

Incubación artificial de una puesta de *Alytes obstetricans*

Israel Salcedo-González

C.e.: israel.salcedo90@gmail.com

Fecha de aceptación: 5 de diciembre de 2021.

Key words: artificial incubation, common midwife toad, egg clutch, hatching.

Hasta el momento, la incubación artificial de puestas de sapo partero común (*Alytes obstetricans*) ha resultado complicada (Martín-Beyer, 2019) y los casos de éxito únicamente anecdóticos (Wells *et al.*, 2015). Esta dificultad está relacionada con las singulares adaptaciones reproductivas al medio terrestre de las especies del género *Alytes*.

Por un lado, el amplexo se realiza en tierra y los machos cargan con las puestas hasta su eclosión. El cuidado de los huevos en esta etapa es fundamental, aunque se ha descartado que los machos humedezcan la puesta, manteniéndose en este periodo el hábito de los adultos de ocupar refugios bajo tierra (Bosch, 2014). Estudios en otros anfibios que cuidan de sus puestas indican que el movimiento de los huevos puede ser esencial (Crump, 1996; Wells *et al.*, 2015), tanto para evitar infecciones fúngicas al romperse las hifas de los hongos que los parasitan (Salthe & Mecham, 1974) como para prevenir anomalías del desarrollo, al evitar la adhesión del embrión a la cubierta del huevo (Organ, 1960; Forester, 1979; Simon, 1983).

Por otra parte, la mayoría de los huevos de especies anamnióticas de incubación terrestre mueren por hipoxia si se les incuba bajo el agua, debido precisamente a adaptaciones evolutivas que evitan la desecación (Martin & Carter, 2013). Por último, en ecosistemas de la alta montaña pirenaica, se ha constatado la menor tolerancia de sus larvas a las aguas con baja conductividad, lo que podría tener rela-

ción con su capacidad de mantener la osmolaridad interna (Miró *et al.*, 2018).

Con todo ello, la incubación artificial de huevos de sapos parteros puede ser requerida con cierta frecuencia al encontrar puestas abandonadas o en programas de cría en cautividad, en los que es necesario retirar la puesta del macho al constreñirle las extremidades posteriores (Wells *et al.*, 2015). Así, en la presente nota se describe la metodología seguida para la incubación artificial de una puesta huérfana de sapo partero común.

El 14 de abril de 2021 se encontró una puesta de *A. obstetricans* en los alrededores de la ciudad de Burgos. Tras su inspección bajo lupa binocular (Ura Technic modelo 216/2) se determinó que los huevos se encontraban entre la etapa 20 y 21 de desarrollo embrionario (Gosner, 1960), con circulación sanguínea visible a través de branquias externas, ojos en proceso de desarrollo y piel sin pigmentación. La puesta constaba de 31 huevos, que se separaron individualmente. De estos, cinco estaban muertos o sin fecundar y fueron descartados. Los 26 restantes se repartieron en dos grupos de 13 huevos con la finalidad de probar dos condiciones de incubación (Figura 1).

INCUBACIÓN

Los huevos se mantuvieron en una habitación con luz natural indirecta y a una temperatura de entre 16 y 20° C.



Figura 1: Los dos grupos de incubación: grupo 1 a la izquierda y grupo 2 a la derecha. Día 1.

Grupo 1: Para incubar el primer grupo de huevos se prepararon varias capas de papel de celulosa humedecidas con agua. El papel se mantuvo húmedo, sin que llegase a estar saturado (Figura 1, izquierda y Figura 2). Los huevos se colocaron sobre el papel y se taparon con un recipiente de vidrio, para que el aire también permaneciera húmedo. Durante el tiempo de incubación se mantuvo el mismo papel, humedeciéndolo cada día y comprobando el estado de los embriones, volteándolos cada ocho horas aproximadamente.



Figura 2: Día 2 de los huevos sobre papel.

Grupo 2: El segundo grupo de huevos se mantuvo sobre una capa de agua que los cubría por la mitad y con una superficie de contacto con el aire similar en todos ellos. En este caso, los huevos se colocaron suficientemente separados, debido a que a poca distancia tendían a unirse por la tensión superficial del agua y esta acababa cubriendo a los centrales casi por completo (Figura 1, derecha). Se procedió del mismo modo que en el grupo anterior, cubriéndolos con un recipiente de vidrio. Y de la misma manera, se comprobaba diariamente su estado, se volteaban y se retiraban los huevos muertos, cambiándolos a una nueva superficie con agua limpia para prevenir infecciones.

ECLOSIÓN

Tras ocho días de incubación, se observó bajo lupa binocular que los embriones de ambos grupos se habían desarrollado hasta la etapa larvaria 25 de Gosner. En este momento se observó que las larvas estaban completamente pigmentadas, exceptuando una franja ventral, la cola tenía prácticamente la longitud del cuerpo, tenían los ojos totalmente desarrollados, respondían mo-

Foto Israel Salcedo-González



Figura 3: Eclosión el día 8 de la primera larva incubada sobre papel.

viéndose rápidamente ante cualquier estímulo y, al igual que se había descrito previamente (Noble, 1926), las branquias habían comenzado a atrofiarse dejando de circular sangre a través de ellas. Además, en la superficie de los huevos del primer grupo se podían observar pequeñas descamaciones, cambios similares a los observados por Wells *et al.* (2015). En este momento, se cubrieron todos los huevos con agua.

A las pocas horas se produjeron las primeras eclosiones: una larva del primer grupo con movilidad normal (Figura 3) y tres larvas muertas del segundo grupo cuyos cuerpos se habían desfigurado al salir (Figura 4). Tras más de 14 horas sin nuevas eclosiones, se ayudó al nacimiento del resto de larvas. Cada huevo se transfirió a un recipiente con una pequeña capa de agua, donde se mantuvo contra el fondo presionándolo suavemente con dos dedos. Con el filo de una aguja hipodérmica se fueron rompiendo poco a poco las dos capas de la cubierta, justo frente a la cabeza de la larva. Al romperse la capa interna, se facilitó la rápida salida de la larva ejerciendo una pequeña presión sobre el huevo.

Cada grupo de larvas se trasladó por separado a un tanque de plástico de unos 0,1 m² de superficie, con una profundidad aproximada de 10 cm de agua. Se agregaron algas filamentosas de charcas cercanas a la procedencia de la puesta y se suplementó con *Gammarus* secos pulverizados y huevo cocido triturado. Se mantuvieron durante 15 días para su observación, con luz directa, provistas de unas

Foto Israel Salcedo-González



Figura 4: Eclosión el día 8 de la primera larva incubada sobre agua (20X).

pedras como refugio y realizando cambios de agua cada tres días (Figuras 5 y 6).

En las larvas del grupo 2 no se observó ingesta durante los dos primeros días tras la eclosión. Por ello, se determinó agregar azúcar (sacarosa) al agua para facilitar una fuente nutritiva en disolución, siendo un tratamiento similar al utilizado para los adultos que presentan evaginación intestinal (Martín-Beyer, 2019). Así, durante las siguientes semanas, dos veces al día las larvas se trasladaron a un pequeño tanque con azúcar durante una hora. Tras este tiempo, se transferían a un nuevo tanque sin azúcar para evitar la proliferación de microorganismos y posibles infecciones.

Durante la incubación se observó que los huevos del grupo 1, mantenidos sobre papel húmedo, presentaban un tamaño ligeramente mayor que los que estaban en agua, además de una mayor movilidad, tanto en los estiramientos y cambios de posición esporádicos de la cola como en la agitada respuesta a estímulos como luz, sonido o movimiento. Tras ser cubiertos por agua para facilitar la eclosión, se reparó en que los huevos de este grupo se hincharon ligeramente. La supervivencia del grupo 1 fue del 100% a los 15 días tras la

eclosión (Tabla 1), momento en el que las larvas se liberaron en una charca permanente cercana al lugar donde se localizaron.

Los huevos del segundo grupo se percibían más pequeños y las larvas menos móviles que las del grupo 1. En dos ocasiones se detectó una larva muerta que estaba completamente rodeada por otros huevos y que, por tensión superficial, también estaba prácticamente cubierta de agua.

En este segundo grupo los huevos, una vez cubiertos completamente de agua, no se hincharon, aunque las larvas mantenían movilidad dentro del huevo. Durante la eclosión, sus cuerpos se deformaron completamente y la mayoría salieron desfiguradas y con los tejidos rotos, provocando su muerte (Figura 4). Solo cuatro larvas sobrevivieron al nacimiento (Tabla 1), presentando poca movilidad. Durante el tratamiento con azúcar, estas mejoraban su equilibriocepción y aumentaban su respuesta a estímulos. Aun así, no se observó ingesta en ninguna de ellas y todas murieron a lo largo de los 15 días de observación.

A pesar de que el número de individuos para este estudio ha sido muy bajo, el alto éxito de supervivencia en la incubación sobre papel



Figura 5: Larvas incubadas sobre papel el día 7 tras la eclosión durante un cambio de agua.



Figura 6: Larvas incubadas sobre papel 15 días tras la eclosión.

Tabla 1: Supervivencia de las larvas a lo largo del experimento. G1=Grupo 1 (papel); G2=Grupo 2 (agua).

Etapa	Número de larvas	
	G 1	G 2
Inicio	13	13
Final de la incubación	13	11
Tras la eclosión	13	4
15 días después de la eclosión	13	0

húmedo puede convertir esta técnica en un buen punto de partida para futuras incubaciones artificiales de puestas de sapo partero.

Es posible que la clave del éxito sea que el papel haya podido actuar como sustituto de la humedad de la piel del macho y que la humedad ambiental haya simulado las condiciones de los refugios en los que se cobijan. A pesar de que en ningún momento el papel llegaba a estar saturado de agua los huevos permanecieron tersos y llenos de líquido (Figura 2). Así, al igual que se han constatado estrategias moleculares de regulación osmótica en otras especies de anfibios (Suzuki & Tanaka, 2009), podría ser que los huevos de *A. obstetricans* estuvieran provistos de mecanismos similares en su superficie.

Por otro lado, haber separado los huevos individualmente ha permitido eliminar los que estaban muertos, evitando posibles infecciones, además de ofrecer condiciones mucho más homogéneas que manteniéndolos unidos en la puesta original. El hecho de que dos larvas del segundo grupo muriesen tras pasar varias horas rodeadas de otros huevos, y casi completamente cubiertas de agua, podría ser consecuencia de estar en condiciones de hipoxia bajo el agua (Martin & Carter, 2013), al tener menor superficie expuesta al aire y competir por los gases disueltos en el agua con los huevos que las rodeaban. Precisamente esta era una de las situaciones a evitar, al tratar de

mantener separados los huevos en el grupo 2 y procurando que al menos su mitad superior se mantuviera siempre en contacto con el aire. Sin embargo, con frecuencia la tensión superficial del agua tendía a unirlos entre sí.

Por otro lado, el hecho de que los huevos incubados en agua tuvieran un menor tamaño y las larvas una menor movilidad, sobreviviendo hasta justo su eclosión, momento que provocaba su muerte, podría tener relación con la menor tolerancia de la especie a aguas con conductividades bajas (Miró *et al.*, 2018). De esta manera, la secuencia de hechos observados en el grupo 2 podría corresponderse con una baja osmolaridad, a consecuencia de la pérdida de sales. Que los huevos fuesen más pequeños y apenas se hincharon tras ser cubiertos completamente de agua podría indicar que tenían menor presión osmótica. La menor movilidad también podría corresponder con una baja osmolaridad, puesto que la contracción muscular está mediada por calcio (Ebashi & Endo, 1968), e incluso el hecho de que los cuerpos de las larvas se rompieran durante la eclosión podría indicar que sus células no estaban bien cohesionadas, sugiriendo que las integrinas, cadherinas y otras moléculas responsables de la adhesión celular no tuvieron la suficiente disponibilidad de calcio para mantener correctamente la integridad de los tejidos (Albelda & Buck, 1990; Rowin *et al.*, 1998; Sjaastad & Nelson, 2005).

Precisamente el temor a esta pérdida osmótica y sus consecuencias es lo que llevó a ayudar a la eclosión de los huevos. El hecho de que varias larvas eclosionaran a las pocas horas de ser sumergidas indica que el momento para ellas era el adecuado. Pero que la mayoría no lo hiciera podría sugerir que, o bien aún era necesario un tiempo más largo de incubación, o que alguna de las variables en las condiciones de la eclosión no fuera la

adecuada. Así, en futuras incubaciones podrían probarse diferentes momentos para inducir la eclosión, además de mantener un control de estas condiciones, especialmente en lo referido a la osmolaridad del agua.

En otro orden de cosas, el mantenimiento con azúcar de las larvas del segundo grupo pudo ser relativamente efectivo para mantenerlas con vida durante más tiempo, pero es probable que las deficiencias acumuladas durante la incubación y la eclosión hayan impedido su completa recuperación.

Por todo ello, estos datos señalan algunos aspectos para tener en cuenta en la incubación artificial de huevos de sapos parteros, invitando a profundizar en experiencias de este tipo para valorar los diversos aspectos señalados. Además, abren nuevos interrogantes para lograr una incubación y eclosión óptimas y determinar su relación con las adaptaciones a la reproducción terrestre de la especie.

AGRADECIMIENTOS: A B. Martín Beyer.

REFERENCIAS

- Albelda, S.M. & Buck, C.A. 1990. Integrins and other cell adhesion molecules. *The FASEB Journal*, 4(11): 2868–2880.
- Bosch, J. 2014. Sapo partero común – *Alytes obstetricans*. In: Salvador, A., Martínez-Solano, I. (eds.). *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Museo Nacional de Ciencias Naturales-CSIC. Madrid.
- Crump, M.L. 1996. Parental Care among the Amphibia. 109–144. In: Rosenblatt, J.S., Snowdon, C.T. (eds.). *Parental Care: Evolution, Mechanisms, And Adaptive Significance*. Academic Press. San Diego. USA.
- Ebashi, S. & Endo, M. 1968. Calcium and muscle contraction. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 18: 123–183.
- Forester, D.C. 1979. The adaptiveness of parental care in *Desmognathus ochrophaeus* (Urodela: Plethodontidae). *Copeia*, 2: 332–341.
- Gosner, K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16(3): 183–190.
- Martín, K.L. & Carter, A.L. 2013. Brave new propagules: Terrestrial embryos in anamniotic eggs. *Integrative and Comparative Biology*, 53(2): 233–247.
- Martín-Beyer, B. 2019. *Desarrollo de una metodología para la cría en cautividad de la rana patilarga y el sapo partero común con vistas a su reintroducción en el Macizo de Peñalara*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Madrid.
- Miró, A., Sabas, I. & Ventura, M. 2018. Large negative effect of non-native trout and minnows on Pyrenean lake amphibians. *Biological Conservation*, 218: 144–153.
- Noble, G.K. 1926. The hatching process of *Alytes*, *Eleutherodactylus* and other amphibians. *American Museum Novitates*, 229: 1–7.
- Organ, J.A. 1960. Studies on the life history of the salamander, *Plethodon welleri*. *Copeia*, 4: 287–297.
- Rowin, M.E., Whatley, R.E., Yednock, T. & Bohnsack, J.F. 1998. Intracellular calcium requirements for beta 1 integrin activation. *Journal of Cellular Physiology*, 175(2): 193–202.
- Salthe, S.N. & Mecham, J.S. 1974. Reproductive and courtship patterns. *Physiology of the Amphibia*, 2: 309–521.
- Simon, M.P. 1983. The ecology of parental care in a terrestrial breeding frog from New Guinea. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 14: 61–67.
- Sjaastad, M.D. & Nelson, W.J. 2005. Integrin-mediated calcium signaling and regulation of cell adhesion by intracellular calcium. *Bioessays*, 19(1): 47–55.
- Suzuki, M. & Tanaka, S. 2009. Molecular and cellular regulation of water homeostasis in anuran amphibians by aquaporins. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 153: 231–241.
- Wells, E., García-Alonso, D., Rosa, G.M. & Tapley, B. 2015. *Amphibian taxon advisory group best practice guidelines for midwife toads (Alytes sp.)*. European Association of Zoos and Aquaria (EAZA). Amsterdam.