 0.5641$	$n = 18$	$r_s = 0.5472$	$n = 18$
	$S = 422.39$	$P < 0.01^{**}$	$S = 438.76$	$P = 0.01^{**}$
MACHOS > 2años	no se puede calcular porque en todos los individuos el número de huesos es el mismo y, por tanto, la desviación típica es 0			
HEMBRAS	$r_s = 0.5972$	$n = 17$	$r_s = 0.5512$	$n = 17$
	$S = 328.68$	$P < 0.01^{**}$	$S = 366.22$	$P < 0.05^*$
HEMBRAS > 2años	$r_s = 0.0954$	$n = 14$	$r_s = 0.109$	$n = 14$
	$S = 411.59$	$P > 0.10$	$S = 450.04$	$P > 0.10$
TODA LA POBLACION	$r_s = 0.6405$	$n = 37$	$r_s = 0.6093$	$n = 37$
	$P < 0.001^{***}$		$P < 0.001^{***}$	

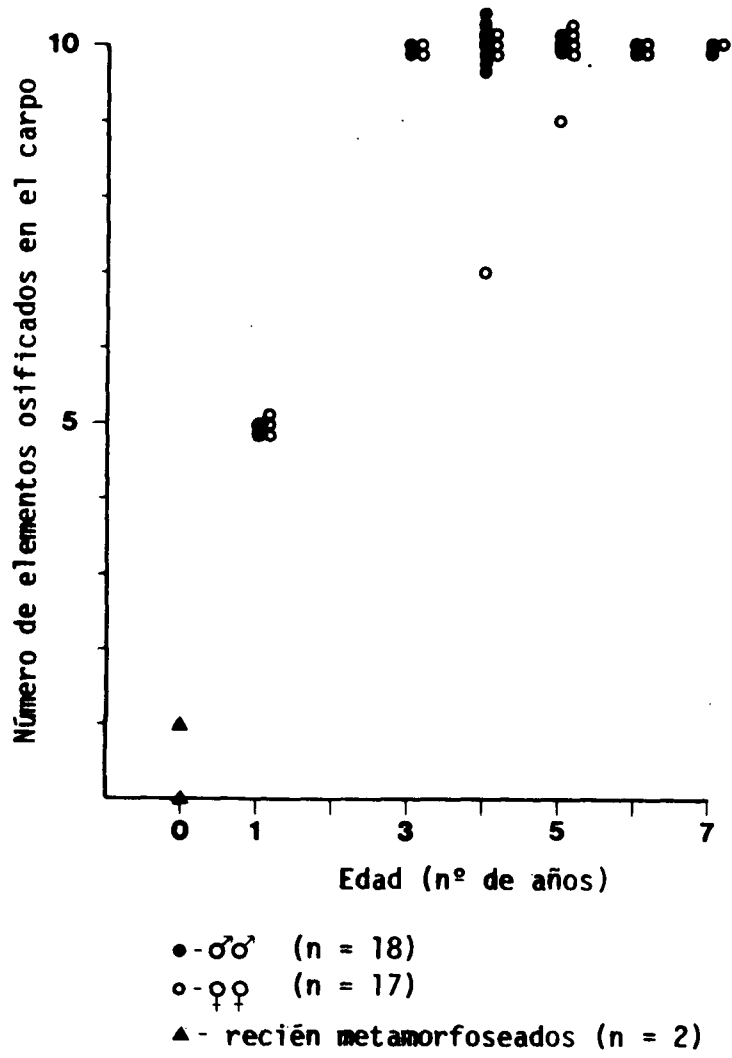


Figura 51.- Pelobates varaldii. Número de elementos del cuerpo osificados en relación con la edad.

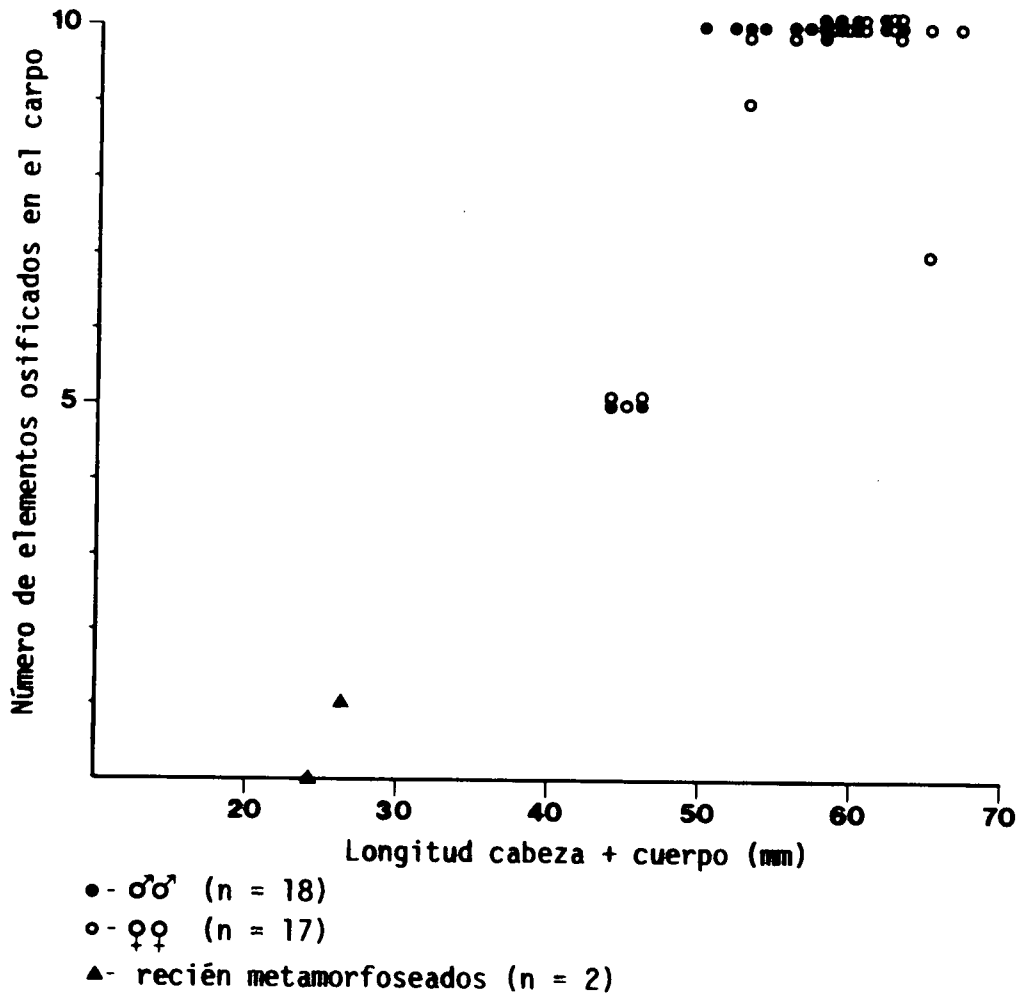


Figura 52.- *Pelobates varaldii*. Número de elementos del cuerpo osificados en relación con el tamaño (LCC).

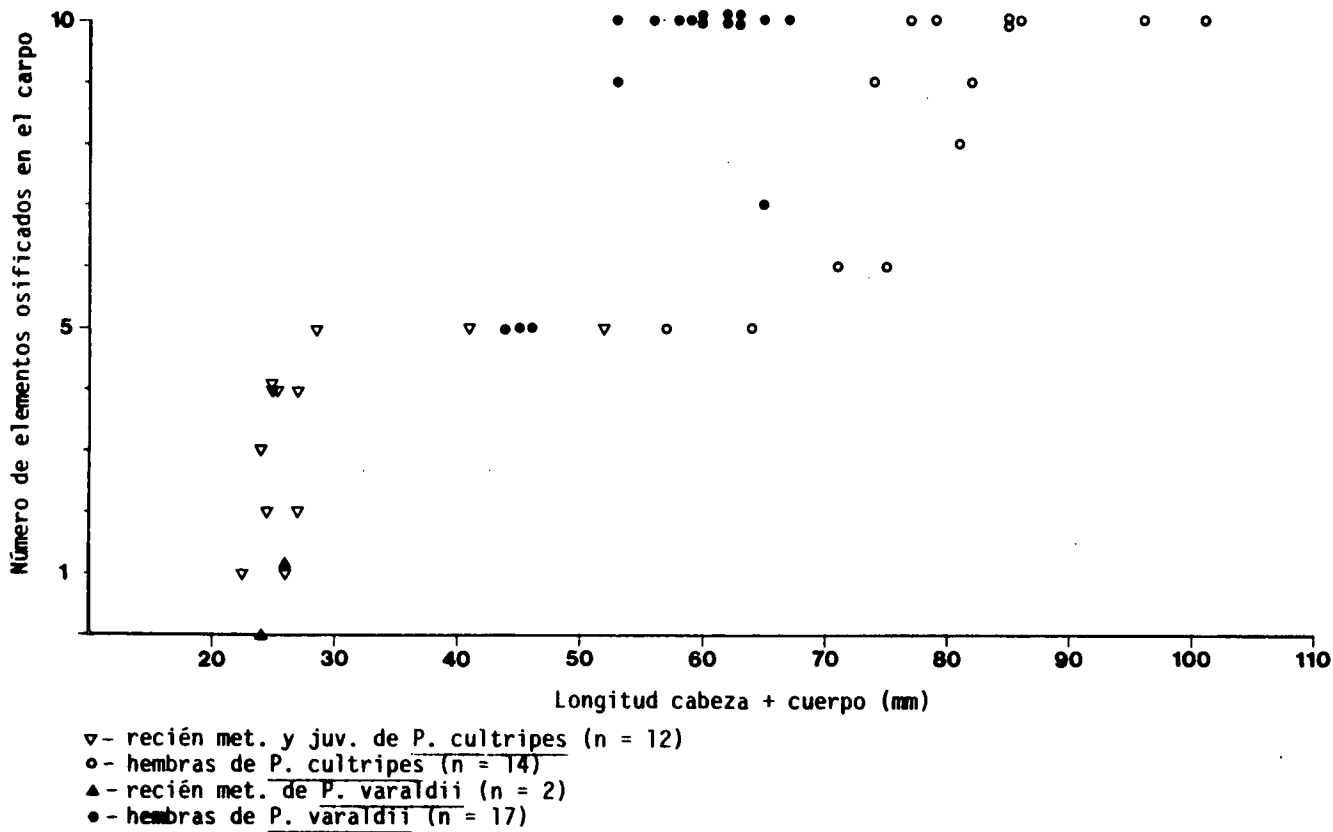
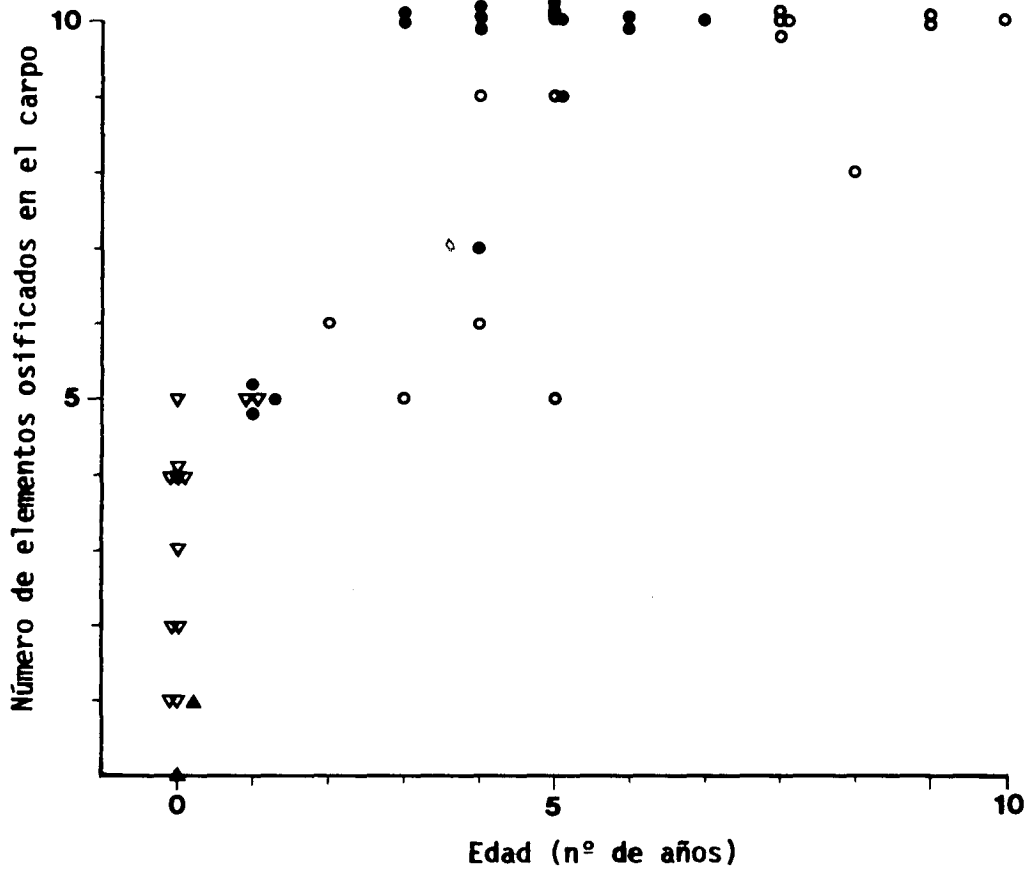


Figura 53.- Diferencias entre *Pelobates cultripes* y *P. varaldii* en el estado de osificación del cuerpo en relación con el tamaño.



- ▽-recién met. y juv. de *P. cultripes* (n = 12)
- hembras de *P. cultripes* (n = 14)
- ▲-recién met. de *P. varaldii* (n = 2)
- hembras de *P. varaldii* (n = 17)

Figura 54.- Diferencias entre *Pelobates cultripes* y *P. varaldii* en el estado de osificación del cuerpo en relación con la edad.

en su carpo. Y de 30 adultos (26 machos y 4 hembras), sólo tres hembras presentaban distinto grado de osificación. De donde pudimos deducir que los cuatro últimos huesos que inician su osificación en P. punctatus son, por este orden: prepollex 2, carpal 2, carpal 1 y subulnar. Por tanto, también en Pelodytes hay dimorfismo sexual en el estado de osificación del carpo. Si admitimos que los huesos del carpo deben iniciar su osificación por orden de tamaño, al igual que en P. cultripes, la secuencia de Pelodytes punctatus sería la siguiente: hamatum, postaxialcentral, radial, ulnar, prepollex 1, prepollex 2, carpal 2, carpal 1 y subulnar. La comprobación de esta hipótesis sólo requeriría estudiar diez juveniles de distintos tamaños y diez hembras.

-----

En cuanto a la duración del proceso de inicio de la osificación en el carpo, ya hemos visto que es distinta en machos y en hembras. En machos de P. cultripes, el proceso emplea entre 3 y 4 años; en hembras unos 8 años. En P. varaldii, la osificación se ha iniciado en los diez elementos del carpo en los machos entre el fin de la metamorfosis y el año siguiente al de la madurez sexual, es decir, el segundo año; en algunas hembras hasta un poco más tarde, pero en la mayoría a los dos años también. No sabemos casi nada del factor tiempo de este proceso en las restantes especies de anuros, excepto lo ya descrito de que existe dimorfismo sexual, al menos en Pelodytes punctatus.

Las trayectorias ontogenéticas del proceso de osificación de la cintura escapular y miembro anterior de Pelobates cultripes y Pelodytes punctatus se han dibujado en la figura 55. Los datos en que se basan ambas trayectorias pueden consultarse en la tabla 36.

En cuanto a las alteraciones en el número de elementos del carpo, lo más importante que hay que resaltar es que apenas existen. En Pelobates cultripes no se ha detectado ninguna, después de estudiar 34 juveniles y 45 adultos; en P. varaldii tampoco (n = 37), ni en P. fuscus (n = 7), ni en P. syriacus (n = 2). En Scaphiopus couchii (n = 9) y en Spea multiplicatus (n = 10) no se ha detectado variabilidad alguna, y lo mismo podemos afirmar de Megophrys montana (n = 10). En Pelodytes punctatus, sólo un ejemplar (3.33%) presentaba una sola falange en los prepollex de ambas manos, en vez de dos como es habitual; otro ejemplar presentaba excrecencias óseas en ambas

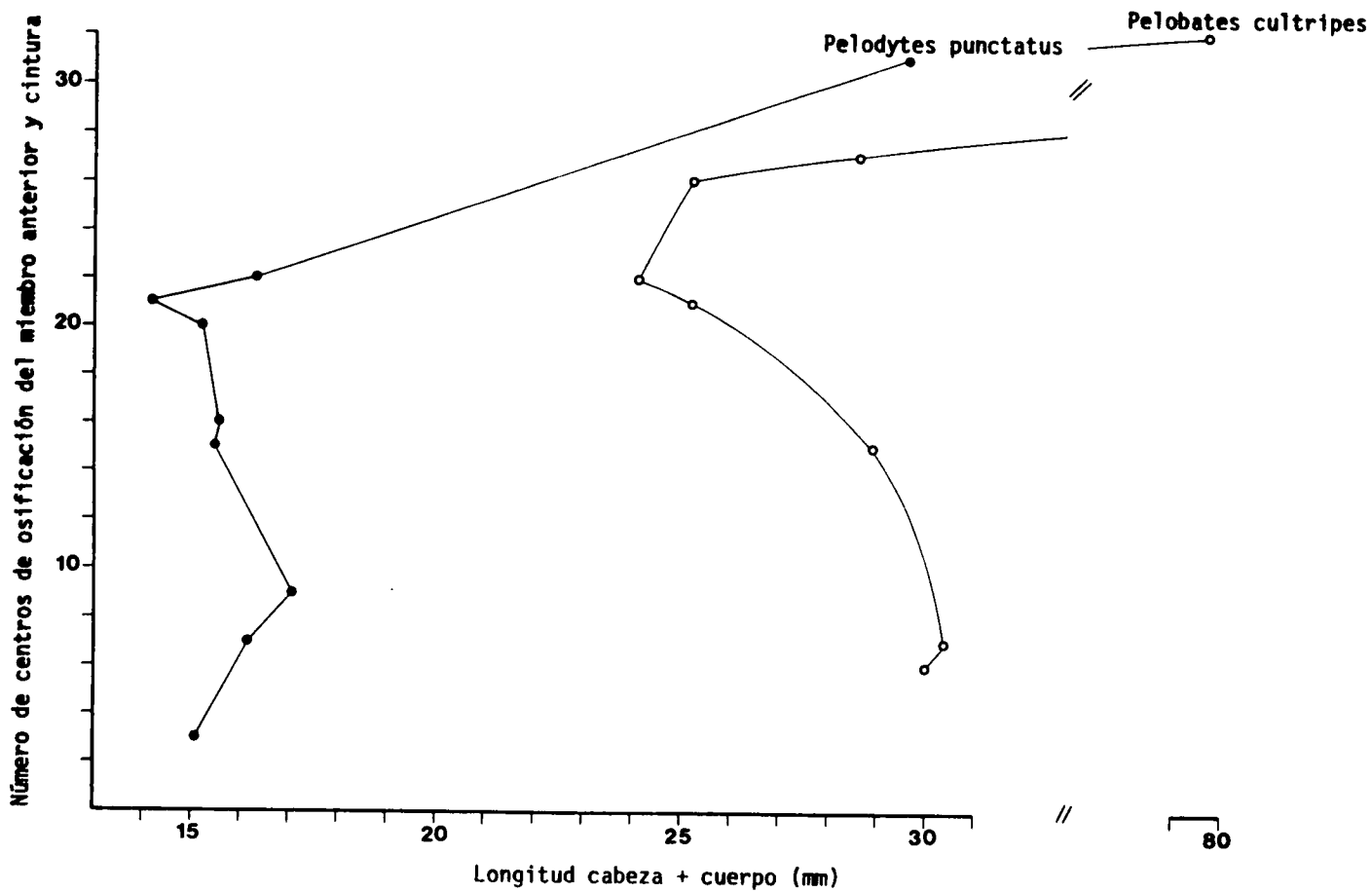


Figura 55.- Trayectorias ontogénicas de los proceso de osificación de los miembros anteriores y cinturas escapulares de Pelobates cultripes y Pelodytes punctatus.

Tabla 36.- Miembro anterior y cintura escapular. Número de centros de osificación existentes, por término medio, y longitud media cabeza + cuerpo (LCC, en mm) en cada estadio de desarrollo (Gosner, 1960) en Pelobates cultripes y Pelodytes punctatus.

Estadio de Gosner	Pelobates cultripes		Pelodytes punctatus	
	LCC (mm)	Nº centros	LCC (mm)	Nº centros
37			15.06	3
38	28.94	6	16.14	7
39	30.36	7	17.06	9
40	28.85	15		
41	25.19	21	15.44	15
42			15.66	16
43			15.20	20
44				
45			14.16	21
46	24.07	22		
1ª sem.	25.15	26		
2ª sem.	28.57	27	16.30	22
Adultos	79.72	32	30.59	31

falanges del prepollex, además de en los metacarpianos. Por tanto, vemos que las únicas malformaciones detectadas en el carpo afectan al número de falanges del prepollex.

-----

### 3.2.4. MIEMBRO POSTERIOR Y CINTURA PELVIANA

#### 3.2.4.1. Descripción del miembro posterior y de la cintura pelviana adulta de Pelobates cultripes

El miembro posterior de Pelobates cultripes está constituido por dos huesos largos, siete elementos tarsales, cinco metatarsianos y catorce falanges, cuya fórmula es: 2, 2, 3, 4, 3.

La cintura pelviana consta de dos huesos, uno par, el ilion, y otro medial, el isquion.

La figura 56 muestra la morfología adulta, posición anatómica y denominación de los huesos del miembro posterior y cintura pelviana de P. cultripes.

#### 3.2.4.2. Secuencia de osificación del miembro posterior y de la cintura pelviana de Pelobates cultripes

Los treinta huesos (29 pares y uno medial) del miembro posterior y cintura pelviana de P. cultripes se forman a partir de 31 centros de osificación, todos pares. Para mayor claridad, los dividimos en tres segmentos y relatamos por separado sus secuencias de osificación.

El primer segmento agrupa a los dos huesos largos de la pata posterior y a los dos huesos de la cintura pelviana. Osifican en el siguiente orden: fémur, ilion, tibia y fíbula (en el estadio 38) e isquion (en el estadio 44).

La tibiofíbula osifica a partir de dos centros adyacentes, correspondientes uno a la tibia y otro a la fíbula. Se fusionan inmediatamente después de su aparición. El proceso de osificación determina la asociación de ambos elementos; en estado cartilaginoso las dos piezas permanecen independizadas (estadios 30 - 36; figura 57 A - F) y antes de que se inicie su osificación adquieren epifisis comunes: primero la proximal (estadio 35) y

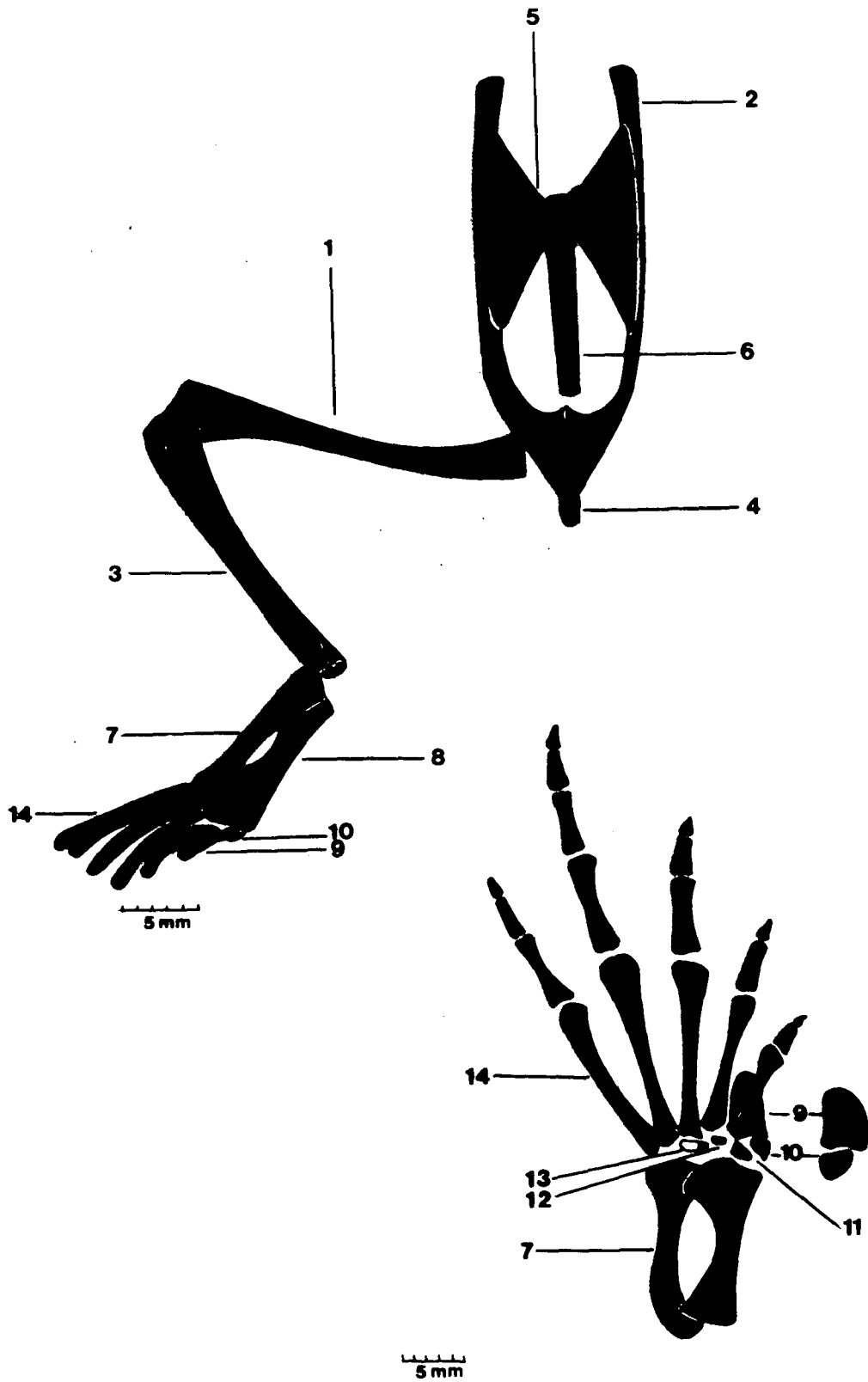


Figura 56.- Morfología, posición anatómica y denominación de los huesos de la pata posterior y cintura pelviana de *Pelobates cultripes*. 1, fémur; 2, ilion; 3, tibiofibula; 4, isquion; 5, sacro; 6, urostilo; 7, fibular; 8, tibial; 9, prehallux 2; 10, prehallux 1; 11, central; 12, tarsal 2; 13, tarsal 3, y 14, quinto metatarsiano.

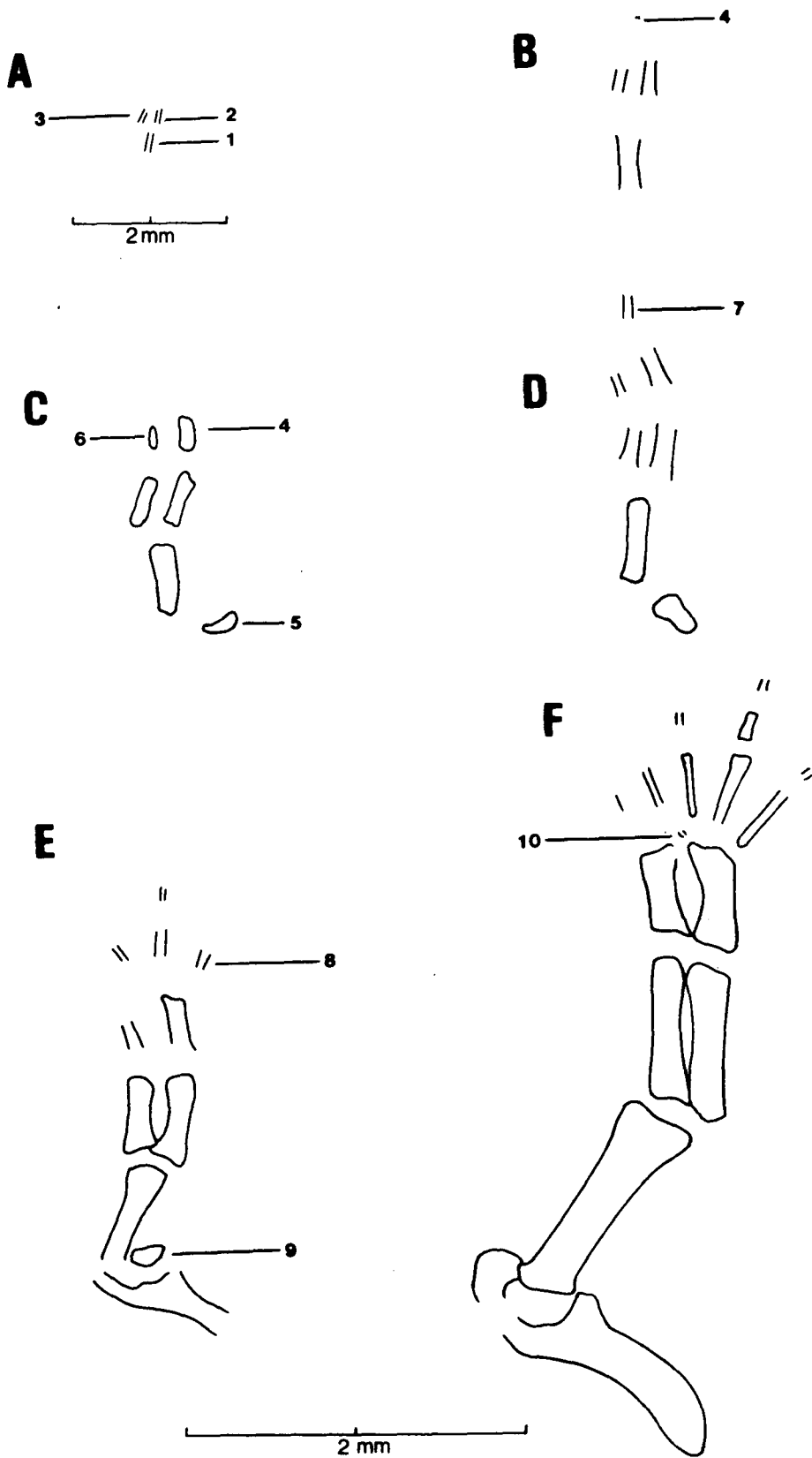


Figura 57.- Pelobates cultripes. Desarrollo de la pata posterior y de la cintura pelviana entre los estadios 31 y 36 (Gosner, 1960). Secuencia de aparición de los distintos elementos. **A**, estadio 31; **B**, estadio 32; **C**, estadio 33; **D**, estadio 34; **E**, estadio 35; **F**, estadio 36. 1, fémur; 2, fibula; 3, tibia; 4, fibular; 5, ilion; 6, tibial; 7, metatarsiano IV; 8, metatarsiano V; 9, isquion, y 10, tarsal 3.

después la distal (estadio 36). Ver figura 58 A y B, y lámina VIII A y B.

El isquion osifica también a partir de dos centros en el estadio 44. En el estadio 35 condricifican dos piezas independientes y ampliamente separadas (figura 57 E y F), cada una adosada al extremo posterior de su ilion. En ningún momento del desarrollo aparece alguna otra pieza independiente que se pueda asociar al pubis.

Estos cuatro huesos derivan de cinco centros de condricificación y otros tantos de osificación, todos pares. La secuencia y estadio de Gosner en que aparecen durante el desarrollo larvario de P. cultripes se detalla en la tabla 37. Las dos secuencias no coinciden. Por ejemplo: el ilion osifica en segundo lugar, pero es el cuarto elemento en condricificar; la tibia y la fíbula inician su osificación a la vez, a pesar de que la fíbula aparece ligeramente antes en estado cartilaginoso.

En la tabla 38 se señala, para cada estadio de Gosner, el porcentaje de individuos examinados en que cada centro había iniciado su osificación.

La duración del inicio de la osificación en este segmento es de 11,08 días por término medio; desde la edad de 21,25 días a que se alcanza el estadio 38, hasta los 32,33 días en que termina el estadio 44, a temperatura óptima.

La segunda etapa de la osificación está constituida por la mineralización de los cinco metatarsianos y las catorce falanges.

El primer elemento en condricificar es el metatarsiano del cuarto dedo en el estadio 34 (figura 57 D), que también es el primero en iniciar su osificación en el estadio 39. En ambos procesos le siguen los metatarsianos V y III. En una secuencia radial que tiene por eje principal el dedo IV continúan apareciendo los restantes metatarsianos y falanges en el orden y estadio de desarrollo que se indica en la tabla 39. Las figuras 57 y 58 muestran etapas sucesivas del proceso. Las últimas falanges en condricificar son las terminales de los dedos II y I, y las últimas en osificar ambas falanges del dedo I.

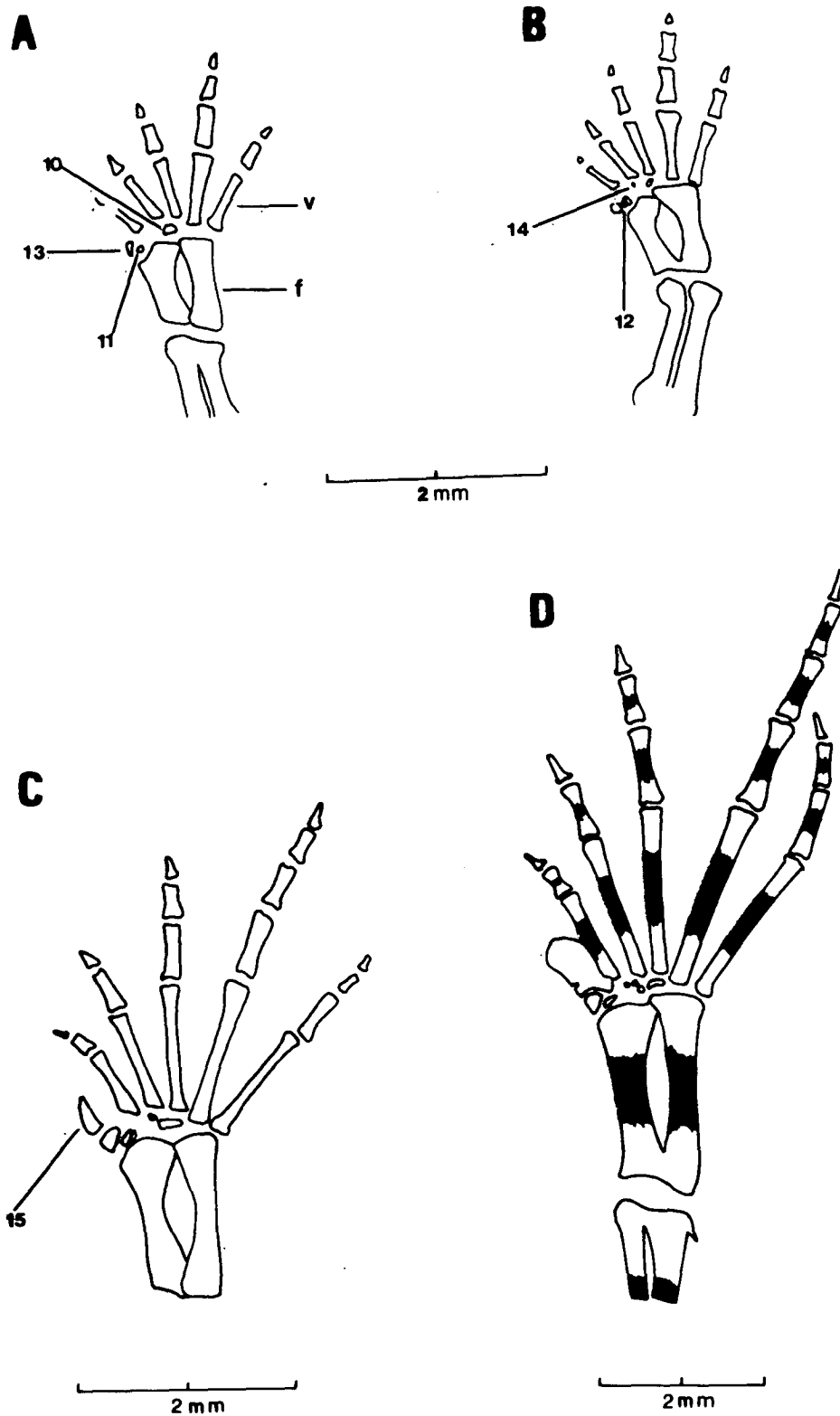


Figura 58.- Pelobates cultripes. Condricación del tarso y secuencias de condricación y de osificación de los metatarsianos y falanges entre los estadios 37 y 40 (Gosner, 1960). En blanco, el cartílago; en negro, el hueso. A, B y C, estadio 37; D, estadio 40. f, fibular; V, quinto metatarsiano; 10, tarsal 3; 11, central dorsal; 12, central ventral; 13, prehallux 1; 14, tarsal 2, y 15, prehallux 2.

Lámina VIII.- Desarrollo del tarso de Pelobates cultripes. En azul, el cartílago; en rojo, el hueso. **A**, estadio 36; obsérvese la independencia del tibial y el fibular. **B**, estadio 37; las epífisis del tibial y el fibular se han fusionado. **C**, estadio 39; la osificación se ha iniciado en todos los huesos largos; tibia y fibula a punto de finalizar su fusión. **D**, estadio 46; la flecha señala el centro de osificación de origen endocondral del prehallux 1. **F**, fibular, y **V**, quinto metatarsiano.

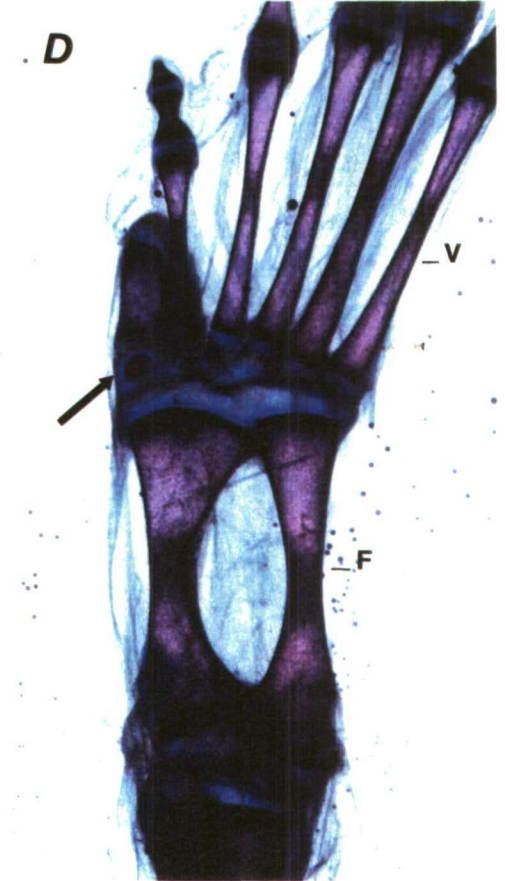
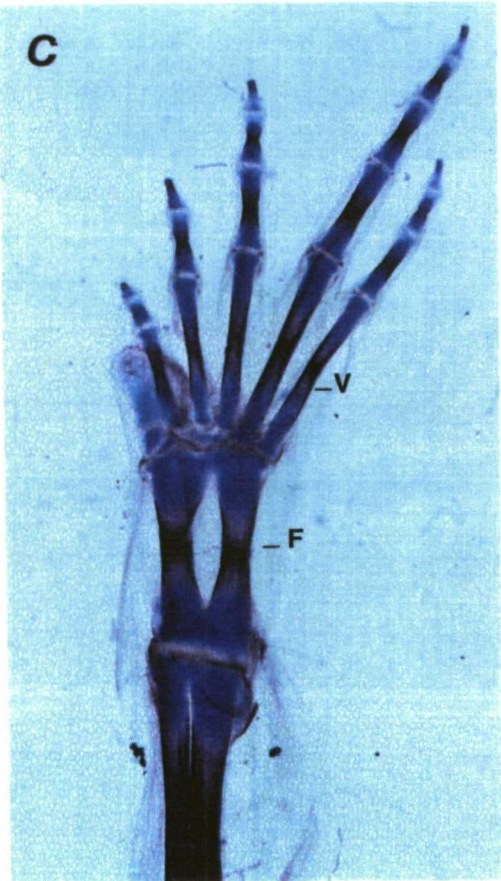
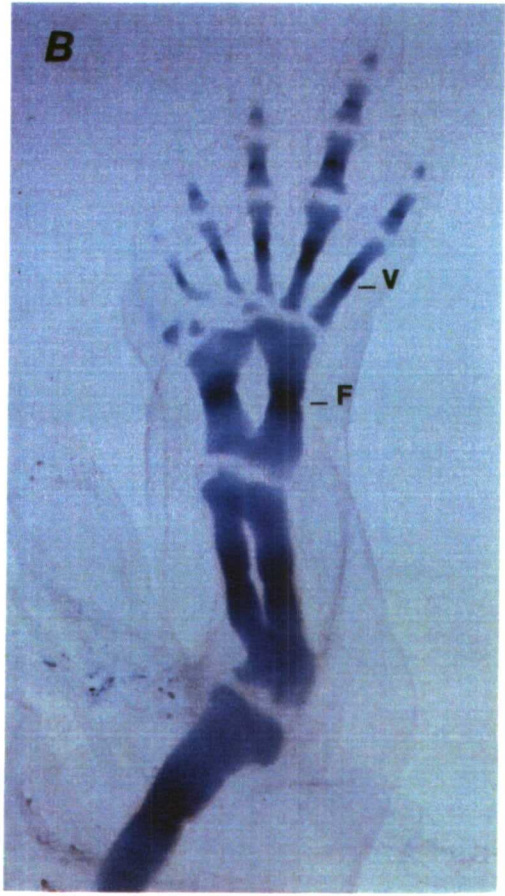
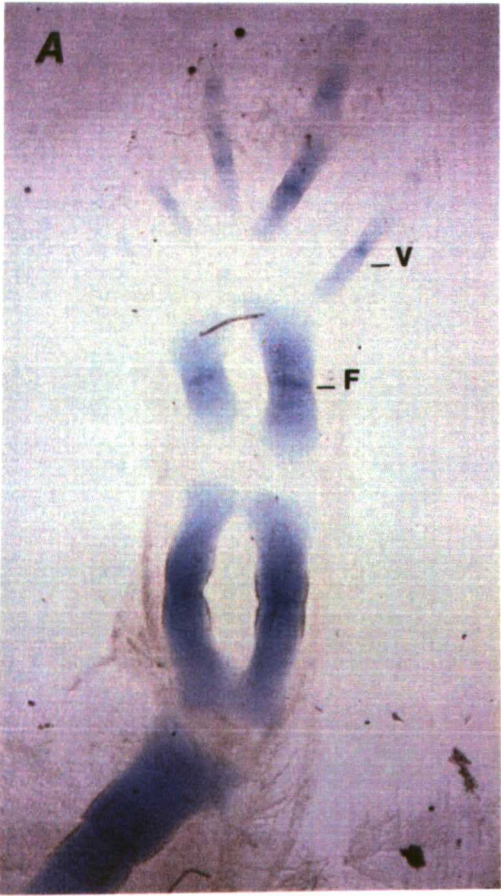


Tabla 37.- Pelobates cultripes. Secuencias de condricación y de osificación de la pata posterior y cintura pelviana.

SECUENCIA DE CONDRIFICACION				SECUENCIA DE OSIFICACION	
Elemento	Est. Gosner			Hueso	Est. Gosner
19	Fémur	29	i	Fémur	38
29	Fíbula	30	i	Ilion	38
39	Tibia	30	i	Fíbula	38
49	Ilion	32	i	Tibia	38
59	Isquion	35	i	Isquion	44



Tabla 39.- Pelobates cultripes. Secuencias de condricación y de osificación de los metatarsianos y falanges de la pata posterior, y estadio de desarrollo (Gosner, 1960) en que se produce cada acontecimiento.

SECUENCIA DE CONDRIFICACION		SECUENCIA DE OSIFICACION	
	Estadio Gosner -----		Estadio Gosner -----
Metatarsiano IV	34	Metatarsiano I	39
Metatarsiano V	35	Metatarsiano V	39
Metatarsiano III	35	Metatarsiano III	39
Falange IV.1	35	Falange IV.1	39
Metatarsiano II	35	Metatarsiano II	39
Falange V.1	36	Falange V.1	39
Falange III.1	36	Falange III.1	39
Falange IV.2	36	Falange IV.2	40
Metatarsiano I	36	Metatarsiano I	40
Falange II.1	37	Falange IV.3	40
Falange IV.3	37	Falange II.1	40
Falange III.2	37	Falange III.2	40
Falange V.2	37	Falange V.2	40
Falange I.1	37	Falange IV.4	40
Falange IV.4	37	Falange II.2	40
Falange III.3	37	Falange III.3	41
Falange V.3	37	Falange V.3	41
Falange II.2	37	Falange I.1	41
Falange I.2	37	Falange I.2	41

El inicio de la condricación de los dedos de la pata posterior de *P. cultripes* transcurre entre los estadios 34 y 37, mientras que en la mano el proceso se inicia ligeramente después (ver tabla 29). Su osificación se produce entre los estadios 39 y 41 (figura 58 D), a la vez que la de los dedos de la mano, y dura lo mismo: 3,88 días por término medio, desde la edad de 23,87 días hasta los 27,75 días.

El tercer segmento se refiere al tarso. Los siete elementos osifican en la siguiente secuencia: tibial y fibular, prehallux 2, prehallux 1, central, tarsal 2 y tarsal 3.

El tibial y el fibular inician su osificación simultáneamente en el estadio 39 (lámina VIII C). El fibular comienza a condricar antes, en el estadio 32; mientras el tibial se identifica por primera vez en el estadio 33. Al finalizar el estadio 36, ambas piezas presentan una epífisis proximal común, y al concluir el estadio 37, se fusionan también su epífisis distales. Ver figuras 57 F y 58 A - D, y lámina VIII A y B. Las dos piezas aparecen individualizadas en los esqueletos desarticulados de los adultos excepto en los ejemplares de mayor tamaño, en los cuales pueden separarse manualmente.

El inicio de la osificación en estas dos piezas, al igual que en los restantes huesos largos de los miembros, es de tipo pericondral. Es decir, alrededor de la diáfisis cartilaginosa se deposita una matriz ósea (ver fémur, tibia y fíbula en la lámina VIII A), constituida fundamentalmente por fibras de colágeno. Posteriormente se impregna de sales cálcicas y se hace susceptible a la tinción con alizarina roja (Hall, 1974). Poco más tarde, el cartilago es destruido y en su lugar se reconstruye hueso de tipo endocondral (ver cortes transversales de fémur en las láminas I, II y III para diferenciar los dos tipos de hueso). El prehallux 2, o hueso de la espuela, también osifica de esta manera. En cambio, los otros cuatro huesos del tarso, al igual que los del carpo, sufren osificación de tipo endocondral exclusivamente: el centro de osificación aparece en el interior de la pieza cartilaginosa. En las preparaciones se observa un núcleo teñido de rojo -hueso- rodeado completamente por tejido de color azul -cartilago-. Comparar las láminas 7 A y B con la 7C. Ver centros de osificación 1 y 2 del carpo, en la lámina VII D, y centro de osificación del prehallux 1, señalado con una flecha en la lámina

VIII D.

El tibial y el fibular, por su comportamiento en las secuencias de condricación y de osificación, y por el tipo de osificación que sufren, -si no fuera porque tradicionalmente se incluyen en el tarso-, deberían incluirse en el primer segmento descrito; es decir, en el de los huesos largos del miembro posterior y cintura pelviana.

El prehallux 2 es el tercer elemento del tarso en osificar, en el estadio 44 (figura 59 B), y el último en condricar, al final del estadio 37.

El prehallux 1 osifica en el estadio 46 (figura 59 C y lámina VIII D). El inicio de su mineralización señala el fin de la metamorfosis en el miembro posterior.

El central sólo osifica en algunos adultos. De su ontogenia, lo más destacable es su formación por fusión de dos piezas cartilaginosas, una dorsal y otra ventral, que aparecen en el estadio 37 (ver figura 58 A, B y C) y se fusionan en el 39. En los machos osifica en cuanto éstos alcanzan el tamaño y la edad media de la población a que pertenecen. En las hembras sólo osifica en algunas de las más viejas y de mayor tamaño.

El tarsal 2 condricar en el estadio 37 (figura 58 B). Osifica sólo en los machos (figura 59 E); a partir de los 80 mm de longitud cabeza + cuerpo en la población de Madrid, y a partir de los 74 mm de LCC en la de Porto Covo.

El tarsal 3 condricar en el estadio 36 (figura 57 F). Sólo osifica en los machos de tamaño y edad superior a la media en ambas poblaciones. Ver figura 59 F.

El tarsal 1 condricar sólo en algunos individuos. Si lo hace, su aparición se efectua en el estadio 44. Este elemento se encontraba presente en dos (18.20%) de los 11 P. cultripes entre el estadio 44 y la primera semana postmetamórfica examinados con este fin. En la población adulta de Madrid, el tarsal 1 se identificaba en el 6.90% de los ejemplares, siempre en estado

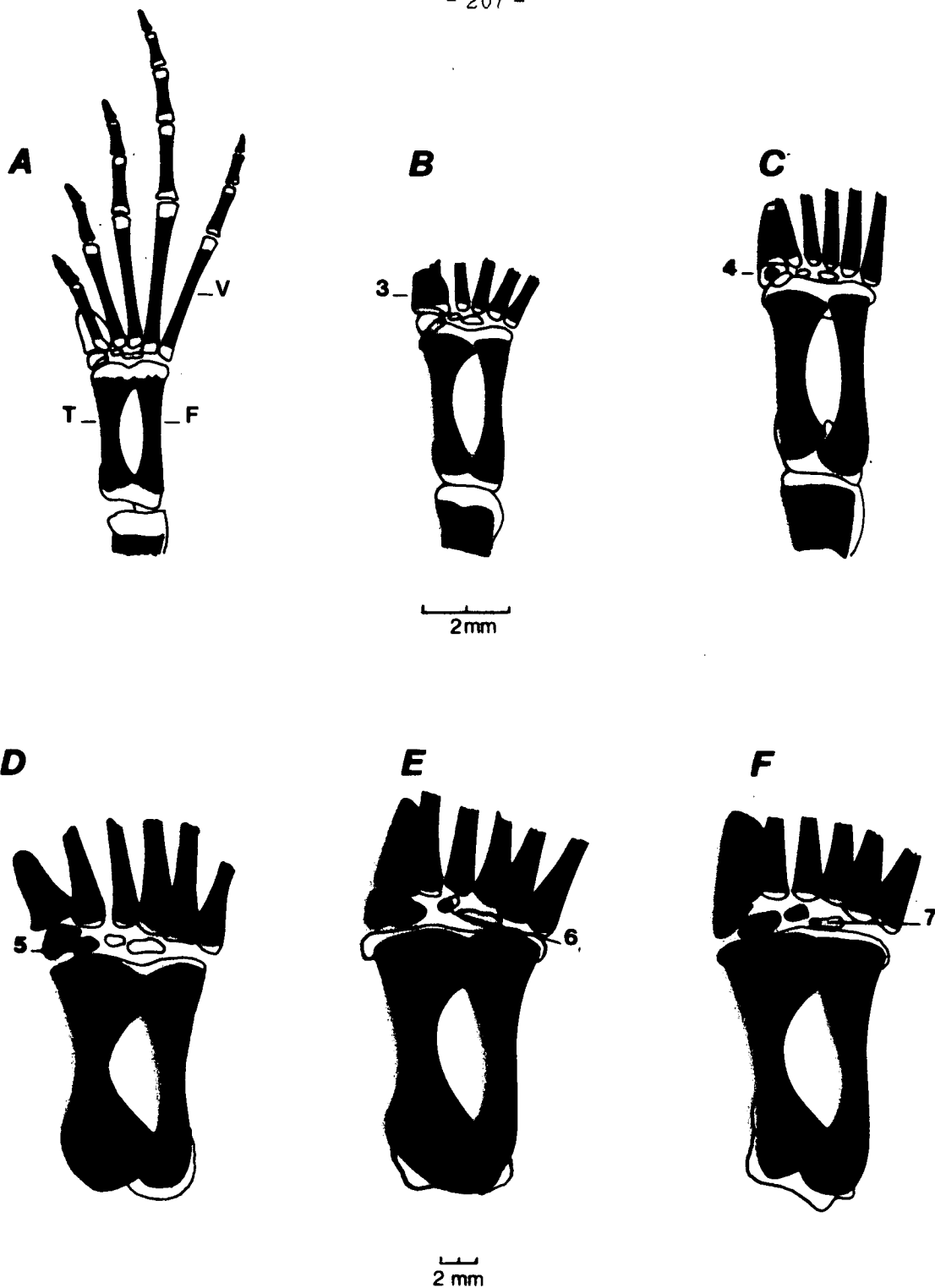


Figura 59.- Pelobates cultripes. Secuencia de osificación del tarso. En blanco, el cartilago; en negro, el hueso. A, estadio 43; B, estadio 44; C, primera semana postmetamórfica; D, E y F, adultos. F, fibular; T, tibial; V, quinto metatarsiano; 3, prehallux 2; 4, prehallux 1; 5, central; 6, tarsal 2, y 7, tarsal 3.

cartilaginoso. En la población de Porto Covo, esta pieza se reconocía en el 66.70% de los sapos; en uno de ellos, incluso, había comenzado a osificar (figura 64 B). Las diferencias en la presencia del tarsal 1 entre los P. cultripes adultos de las dos poblaciones son muy altamente significativas ( $n_1 = 29$ ;  $n_2 = 9$ ;  $U = 52.50$ ;  $P = 0.0001$ ). No hay diferencias entre ambos sexos en cuanto a su presencia, en ninguna de las dos poblaciones (Madrid:  $n_1 = 14$ ;  $n_2 = 13$ ;  $U = 90.50$ ;  $P = 0.9574$ . Porto Covo:  $n_1 = 5$ ;  $n_2 = 2$ ;  $U = 6.50$ ;  $P = 0.4624$ ).

La osificación de los tres elementos finales de la secuencia: central, tarsal 2 y tarsal 3 se produce después de la madurez sexual.

En la tabla 40 se resume la secuencia y el estadio de desarrollo o la edad en que condrifican y osifican los elementos del tarso de P. cultripes.

En el estado de osificación de los tres elementos finales de la secuencia se observa dimorfismo sexual. Este es aún más acusado que el existente en los huesos periféricos del carpo. El número de elementos osificados en el tarso de los machos de la población de Madrid es mayor que el número de tarsales osificados en las hembras, con un nivel de significación del 99,9% (test de la U de Mann-Witney,  $n_1 = 15$ ;  $n_2 = 14$ ;  $U = 174.00$ ;  $P = 0.001$ ). En la población de Porto Covo, la diferencia entre el número de huesos en el tarso de los machos y el número de huesos en el de las hembras es significativa al 99% ( $n_1 = 12$ ;  $n_2 = 4$ ;  $U = 46.0$ ;  $P = 0.0056$ ). Los histogramas de frecuencias se presentan en la figura 60.

En las dos poblaciones de P. cultripes estudiadas las distribuciones de frecuencia del número de elementos osificados en el tarso difieren ligeramente, tanto en machos como en hembras, como puede deducirse del examen de la figura 61. Sin embargo, ni en machos ( $n_1 = 15$ ;  $n_2 = 12$ ;  $U = 61.00$ ;  $P = 0.1274$ ) ni en hembras ( $n_1 = 14$ ;  $n_2 = 4$ ;  $U = 36.00$ ;  $P = 0.2388$ ) estas diferencias entre las poblaciones resultaron significativas. Aunque -como ya hemos señalado anteriormente- la presencia del tarsal 1 en estado cartilaginoso en la población de Porto Covo, y su ausencia en la población de Madrid, sí puede considerarse una característica distintiva de ambas poblaciones.

Tabla 40.- Pelobates cultripes. Secuencias de condricación y de osificación del tarso, y estadio de desarrollo (Gosner, 1960) en que se produce cada acontecimiento.

SECUENCIA DE CONDRIFICACION	Estadio de Gosner	SECUENCIA DE OSIFICACION	Estadio o Edad
Fibular	32	Tibial	38
Tibial	33	Fibular	38
Tarsal 3	36	Prehallux 2	44
Central dorsal	37	Prehallux 1	46
Central ventral	37	Central	adultos
Prehallux 1	37	Tarsal 2	adultos (sólo machos)
Tarsal 2	37	Tarsal 3	adultos (sólo machos)
Prehallux 2	37 (final)	Tarsal 1	adultos (sólo machos de la población de Porto Covo)
Tarsal 1	44		

FUSIONES

-----  
 Ctral dsal + Ctral vtral 39

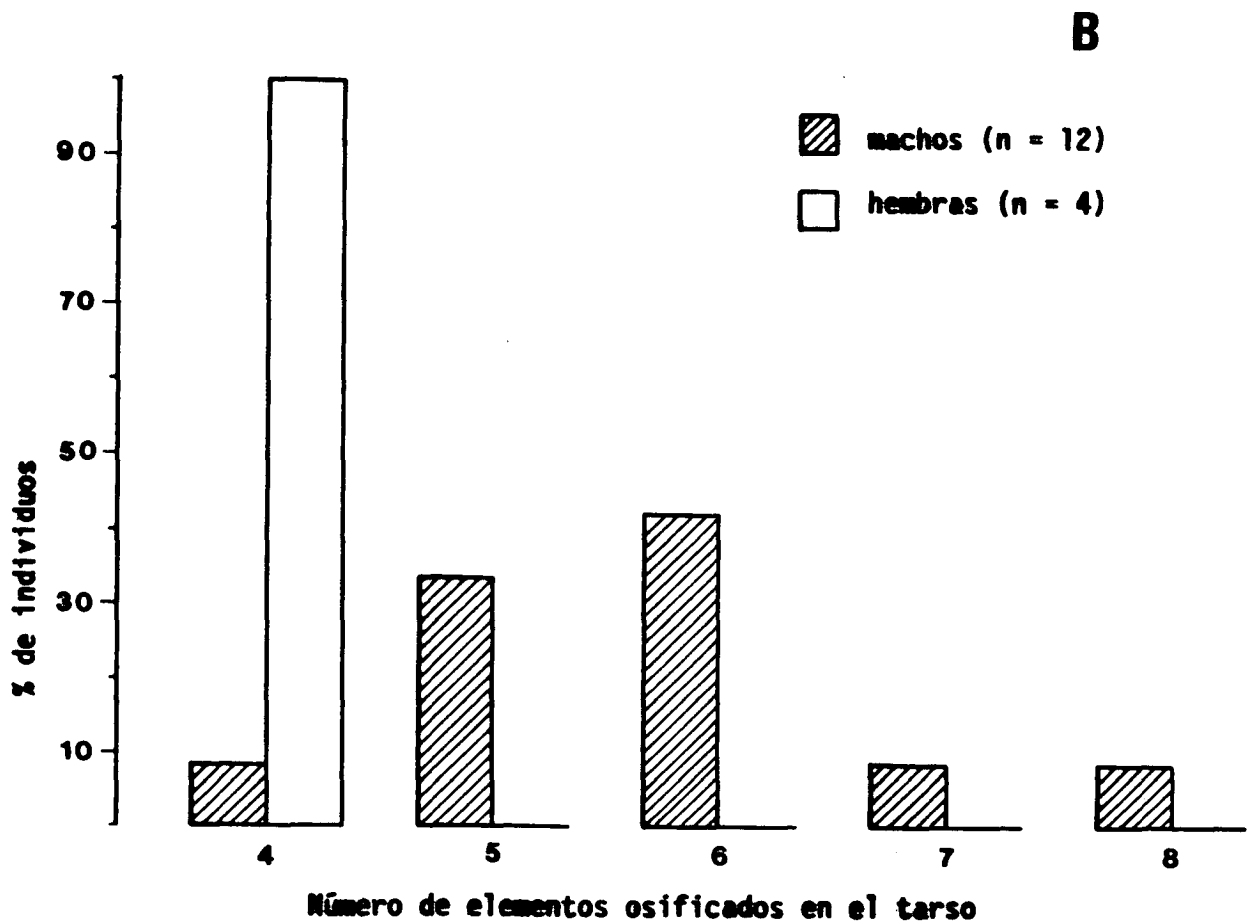
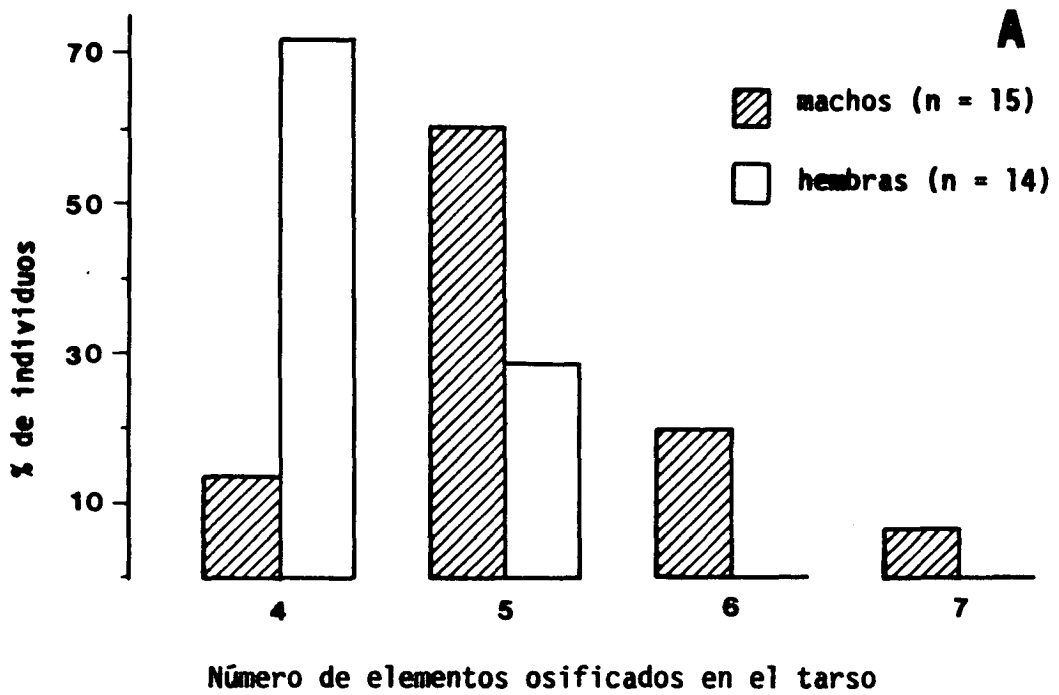


Figura 60.- Pelobates cultripes. Histogramas de frecuencia del número de elementos osificados en el tarso de machos y hembras. Las diferencias entre ambos sexos son muy significativas. A, población de Madrid; B, población de Porto Covo.

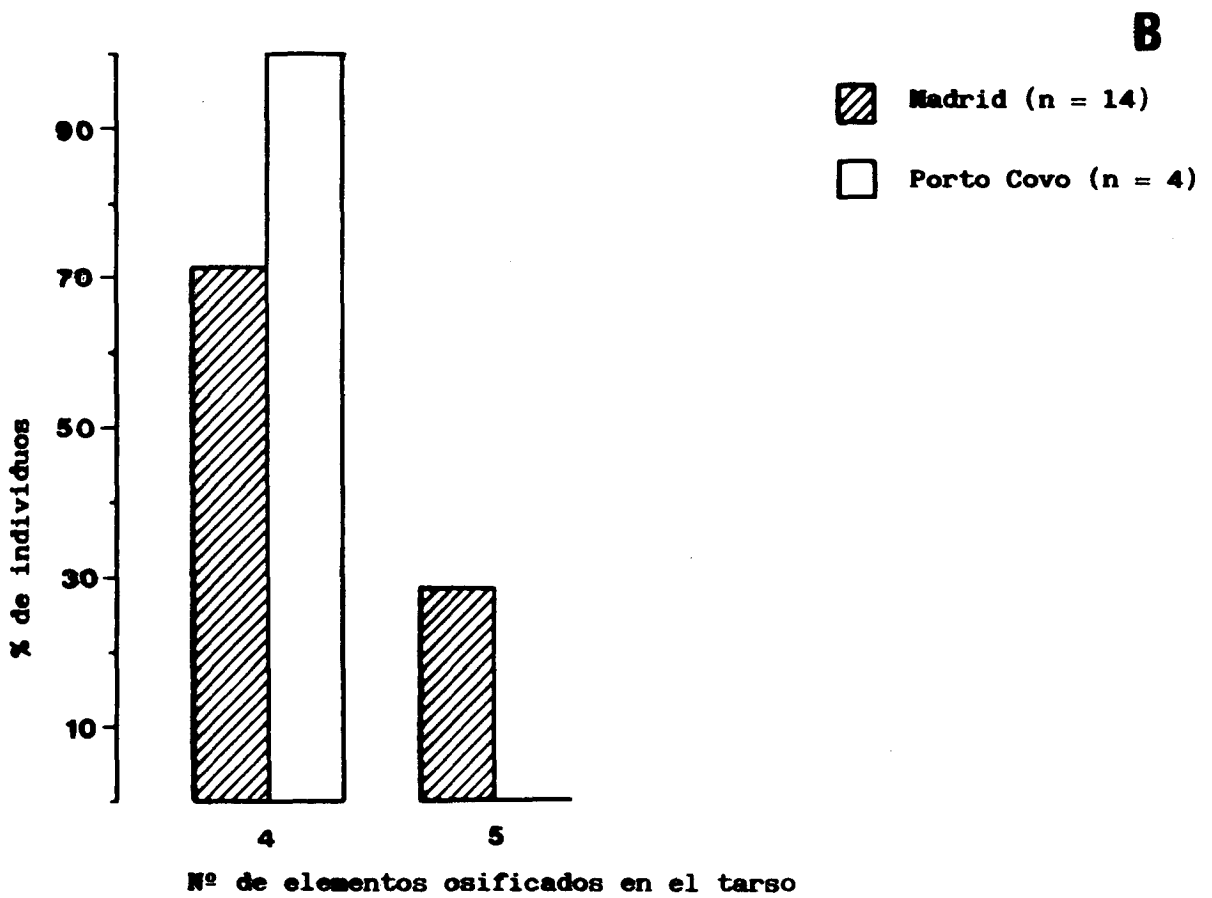
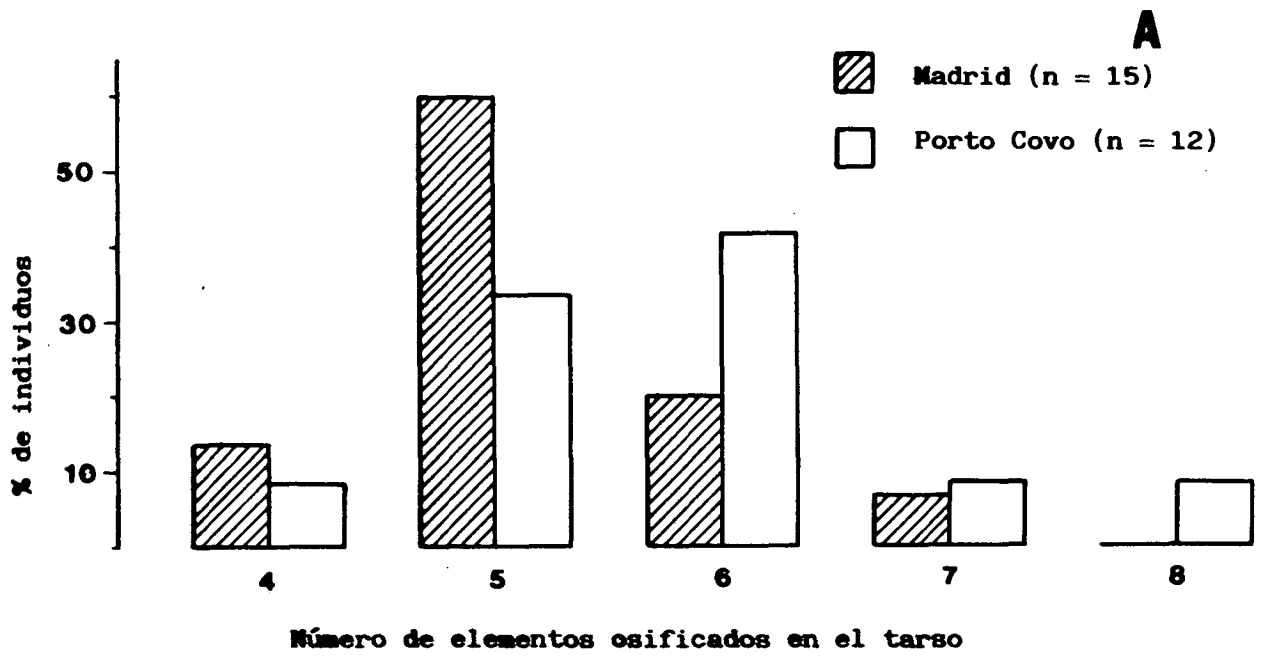


Figura 61.- Distribución de frecuencias del número de elementos osificados en el tarso en dos poblaciones de Pelobates cultripes. Las diferencias entre las dos poblaciones no son significativas. A, machos; B, hembras..

En P. cultripes, existe una relación positiva y muy altamente significativa entre el número de elementos osificados en el tarso y la longitud cabeza + cuerpo del ejemplar, en los machos de la población de Madrid ( $n = 15$ ;  $r_s = 0.7483$ ;  $S = 140.95$ ;  $P < 0.001$ ); significativa al 95% en los machos de Porto Covo ( $n = 12$ ;  $r_s = 0.5322$ ;  $S = 133.79$ ;  $P < 0.05$ ), y también significativa al 95% en las hembras de Madrid ( $n = 14$ ;  $r_s = 0.5694$ ;  $S = 195.92$ ;  $P < 0.05$ ). En las hembras de Porto Covo la relación no puede calcularse porque la desviación típica de la variable "número de huesos del tarso" es cero. El diagrama de dispersión del tamaño (LCC) y el número de elementos osificados en el tarso en Pelobates cultripes se representa en la figura 62; se utilizan símbolos diferentes para los machos y las hembras de cada población.

La relación entre el número de huesos del tarso y la edad es significativa al 95% en los machos de P. cultripes de la población madrileña ( $n = 15$ ;  $r_s = 0.4830$ ;  $S = 289.52$ ;  $P < 0.05$ ); sin embargo, si solo incluimos en el análisis los machos de más de tres años -edad a partir de la cual hemos considerado que el crecimiento en longitud de los animales se estabiliza- la relación entre ambas variables deja de ser significativa ( $n = 14$ ;  $r_s = 0.3419$ ;  $S = 299.43$ ;  $P > 0.10$ ). Tampoco es significativa en los machos de esta especie de Porto Covo ( $n = 11$ ;  $r_s = 0.0898$ ;  $S = 200.24$ ;  $P \gg 0.10$ ), ni en las hembras de Madrid ( $n = 14$ ;  $r_s = 0.3184$ ;  $S = 310.13$ ;  $P > 0.10$ ). El diagrama de dispersión del número de huesos del tarso y la edad en Pelobates cultripes puede consultarse en la figura 63.

El proceso de inicio de la osificación en el tarso de P. cultripes transcurre en tres fases. La primera afecta a sus dos huesos largos, tibial y fibular, que osifican en el estadio 39; el proceso sucede a los 24 días de edad a 28° C y dura menos de un día. La segunda, afecta a los huesos de la espuela, prehallux 2 y prehallux 1, que osifican en 2,33 días por término medio, entre los 31 y 33,33 días de edad a temperatura óptima. La tercera, afecta al hueso central y a los tarsales 2 y 3, que sólo osifican en los adultos; su mineralización se inicia después de la madurez sexual y finaliza uno o dos años más tarde, en cuanto el animal alcanza su tamaño definitivo. La intensidad del proceso es mayor en los machos que en las hembras. El número de elementos afectados por la osificación depende del sexo y del

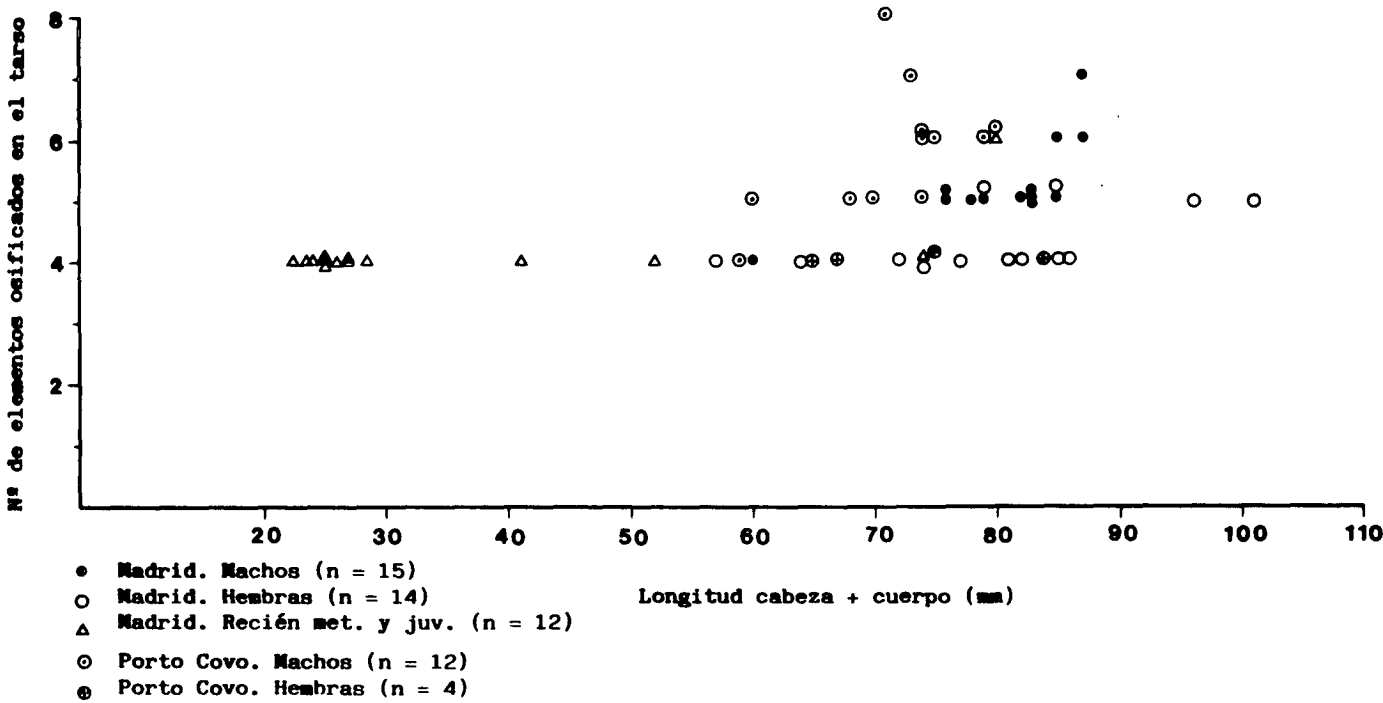


Figura 62.- Pelobates cultripes. Diagrama de dispersión de la longitud cabeza + cuerpo (LCC) y el número de elementos osificados en el tarso. Se distingue entre juveniles, machos y hembras, y entre los individuos de la población de Madrid y los de la población de Porto Covo.

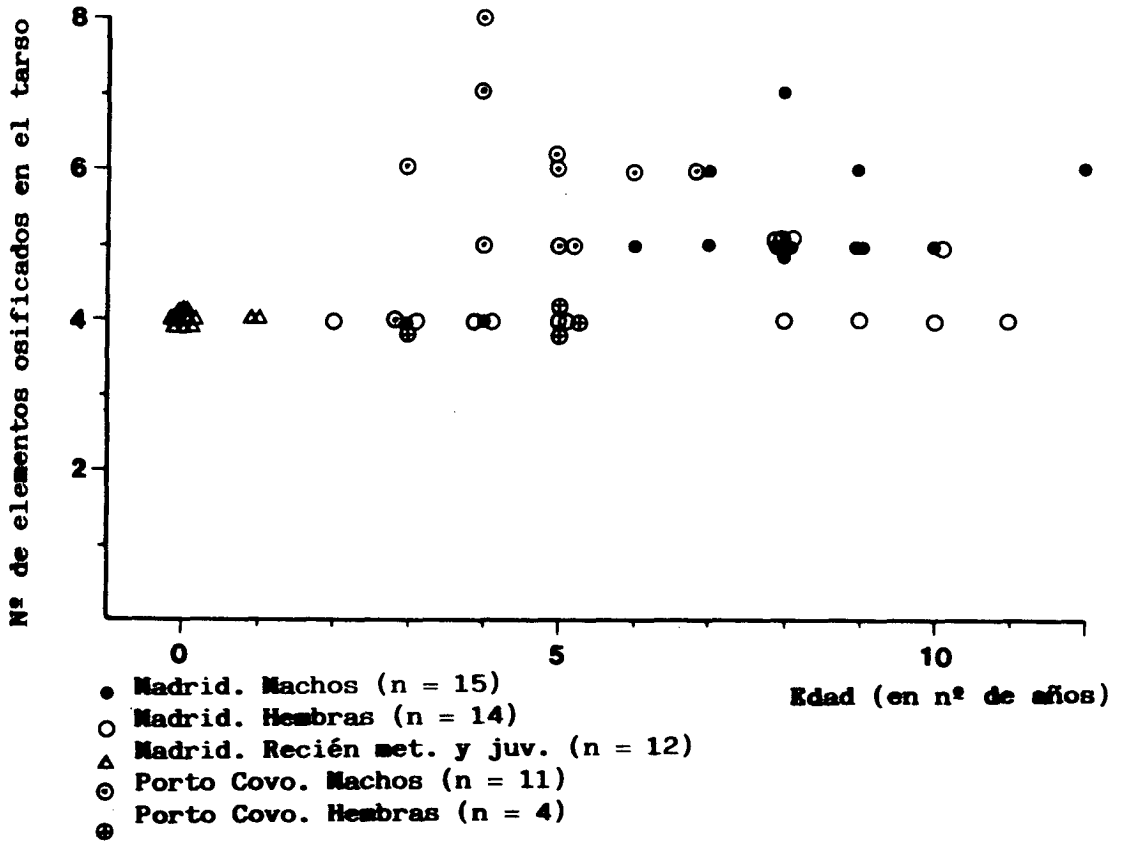


Figura 63.- Pelobates cultripes. Diagrama de dispersión de la edad y el número de elementos osificados en el tarso. Se distingue entre juveniles, machos y hembras, y entre la población de Madrid y la de Porto Covo.

tamaño definitivo del animal; sólo está relacionado con la edad en los dos años posteriores a la adquisición de la madurez sexual, después de este tiempo el número de elementos osificados en el tarso no depende de ella, sino del tamaño máximo alcanzado.

Las correlaciones entre el número de elementos osificados en el carpo y el número de elementos osificados en el tarso son positivas y significativas, tanto en los machos ( $n = 15$ ;  $r_s = 0.4562$ ;  $S = 304.53$ ;  $P < 0.05$ ) como en las hembras ( $n = 14$ ;  $r_s = 0.5886$ ;  $S = 187.19$ ;  $P < 0.05$ ).

La única variabilidad detectada en el miembro posterior y cintura pelviana de P. cultripes, aparte de la existente en el estado de osificación del tarso entre machos y hembras, se refiere al número de tarsales, concretamente a la presencia del tarsal 1 en el 66.67% de los adultos de la población de Porto Covo y a su ausencia en el 93.10% de los adultos de Madrid.

#### 3.2.4.3. Comparación con Pelodytes punctatus y otras especies de Anuros

Vamos a estudiar sucesivamente los tres segmentos en que hemos dividido el miembro posterior y la cintura pelviana, atendiendo a las siguientes características:

Número de elementos en el adulto

Número de centros de condricación y de osificación

Secuencia de osificación

Duración del inicio de la osificación

Frecuencia de anomalías

#### Cintura pelviana y pata

En P. cultripes, la cintura pelviana está constituida por dos huesos, uno par y otro medial. El mismo número de elementos se observa en las otras especies de las familias Pelobatidae, Pelodytidae y Megophryidae. Y en las

restantes familias de Anuros, exceptuando tres géneros que poseen un elemento esquelético medial prepúbico, llamado también epipubis: Xenopus (Pipidae), Ascaphus (Ascaphidae) y Leiopelma (Leiopelmatidae). El género Ascaphus presenta asimismo un par de huesos postpúbicos, o huesos nobelianos (Trueb, 1973).

En cuanto al número de centros de osificación en el fémur, ilion, tibiofibula e isquion, en Pelodytes punctatus no hemos observado ninguna diferencia digna de mención respecto a lo ya descrito en Pelobates cultripes.

Por el contrario, sí hemos detectado alteraciones en la secuencia en que se inicia la osificación de estos huesos comparada con la de P. cultripes. En Pelodytes punctatus, la tibia y la fibula comienzan a osificar antes que el ilion. En Xenopus laevis (Newth, 1956), sin embargo, la secuencia de osificación de este segmento parece coincidir con la de Pelobates; el hueso adicional que presenta esta especie -epipubis-, es el último en osificar. La secuencia de Rana pipiens (Kemp & Hoyt, 1969), por el contrario, es igual que la de Pelodytes punctatus. Un resumen del orden en que inician la osificación los huesos de la pata posterior y la cintura pelviana de las cuatro especies se presenta en la tabla 41.

En cuanto a la duración del proceso de inicio de la osificación en la cintura pelviana y pata posterior, en P. cultripes es de 11.08 días, desde el estadio 38 al 44 de la tabla de Gosner. En Pelodytes punctatus el proceso se inicia en todos los huesos del segmento entre los estadios 37 y 44; en Xenopus laevis (Newth, 1956) entre los estadios 55 y 60 de la tabla normal de Xenopus, equivalentes aproximadamente al 36 - 43 de la tabla de Gosner, y en Rana pipiens (Kemp & Hoyt, 1969) entre los estadios X y XXV de la tabla normal de Rana, equivalentes al 35 - 46 de la de Gosner.

#### **Metatarsianos y falanges**

En Pelobates cultripes, el pie consta de cinco dedos, con 2, 2, 3, 4 y 3 falanges, respectivamente; al contabilizar los metatarsianos resultan 19 huesos. El mismo número de elementos se observa en Pelodytes punctatus y las

Tabla 41.- Secuencias de osificación del miembro posterior y cintura pelviana de Pelobates cultripes y Pelodytes punctatus (esta tesis), Xenopus laevis (Newth, 1956) y Rana pipiens (Kemp & Hoyt, 1969). Los huesos señalados con un asterisco han modificado su posición respecto a la secuencia patrón de P. cultripes, o no existen en dicha especie.

<u>Pelobates cultripes</u>		<u>Pelodytes punctatus</u>		<u>Xenopus laevis</u>		<u>Rana pipiens</u>	
-----		-----		-----		-----	
n = 177		n = 159				n = 162	
Fémur	38	Fémur	37	Fémur	36 (= 55)	Fémur	35 (= X)
Ilion	38	Tibia	37	Ilion	37 (= 56)	Tibia	35 "
Tibia	38	Fibula	37	Tibia	37 "	Fibula	35 "
Fíbula	38	Ilion	37	Fibula	37 "	Ilion	36 (= XI)
Isquion	44	Isquion	44	Isquion	41 (= 58)	Isquion	42 (= XXI)
				Epipubis	43 (= 60)	Pubis	46 (= XXV)
Metatarsiano IV	39	Metasiano IV	38	Metatarsianos	39 (= 56)	Metatarsianos	36 (= XI)
Metatarsiano V	39	Metatarsiano V	38	Falanges	41 (= 58)	Falanges	37 (= XII)
Metatarsiano III	39	Metatarsiano III	38				
Falange IV.1	39	Falange IV.1	38				
Metatarsiano II	39	Metatarsiano II	39				
Falange V.1	39	*Falange III.1	41				
Falange III.1	39	Falange V.1	41				
Falange IV.2	40	Falange IV.2	41				
Metatarsiano I	40	Metatarsiano I	41				
Falange IV.3	40	*Falange II.1	42				
Falange II.1	40	*Falange III.2	42				
Falange III.2	40	Falange IV.3	42				
Falange V.2	40	Falange V.2	42				
Falange IV.4	40	*Falange I.1	42				
Falange II.2	40	Falange IV.4	43				
Falange III.3	41	*Falange III.3	43				
Falange V.3	41	Falange II.2	43				
Falange I.1	41	Falange V.3	43				
Falange I.2	41	Falange I.2	44				
Tibial	38	Tibial	38	Tibial	37 (= 56)	Tibial	36 (= XI)
Fibular	38	Fibular	38	Fibular	37 (= 56)	Fibular	36 (= XI)
Prehallux 2	44	Central	adultos				
Prehallux 1	46	Tarsal 1	machos				
Central	adultos	Tarsal 2	machos				
Tarsal 2	solo machos	Prehallux 1	machos				
Tarsal 3	solo machos	Prehallux 2	machos				
Tarsal 1	solo machos	Prehallux 3	no osif.				
	Porto Covo	Tarsal 3	no osific.				

restantes especies de las familias Pelobatidae, Pelodytidae y Megophryidae. En las dos especies estudiadas de esta última familia, Leptobrachium hasseltii y Megophrys montana las epífisis de todos los huesos largos del pie estaban fuertemente calcificadas.

En cuanto a la secuencia de osificación, Pelodytes punctatus presenta cinco alteraciones sobre el patrón descrito en P. cultripes: la primera falange del tercer dedo (III.1) osifica antes que la primera del quinto (V.I); las falanges II.1 y III.2 osifican antes que la IV.3; la I.1 se adelanta a la IV.4, a la II.2, a la III.3 y a la V.3; a su vez, la falange III.3 precede en el inicio de su osificación a la II.2. Los detalles de las secuencias de ambas especies pueden consultarse en la tabla 41. No existen datos adicionales de ninguna otra especie de anuro.

En P. cultripes, la duración media del proceso es de 3.88 días a temperatura óptima de crecimiento; el proceso se inicia en los 19 huesos entre los estadios 39 y 41. En Pelodytes punctatus, el comienzo de la osificación se produce entre los estadios 38 y 44; en Xenopus laevis (Newth, 1956) entre el 56 y 58 de la tabla normal de Xenopus, equivalentes al 39 - 41 de la tabla de Gosner, y en Rana pipiens (Kemp & Hoyt, 1969) entre el XI y el XII de su tabla normal, equivalentes al 36 - 37 de la de Gosner.

### Tarso

Según las poblaciones, el tarso de P. cultripes está constituido por siete elementos o por ocho. La población de Madrid presenta tibial, fibular, prehallux 2, prehallux 1, central, tarsal 2 y tarsal 3 (figura 64 A); mientras que la de Porto Covo posee un tarsal 1 adicional (figura 64 B). Al igual que la población de P. cultripes de Porto Covo, el 92.86% de los P. varaldii examinados con este fin (n = 14) presentaba ocho elementos en el tarso (figura 64 C) y el 7.14% restante, siete; a éstos les faltaba el tarsal 1.

La única hembra disponible de P. syriacus tenía su tarso constituido por cuatro huesos: tibial, fibular, prehallux 2 y prehallux 1 (figura 64 D). El central y los dos tarsales eran cartilagosos, a pesar de la gran talla del

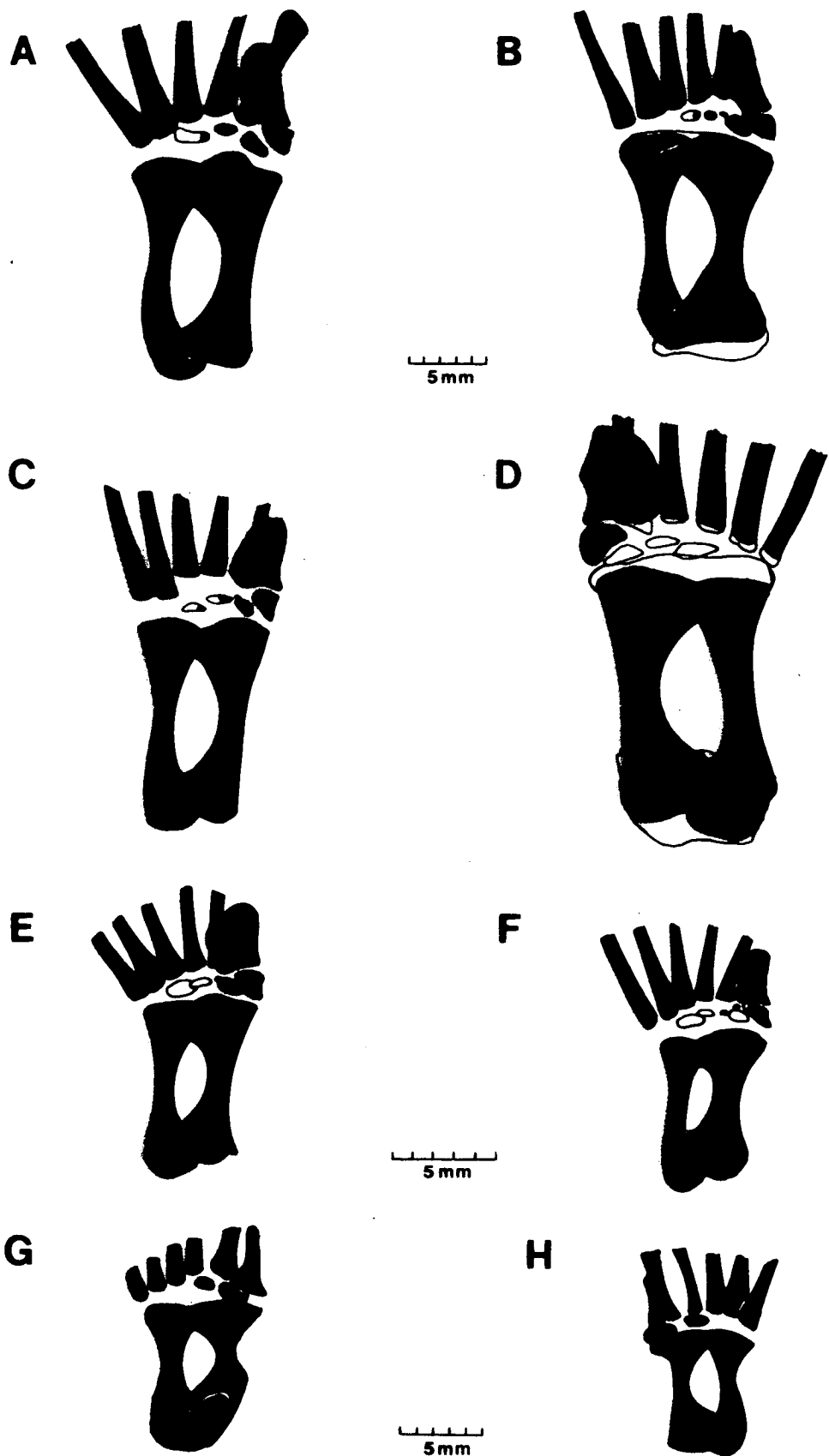


Figura 64.- Morfología del tarso en la familia Pelobatidae. En blanco, el cartilago; en negro, el hueso. A y B, *Pelobates cultripes* (Madrid y Porto Covo, respectivamente); C, *Pelobates varaldii*; D, *Pelobates syriacus*; E y F, *Pelobates fuscus*; G, *Scaphiopus couchii* (sólo elementos óseos), y H, *Spea multiplicatus* (sólo elementos óseos).

animal (LCC = 79 mm).

En P. fuscus, de seis adultos examinados, tres (50%) poseían tres tarsales (figura 64 E), dos (33.33%) poseían cuatro (figura 64 F), y uno presentaba sólo dos (16.67%). En la literatura sólo consta la existencia de tres tarsales en esta especie (Chomiakoff, 1894; Schmalhausen, 1908). Ningún autor que haya estudiado la anatomía o el desarrollo del tarso en anuros (p.e.: Howes & Ridewood, 1888; Chomiakoff, 1894; Schmalhausen, 1908; Holgrem 1933; Jarosova 1974; Saint Aubain, 1981) indica que el número de tarsales pueda estar sujeto a variabilidad intraespecífica, circunstancia que nosotros hemos detectado en las especies del género Pelobates.

Desafortunadamente, los ejemplares procedentes de colecciones científicas conservados largo tiempo en alcohol son incapaces de absorber adecuadamente el colorante para el cartílago. Este ha sido el caso en los Scaphiopus couchii estudiados, y por tanto, no hemos podido determinar el número de tarsales cartilagosos presentes. De este especie sólo podemos señalar los elementos osificados, en la figura 64 G. Son cinco: tibial, fibular, prehallux 1, central y un tarsal. Este último, osificado sólo en cinco (56.56%) de los nueve machos estudiados.

Spea multiplicatus mostraba, en los diez machos examinados, seis huesos en el tarso: tibial, fibular, prehallux 1, prehallux 2, central y un tarsal. El tibial y el fibular se encontraban completamente fusionados en sus extremos proximal y distal en todos los casos. No ha sido posible determinar la existencia de más elementos tarsales en estado cartilaginoso, por el problema mencionado en el párrafo anterior. Los elementos óseos se han representado en la figura 64 H.

De la familia Pelodytidae hemos estudiado el tarso de las dos especies existentes. En Pelodytes punctatus, aunque la variabilidad en el número de elementos es grande, el tarso está constituido en 17 casos (60.71%) por ocho elementos: tibial-fibular (ambos fusionados en toda su longitud), prehallux 1, prehallux 2, prehallux 3, central, tarsal 1, tarsal 2 y tarsal 3 (figura 65 A). A veces falta el prehallux 3 (n = 6; 21.43%; figura 65 B); mientras que en otros individuos se observa un elemento cartilaginoso adicional debajo del

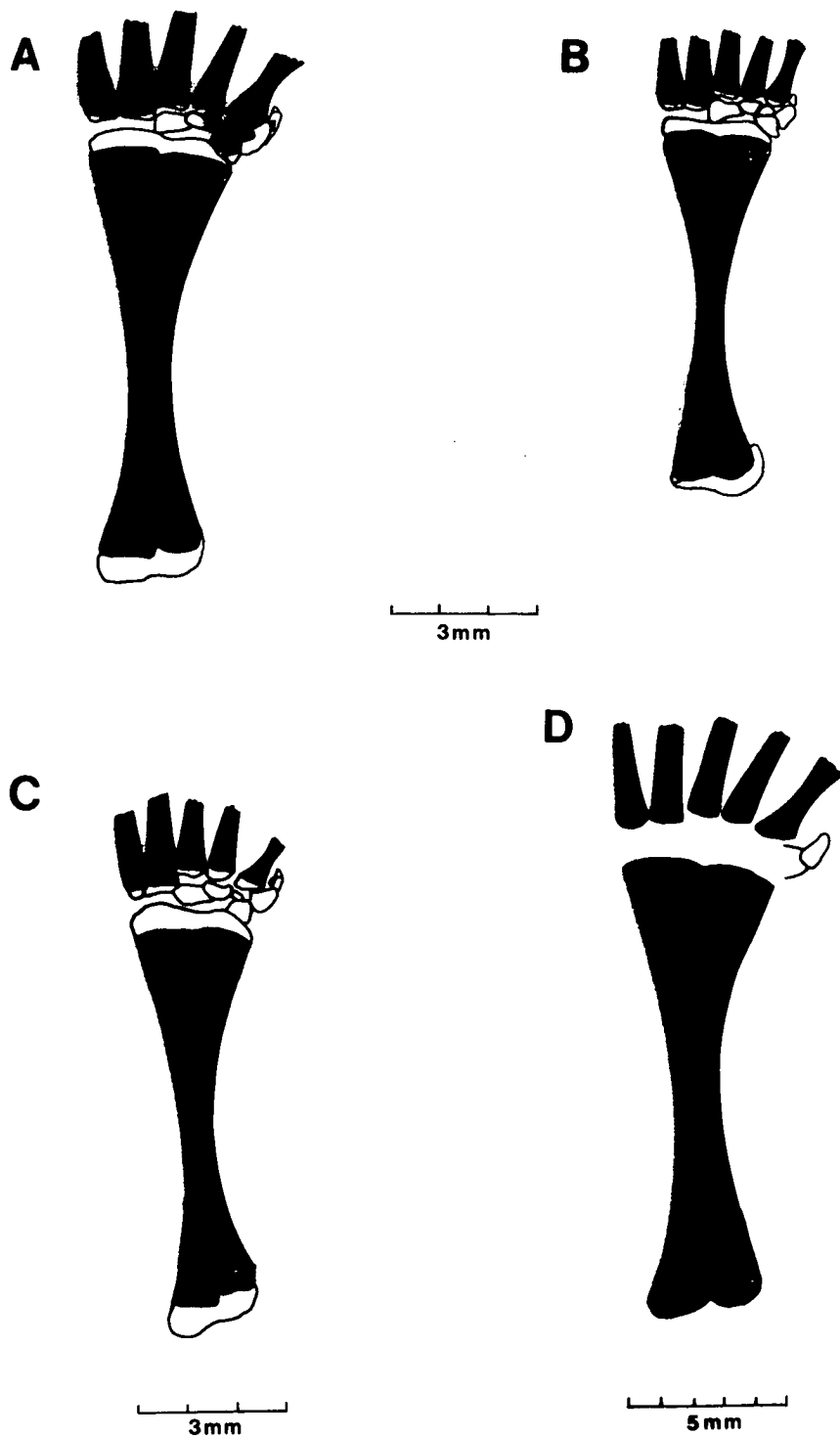


Figura 65.- Morfología del tarso en la familia Pelodytidae. En blanco, el cartilago; en negro, el hueso. A, B y C, variabilidad en Pelodytes punctatus; D, Pelodytes caucasicus (sólo elementos óseos).

prehallux 3 (n = 5; 17.86%; figura 65 C).

De los ocho elementos, Pelodytes punctatus presenta osificado siempre uno: el tibialfibular (figura 65 C). Como máximo hemos encontrado osificados seis, en uno de los machos de mayor tamaño: tibialfibular, central, tarsal 1, tarsal 2, prehallux 1 y prehallux 2 (figura 65 A).

En el único tarso de Pelodytes caucasicus estudiado sólo se encontraba osificado el tibialfibular. Al menos presentaba dos elementos cartilagosos en el prehallux; pero no podemos descartar la existencia de más piezas en el mismo, ni pudimos establecer el número de tarsales, ya que la tinción resultó deficiente. El dibujo puede contemplarse en la figura 65 D.

En la familia Megophryidae, el tarso de Megophrys montana está compuesto por ocho elementos: tibial, fibular, prehallux 1, prehallux 2, prehallux 3, central y dos tarsales. El tibial y el fibular sufren osificación; pero los restantes elementos del tarso, excepto las últimas falanges del prehallux, están constituidos por cartilago calcificado. En la figura 66 A se presenta un dibujo del mismo en norma dorsal.

El tarso de Leptobrachium hasseltii presenta siete elementos, como puede verse en la figura 66 B. Las epifisis comunes al tibial y al fibular se hallan fuertemente calcificadas, al igual que los restantes elementos del tarso, exceptuando el prehallux 2 que se conserva cartilaginoso en su mayor parte.

Hasta el momento, se han descrito nueve variaciones en el número de elementos del tarso (Howes & Ridewood, 1888). En la figura 67 las reproducimos del trabajo original. Si prescindimos de las variaciones debidas a la existencia de uno, dos, tres o cuatro elementos en el prehallux (señaladas con asterisco en la figura), nos quedamos con cuatro tipos de tarso. Tres de ellos tienen en común tres huesos: tibial, fibular y central; difieren en la posesión de uno (tipo Ceratophrys ornata), dos (tipo Xenopus laevis) o tres tarsales (tipo Alytes obstetricans). El cuarto modelo descrito por estos autores se caracteriza por la fusión del tibial y el fibular en toda su longitud, y la existencia de un central y tres tarsales (Pelodytes

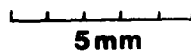
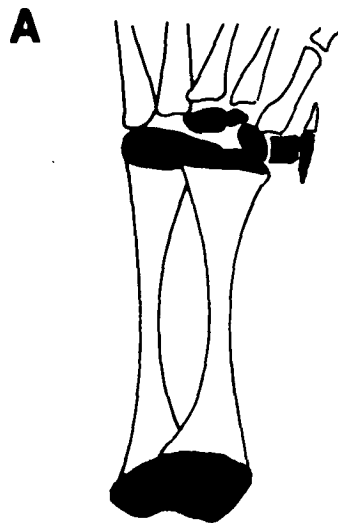


Figura 66.- Morfología del tarso en la familia Megophryidae. En negro, el cartilago calcificado; en blanco, el hueso. **A**, Megophrys montana; **B**, Leptobrachium hasseltii.

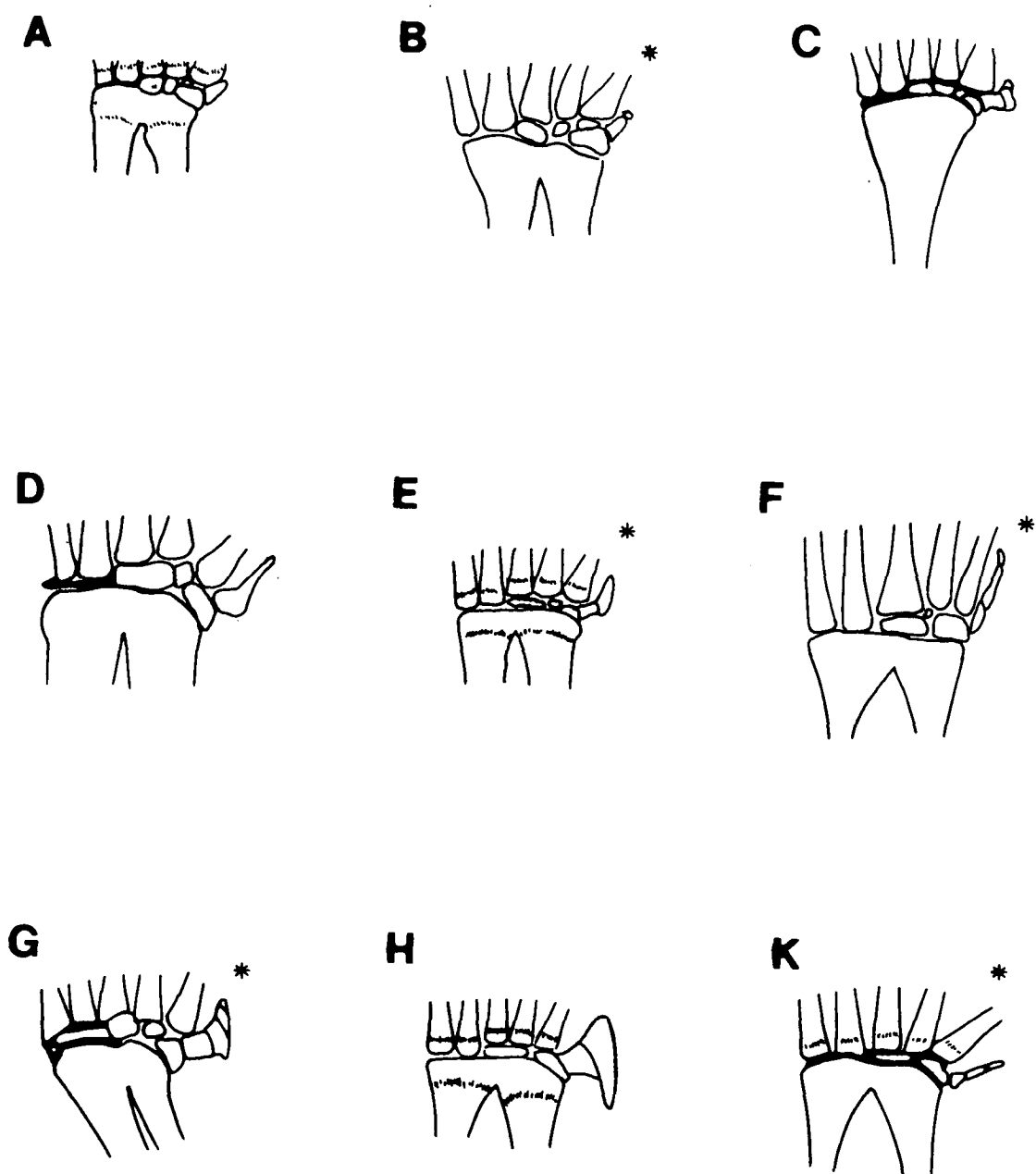


Figura 67.- Tipos de tarso en Anuros (Howes & Ridewood, 1888). Los señalados con un asterisco sólo difieren en el número de elementos del prehallux. A, Alytes obstetricans; B, "Bombinator igneus" (= Bombina bombina); C, Pelodytes punctatus; D, "Xenophrys monticola" (= Megophrys montana); E, Limnodynastes tasmaniensis; F, Xenopus laevis; G, Hyla caerulea; H, Ceratophrys ornata, y K, Phryniscus laevis.

punctatus).

Las descripciones de tarsos de anuros fósiles son escasas, debido a que la naturaleza cartilaginosa de los tarsales impide su fosilización. Sólo en Thoraciliacus rostriceps y Cordicephallus gracilis (Pipidae) se han encontrado tarsos con siete y ocho elementos, respectivamente (Nevo, 1968). Correspondían al tibial, fibular, central; tarsales 1, 2 y 3, y prehallux 1 en la primera especie y al prehallux 2, además, en la segunda. En Macropelobates osborni (Pelobatidae) fosilizaron seis huesos: tibial, fibular, prehallux 2, prehallux 1, central y un tarsal -probablemente el 2- (figura 28 en Estes, 1970) En Palaeobatrachus grandipes (Palaeobatrachidae) sólo osificaba el tibial, fibular, central y tres segmentos de prehallux (Jarosova, 1974). Del tarso de Notobatrachus degiustoi (Ascaphidae) únicamente fosilizaron el tibial y el fibular (Estes & Reig, 1973), y de Eodiscoglossus santoniae (Discoglossidae), además de los dos huesos anteriores, el central y el prehallux 1 (figura 1-10 en Estes & Reig, 1973; Vernaud-Grazzini & Wenz, 1975).

-----

En cuanto al número de centros de condricación, en Pelobates cultripes hemos encontrado uno por cada elemento del tarso menos el central, que posee dos. En total ocho centros. De este género sólo se ha estudiado con anterioridad el desarrollo del tarso de la especie centroeuropea, Pelobates fuscus, (Chomiakoff, 1894; Schmalhausen, 1908; Holgrem, 1933) que, como podemos ver en la figura 64 E, generalmente presenta tres tarsales. Chomiakoff (1894) describió un sólo centro de condricación para cada elemento, incluido el central. En cambio, Schmalhausen (1908) y Holgrem (1933), además de detectar dos centros de condricación en la ontogenia del central homologan el tarsal 3 a un central 3 + tarsal 3, aunque Schmalhausen nunca identifica dos esbozos cartilaginosos independientes en su desarrollo. Holgrem (1933) afirma haber visto ambos elementos, central 3 y tarsal 3, independientes, pero no muestra ninguna fotografía. A pesar de la gran cantidad de P. cultripes que he examinado no he podido confirmar, en esta especie, el origen doble del tarsal 3.

En Pelodytes punctatus se identifican 10 centros de condricación de aparición constante, que surgen en la siguiente secuencia: fibular (estadio 32;

figura 68 A), tibial (estadio 33); tarsal 3 (estadio 35; figura 68 B); central dorsal, central ventral, prehallux 1 y tarsal 2 (estadio 37; figura 68 D y lámina IX A); prehallux 2 y tarsal 1 (estadio 38; figura 69 A y lámina IX B); por último, el esbozo del prehallux 3 se independiza en la primera semana después de finalizar la metamorfosis. Los centrales dorsal y ventral se fusionan en el estadio 38. En algunos ejemplares del estadio 37 aparece un esbozo cartilaginoso muy pequeño sobre el tarsal 3, que aparentemente se fusiona con él en ese mismo estadio, pues no se detecta en el estadio 38 o posteriores. Lo mismo sucede sobre los tarsales 2 y 1 entre los estadios 44 y 46, y de nuevo también sólo en algunos ejemplares. Esto nos hace dudar sobre si dichos esbozos serán de aparición constante, pero de individualidad fugaz durante el desarrollo; o bien, aparecen esporádicamente tan sólo en algunos individuos.

No existen otras descripciones del desarrollo del tarso en las familias Pelobatidae, Pelodytidae o Megophryidae.

De las restantes familias de anuros, se conoce el desarrollo del tarso de siete especies, pertenecientes a las cinco familias siguientes:

- Discoglossidae:                    "Bombinator igneus" (= Bombina bombina) (Schmalhausen, 1908);  
    "Bombinator pachypus" (= Bombina variegata) (Steiner, 1921), y Discoglossus pictus (Jarosova, 1974).
- Pipidae:                            Xenopus laevis (Holgrem, 1933; Jarosova, 1974; Saint-Aubain, 1981; Shubin & Alberch, 1986).
- Hylidae:                            Hyla arborea (Schmalhausen, 1908)
- Bufonidae:                        "Bufo variabilis" (= Bufo viridis) (Schmalhausen, 1908)
- Ranidae:                            Rana arvalis (Tschernoff, 1907).

La duración del proceso de condricación del tarso de Pelobates cultripes a 28°C es de 11.63 días (del estadio 32 al final del estadio 37). En Pelodytes punctatus el proceso transcurre entre el estadio 32 y la 1ª semana

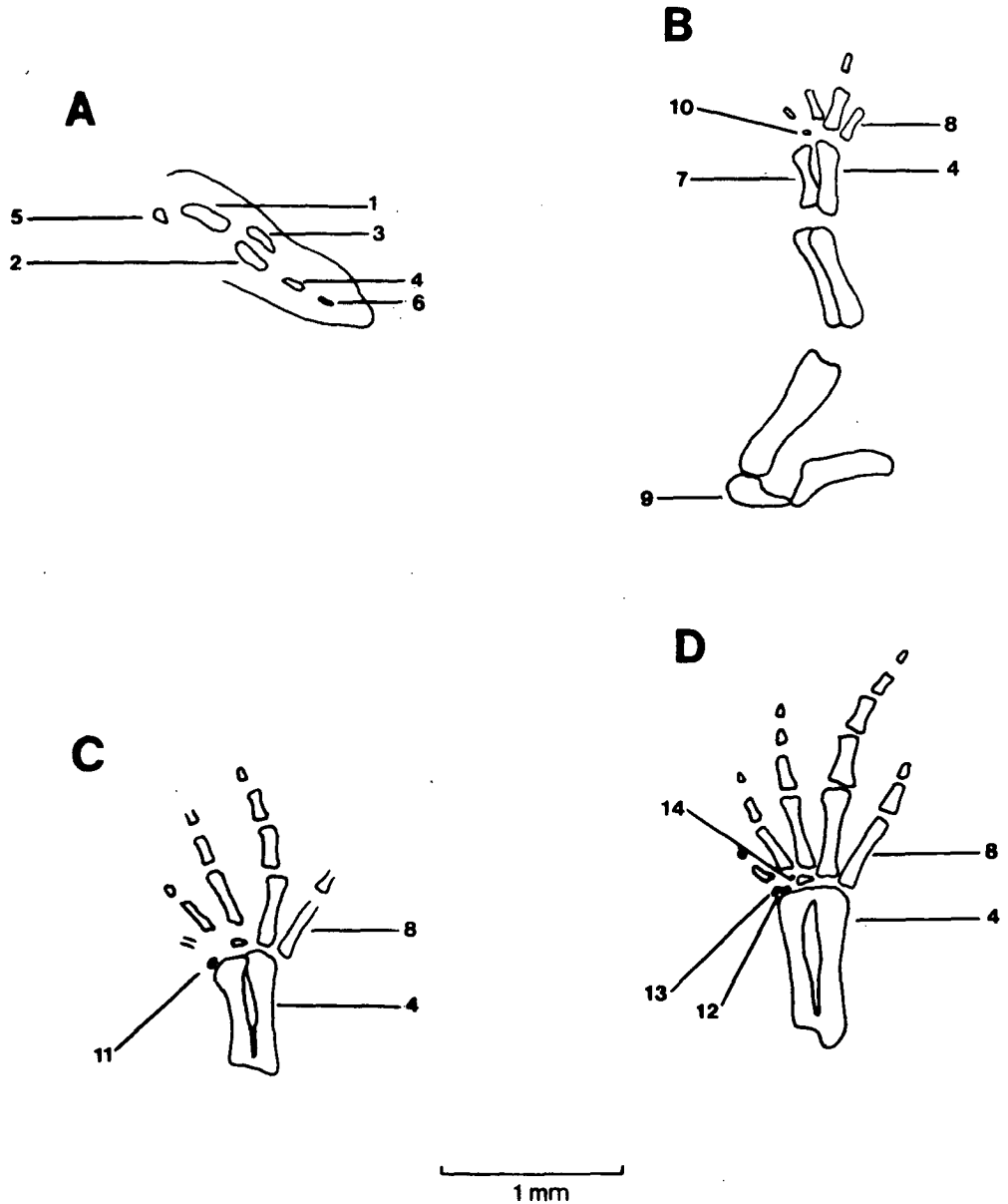
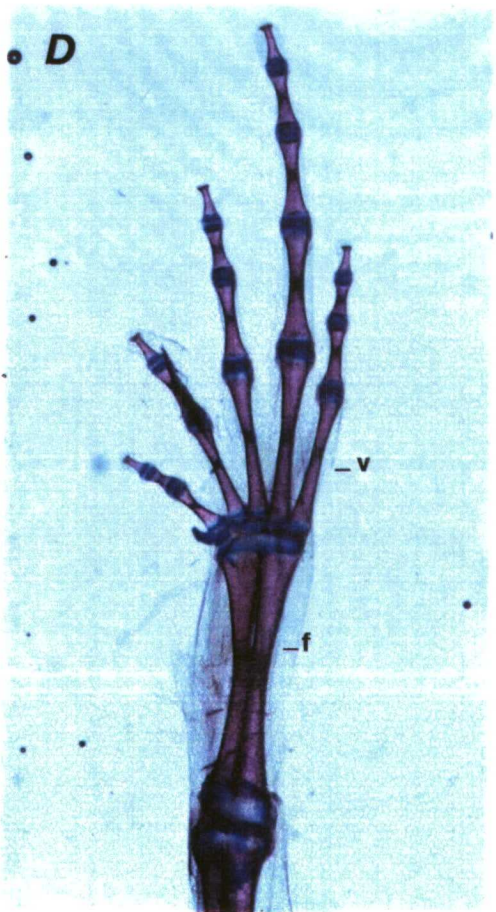
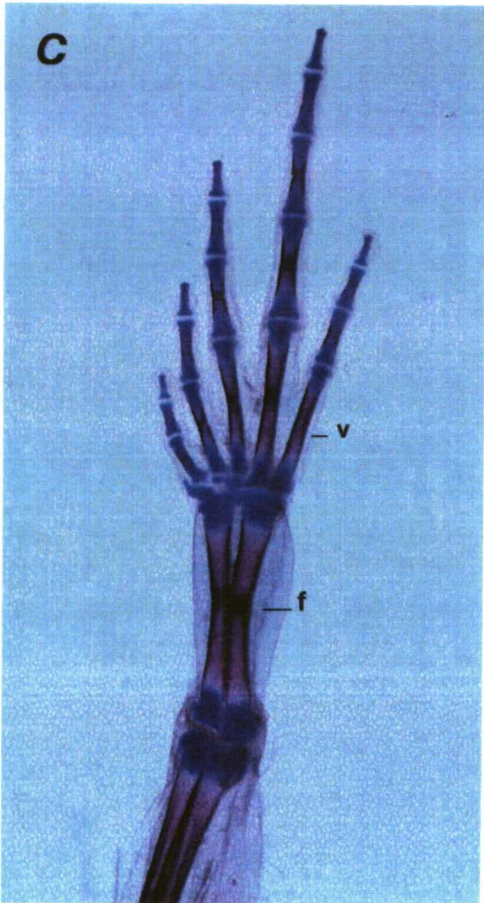
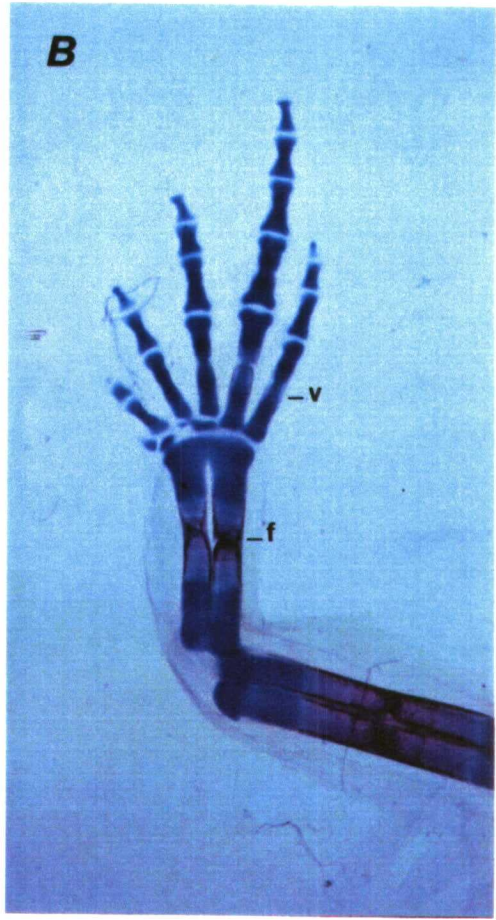
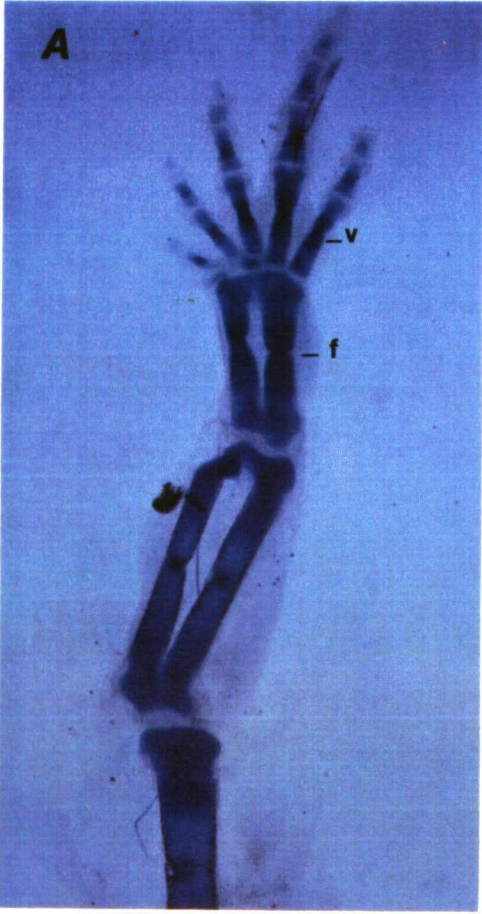


Figura 68.- Desarrollo de la pata posterior y cintura pelviana de Pelodytes punctatus. Secuencia de condricación. A, estadio 32; B, estadio 35; C y D, estadio 37. 1, fémur; 2, fibula; 3, tibial; 4, fibular; 5, ilion; 6, metatarsiano IV; 7, tibial; 8, metatarsiano V; 9, isquion; 10, tarsal 3; 11, central dorsal; 12, central ventral; 13, prehallux 1, y 14, tarsal 2.

Lámina IX.- Desarrollo del tarso de Pelodytes punctatus. En azul, el cartílago; en rojo, el hueso. **A**, estadio 37; tibial y fibular con sus epífisis fusionadas. **B**, estadio 38; se inicia la osificación del tibial y el fibular, a la vez que el proceso de fusión. **C**, estadio 41; la osificación de tipo pericondral se ha iniciado en las falanges; la fusión del tibial y el fibular supera el 50% de su longitud. **D**, estadio 46; fusión del tibial y el fibular prácticamente concluida.



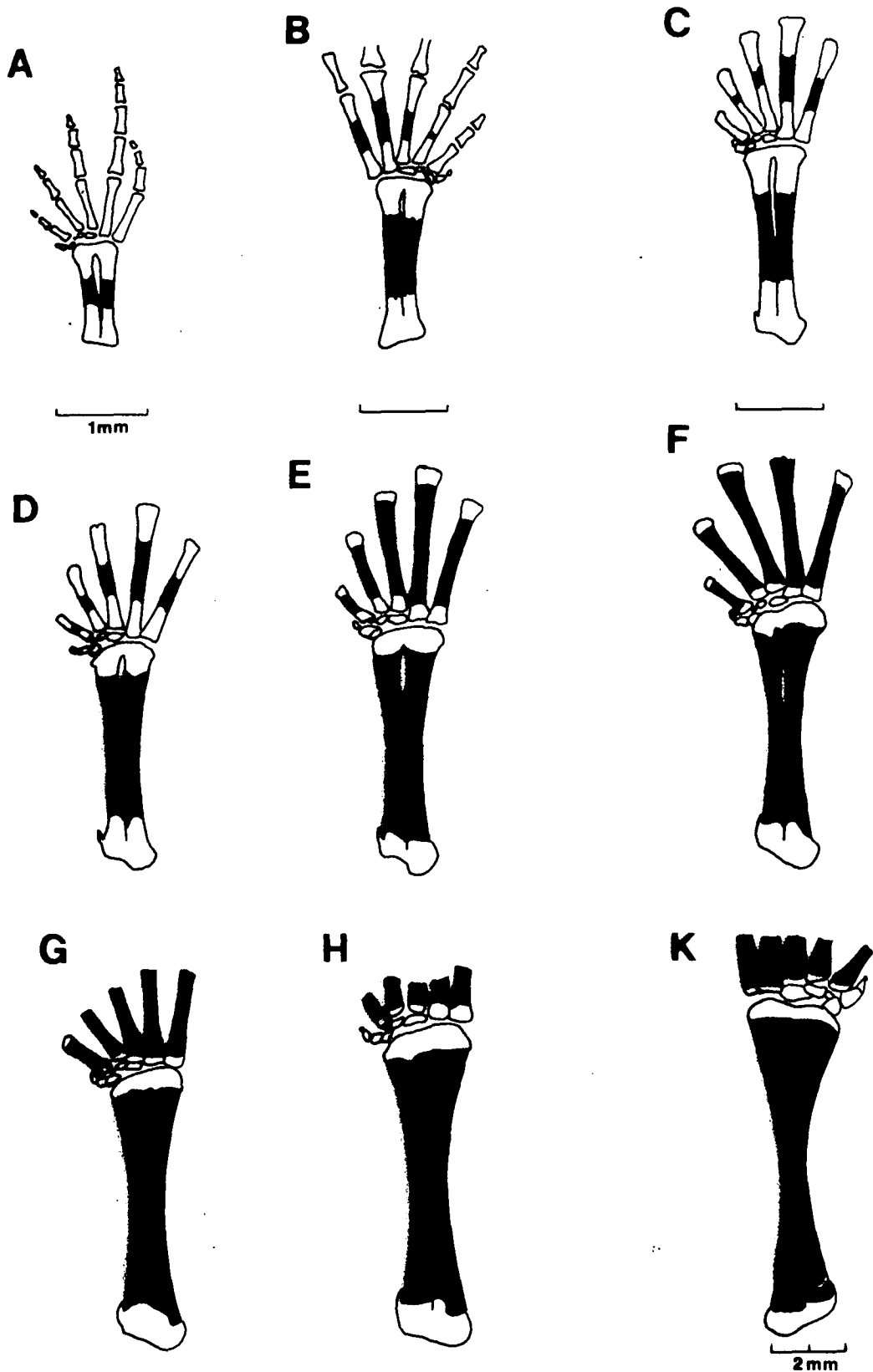


Figura 69.- Proceso de osificación y de fusión del tibialfibular en *Pelodytes punctatus*. A, estadio 38; B, estadio 39; C, estadio 40; D, estadio 42; E, estadio 43; F, estadio 45; G, estadio 46; H, primera semana postmetamórfica; K, adulto.

postmetamórfica.

En Pelobates cultripes y P. varaldii solo hay un centro de osificación por cada hueso del tarso. En Pelodytes punctatus los huesos osifican a partir de un único centro, con la excepción del tibialfibular que osifica a partir de dos centros, uno en el tibial y otro en el fibular.

-----

La secuencia de osificación del tarso de Pelobates cultripes es la siguiente: tibial y fibular (1ª etapa); prehallux 2 y prehallux 1 (2ª etapa); central, tarsal 2 y tarsal 3 (etapa adulta). La tercera etapa presentaba notables diferencias entre machos (llegan a osificar los tres elementos) y hembras (sólo osifica el central en el 28.6% de los ejemplares estudiados).

En Pelobates varaldii los siete elementos del tarso comunes con Pelobates cultripes osifican en la misma secuencia. El elemento adicional que presenta P. varaldii -tarsal 1- osifica en último lugar.

En la especie norteafricana, al igual que en la ibérica, la tercera etapa de la osificación se inicia un año después de alcanzar la madurez sexual, y presenta diferencias importantes entre machos y hembras. Los tarsales 1, 2 y 3 no osifican nunca en las hembras y sí en algunos machos. El central osifica en todos los machos a partir del 2º año de edad y sólo en el 43.75% de las hembras. Los histogramas de frecuencia del número de elementos osificados en el tarso de P. varaldii, separando machos y hembras, se representan en la figura 70. Las diferencias entre ambos sexos son muy altamente significativas ( $n_1 = 18$ ;  $n_2 = 16$ ;  $U = 247.50$ ;  $P = 0.0002$ ).

En los machos de P. varaldii, al igual que en P. cultripes, existe una relación positiva y significativa entre el número de elementos osificados en el tarso y el tamaño del ejemplar ( $n = 18$ ;  $r_s = 0.4719$ ;  $S = 511.73$ ;  $P < 0.05$ ) y entre dicho número y la edad ( $n = 18$ ;  $r_s = 0.4452$ ;  $S = 537.60$ ;  $P < 0.05$ ). Sin embargo, si prescindimos de los dos machos de un año, deja de haber relación significativa entre el estado de osificación del tarso y el tamaño ( $n = 16$ ;  $r_s = 0.2278$ ;  $S = 525.10$ ;  $P > 0.10$ ) y entre dicho estado y la edad ( $n = 16$ ;  $r_s = 0.1714$ ;  $S = 577.45$ ;  $P > 0.10$ ). En las hembras no hay relación

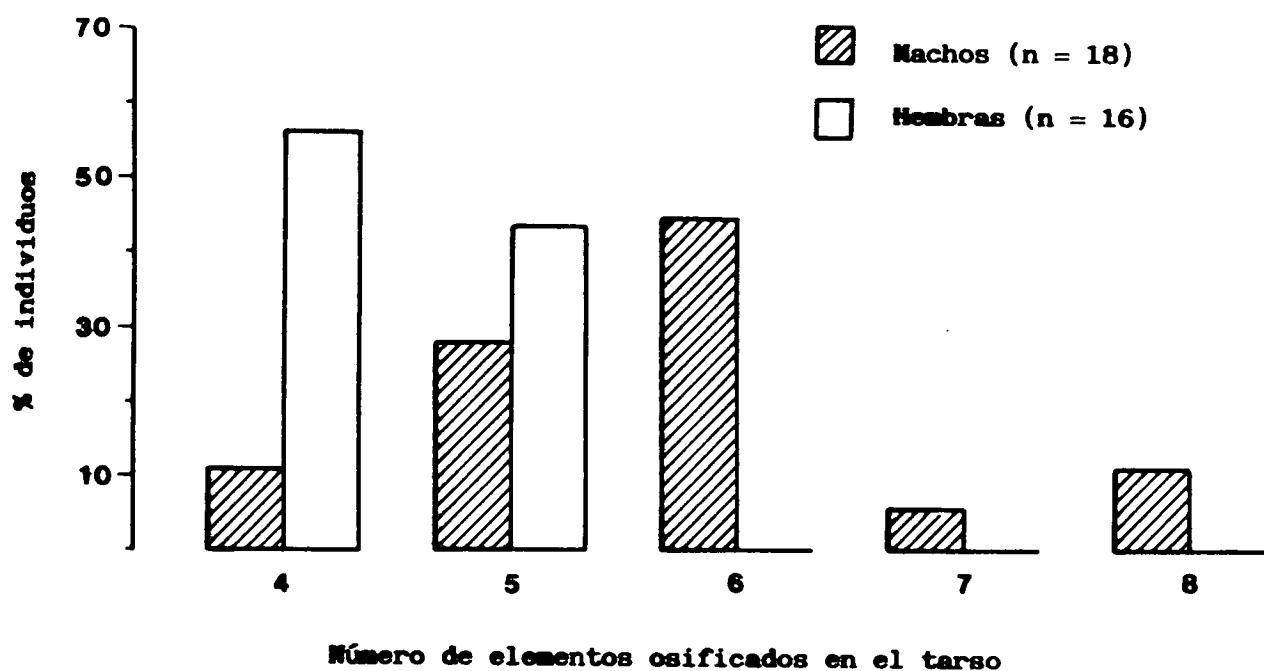


Figura 70.- *Pelobates varaldii*. Distribución de frecuencias del número de elementos osificados en el tarso de machos y hembras. Las diferencias entre ambos sexos son muy altamente significativas.

significativa ni entre el número de huesos del tarso y el tamaño ( $n = 16$ ;  $r_s = 0.1508$ ;  $S = 577.46$ ;  $P > 0.10$ , ni entre dicho número y la edad ( $n = 16$ ;  $r_s = 0.1118$ ;  $S = 603.98$ ;  $P > 0.10$ ). Los diagramas de dispersión correspondientes se muestran en las figuras 71 y 72.

La secuencia de osificación de los elementos del tarso de Pelodytes punctatus transcurre como sigue: tibialfibular (estadio 38); central, tarsal 1, tarsal 2, prehallux 1 y prehallux 2 (adultos). El tarsal 3 y el prehallux 3 nunca osifican en esta especie. Podemos dividir la osificación del tarso en dos etapas.

La primera de ellas afecta al tibialfibular. Dada la peculiar anatomía de este hueso, en la figura 69 dibujamos aspectos sucesivos en la progresión de la fusión y la osificación de los dos elementos que lo constituyen.

Las epifisis proximales del tibial y el fibular se fusionan hacia la mitad del estadio 37 (figura 68 C y lámina IX A); y las distales al finalizar el mismo (figura 68 D). La osificación de ambos elementos se inicia en el estadio 38 (figura 69 A) y la fusión de sus diáfisis en el 39 (figura 69 B y lámina IX B). La fusión afecta al 83% de la longitud del fibular al finalizar la metamorfosis (estadio 46; figura 69 G y lámina IX D).

En el estadio 38 se encuentra osificado el 25% de la longitud del fibular (figura 69 A y lámina IX B); el 40% en el estadio 40 (figura 69 C); el 61% en el estadio 42 (figura 69 D y lámina IX C) y el 83% en el 46 (figura 69 G y lámina IX D). En el adulto, entre el 88 y el 90% de la longitud del fibular -incluidas las epifisis- está constituida por tejido óseo.

En la figura 73, se muestra el paralelismo de los procesos de osificación y fusión del tibial fibular de Pelodytes punctatus. Los datos en que se basa la figura se detallan en la tabla 42.

En cuanto al crecimiento relativo en longitud de los elementos largos del tarso, tenemos que decir que el fibular pasa de tener una longitud máxima equivalente al 1% de la longitud cabeza + cuerpo en el renacuajo de estadio 33, al 5% en el estadio 37, el 10% en el 39, el 17% en el 42; el 21% en el 43

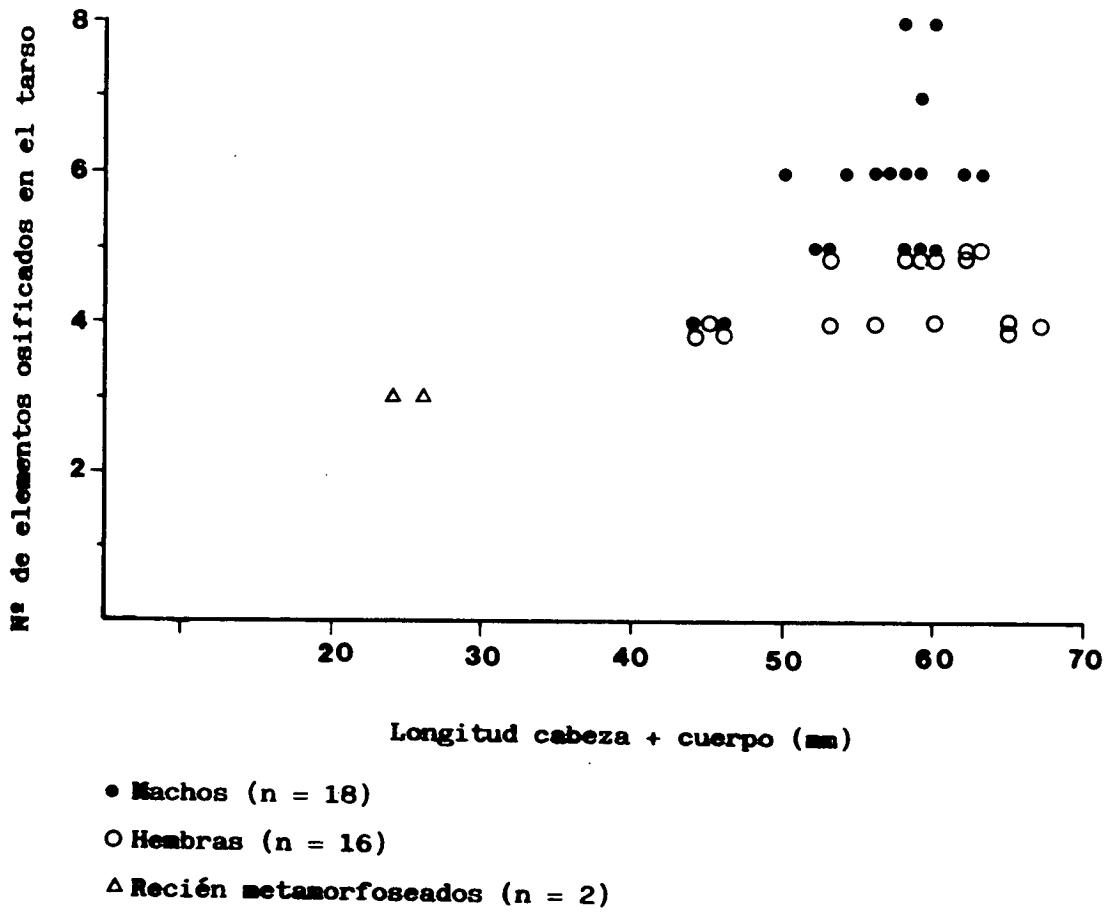


Figura 71.- Pelobates varaldii. Diagrama de dispersión de la longitud cabeza + cuerpo (LCC) y el número de elementos osificados en el tarso.

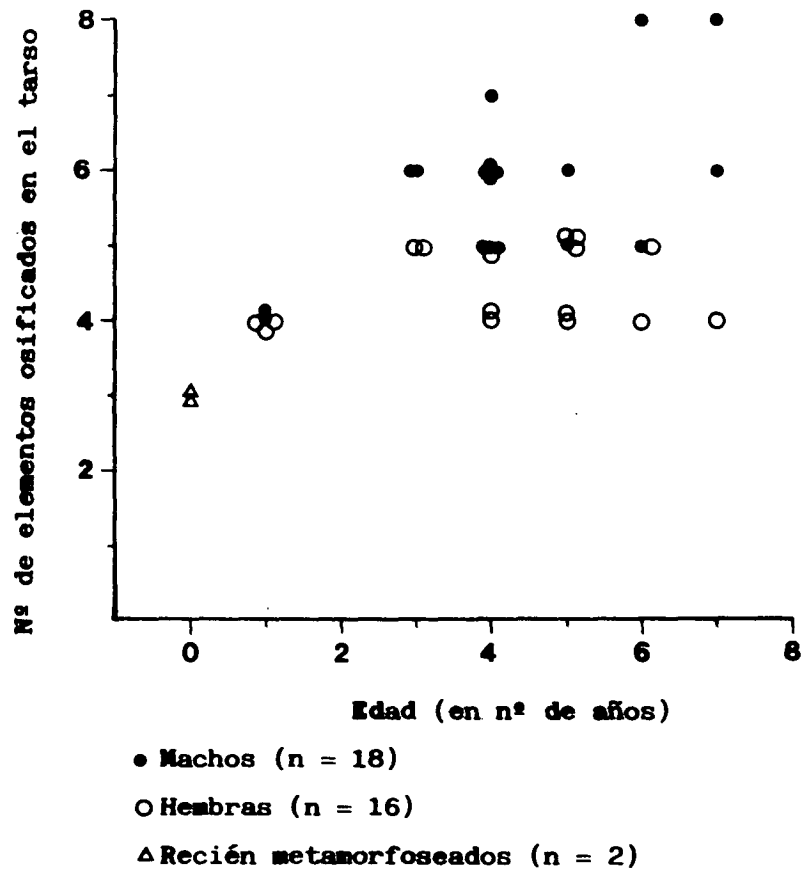


Figura 72.- Pelobates varaldii. Diagrama de dispersión de la edad y el número de elementos osificados en el tarso.

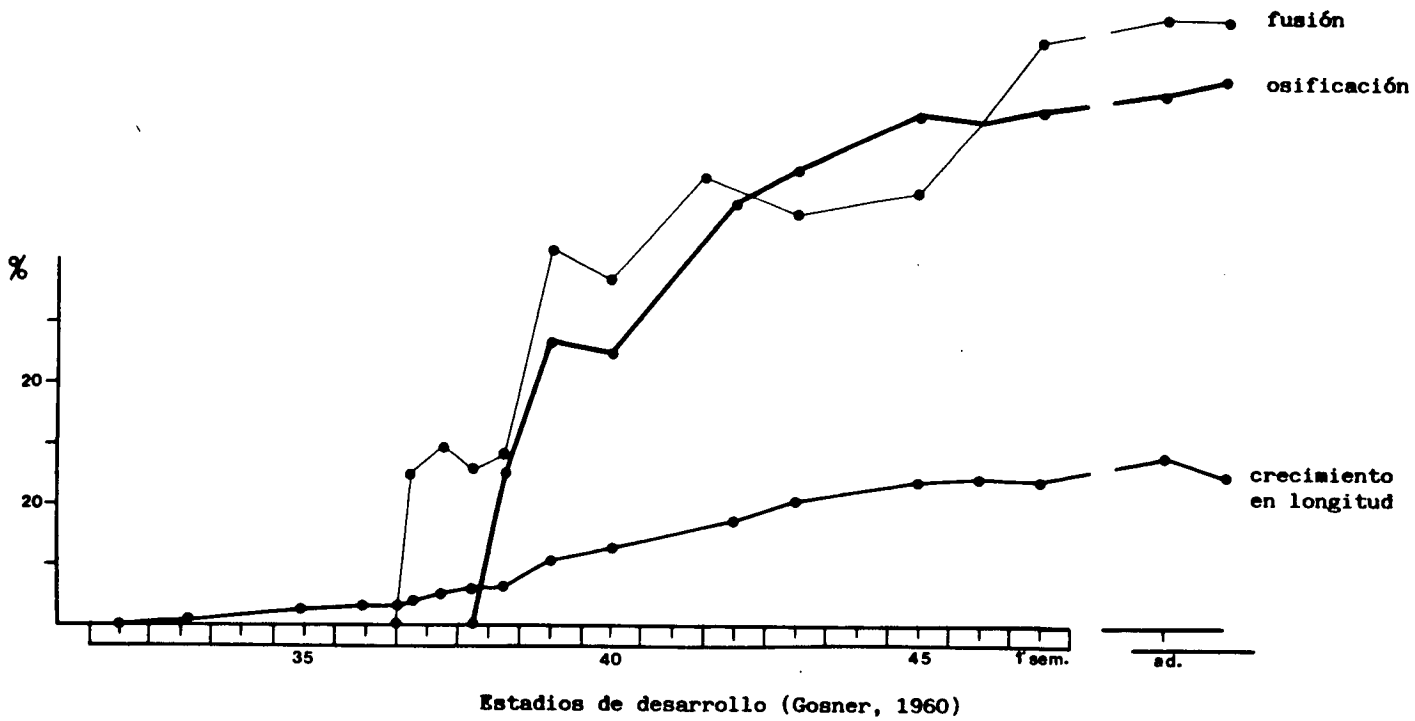


Figura 73.- *Pelodytes punctatus*. Trazo medio, crecimiento en longitud del fibular (expresado como porcentaje de la longitud cabeza + cuerpo). Trazo grueso, progreso de la osificación del fibular, y, trazo fino, progreso de su fusión con el tibial (expresados como porcentajes de la longitud del fibular en cada estadio, incluidas las epífisis).

Tabla 42.- Pelodytes punctatus. Crecimiento en longitud relativa del fibular, progreso de su fusión con el tibial y avance de su osificación a lo largo del desarrollo.

Estadio de Gosner	Longitud del fibular (% de LCC)	% de la long. del fibular fusionada	% de la long. del fibular osificada
33	1 .13	0	0
35	3 .01	0	0
36	3 .54	0	0
37	3 .63	0	0
37	4 .39	24 .67	0
37	5 .60	29 .53	0
38	6 .32	25 .37	0
38	6 .67	28 .13	25 .18
39	10 .44	62 .18	47 .13
40	13 .12	56 .67	40 .52
42	17 .35	73 .80	60 .93
43	20 .84	60 .73	74 .86
45	23 .92	71 .41	84 .33
46	24 .53	83 .24	82 .92
2ª sem.	24 .19	90 .58	80 .51
adulto	28 .58	100	87 .74
adulto	25 .03	100	89 .83

y el 24% en el 46; su longitud en el adulto oscila entre el 25 y el 28% de su talla (tabla 42). El aumento de longitud relativa del tarso de Pelodytes punctatus a lo largo de su desarrollo larvario y su crecimiento postmetamórfico se representa también en la figura 73. Al fin de la metamorfosis, el tibialfibular de P. punctatus muestra unas proporciones semejantes a las del adulto.

La segunda y última etapa de la osificación del tarso de P. punctatus afecta al central, tarsal 1, tarsal 2, prehallux 1 y prehallux 2. Esta etapa presenta dimorfismo sexual: en las hembras sólo osifica el central.

En la figura 74 se representan los histogramas de frecuencia por clases, según el número de elementos del tarso osificados, de los machos y las hembras estudiados. El escaso número de hembras ( $n = 3$ ) invalida cualquier comparación estadística de la distribución de los datos.

En los machos, la relación entre el número de elementos del tarso osificados y el tamaño es positiva y altamente significativa ( $n = 26$ ;  $r_s = 0.5173$ ;  $S = 1411.90$ ;  $P < 0.01$ ). El diagrama de dispersión de las dos variables se representa en la figura 75.

-----

En cuanto a la duración del proceso de inicio de la osificación en el tarso, en P. cultripes la primera y segunda etapas transcurren entre los estadios 39 y 46 de la tabla de Gosner y dura 9,33 días. La tercera etapa se inicia al año siguiente de alcanzar la madurez sexual; tiene una duración imprecisa, y afecta a más elementos en los machos. En P. varaldii, la tercera etapa de la osificación del tarso también implica más elementos en los machos. En Pelodytes punctatus sólo hay dos etapas. La primera se inicia en el estadio 38 y la segunda por lo menos un año después de que las gónadas maduren; al igual que en las dos especies anteriores, esta etapa presenta dimorfismo sexual. Consultar la tabla 41. El tibial y el fibular de Xenopus laevis (Newth, 1956) inician su osificación en el estadio 56 de su tabla normal (equivalente al 37 - 39 de la de Gosner) y los restantes elementos en la etapa adulta (Bernasconi, 1951). En Rana pipiens (Kemp & Hoyt, 1969), el tibial y el fibular empiezan a osificar en el estadio XI de su tabla normal

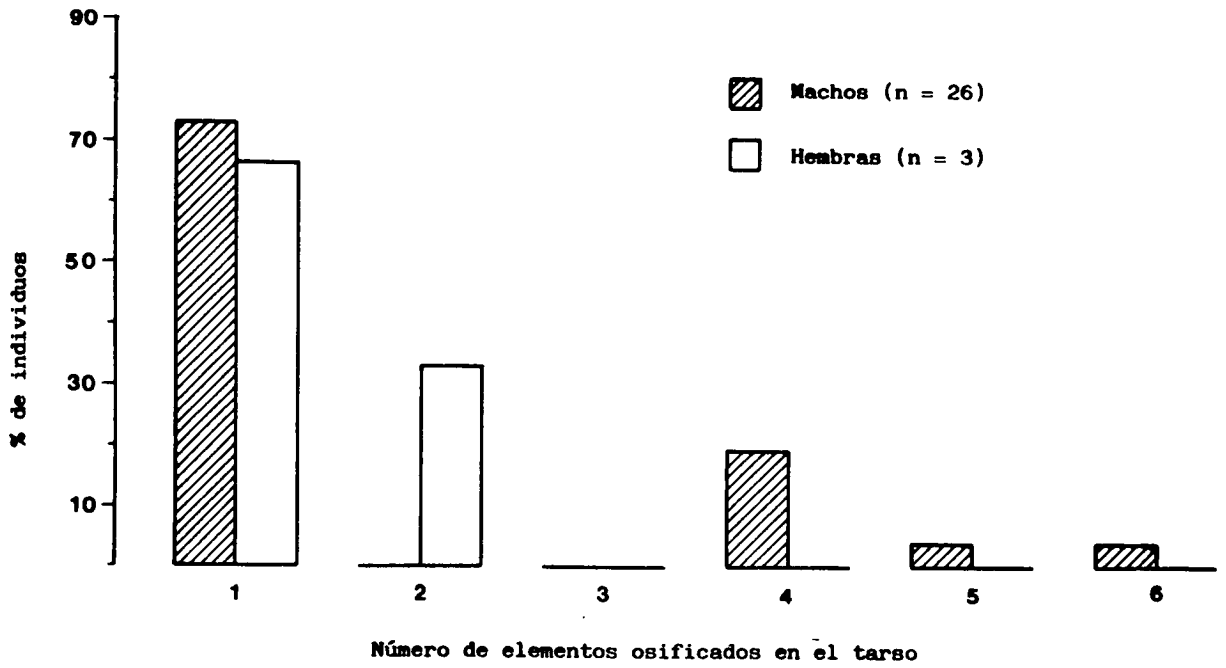


Figura 74.- *Pelodytes punctatus*. Dimorfismo sexual en el número de elementos osificados en el tarso.

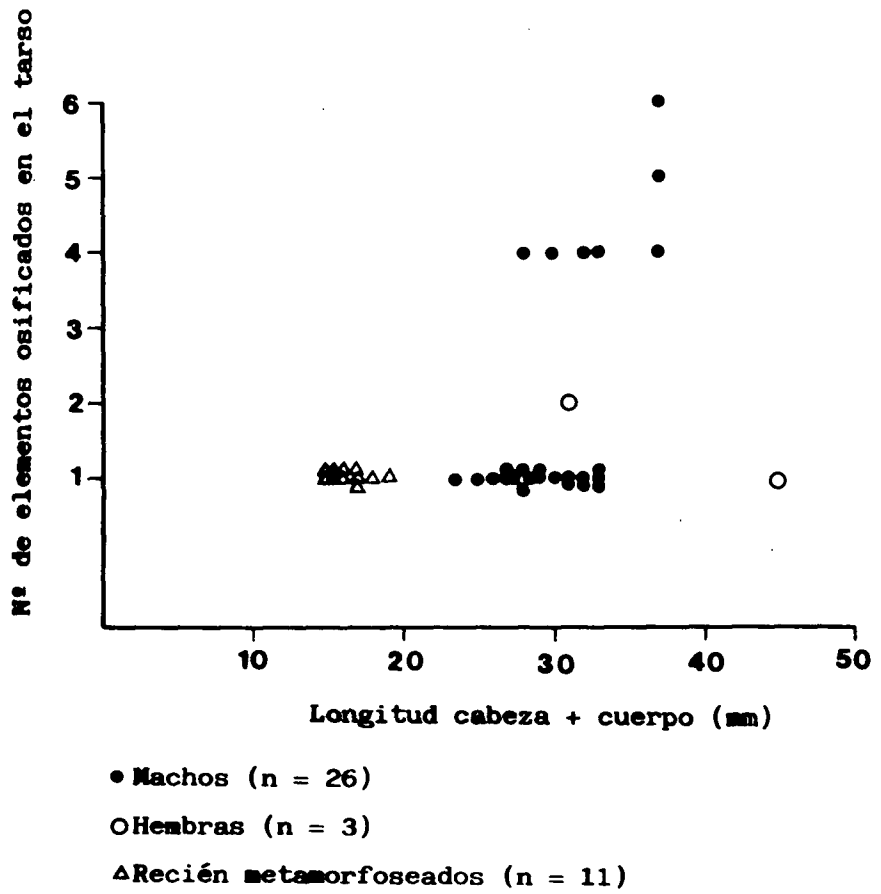


Figura 75.- Pelodytes punctatus. Diagrama de dispersión del tamaño y el número de elementos del tarso osificados.

(equivalente al 36 de la de Gosner); los autores no indican cuando osifican los tarsales. No hay datos sobre la duración del proceso de osificación del tarso de cualquier otro anuro.

La trayectoria ontogenética del proceso de condricación y de osificación del miembro posterior y cintura pelviana de P. cultripes, en tiempo real a 28°C, se representa en la figura 76. Los datos con que hemos realizado dicha figura pueden consultarse en la tabla 43.

La trayectoria del proceso de osificación del miembro posterior y cintura pelviana de Pelobates cultripes, modificada para poder compararla con la de Pelodytes punctatus se muestra en la figura 77. En abscisas, en vez de representar tiempo real, representamos la longitud media cabeza + cuerpo a cada estadio de Gosner. Los datos a partir de los cuales construimos esta representación figuran en la tabla 44.

-----

Las anomalías más comunes en el miembro posterior y cintura pelviana, se reducen a:

- variabilidad en el número de tarsales, detectada en Pelobates cultripes, P. varaldii y P. fuscus.
- variabilidad en el número de elementos del prehallux, muy común en Pelodytes punctatus.
- variabilidad en el estado de osificación del tarso en los adultos de las familias Pelobatidae y Pelodytidae, condicionada fundamentalmente por el sexo del animal, y secundariamente por su tamaño.
- asimetrías en el número de elementos afectados de osificación entre una pata y otra. Dado que siempre y exclusivamente afectaban al último elemento de la secuencia, he interpretado estas asimetrías como temporales y he considerado que la osificación del elemento en cuestión ya se había iniciado, aunque esto sólo fuera estrictamente cierto para uno de los elementos del par.

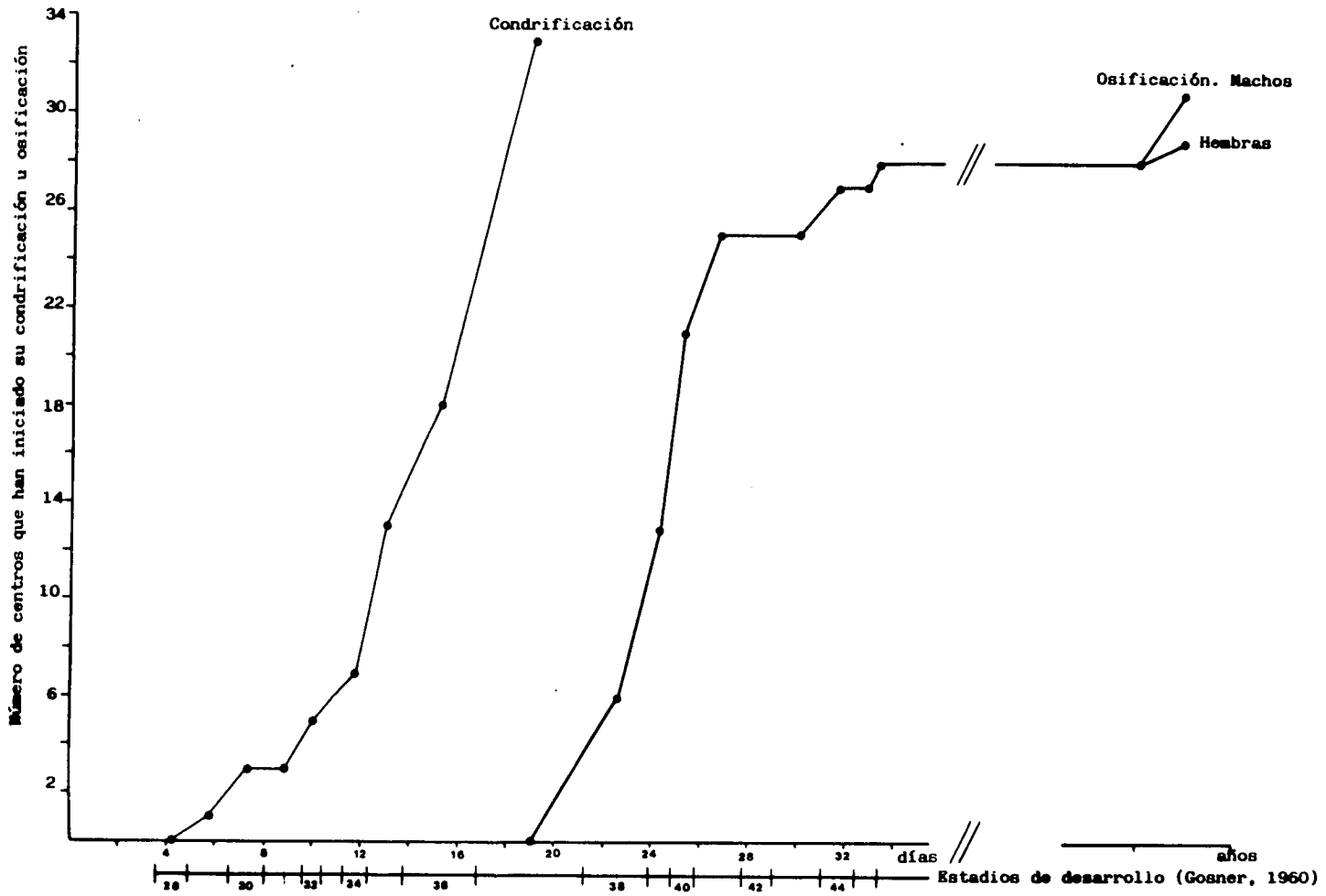


Figura 76.- Pelobates cultripes. Trayectorias ontogenéticas de los procesos de inicio de la condricación y de inicio de la osificación del miembro posterior y de la cintura pelviana.

Tabla 43.- Para cada estadio de Gosner (1960), edad característica a temperatura óptima de crecimiento (28°C) y número de centros de condricación y de osificación presentes en el miembro posterior y cintura pelviana de Pelobates cultripes.

Estadio de Gosner	Edad a que se alcanza cada estadio a 28° C (en días)	Edad característica a 28° C (en días)	Nº de centros de condricación presentes	Nº de centros de osificación presentes
28	3 .50	4 .12	0	
29	4 .75	5 .62	1	
30	6 .50	7 .25	3	
31	8 .00	8 .81	3	
32	9 .62	9 .99	5	
33	10 .37	10 .81	6	
34	11 .25	11 .75	7	
35	12 .25	13 .00	13	
36	13 .75	15 .25	18	
37	16 .75	19 .00	33	
38	21 .25	22 .56		6
39	23 .87	24 .31		13
40	24 .75	25 .25		21
41	25 .75	26 .75		25
42	27 .75	28 .37		25
43	29 .00	30 .00		25
44	31 .00	31 .66		27
45	32 .33	32 .83		27
46	33 .33	33 .33		28
hembras				29
machos				31

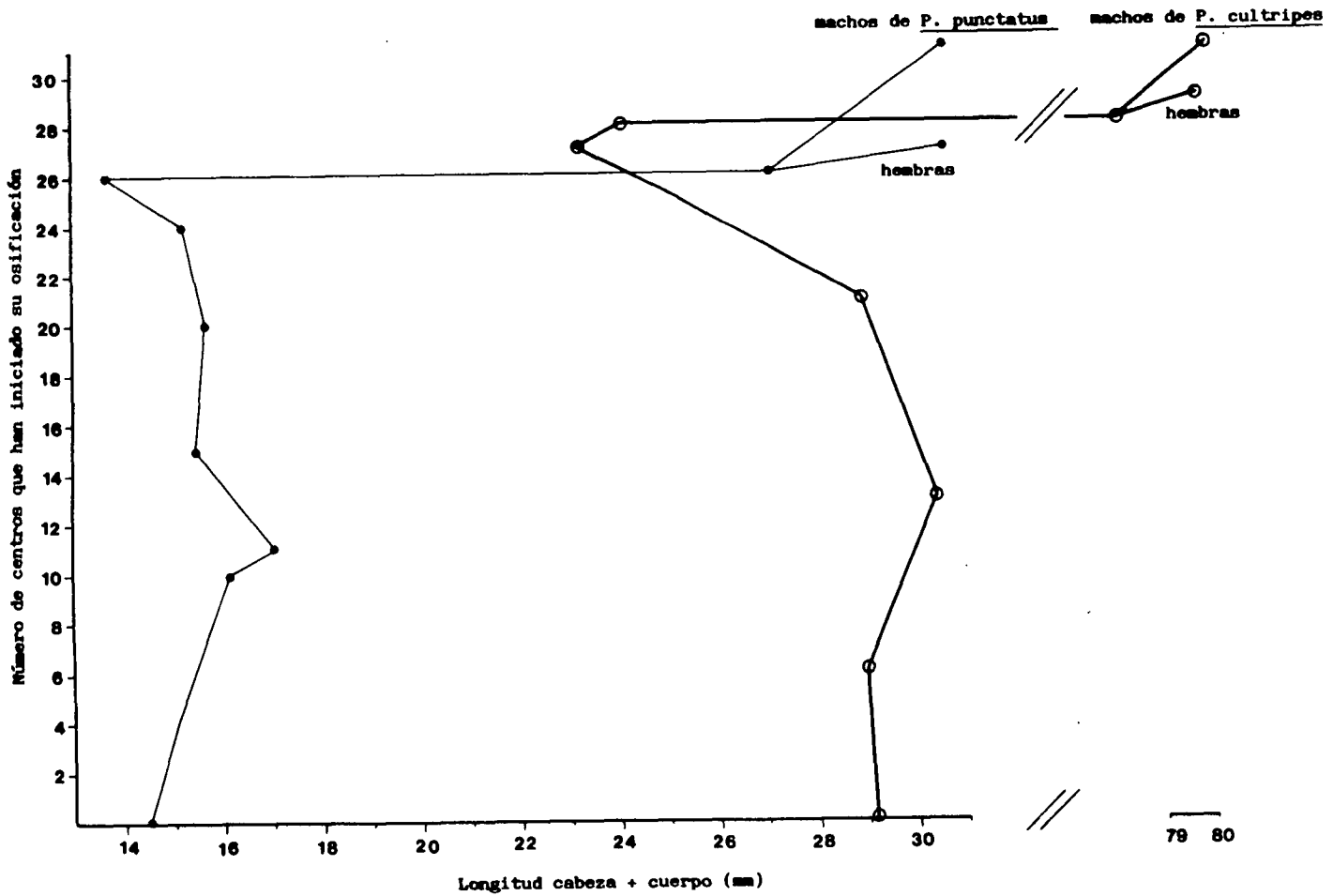


Figura 77.- Trayectorias ontogenéticas del proceso de inicio de la osificación en el miembro posterior y cintura pelviana de Pelobates cultripes y Pelodytes punctatus.

Tabla 44.- Para cada estadio de Gosner, longitud media cabeza + cuerpo (LCC) y número de centros de osificación presentes en Pelobates cultripes y Pelodytes punctatus.

Estadio Gosner	Pelobates cultripes		Pelodytes punctatus	
	LCC	Nº centros de osificación	LCC	Nº centros de osificación
36			14.47	0
37	29.12	0	15.06	4
38	28.94	6	16.14	10
39	30.36	13	17.06	11
40	28.85	21		
41	25.19	25	15.44	15
42			15.66	20
43			15.20	24
44	23.11	27	13.63	26
45				
46	24.03	28		
Hembras	79.57	29	30.59	27
Machos	79.87	31	30.20	31

#### **4. CONCLUSIONES GENERALES**

#### 4. CONCLUSIONES GENERALES

Esta tesis se ha realizado sobre el desarrollo del esqueleto de los anuros en sus etapas media y final, y tanto el tema como las familias objeto de estudio eran muy poco conocidas. Por ello, en este capítulo no resulta factible enumerar todas las observaciones y descripciones nuevas que se han realizado y sólo reseñaremos las conclusiones que tienen implicaciones y repercusiones más generales.

1. Los estadios de Gosner de la etapa larvaria de Pelobates cultripes presentan duraciones muy desiguales, incluso cuando la temperatura del agua se mantiene constante.
2. Se propone un método patrón para calcular la duración en días de cada estadio. Este método permite comparaciones interespecíficas. Consiste en medir la duración -en días u horas- de cada estadio a la temperatura óptima de crecimiento, en cada especie.
3. Durante la metamorfosis, los renacuajos, además de la disminución de longitud total debida a la reabsorción de la cola, experimentan paralelamente una reducción de su longitud cabeza + cuerpo. Esta se explica, a nivel morfológico, por reabsorción de la pieza cloacal, acortamiento de la parte anterior del cráneo y contracción de los espacios intervertebrales. La reducción es proporcionalmente mayor en los renacuajos de mayor tamaño.
4. Las poblaciones del género Pelobates no presentan diferencias entre machos y hembras en la edad a la que maduran las gónadas.
5. Las poblaciones del género Pelobates no presentan diferencias de longevidad atribuibles al sexo.
6. Las poblaciones del género Pelobates no presentan dimorfismo sexual en talla.
7. Las diferencias de tamaño y de longevidad interpoblacionales de

Pelobates cultripes se consideran, en principio, asociadas a factores ambientales. En concreto, la población capturada a nivel del mar se mostró significativamente más pequeña y menos longeva.

8. El crecimiento en longitud de Pelobates cultripes y P. varaldii se considera terminado dos años después de lograr la madurez sexual. La primavera inmediatamente siguiente al invierno en que maduran las gónadas, los sapos siguen creciendo en longitud cabeza + cuerpo y probablemente no se reproducen; la segunda primavera después de la madurez se reproducen con toda seguridad y crecen un poco más, luego el crecimiento en longitud de los animales se interrumpe. De hecho, nuestros resultados cuestionan la validez general de la teoría del crecimiento indefinido de las especies poiquilothermas.
9. Las diferencias de tamaño entre los adultos de Pelobates cultripes y P. varaldii se explican por un desfase en el momento de alcanzar la madurez sexual. Esto acarrea una morfología pedomórfica de tipo progenético en P. varaldii, con menor longitud cabeza + cuerpo en esta especie que alcanza un año antes la madurez sexual.
10. Se concluye que las secuencias de osificación de los cuatro segmentos en que hemos dividido el esqueleto caracterizan, inequívocamente, el desarrollo de una especie. Si a esto añadimos que la variabilidad intraespecífica detectada es bajísima, podemos recomendar vivamente la utilización de secuencias de osificación como caracteres taxonómicos en la inferencia de filogenias. Estos caracteres afectan a un segmento del proceso de desarrollo; no son sólo rasgos distintivos de la etapa larvaria o adulta, como el resto de los caracteres utilizados hasta la fecha en la taxonomía de anuros.
11. Nuestros resultados demuestran que, como cabía esperar, las especies del mismo género manifiestan diferencias de muy pocos pasos en sus secuencias de osificación. Estas diferencias son mayores entre las especies de las dos familias estudiadas -que tradicionalmente se han considerado muy próximas filogenéticamente-, y son mucho más acusadas con las especies de las restantes familias revisadas. Por tanto, los

resultados de las comparaciones interespecíficas son congruentes a grandes rasgos con la macrotaxonomía actual. Consecuentemente, se recomienda la acumulación de más datos sobre este tipo de caracteres del desarrollo procedentes de más especies y de más familias, pues se requieren para inferir relaciones de parentesco entre ellas.

12. La utilización de estos datos exigirá la elaboración de índices de similaridad entre secuencias y entre estadios. La obtención de los mismos se hallará sujeta a la siguiente restricción:

El número de ejemplares necesario para establecer secuencias detalladas oscilará entre cinco y diez por estadio, ya que el número mínimo ha de ser igual, al menos, al número de centros que inician su osificación. Esta imposición garantiza suficientes "instantáneas" de un proceso que, además de ser continuo, está dividido en estadios muy desiguales tanto en duración como en número de acontecimientos de diferenciación del esqueleto. A la vez, minimiza la subjetividad en la determinación de los estadios, tanto de un mismo autor en distintos momentos como, sobre todo, las diferencias de apreciación entre distintos investigadores cuando se quieren comparar los resultados de sus trabajos.

13. De nuestras indagaciones preliminares se desprende que el momento de inicio de la mineralización de los huesos se ve afectado en gran medida por factores ambientales, tales como la temperatura o la crianza en cautividad. Estos resultados obligan a que los trabajos relacionando la osificación del esqueleto con otros procesos del desarrollo morfológico - estadios de Gosner, por ejemplo- deban ser realizados exclusivamente con ejemplares colectados en el campo en situaciones "no límite", que son los que presentan rangos de variación más reducidos. Por encima de todo, esta recomendación ha de aplicarse estrictamente en las comparaciones interespecíficas del momento de inicio de la osificación de cada hueso. Dada la variabilidad de estos caracteres, no son aconsejables para estudios taxonómicos; aunque estos datos son claves en la identificación de heterocronías.

14. Para cada centro de osificación, se propone que se considere estadio

- de inicio de su mineralización, el primero de la serie en el cual al menos el 50% de los ejemplares examinados presenta mineralización. Se censura el criterio empleado hasta ahora por otros autores que consideran estadio de inicio el primero en que algún ejemplar, aunque sea uno solo, presenta mineralización, pues favorece que las escasas excepciones se consignent como patrón típico de la especie.
15. En Pelobates cultripes se han detectado pequeñas alteraciones respecto a la secuencia patrón, en las secuencias de osificación del cráneo y del carpo. Estos datos contribuyen a confirmar la hipótesis de Hanken & Hall (1984) de que la secuencia de osificación es un conjunto de sucesos esencialmente independientes.
  16. Se confirma la colaboración de una osificación medial de tipo dérmico en la constitución del frontoparietal de Pelobates cultripes y P. varaldii. Rocek (1980) la describió con todo detalle en P. fuscus y P. syriacus; sin embargo, dudamos de la importancia filogenética que dicho autor atribuye a este centro de osificación adicional, apoyándonos en la gran diversidad que existe, publicada en la bibliografía, en cuanto a número de centros de osificación en los huesos de membrana del cráneo de los anuros.
  17. Se coincide con otros autores en que la reducción del número de vértebras presacras en los anuros es un carácter derivado de todo el orden. Se hipotetiza la desaparición de las últimas vértebras por un simple proceso de heterocronía. Después de la condricación de las nueve o diez primeras vértebras, en las estadios 25 y 26, se produciría una ralentización del proceso de diferenciación vertebral, llegando finalmente a la interrupción del proceso de condricación dos o tres arcos neurales más tarde, al final de la metamorfosis. Este fenómeno iría asociado con una aceleración del ritmo de crecimiento longitudinal de los huesos largos de los miembros y de las cinturas.
  18. La presencia en Pelobates cultripes de centros de osificación independientes en las apófisis transversas de las últimas vértebras presacras, 5ª, 6ª, 7ª y 8ª, hace posible la homologación de dichas apófisis con costillas. No ha podido confirmarse la existencia de

costillas en Pelodytes punctatus.

19. El estudio comparado del desarrollo de la columna vertebral de Pelobátidos y Pelodítidos nos permite afirmar que la procelia de sus vértebras adultas se alcanza por un proceso de desarrollo convergente. Sólo se presentan cóndilos libres en los pelobátidos juveniles. Por tanto, dicho carácter debe codificarse de distinta manera en las dos familias.
20. Nuestros resultados, en cuanto a porcentajes de malformaciones en la columna vertebral de renacuajos y adultos, nos permiten afirmar rotundamente que las asimetrías del sacro no tienen ninguna repercusión significativa en la probabilidad de supervivencia de los individuos que las padecen.
21. La variabilidad existente en la columna vertebral de las especies estudiadas en cuanto a: número de vértebras presacras, fusión de vértebras, tipo de articulación sacrococcígea y presencia de procesos transversos en el urostilo, aboga en contra de su utilización indiscriminada como caracteres taxonómicos a nivel familiar sin una valoración previa, taxón por taxón, de su variabilidad intraespecífica.
22. Del estudio cuidadoso de la condricación de la cintura pelviana de Pelobates cultripes y Pelodytes punctatus se desprende que en ningún momento de su ontogenia existe una pieza cartilaginosa independiente que pueda asociarse al pubis. Tampoco se ha encontrado una descripción clara de la posible ontogenia del pubis en la revisión bibliográfica efectuada. Como consecuencia, se defiende la ausencia de pubis al menos en las dos familias estudiadas.
23. Las osificaciones que se inician después de la madurez sexual -carpo y tarso- mostraron diferencias significativas entre ambos sexos en su estado de mineralización, en las tres especies de las que se estudió gran número de ejemplares. Estos resultados nos parecen suficientes para enunciar una hipótesis sobre la osificación más intensa del carpo y del tarso en los anuros machos, respecto a las hembras de su misma especie. Además, esperamos que el dimorfismo sea más acusado en las especies con

mayor talla adulta de entre las varias de un mismo género. Esta conclusión tiene repercusión en paleontología: en especies fósiles de anuros, será posible identificar el sexo de una fracción de individuos en las poblaciones de las cuales existan, al menos, veinte carpos y tarsos bien conservados.

24. En las especies examinadas, la variabilidad en el número de elementos del carpo ha sido prácticamente inexistente a nivel intraespecífico e intragenérico. Pero, de los estudios del proceso de condricación y de la revisión bibliográfica efectuada, se deducen multitud de convergencias en la morfología adulta. No obstante, la gran divergencia de los carpos adultos de Megophrys y Leptobrachium añade un dato que nos parece importante para la posible ubicación de estas especies en familias distintas.
25. Se rechaza el modelo de desarrollo del carpo de los tetrápodos de Holgrem (1933). Los datos no apoyan la recapitulación durante el desarrollo del carpo de un modelo ancestral, equivalente en número de elementos al del anfibio Eriops, el cual poseía el carpo conservado completo más antiguo que se conoce.
26. Se sugiere que el tibial y el fibular de los anuros podría proceder de la duplicación de la tibia y la fibula, en vez de pertenecer al tarso. Para ello, nos basamos en el tipo de osificación que sufren -idéntica a la de los restantes huesos largos- y en su comportamiento en las secuencias de condricación y de osificación del miembro posterior. Mientras no se descubran fósiles que prueben un alargamiento progresivo de estos dos huesos, me parece que también debe tenerse en cuenta la posibilidad de su aparición filogenéticamente brusca por un mecanismo de duplicación.
27. Se rectifican los siguientes caracteres diagnósticos de la familia Pelobatidae (Lynch, 1973; Cannatella, 1985):
  - Presencia de columella: este hueso falta en Pelobates cultripes, P. fuscus, y P. syriacus, aunque se encuentra osificado y bien desarrollado en P. varaldii y todas las especies de los géneros

Scaphiopus y Spea.

- Fusión del sacro y el urostilo: sólo es cierta en Pelobates fuscus, P. syriacus y las especies de los géneros Scaphiopus y Spea. El 83% de los adultos de Pelobates cultripes y la casi totalidad de los P. varaldii conservan individualizadas ambas piezas, y articuladas por un sólo cóndilo de tamaño insignificante.
  
- 28. Se rechazan, por erróneos, los siguientes caracteres diagnósticos de la familia Pelodytidae (Lynch, 1973; Cannatella, 1985): fusión del atlas y la segunda vértebra, anomocelia de la columna vertebral, y articulación sacrococcigea monocondilar. Esta última articulación es de tipo bicondilar, con tendencia a la fusión parcial de los dos cóndilos en los Pelodytes punctatus de mayor tamaño.
  
- 29. Se añade un nuevo carácter a las diagnosis de las familias Pelobatidae y Pelodytidae: la presencia en todas las especies de un hueso del carpo descrito e identificado como tal por primera vez en este trabajo, el subulnar.
  
- 30. Los estudios comparados de desarrollo se han revelado como el mejor método para filtrar los caracteres óseos utilizados en la macrosistemática del orden Anura, pues permiten identificar -y eliminar de los análisis- muchos caracteres convergentes y ponderar otros. La ponderación es necesaria en caracteres afectados de gran variabilidad intraespecífica, elevado porcentaje de malformaciones, o resultado múltiple de un sólo y simple proceso heterocrónico. Por otra parte, estos estudios sirven para caracterizar inequívocamente todos los estadios de desarrollo de una especie. Además, con ellos se podrán inferir filogenias entre varias especies estadio por estadio y, posteriormente, examinar la congruencia de los resultados.

**5. BIBLIOGRAFIA**

- ADOLPHI, H. (1895). Über Variationen der Spinalnerven und der Wirbelsäule anurer Amphibien. II (Pelobates fuscus Wagl. und Rana esculenta L.). **Morph. Jb.**, 22: 448-490.
- ALBERCH, P. (1985). Problems with the interpretations of developmental sequences. **Syst. Zool.**, 34 (1): 46-58.
- & ALBERCH, J. (1981). Heterochronic mechanism of morphological diversification and evolutionary change in the neotropical salamander, Bolitoglossa occidentalis (Amphibia: Plethodontidae). **J. Morph.**, 167: 249-264.
- ; GOULD, S. J.; OSTER, G. F. & WAKE, D. B. (1979). Size and shape in ontogeny and phylogeny. **Paleobiology**, 5 (3): 296-317.
- ALTIG, R. (1969a). Notes on the ontogeny of the osseous cranium of Ascaphus truei. **Herpetologica**, 25 (1): 59-62.
- (1969b). **Developmental cranial osteology of three species of Rana (Anura)**. Ph. D. dissertation, Oregon State University, Corvallis, 81 pp. En Gaudin (1978).
- ALVAREZ, J. & SALVADOR, A. (1984). Cría de anuros en la laguna de Chozas de Arriba (León) en 1980. **Mediterránea Ser. Biol.**, 7: 27-48.
- ANDERSEN, M. L. (1977). Myological studies on the relationship between the anuran prepollex and prehallux. **Herp. Rev.**, 8 (3) supplement: 1.
- ANDREONE, F. & PAVIGNANO, I. (1988). Observations on the breeding migration of Pelobates fuscus insubricus Cornalia, 1873 at a ditch in North Western Italy (Amphibia, Anura, Pelobatidae). **Boll. Mus. reg. Sci. nat. Torino**, 6 (1): 241-250.
- ARNOLD, E. N. & BURTON, J. A. (1978). **Guía de campo de los reptiles y anfibios de España y Europa**. Ediciones Omega, S. A., Barcelona. 275 pp.

- BAKER, J. R. (1933). **Cytological Technique. The principles and practice of methods used to determine the structure of the metazoan cell.** Methuen & CO., London. 211 pp.
- BARBADILLO, L. J. (1987). **La Guía de Incafo de los anfibios y reptiles de la Península Ibérica, Islas Baleares y Canarias.** Incafo, Madrid. 693 pp.
- BAŞOĞLU, M. & ZALOĞLU, S. (1964). Morphological and osteological studies in Pelobates syriacus from Izmir Region, Western Anatolia (Amphibia, Pelobatidae). **Senckenberg. biol.**, 45 (3/5): 233-242.
- BERNASCONI, A. F. (1951). Über den Ossifikationsmodus bei Xenopus laevis Daud. **Densk. schweiz. naturf. Ges.**, 79: 1-252 + 2 láms.
- BORN, G. (1880). Nachträge zu "Carpus und Tarsus". **Morph. Jb.**, 6: 49-78.
- BOSCA Y CASANOVES, E. (1919). Una adición al género Pelobates Wagler. **Boln. R. Soc. esp. Hist. nat.**, 19: 89-93 + Lám. I.
- BOULENGER, G. A. (1920). Sur le Pelobates Wilsoni, Boscá. **Boln. R. Soc. esp. Hist. nat.**, 20: 293-294.
- BRANHAM, A. E. & LIST, J. C. (1979). Development of the urostyle during metamorphosis in five species of anurans. **J. Morph.**, 159: 311-330.
- BROWN, G. W. Jr. (1964). The metabolism of Amphibia. En J. A. Moore (ed.): **Physiology of the Amphibia.** Academic Press, New York. pp.: 1-98.
- BUFFRENIL, V. de (1982). Morphogenesis of bone ornamentation in extant and extinct crocodylians. **Zoomorphology**, 99: 155-166.
- BURKE, A. C. & ALBERCH, P. (1985). The development and homology of the chelonian carpus and tarsus. **J. Morph.**, 186: 119-131.

- BUSACK, S. D. (1986). Biogeographic analysis of the herpetofauna separates by the formation of the strait of Gibraltar. **National Geographic Research**, 2 (1): 17-36.
- --; MAXON, L. R. & WILSON, M. A. (1985). Pelobates varaldii (Anura: Pelobatidae): a morphologically conservative species. **Copeia**, 1985 (1): 107-112.
- -- & ZUG, G. R. (1976). Observations on the tadpoles of Pelobates cultripes from Southern Spain. **Herpetologica**, 32: 130-137.
- CANNATELLA, D. C. (1985). **A phylogeny of primitive frogs (Archaeobatrachians)**. Ph. D. Thesis. Univ. Kansas, Lawrence. 404 pp.
- ----- & TRUEB, L. (1988). Evolution of Pipoid frogs: Morphology and phylogenetic relationships of Pseudhymenochirus. **J. Herpet.**, 22 (4): 439-456.
- CASTANET, J. (1975). Quelques observations sur la présence et la structure des marques squelettiques de croissance chez les amphibiens. **Bull. Soc. zool. Fr.**, 100: 603-620.
- -- (1981). Nouvelles données sur les lignes cimentantes de l'os. **Arch. Biol. (Bruxelles)**, 92: 1-24.
- -- (1982). **Recherches sur la croissance du tissu osseux des reptiles. Application: La méthode squelettochronologique**. Thèse Dr. ès Sciences. Univ. Paris VII. 244 pp.
- -- (1987). La squelettochronologie chez les Reptiles III- Application. **Annls Sci. nat., Zoologie**, 13<sup>e</sup> Série, 8: 157-172.
- CONANT, R. (1958). **A field guide to reptiles and amphibians of Eastern and Central North America** (2<sup>e</sup> edición 1975). Houghton Mifflin Co, Boston. 429 pp.

- CHOMIAKOFF, M. von (1894). Die Entwicklung des Tarsus bei Pelobates fuscus. **Bull. Soc. Nat. Moscou**, 8: 351-357 + lám. VIII.
- DIAZ-PANIAGUA, C. (1983). Influencia de las características del medio acuático sobre las poblaciones de larvas de anfibios en la Reserva Biológica de Doñana (Huelva, España). **Doñana, Acta Vertebrata**, 10 (1): 41-53.
- (1985). Larval diets related to morphological characters of five anuran species in the Biological Reserve of Doñana (Huelva, Spain). **Amphibia-Reptilia**, 6: 307-322.
- (1986). Reproductive period of amphibians in the Biological Reserve of Doñana (SW Spain). En Roček, Z. (ed.): **Studies in Herpetology**, Prague, pp: 429-432.
- & ARRIZABALAGA, B. (1987). Development and growth rates of coexisting Pelobates cultripes and Pelodytes punctatus. En Gelder, J. J. van; Strijbosch, H. & Bergers, P. J. M. (eds.): **Proc. Fourth Ord. Gen. Meet. S. E. H.**, Faculty of Sciences, Nijmegen, pp: 115-118.
- & RIVAS, R. (1987). Datos sobre actividad de anfibios y pequeños reptiles de Doñana (Huelva, España). **Mediterránea Ser. Biol.**, 9: 15-27.
- DIJK, D. E. van (1960). Segmentation of the pelvic region of Anura with particular reference to the urostyle of Ascaphus. **S. Afr. J. Sci.**, 56 (3): 78-80.
- DINGERKUS, G. & UHLER, L. D. (1977). Enzyme clearing of alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage. **Stain Tech.**, 52 (4): 229-232.
- DINSMORE, C. E. & HANKEN, J. (1986). Native variant limb skeletal patterns in the red-backed salamander, Plethodon cinereus, are not regenerated. **J. Morph.**, 190: 191-200.

- DIXON, W. J. (ed.) (1983). **BMDP Statistical Software 1983 Printing with additions**, Univ. California Press, Berkeley, 734 pp.
- DOESBURG, P. H. van (1956). The further development of skeleton and musculature of the head: The development up to metamorphosis. En Nieuwkoop, P. D. & Faber, J. (eds.): **Normal table of Xenopus laevis (Daudin)** (2ª edición 1967), North-Holland Publishing Company, Amsterdam, pp: 86-93.
- DOMINGO-SORIA, A. (1983). Nueva localidad para Pelodytes punctatus (Daudin) 1802. **Doñana, Acta Vertebrata**, 10 (1): 203.
- DUELLMAN, W. E. & TRUEB, L. (1986). **Biology of Amphibians**. McGraw-Hill Book Company, New York. 670 pp.
- DŽUKIĆ, G. & PASULJEVIĆ, G. (1983). On chorological demarcation of the species Pelobates fuscus (Laurenti) 1768 and Pelobates syriacus. Boettger 1889 (Amphibia, Pelobatidae) in Yugoslavia I. Zoogeographical study. **Drugi simpozijum o fauni SR Srbije-Zbornik**, Beograd. pp: 139-142. En yugoslavo, con resumen en inglés.
- EATON, T. H. Jr. (1939). Development of the frontoparietal bones in frogs. **Copeia**, 1939 (2): 95-97.
- (1942). Are the "fronto-parietal" bones in frog actually frontals. **J. Wash. Acad. Sci.**, 32: 151-153.
- EISELT, J. von (1988). Krötenfrösche (Pelobates gen., Amphibia salientia) in Türkisch-Thrakien und Griechenland. **Annln. naturh. Mus. Wien**, 90 (B): 51-59.
- EMELIANOFF, S. V. (1925). Zur Frage über die Entwicklung der Wirbelsäule bei den Amphibien. **Russk. zool. Zh.**, 5, (1-2): 53-72. En ruso, con resumen en alemán.

- EMERY, C. (1894). Sulla morfologia dei membri degli anfibi e sulla filogenia del chiropterigio. *Ricerche Lab. Anat. Roma*, 4: 5-35 + 2 láms.
- (1897). Die fossilen Reste von Archegosaurus und Eryops und ihre Bedeutung für die Morphologie des Gliedmaßenskelets. *Anat. Anz.*, 14: 201-208.
- ESTEBAN, M. & SANCHIZ, B. (1986). Paleoclimatic inferences based on fossil ranids. En Roček, Z. (ed.): *Studies in Herpetology*, Prague, pp: 379-382.
- ESTES, R. (1970). New fossil Pelobatid Frogs and a review of the genus Eopelobates. *Bull. Mus. comp. Zool. Harv.*, 139 (6): 293-339.
- & REIG, O. A. (1973). The early fossil record of frogs a review of the evidence. En Vial, J. L. (ed.): *Evolutionary biology of the anurans: Contemporary research on major problems*, Univ. Missouri Press, Columbia, pp: 11-63.
- ETKIN, W. (1964). Metamorfosis. En J. A. Moore (ed.): *Physiology of the Amphibia*. Academic Press, New York. pp: 427-468.
- FINK, W. L. (1982). The conceptual relationship between ontogeny and phylogeny. *Paleobiology*, 8 (3): 254-264.
- FOX, H. (1984). *Amphibian morphogenesis*. Humana Press, Clifton (New Jersey), 301 pp.
- FROST, D. R. (ed.) (1985). *Amphibian species of the world: A taxonomic and geographic reference*. Allen Press, Inc. & The Association of Systematics Collections, Lawrence (Kansas). 732 pp.
- GABE, M. (1969). *Techniques histologiques*. Masson et C<sup>a</sup>, Paris. 1113 pp.
- GADOW, H. (1896). On the evolution of the vertebral column of Amphibia and Amniota. *Phil. Trans. R. Soc., Series B*, 187: 1-57.

- & ABBOTT, E. C. (1895). On the evolution of the vertebral column of fishes. *Phil. Trans. R. Soc., Series B*, 186: 193-221.
- GANS, C. & PARSONS, T. S. (1966). On the origin of the jumping mechanism in frogs. *Evolution*, 20: 92-99.
- GARCIA-PARIS, M. (1985). *Los anfibios de España*. Publicaciones de Extensión Agraria, Madrid. 287pp.
- GARCIA-VALDECASAS, A. & SANCHÍZ, B. (1989). La inferencia filogenética. En Aguirre, A. (Coordinador): *Paleontología. Nuevas tendencias*. CSIC, Madrid. pp: 47-59.
- GARDINER, B. G. (1983). Gnathostome vertebrae and the classification of the Amphibia. *Zool. J. Linn. Soc.*, 75: 1-59.
- GAUDIN, A. J. (1973). The development of the skull in the Pacific tree frog, *Hyla regilla*. *Herpetologica*, 29: 205-218.
- -- (1978). The sequence of cranial ossification in the California toad, *Bufo boreas* (Amphibia, Anura, Bufonidae). *J. Herpet.*, 12: 309-318.
- GEGENBAUR, C. (1864). *Untersuchungen zur Vergleichenden Anatomie der Wirbelthiere. I. Carpus und Tarsus*. Verl. W. Engelmann, Leipzig. 127 pp + 6 láms.
- GISLEN, T. (1936). On the history of the evolution and distribution of the european Pelobatids. *Zoogeographica*, 3: 119-131.
- GOSNER, K. L. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16: 183-190.
- GREEN, T. L. (1931). On the pelvis of the anura: a study in adaptation and recapitulation. *Proc. zool. Soc. Lond.*, 1931 (4): 1259-1290.

- GREGORY, W. K.; MINER, R. W. & NOBLE, G. K. (1923). The carpus of Eryops and the structure of the primitive chiropterygium. **Bull. Am. Mus. nat. Hist.**, 48: 279-288.
- GRIFFITHS, I. (1954). On the nature of the fronto-parietal in Amphibia, Salientia. **Proc. zool. Soc. Lond.**, 123: 781-792.
- -- (1956). Status of Protobatrachus massinoti. **Nature, Lond.**, 177: 342-343.
- -- (1959). The phylogenetic status of the Sooglossinae. **Ann. nat. Hist.**, 2: 626-640.
- -- (1963). The phylogeny of the Salientia. **Biol. Rev.**, 38: 241-292 + 1 lám.
- GUARDABASSI, A. (1952). I sali di calcio del sacco endolinfatico ed i processi di calcificazione delle ossa durante la metamorfosi normale e sperimentale nelle larve di Bufo vulgaris, Rana dalmatina e Rana esculenta. **Boll. Soc. ital. Biol. sper.**, 28: 355-357.
- ---- (1960). The utilization of the calcareous deposits of the endolymphatic sacs of Bufo bufo bufo in the mineralization of the skeleton. Investigations by means of Ca<sup>45</sup>. **Z. Zellforsch.**, 51: 278-282.
- HAINES, R. W. (1938). The primitive form of epiphysis in the long bones of tetrapods. **J. Anat.**, 72: 323-343.
- -- (1969). Epiphyses and sesamoids. En Gans, C.; Bellairs, S. d'A. & Parsons, T. S. (eds.): **Biology of the Reptilia. Vol. 1. Morphology A.** Academic Press, London. pp: 81-116.
- HALL, B. K. (1984). Development processes underlying heterochrony as an evolutionary mechanism. **Can. J. Zool.**, 62: 1-7.

- HALLIDAY, T. R. & VERRELL, P. A. (1988). Body size and age in amphibians and reptiles. *J. Herpet.*, 22 (3): 253-265.
- HANKEN, J. (1982). Appendicular skeletal morphology in minute salamanders, genus Thorius (Amphibia: Plethodontidae): Growth regulation, adult size determination, and natural variation. *J. Morph.*, 174: 57-77.
- (1983). High incidence of limb skeletal variants in a peripheral population of the red-backed salamander, Plethodon cinereus (Amphibia: Plethodontidae), from Nova Scotia. *Can. J. Zool.*, 61: 1925-1931.
- & DINSMORE, C. E. (1986). Geographic variation in the limb skeleton of the red-backed salamander, Plethodon cinereus. *J. Herpet.*, 20 (1): 97-101.
- HANKEN, J. & HALL, B. K. (1984). Variation and timing of the cranial ossification sequence of the Oriental fire-bellied toad, Bombina orientalis (Amphibia, Discoglossidae). *J. Morph.*, 182: 245-255.
- HARKEY, G. A. & SEMLITSCH, R. D. (1988). Effects of temperature on growth, development and color polymorphism in the ornate chorus frog Pseudacris ornata. *Copeia*, 1988 (4): 1001-1007.
- HEMELAAR, A. S. M. (1981). Age determination of male Bufo bufo (Amphibia, Anura) from the Netherlands, based on year rings in phalanges. *Amphibia-Reptilia*, 1 (3/4): 223-233.
- (1988). Age, growth and other population characteristics of Bufo bufo from different latitudes and altitudes. *J. Herpet.*, 22 (4): 369-388.
- HERRERA, C. M. (1973). Régimen alimenticio de Tyto alba en España sudoccidental. *Ardeola*, 19 (2): 359-394.
- HERRERO, P. & TALAVERA, R. R. (1988). Citotaxonomic studies on Iberian and

Maroccan Pelobates (Anura: Pelobatidae). *Acta zool. cracov.*, 31 (17): 505-508 + lám. XVIII.

HINCHLIFFE J. R. (1977). The chondrogenic pattern in chick limb morphogenesis: a problem of development and evolution. En Ede, B. A.; Hinchliffe, J. R. & Balls, M.: **Vertebrate limb and somite morphogenesis**. Cambridge Univ. Press. En Hinchliffe & Johnson (1980).

----- & JOHNSON, D. R. (1980). **The development of the vertebrate limb. An approach through experiment, genetics and evolution**. Clarendon Press, Oxford, 268 pp + 13 láms.

HOLMGREN, N. (1933). On the origin of the tetrapod limb. *Acta zool., Stockh.*, 14: 185-295

----- -- (1949). On the tetrapod limb problem-again. *Acta zool., Stockh.*, 30: 485-508.

HOTA, A. K. & DASH, M. C. (1986). Growth and metamorphosis of anuran larvae: effect of diet and temperature. *Alytes*, 5 (4): 165-172.

HOUDRY, J. & BEAUMONT, A. (1985). **Les métamorphoses des amphibiens**. Masson ed., París. 273 pp.

HOWELL, A. B. (1935). Morphogenesis of the shoulder architecture. Part III. *Amphibia. Q. Rev. Biol.*, 10: 397-431.

HOWES, G. B. (1886). On some abnormalities of the Frog's vertebral column. *R. temporaria. Anat. Anz.*, 1: 277-281.

----- & RIDEWOOD, W. (1888). On the carpus and tarsus of the anura. *Proc. zool. Soc. Lond.*, (1888): 141-182 + 2 láms.

INGER, R. F. (1967). The development of a phylogeny of frogs. *Evolution*, 21: 369-384.

- JAROŠOVÁ, J. (1973). The components of the carpus in Paleobatrachus and their development in two related recent species. Cas. narod. Mus., 142 (1-4): 89-106 + 8 láms.
- (1974). The components of the tarsus in Paleobatrachus and their development in related recent species. Acta Univ. Carol.-Geologica, 1: 119-144 + 16 láms..
- KADEL, H. & HEMMER, H. (1984). Temperature dependence of larval development in the Mallorcan midwife toad, Baleaphryne muletensis. En Hemmer, H. & Alcover, J. A. (eds.): Història Biològica del Ferreret. Ed. Moll, Ciutat de Mallorca, pp: 169-173.
- KEMP, N. E. & HOYT, J. A. (1969). Sequence of ossification in the skeleton of growing and metamorphosing tadpoles of Rana pipiens. J. Morph., 129: 415-444.
- KLUGE, A. G. (1966). A new pelobatine frog from the lower Miocene of South Dakota with a discussion of the evolution of the Scaphiopus-Spea complex. Contr. Sci., 113: 1-26.
- FARRIS, J. S. (1969). Quantitative phyletics and the evolution of anurans. Syst. Zool., 18 (1): 1-32.
- LEBEDKINA, N. S. (1986). The homologies of temporal bones in Amphibia and Reptilia. En Z. Roček (ed.): Studies in Herpetology, Prague, pp: 303-306.
- LEE, J. C. (1982). Accuracy and precision in anuran morphometrics: artifacts of preservation. Syst. Zool., 31 (3): 266-281.
- LIBBIN, R. M.; SINGH, I. J.; HIRSCHMAN, A. & MITCHELL, O. G. (1988). A prolonged cartilaginous phase in newt forelimb skeletal regeneration. J. exp. Zool., 248: 238-242.

- LIMBAUGH, B. A. & VOLPE, E. P. (1957). Early development of the gulf coast toad, Bufo valliceps, Weigmann. *Am. Mus. Novit.*, 1842: 1-32.
- LOCQUIN, M. & LANGERON, M. (1985). *Manual de Microscopía*. Labor, S. A., Barcelona. 373 pp.
- LYNCH, J. D. (1973). The transition from Archaic to Advanced frogs. En Vial, J. L. (ed.): *Evolutionary Biology of the Anurans: Contemporary research on major problems*, Univ. Missouri Press, Columbia, pp: 133-182.
- McNAMARA, K. J. (1988). Patterns of heterochrony in the fossil record. *Tree*, 3 (7): 176-180.
- MADEJ, Z. (1965). Variations in the sacral region of the spine in Bombina bombina (Linnaeus, 1761) and Bombina variegata (Linnaeus, 1758) (Salientia, Discoglossidae). *Acta biol. cracov. Série Zoologie*, 8: 185-197.
- MARTENS, H. (1984). Temperature selection in tadpoles of Baleaphryne muletensis. En Hemmer, H. & Alcover, J. A. (eds.): *Història Biològica del Ferreret*. Ed. Moll, Ciutat de Mallorca, pp: 163-168.
- (1986). Sur la répartition altitudinale de Pelobates cultripes (Cuvier, 1829) (Amphibia, Pelobatidae) en France. *Bull. Soc. Herp. Fr.*, 39: 20-21.
- MATHUR, J. K. & GOEL, S. C. (1976). Patterns of chondrogenesis and calcification in the developing limb of the lizard, Calotes versicolor. *J. Morph.*, 149: 401-419.
- MELLENDEZ, B. (1979). Anfíbios. En *Paleontología, II (Vertebrados)*. Paraninfo, Madrid, pp: 167-208.

- MOFFAT, L. A. (1974). The development and adult structure of the vertebral column in Leiopelma (Amphibia: Anura). *Proc. Linn. Soc. N. S. W.*, 98 (3): 141-174.
- MOOKERJEE, H. K. (1930). On the development of the vertebral column of Urodela. *Phil. Trans. R. Soc. Lond., Series B*, 218: 415-446 + 5 láms.
- (1931). On the development of the vertebral column of Anura. *Phil. Trans. R. Soc. Lond., Series B*, 219: 165-195 + 5 láms.
- (1936). The development of the vertebral column and its bearing on the study of organic evolution. *Proc. Indian Sci. Congr.*, 23: 307-343.
- (1938). On the development of the transverse process and the rib of Salientia (Anura). *Anat. Anz.*, 87: 239-241.
- & DAS, S. K. (1939). Futher investigation on the development of the vertebral column in Salientia (Anura). *J. Morph.*, 64: 167-198.
- MORESCALCHI, A.; OLMO, E. & STINGO, V. (1977). Trends of karyological evolution in Pelobatoid frogs. *Experientia*, 33 (12): 1577-1578.
- NEVO, E. (1968). Pipid frogs from the early Cretaceous of Israel and Pipid evolution. *Bull. Mus. comp. Zool. Harv.*, 136 (8): 255-318.
- NEWTH, D. R. (1949). A contribution to the study of the fore-limb eruption in metamorphosing anura. *Proc. zool. Soc. Lond.*, 119: 643-659.
- (1956). The development of skeleton and muscles of the pelvic girdle and hindlimbs. En Nieuwkoop, P. D. & Faber, J. (eds.): **Normal table of Xenopus laevis (Daudin)** (2ª edición 1967), North-Holand Publishing Company, Amsterdam, pp: 117-120.

- NIEUWKOOP, P. D. & FABER, J. (eds.) (1956). **Normal table of Xenopus laevis Daudin). A systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis.** (2ª edición 1967), North-Holand Publishing Company, Amsterdam. 252 pp + 10 láms.
- NOBLE, G. K. (1931). **Biology of the Amphibia.** (2ª edición 1954). Dover Publications, Inc., New York. 577 pp.
- NUSSBAUM, R. A. (1982). Heterotopic bones in the hindlimbs of frogs of the families Pipidae, Ranidae and Scoglossidae. **Herpetologica**, 38 (2): 312-320.
- ORTON, G. L. (1953). The systematics of vertebrate larvae. **Syst. Zool.**, 2 (2): 63-75.
- (1955). The role of ontogeny in systematics and evolution. **Evolution**, 9: 75-83.
- (1957). The bearing of larval evolution on some problems in frog classification. **Syst. Zool.**, 6 (2): 79-86.
- OSTER, G. F.; SHUBIN, N.; MURRAY, J. D. & ALBERCH, P. (1988). Evolution and morphogenetic rules: the shape of the vertebrate limb in ontogeny and phylogeny. **Evolution**, 42 (5): 862-884.
- PARKER, W. K. (1881). On the structure and development of the skull in Batrachia, part. III. **Phil. Trans. R. Soc.**, 172 (1): 1-266. En Ramaswami (1935).
- PARSONS, T. S. & WILLIAMS, E. E. (1962). The teeth of Amphibia and their relation to Amphibian phylogeny. **J. Morph.**, 110: 375-389.
- (1963). The relationships of the modern Amphibia: a re-examination. **Q. Rev. Biol.**, 38: 26-53.

- PASTEUR, G. (1958). Sur les tendances évolutives et la phylogénie des Pélobates (Batraciens Anoures) actuels. *C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris*, 247: 1037-1039.
- & BONS, J. (1959). Les batraciens du Maroc. *Trav. Inst. scient. chérif. ser. Zool.*, 17: XVI + 241 pp.
- PAWLOWSKA-INDYK, A. (1985). The effect of temperature during the embryonic development on the structure of the vertebral column of Xenopus laevis (Daudin). *Zoologica Pol.*, 32: 211-222.
- PLETZEN, R. van (1956). The development of the skeleton and muscles of shoulder girdle and forelimbs. En Nieuwkoop, P. D. & Faber, J. (eds.): **Normal table of Xenopus laevis (Daudin)** (2ª edición 1967), North-Holland Publishing Company, Amsterdam, pp: 112-116.
- PORTER, K. R. (1972). **Herpetology**. W. B. Saunders Company, Philadelphia. 524 pp.
- QUEIROZ, K. de (1985). The ontogenetic method for determining character polarity and its relevance to phylogenetic systematics. *Syst. Zool.*, 34 (3): 280-289.
- RAGE, J.-C. & ROČEK, Z. (1989). Redescription of Triadobatrachus massinoti (Piveteau, 1936) an anuran amphibian from the early Triassic. *Palaeontographica Abt. A*, 206: 1-16.
- RAMASWAMI, L. S. (1935). The cranial morphology of some examples of Pelobatidae (Anura). *Anat. Anz.*, 81: 65-96.
- REILLY, S. M. (1986). Ontogeny of cranial ossification in the Eastern newt Notophthalmus viridescens (Caudata: Salamandridae), and its relationship to metamorphosis and neoteny. *J. Morph.*, 188: 315-326.
- REINBACH, W. (1939). Über das Os supratemporale von Pelobates fuscus. *Morph. Jb.*, 84: 169-186. En Roček (1980).

- RICQLES, A. de (1964). La formation des os longs des membres de Pleurodeles waltlii (Michahelles), première partie. **Bull. Soc. zool. Fr.**, 89: 797-808.
- (1965). La formation des os longs des membres de Pleurodeles waltlii (Michahelles), Deuxième partie. **Bull. Soc. zool. Fr.**, 90: 267-286.
- RIDEWOOD, W. G. (1897). On the structure and development of the hyobranquial skeleton of the Parsley-Frog (Pelodytes punctatus). **Proc. zool. Soc. Lond.**, 39: 577-594 + lám. XXXV.
- RITLAND, R. M. (1955). Studies on the post-cranial morphology of Ascaphus truei. **J. Morph.**, 97: 119-177.
- ROČEK, Z. (1980). Cranial anatomy of frogs of the family Pelobatidae Stanius, 1856, with outlines of their phylogeny and systematics. **Acta Univ. Carol.-Biologica**, 1980-1981: 1-164.
- (1982). Macropelobates osborni Noble, 1924 - redescription and reassignment. **Acta Univ. Carol.-Geologica**, 4: 421-438.
- (1988). Origin and evolution of the frontoparietal complex in anurans. **Amphibia-Reptilia**, 9: 385-403.
- ROSAS-GONZALEZ, A. (1989). Paleontología, ontogenia y heterocronía. En Aguirre, E. (Coordinador): **Paleontología. Nuevas tendencias**. CSIC, Madrid. pp: 83-107.
- RÜHMEKORF, E. (1958). Beiträge zur ökologie mitteleuropäischer Salientia. II. Temperatuwahl der Larven. **Z. Morph. Okol. Tiere**, 47: 20-36.
- RYSER, J. (1988). Determination of growth and maturation in the common frog, Rana temporaria, by skeletochronology. **J. Zool., Lond.** 216, 673-685.

- SAGE, R. D.; PRAGER, E. M. & WAKE, D. B. (1982). A Cretaceous divergence time between pelobatid frogs (Pelobates and Scaphiopus): immunological studies of serum albumin. *J. Zool., Lond.*, 198: 481-494.
- SAHNI, A.; KUMAR, K.; HARTENBERGER, J.-L.; JAEGER, J.-J.; RAGE, J.-C.; SUDRE, J. & VIANEY-LIAUD, M. (1982). Microvertébrés nouveaux des Trapps du Deccan (Inde): mise en évidence d'une voie de communication terrestre probable entre la Laurasia et l'Inde à la limite Crétacé-Tertiaire. *Bull. Soc. géol. Fr.*, 24 (5-6): 1093-1099.
- SAINT-AUBAIN, M. L. (1981). Amphibian limb ontogeny and its bearing on the phylogeny of the group. *Z. Zool. Syst. EvolForsch.*, 19 (3): 175-194.
- SALVADOR, A. (1974). *Guía de los anfibios y reptiles españoles*. ICONA, Madrid, 282 pp.
- -- (1985). *Guía de campo de los anfibios y reptiles de la Península Ibérica, Islas Baleares y Canarias*. S. García (ed.), León. 212 pp. + 128 fotografías + 78 mapas.
- --; ALVAREZ, J. & GARCIA, C. (1986). Reproductive biology of a northern population of the western spadefoot, Pelobates cultripes (Anura: Pelobatidae). En Rocek, Z.: *Studies in Herpetology*, Prague, pp: 403-408.
- SANCHIZ, B. (1978). Nuevos restos fósiles de la familia Pelodytidae (Amphibia, Anura). *Estudios geol.*, 34: 9-27.
- (1984). Análisis filogenético de la tribu Alytini (Anura, Discoglossidae) mediante el estudio de su morfoestructura ósea. En Hemmer, H. & Alcover, J. A. (eds.): *Historia Biológica del Ferrerret*, ed. Moll, Ciutat de Mallorca, pp: 61-108.
- (1985). A reconstruction of the anuran locomotor synthetotype. En Rocek, Z. (ed.): *Studies in Herpetology*, Prague, pp: 111-116.

- (1986a). **Tendencias actuales en sistemática evolutiva**. Facultad de Geología, Univ. Zaragoza, Zaragoza. 4 pp.
- (1986b). La evolución de los Discoglosidos: implicaciones metodológicas. **Resúmenes del I Congreso Nacional de Herpetología & II Reunión General de la SCIH, Societat Catalana d'Ictiologia i Herpetologia**, Beniàssim. p. 94.
- & SANZ, J. L. (1980). Los anfibios del Pleistoceno medio de Aridos-1 (Arganda, Madrid). **Ocupaciones achelenses en el valle del Jarama**, Diputación de Madrid, Madrid, pp: 105-126.
- SCHAEFFER, B. (1941). The morphological and functional evolution of the tarsus in amphibians and reptiles. **Bull. Am. Mus. nat. Hist.**, 78: 395-472.
- SCHMALHAUSEN, J. J. von (1907). Die Entwicklung des Skelettes der vorderen Extremität der anuren Amphibien. **Ant. Anz.**, 31: 177-187.
- (1908). die Entwicklung des Skelettes der hinteren Extremität der anuren Amphibien. **Anat. Anz.**, 33: 337-344.
- SEDRA, S. N. (1949). On the homology of certain elements in the skull of Bufo regularis Reuss (Salientia). **Proc. zool. Soc. Lond.**, 119: 633-641.
- & MICHAEL, M. I. (1956). The further development of skeleton and musculature of the head: The description of skeleton and musculature of the head at stage 55 and the development during metamorphosis. En Nieuwkoop, P. D. & Faber, J. (eds.): **Normal table of Xenopus laevis (Daudin) (2ª edición 1967)**. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, pp: 93-101.
- (1957). The development of the skull, visceral arches, larynx and visceral muscles of the south african clawed toad Xenopus laevis (Daudin) during the process of metamorphosis (from stage 55 to stage 66). **Verhd. K. ned. Akad. Wet.**, 51: 1-80.

- SEDRA, S. N. & MOURSI, A. A. (1958). The ontogenesis of the vertebral column of Bufo regularis Reuss. **Cesk. Morfol.**, 6: 7-32.
- SEVERTZOFF, A. N. (1891). Ueber eininge Eigenthümlichkeiten in der Entwicklung und im Bau des Schädels von Pelobates fuscus. **Bull. Soc. Nat. Moscou**, 5: 143-160. En Roček (1980).
- SHUBIN, N. H. & ALBERCH, P. (1986). A morphogenetic approach to the origin and basic organization of the tetrapod limb. **Evolut. Biol.**, 20: 319-387.
- SIMONS, E. V. & HORN, J. R. van (1971). A new procedure for whole-mount alcian blue staining of the cartilaginous skeleton of chicken embryos, adapted to the clearing procedure in potassium hydroxide. **Acta Morphol. Neerl.-Scand.**, 8: 281-292.
- SMIRINA, E. M. (1972). Annual layers in bones of Rana temporaria. **Zool. Zh.**, 51 (10): 1529-1534. En ruso, con resumen en inglés.
- ---; KLEVEZAL, G. A. & BERGER, L. (1986). Experimental investigation of the annual layer formation in bones of amphibians. **Zool. Zh.**, 65 (10): 1526-1534. En ruso, con resumen en inglés.
- SMIT, A. L. (1953). The ontogenesis of the vertebral column of Xenopus laevis (Daudin) with special reference to the segmentation of the metotic region of the skull. **Annale Univ. Stellenbosch, Sect. A**, 29 (3): 79-136.
- (1956). The further development of skeleton and musculature of the trunk. En Nieuwkoop, P. D. & Faber, J. (eds.): **Normal table of Xenopus laevis (Daudin)** (2ª edición 1967), North-Holland Publishing Company, Amsterdam, pp: 102-109.

- SOFIANIDU, T. S. (1977). Estudio de la biología y ecología de Pelobates syriacus Boettger (Amphibia: Pelobatidae). Tesis Doctoral. Univ. Salónica, 181 pp. En griego.
- SOKAL, R. R. & ROHLF, F. J. (1979). **Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica.** Blume Ed., Madrid. 832pp.
- SOKOL, O. M. (1975). The phylogeny of anuran larvae: a new look. **Copeia**, 1975 (1): 1-23.
- (1977). A subordinal classification of frogs (Amphibia: Anura). **J. Zool., Lond.**, 182: 505-508.
- (1981a). The larval chondrocranium of Pelodytes punctatus, with a review of tadpole chondrocrania. **J. Morph.**, 169: 161-183.
- (1981b). The filter apparatus of larval Pelodytes punctatus (Amphibia: Anura). **Amphibia-Reptilia**, 2: 195-208.
- ŠPINAR, Z. V. (1972). **Tertiary Frogs from Central Europe.** Academia, Prague. 286 pp.
- --; BOUBELÍK, M. & ROMANOVSKÝ, A. (1971). A contribution to the phylogeny of the family Pelobatidae (Anura). **Acta Univ. Carol.-Geologica**, 3: 279-285.
- -- & TATARINOV, L. P. (1986). A new genus and species of Discoglossid frog from the Upper Cretaceous of the Gobi desert. **J. Vert. Paleont.**, 6 (2): 113-122.
- STEBBINS, R. C. (1966). **A field guide to Western Reptiles and Amphibians.** Houghton Mifflin Company, Boston. 279 pp.
- STEINER, H. (1921). Hand und Fuß der Amphibien, ein Beitrag zur Extremitätenfrage. **Anat. Anz.**, 53: 513-544.

- STEPHENSON, E. M. (1960). The skeletal characters of Leiopelma hamiltoni McCulloch, with particular reference of the effects of heterochrony on the genus. *Trans. R. Soc. N. Z.*, 88: 473-488.
- , N. G. (1955). On the development of the frog Leiopelma hochstetteri. *Proc. zool. Soc. Lond.*, 124: 785-795.
- STOKELY, P. S. & LIST, J. C. (1954). The progress of ossification in the skull of the cricketfrog Pseudacris nigrita triseriata. *Copeia*, 1954 (3): 211-217.
- TALAVERA, R. R. (1985). Notas sobre la ontogenia de las especializaciones locomotoras del tarso de Pelodytes punctatus (Anura). *Butll. Soc. Cat. Ictio. Herp.*, 10: 27-31.
- (1987a). Anomalies in the vertebral column ontogeny of field reared Pelobates cultripes. En J. J. van Gelder, H. Strijbosch & P. J. M. Bergers (eds.): *Proc. Fourth Ord. Gen. Meet. S. E. H.*, Faculty of Sciences, Nijmegen, pp: 395-398.
- (1987b). Ontogenia y anatomía del carpo en Pelobátidos. *Resúmenes del II Congreso Nacional de Herpetología*, Facultad de Biología, Univ. Salamanca, Salamanca. p: 94.
- (1989). The ossification sequences of the skeletal systems in Pelobates cultripes (Anura, Pelobatidae) and Pelodytes punctatus (Anura, Pelodytidae). *Abstracts of the First World Congress of Herpetology*, Univ. Kent, Canterbury.
- & SANCHIZ, B. (1987a). Temperature dependence of larval development in Pelobates cultripes (preliminary experiments). En J. J. van Gelder, H. Strijbosch & P. J. M. Bergers (eds.): *Proc. Fourth Ord. Gen. Meet. S. E. H.*, Faculty of Sciences, Nijmegen, pp: 399-402.

- & ----- (1987b). Duración de cada estadio de Gosner en el desarrollo larvario de Pelobates cultripes. **Resúmenes de la VIII Bienal de la Real Sociedad Española de Historia Natural**, Facultad de Ciencias Biológicas, Univ. Navarra, Pamplona.
- & ----- (1989). Influencia de la temperatura en la osificación del esqueleto de Pelobates cultripes (Amphibia, Anura). **Resúmenes de la IX Bienal de la Real Sociedad Española de Historia Natural**, Facultad de Biología, Univ. Sevilla y Centro de Información y Documentación Agraria de la Junta de Andalucía, Sevilla. p. 105.
- TAYLOR, A. C. & KOLLROS, J. J. (1946). Stages in the normal development of Rana pipiens larvae. **Anat. Rec.**, 94 (1): 7-13 + 5 láms.
- TAYLOR, W. R. (1967). An enzyme method of clearing and staining small vertebrates. **Proc. U. S. natn. Mus.**, 122: 1-17.
- TIHEN, J. A. (1960a). On Neoscaphiopus and other Pliocene pelobatid frogs. **Copeia**, 1960 (2): 89-94.
- (1960b). Two new genera of African bufonids, with remarks on the phylogeny of related genera. **Copeia**, 1960 (3): 225-233.
- (1965). Evolutionary trends in frogs. **Am. Zool.**, 5: 309-318.
- TREWAVAS, E. (1933). The hyoid and larynx of the Anura. **Phil. Trans. R. Soc. Lond., Series B**, 222: 401-527.
- TRUEB, L. (1966). Morphology and development of the skull in the frog Hyla septentrionalis. **Copeia**, 1966: 562-573.
- (1973). Bones, frogs and evolution. En J. L. Vial (ed.): **Evolutionary biology of the anurans: Contemporary research on major problems**. Univ. Missouri Press, Columbia, pp: 62-132..

- (1985). A summary of osteocranial development in anurans with notes on the sequence of cranial ossification in Rhinophrynus dorsalis (Anura: Pipoidae: Rhinophrynidae). **Suid-Afrikaanse Tydskrif vir Wetenskap**, 81: 181-185.
- & ALBERCH, P. (1985). Miniaturization and the anuran skull: a case study of heterochrony. **Fortschr. Zool.**, 30: 113-121.
- TSCHERNOFF, N. D. von (1907). Zur Embryonalentwicklung der hinteren Extremitäten des Froches. **Anat. Anz.**, 30: 593-612.
- TSCHUGUNOVA, T. J. (1981). Interfrontal en Bombina orientalis (Blgr.) y Bombina bombina (L.). En J. L. Borkin (ed.): **Investigaciones herpetológicas en Siberia y el lejano Este**. Acad. Ciencias URSS, Inst. Zool., Moscú, pp: 117-121. En ruso.
- VALVERDE, J. A. (1967). **Estructura de una comunidad de vertebrados terrestres**. Monografías de la Estación Biológica de Doñana, 1. CSIC, Madrid. 218 pp.
- VERGNAUD-GRAZZINI, C. & WENZ, S. (1975). Les discoglossidés du Jurassique supérieur du Montsech (provincia de Lérida, Espagne). **Annls Paléont. (Vertébrés)**, 61 (1): 19-36 + 5 láms.
- VIEGAS, A. M.; OLIVEIRA, M. E. & CRESPO, E. G. (1983). Sobre alguns aspectos da eco-fisiologia de Pelobates cultripes (Cuvier, 1829) (Amphibia, Pelobatidae), de Portugal: -Regulação hídrica (balanço, osmótico). **Revta Biol. Lisb.**, 12: 643-654.
- WAKE, D. B. (1970). Aspects of vertebral evolution in the modern Amphibia. **Forma Functio**, 3: 33-60.
- & LAWSON, R. (1973). Development and adult morphology of the vertebral column in the Plethodontid Salamander Euricea bislineata, with comments on vertebral evolution in the Amphibia. **J. Morph.**, 139: 251-300.

- WASSERSUG, R. J. (1975). The adaptative significance of the tadpole stage with comments on the maintenance of complex life cycles in Anurans. *Am. Zool.*, 15: 405-417.
- (1976). A procedure for differential staining of cartilage and bone in whole formalin-fixed vertebrates. *Stain Tech.*, 51 (2): 131-134.
- & HOFF, K. (1982). Developmental changes in the orientation of the anuran jaw suspension. A preliminary exploration into the evolution of Anuran metamorphosis. *Evolut. Biol.*, 15: 223-246.
- WILEY, E. O. (1981). *Phylogenetics. The theory and practice of phylogenetic systematics.* John Wiley & Sons, Inc., New York. 439 pp.
- WILLIAMS, E. E. (1959). Gadow's arcualia and the development of tetrapod vertebrae. *Q. Rev. Biol.*, 34: 1-32.
- ZWEIFEL, R. G. (1956). Two pelobatid frogs from the tertiary of North America and their relationships to fossil and recent forms. *Am. Mus. Novit.*, 1762: 1-45.

**6. APENDICE**

## 6. APENDICE

Relación de los ejemplares examinados en esta Tesis.

Las abreviaturas de las colecciones utilizadas son las siguientes:

MNCN = Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid

MM, P P, PV, RPC, RPCPC, RPF, RPV y SM = siglas de trabajo del Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid

ZFMK = Zoologisches Forschungsinstitut und Museum Alexander Koenig, Bonn

Las abreviaturas entre paréntesis indican el tipo de manejo a que fue sometido cada espécimen:

(ED) = Esqueleto desarticulado

(ME) = Medidas externas

(T1) = Tinción con alizarina

(T2) = Tinción con alizarina y azul de alcian

### FAMILIA MEGOPHYRIDAE

Leptobrachium basselti (n = 1 adulto)

MNCN 86121631 (ED, T1, T2)

Megophrys montana (n = 10 adultos)

MNCN 86121622 - 86121630 (ED, T1, T2); MM010 (T2)

### FAMILIA PELOBATIDAE

Pelobates cultripes (n = 64 adultos y juveniles)

MNCN 8204011 (ED); 8401109 (ED); 8405231 (ED); 8410101 - 8410104 (ED, ME, T2); 861211 - 8612119 (ED, ME, T1, T2); 86121110 - 86121127 (ED, ME, T1, T2); 86121128 (ED); 86121177 - 86121194 (ED, ME, T1, T2); Manzanares el Real (T1).

RPC 381 - 385 (T2); 389 - 390 (T2); 395 - 397 (T2).

(n = 195 renacuajos)

RPC 006 - 008; 010 - 019 (ME, T2);

RPC 039; 041 - 047; 049 - 051; 058; 059; 064; 066; 081 - 089; 091; 093 - 097;  
099; 101 - 104; 108; 113; 114; 120; 122; 123; 126; 131; 271; 272; 274 - 277;  
279; 283; 284; 287; 292; 294; 296; 300; 307; 308; 313; 315 - 333; 339 - 341;  
344; 346; 347; 349; 350; 352; 357 - 361; 363; 364; 386 - 388; 391 - 394; 398 -  
402; 404; 408; 410 - 416; 421; 424 - 428; 430 - 432; 434 - 437; 439 - 449;  
452 - 455; 457 - 461; 463; 466; 468 - 470; 477; 484; 485; 488 - 491; 496; 544;  
585; 586; 588; 590; 595; 597; 599; 601; 602; 604; 605 (T2);

RPC 298; 301; 304; 306; 309; 311; 333F; 333K (ME).

Pelobates fuscus

(n = 46 adultos y juveniles)

MNCN 662 - 664 (ME); 8301261 (ED); 83012617 (ED, ME, T1, T2); 83012812  
(ED); 8405295 (ED); 8612161 (ED, ME, T1, T2); 8612162 (ED); 8612163 - 8612167  
(ED, ME, T1, T2).

ZFMK 16006 (ME); 20307 - 20312 (ME); 23838 (ME); 23853 (ME); 23854 (ME);  
23858 (ME); 27950 (ME); 30126 - 30133 (ME); 34218 (ME); 35468 (ME).

(n = 9 renacuajos)

RPF 101 - 103 (T2); 105 - 110 (T2).

Pelobates syriacus

(n = 12 adultos y juveniles)

MNCN 821021121 (ED, ME, T1, T2); 821021122 (ME, T2); 8210211123 (ED, ME, T1,  
T2).

ZFMK 9947 (ME); 9949 (ME); 23825 - 23830 (ME); 23837 (ME).

Pelobates varaldii

(n = 43 adultos y juveniles)

MNCN 8612168 (ED, ME, T1, T2); 8612169 (ED, ME, T1, T2); 86121129 - 86121156  
(ED, ME, T1, T2); 86121610 - 86121621 (ED, ME, T1, T2).

PV043 (ME, T2).

(n = 43 renacuajos)

PV 001 - 005; 008; 010 - 031; 033 - 042; 044 - 048 (T2).

Scaphiopus couchii (n = 10 adultos)  
MNCN 8206161 (ED); 86121641 - 86121649 (ED, T1, T2).

Spea multiplicatus (n = 10 adultos)  
MNCN 86121632 - 86121640 (ED, T1, T2); SM010 (T2).

**FAMILIA PELODYTIDAE**

Pelodytes punctatus (n = 41 adultos y juveniles)  
MNCN 86121157 - 86121176 (ED, T1, T2); 87011314 - 87011321 (ED, T1, T2);  
87011322 (ED).  
PP 1 (T2); 003 (T2); PP 100 - 110 (T2).

(n = 161 renacuajos)  
MNCN 84110111 - 84110121 (ME, T2);  
RPP 017 - 092; 112 - 118; 121; 122; 125; 127 - 133; 135; 136; 141; 143 -  
145; 149; 151; 156 - 159; 167 - 174; 181 - 185; 191; 196 - 201; 203 - 208;  
211 - 214; 219; 221 - 224; 226 - 231; 236; 237; 246; 247 (T2).

Pelodytes caucasicus (n = 3 adultos)  
MNCN 87011323 (ED, T1, T2)  
ZFMK 16004 (ME); 14072 (ME).