

Biología reproductiva de *Lithobates catesbeianus* Shaw, 1802 en condiciones semi-controladas

Avalos-López Alicia, Segura-García Virginia✉, Zubieta Rojas Tohtli

Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. , Morelia, Michoacán. 58040, México

Resumen

Lithobates catesbeianus ha sido introducida en varios países por el valor nutricional de su carne, derivado de su elevado contenido proteico. Sin embargo, los estudios realizados en México acerca de la historia de vida de esta especie, aportan información sumamente generalizada, es por ello que el objetivo de este trabajo fue generar información acerca de la temporada de reproducción, la viabilidad del espermatozoide, describir los estadios del desarrollo embrionario y evaluar la eclosión y sobrevivencia en condiciones semi-controladas lo que puede constituir una base para futuros estudios embriológicos, reproductivos y acuícolas de este anuro de importancia comercial. Para ello, fueron estudiadas algunas características reproductivas, como el ciclo reproductivo y la viabilidad espermática, además de llevar a cabo la fertilización artificial y la descripción del desarrollo embrionario. El valor máximo para el índice gonadosomático (IGS) en hembras reproductoras fue de 34, mientras que el máximo para el índice hepatosomático (IHs) fue de 3.2, con una viabilidad espermática de 99.9%. El desarrollo embrionario comprendió 20 estadios desde el periodo gamético hasta la eclosión con una duración total de 90 horas y 38 minutos; asimismo se obtuvo 90.4% de eclosión y 99.9% de sobrevivencia embrionaria.

Palabras clave: *Lithobates catesbeianus*, biología reproductiva, desarrollo-embionario

Abstract

Lithobates catesbeianus has been introduced in several countries due its meat nutritional value derived from the high protein content. However, the conducted studies in Mexico about the life story from this species, contribute extremely generalized information, this is why the objective from this research was to generate information about the breeding season, the sperm viability, to describe the phases of embryo development, and to evaluate the eclosion and survival under semi-controlled conditions which could constitute a base for future embryological, reproductive and aquaculture studies of this anura of commercial importance. In order to, some reproductive characteristics were studied, as the gonadic maturity cycle and the sperm viability. On the other hand, artificial fertilization and the description of embryo development were carried out. The maximum value for the gonadosomatic index (GSI) was 34 in breeder female, while the highest value for the hepatosomatic index (HI) was 3.2, with a sperm viability of 99.9%. The embryo development included 20 stages from the gametic period to the hatching with 90 hours and 38 minutes of length; likewise, 90.4% of eclosion and 99.9% of the embryo survival were obtained.

Key words: *Lithobates catesbeianus*, reproductive biology, embryo-development

Introducción

Lithobates catesbeianus es originaria de Norteamérica, su distribución natural se extiende desde Nueva Escocia hasta el centro de Florida (AmphibiaWeb, 2015). Fue introducida en varios países de Europa, Asia y Sudamérica al ser considerada como una buena opción para cultivo ya que posee una gran capacidad adaptativa, elevada fecundidad y amplitud de nicho. Sin embargo, ha tenido impactos negativos (competencia, depredación, etc.) en poblaciones de anfibios nativos (Ficetola *et al.* 2007).

Este anuro representa un gran potencial económico debido a la demanda de proteína, ya que su carne es magra, con elevado contenido nutricional por lo que se han propuesto productos alimenticios a partir de la musculatura de la cola de renacuajos (Afonso, 2016). Por otra parte, este anfibio se ha empleado con fines científicos como modelo de laboratorio derivado de la facilidad de manejo (Carlos y Pinto da Matta, 2009). Además, la ranicultura tiene gran impulso en muchas partes del mundo, como es el caso de Brasil, país que tiene en desarrollo tecnologías para esta especie (Teixeira *et al.* 2001).

En México, el cultivo de rana toro inició en la década de los 60 y a partir de entonces se establecieron granjas en varios estados, entre ellos Sinaloa, Yucatán, Nayarit, Morelos, Estado de México. En Michoacán durante 1999 se creó el CINESTAV (Centro de Investigación y Estudios Avanzados) con la finalidad de generar información aplicable al cultivo (FAO, 2015). Sin embargo, aunque se han publicado manuales para cultivo y crianza de esta especie, la información acerca de la historia de vida o de las características reproductivas es muy general, incluso cabe mencionar la nula descripción morfológica de cada estadio del desarrollo embrionario. Por lo que el conocimiento de las fases embrionarias así como el tiempo en que se llevan a cabo será de gran utilidad para los productores, puesto que se evita la manipulación inadecuada durante aquellas etapas críticas del desarrollo ontogénico, misma que pudiera repercutir en pérdidas económicas en el cultivo (CONAPESCA, 2017; GOB, 2017).

Por lo anteriormente comentado es que en el presente estudio se planteó evaluar algunos atributos de la biología reproductiva de la especie en estudio, como la temporada de reproducción, la viabilidad espermática, además de describir por primera vez los estadios del desarrollo embrionario así como evaluar la eclosión y sobrevivencia embrionaria en condiciones semi-controladas.

✉ María Virginia Segura García, virsegura@gmail.com

Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio R, Ciudad Universitaria, Avenida Francisco J. Mújica s/n. Col. Felicitas del Río C.P. 58030. Morelia, Michoacán, México.

Materiales y métodos

Los reproductores se obtuvieron de tres granjas de producción en el estado de Michoacán los cuales fueron transportados al Ranario Experimental Nicolaita de la UMSNH en contenedores de plástico y se les reconoció el sexo mediante caracteres sexuales secundarios.

El aparato reproductor de hembras y machos maduros se detalló con base en las descripciones realizadas por Rizzi *et al.* 2015. Se estimaron los índices gonadosomático (IGS) y hepatosomático (IHs) según el modelo propuesto por Rossenblum *et al.* (1987):

$$IGS = \frac{\text{peso de la gónada (g)}}{\text{peso del ejemplar (g)}} \cdot 100$$

$$IHs = \frac{\text{peso del hígado (g)}}{\text{peso del ejemplar (g)}} \cdot 100$$

Por otro lado, la calidad del líquido seminal se evaluó mediante la técnica de viabilidad de Bloom (Lynch *et al.* 1972).

La fertilización artificial se llevó a cabo de acuerdo a la técnica establecida por Afonso (2004), por lo que se extrajeron los gametos con una proporción sexual de tres machos por dos hembras (3:2), a los que se les suministró de forma intraperitoneal acetato de buserelina (hormona gonadotrópica) con la finalidad de inducir la producción gamética en los reproductores.

Una vez fertilizada la freza, los óvulos fueron trasladados a tinas para su incubación, se distribuyeron de manera uniforme por triplicado en contenedores de 50x31x36 cm que contenían 13 litros de agua corriente. Se verificó que la temperatura del agua se mantuviera en un intervalo de 20 a 28 °C para evitar la muerte de embriones según lo recomendado por Cribb *et al.* (2013) y CIDEM (2010). Cada tina fue oxigenada con una bomba Máxima-R de 120 V y aireador. Se evaluaron diariamente la temperatura (°C), el oxígeno disuelto (OD mg/l), la conductividad (µS), el pH, el porcentaje de saturación de oxígeno (% SO) y los sólidos disueltos totales (SDT ppm) con un multiparamétrico HANNA NI 9828.

Para describir los estadios de los embriones se realizaron observaciones con un microscopio estereoscópico Velab Ve-S1 con aumento de 4X y se tomaron microfotografías con una cámara digital Samsung EC-ES90ZZBPRMX. Las fases del desarrollo embrionario se describieron con base en el criterio de Gosner (1960) y se estableció el tiempo de duración de cada estadio. Además, fueron estimados los porcentajes de eclosión y sobrevivencia mediante las relaciones:

$$ECLOSION = \frac{\text{Numero de larvas}}{\text{Numero de huevos incubados}} \cdot 100$$

$$SOBREVIVENCIA = \frac{\text{No. de larvas vivas 24 h despues de la eclosion}}{\text{No. total de larvas eclosionadas}} \cdot 100$$

Finalmente, se describió la morfología de 60 larvas a las que se les calcularon la longitud patrón (LP), la longitud del vitelo (LV) y se describió su comportamiento.

Resultados

Los ovarios están en posición longitudinal, son pareados, suspendidos por el mesovario y se dividen en varios lóbulos. Los oviductos confluyen ventralmente con el opistonefros en un atrio y desembocan en la cloaca. El tamaño y el color varían de acuerdo al estado de maduración y desarrollo sexual del organismo (**Figura 1**).

Al igual que los ovarios, los testículos son estructuras pares, lobuladas, dispuestos longitudinalmente y suspendidos por el mesorquio. Se disponen en la parte dorsal del celoma, continúan con los conductos deferentes, se encuentran íntimamente conectados con el aparato urinario y junto con el opistonefros desembocan en la cloaca. El tamaño y color varía de acuerdo al estado de maduración y desarrollo sexual del macho (**Figura 2**).

El índice gonadosomático y hepatosomático se estimó en cinco hembras disponibles del Ranario Experimental Nicolaita, ya que las restantes estaban destinadas para la reproducción, por lo que no fue posible sacrificar más individuos de esta etapa de maduración.

El máximo valor del índice gonadosomático (IGS) para hembras en etapa reproductiva fue de 34 (854 g) y el mínimo de 9.3 (413 g), a diferencia del hepatosomático (IHs), cuyo valor máximo fue de 3.2 (413 g) en tanto que el mínimo fue de 2.5 (854). De esta manera, el IGS mostró valores superiores a los del IHs, lo cual indica que las hembras en estudio exhibieron madurez gonadal para la reproducción. El tamaño de las gónadas varió de acuerdo al estado de desarrollo de los ovocitos, es decir, los valores más altos indican un estado de mayor madurez (**Tabla 1**).

El semen es de aspecto blanquecino y al tener contacto con el agua se aglutina. Esta prueba mostró al momento de liberarlo al ambiente, que el 99.9% de los espermatozoides se encontraban saludables para la fecundación, puesto que mediante la técnica empleada aquellos que son viables no se tiñeron (**Figura 3**).

Asimismo, la incubación se llevó a cabo a una temperatura promedio de 21.5 °C, los registros de los parámetros fisicoquímicos se efectuaron diariamente como se pueden observar en el **Tabla 2**.

Tabla 1. Índices gonadosomático y hepatosomático en hembras de *Lithobates catesbeianus*.

No. de ejemplar	Peso total (g)	IGS	IHs
1	956	15.3	2.9
2	854	34.0	2.5
3	853	32.6	2.7
4	657	17.5	2.9
5	413	9.3	3.2

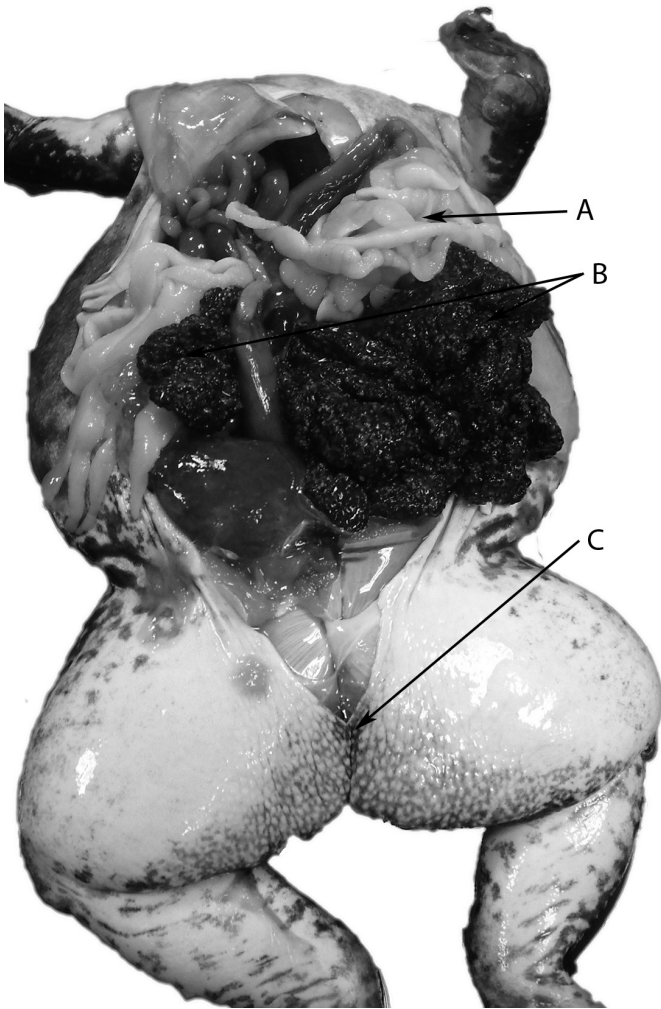


Figura 1. Aparato reproductor femenino de *L. catesbeianus*. A-cuerpo graso; B-ovarios; C-cloaca.

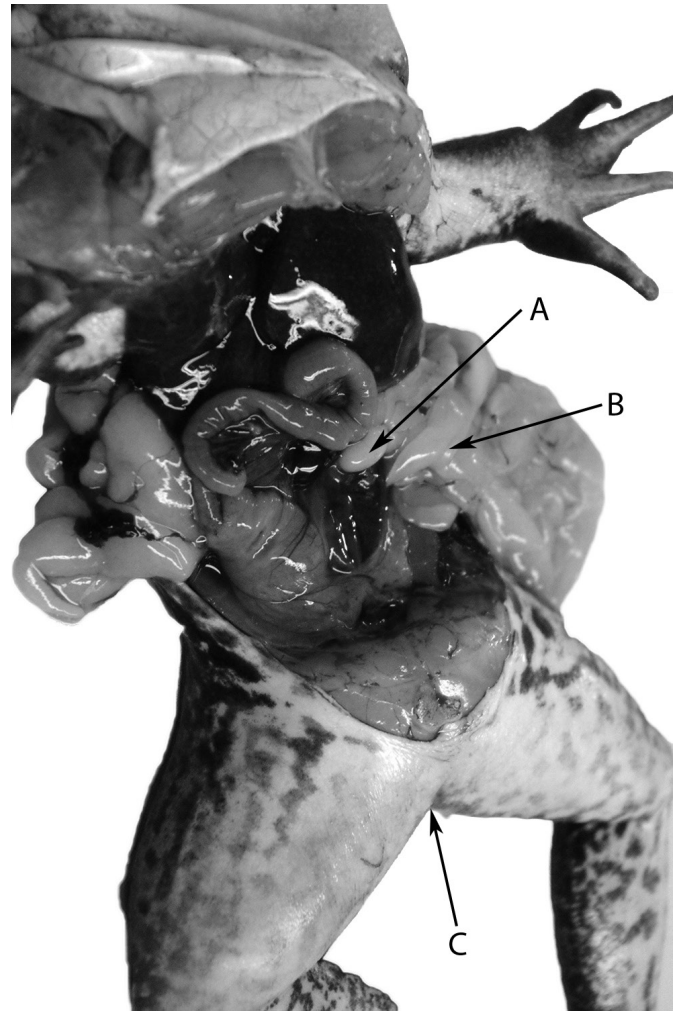


Figura 2. Aparato reproductor masculino de *L. catesbeianus*. A-testículo izquierdo; B-cuerpo graso; C-cloaca.

Tabla 2. Parámetros físico-químicos en las tinas de incubación.

Tinas/Parámetros	T °C	OD (mg/l)	% SO	pH	SDT (mg/l)	Cond (µS)
1	21.2	4.8	67.0	7.8	275.0	550.0
	21.3	4.3	60.3	8.6	289.0	579.0
	21.3	4.6	65.6	8.7	287.0	573.0
	21.4	4.6	64.4	8.6	276.0	552.0
	21.6	3.7	53.2	8.6	302.0	604.0
2	21.3	4.3	45.2	7.8	285.0	570.0
	21.4	4.0	57.4	8.7	284.0	568.0
	21.4	4.5	64.7	8.9	285.0	570.0
	21.4	4.4	62.8	8.6	294.0	588.0
	21.6	4.6	56.2	8.7	295.0	590.0
3	21.6	4.5	64.4	7.6	204.0	409.0
	21.6	4.2	60.7	8.8	285.0	570.0
	21.6	4.4	63.8	8.8	287.0	574.0
	21.7	4.5	62.0	8.8	293.0	585.0
	21.8	4.5	66.4	8.7	296.0	590.0
Intervalo	21.2-21.8	3.7-4.8	45.2-64.7	7.6-8.9	204.0-302.0	409.0-604.0
$\chi \pm \text{on-1}$	21.5±0.17	4.4±0.27	60.9±5.87	8.5±0.41	282.5±22.87	564.8±45.4



Figura 3. Semen de *L. catesbeianus*. Las flechas señalan las cabezas de los espermatozoides viables.

El desarrollo embrionario comprendió 20 estadios con una duración de 90 horas y 38 minutos, los cuales se describen a continuación:

Estadio 1. Periodo gamético. El huevo es esférico con diámetro promedio de 2.4 mm, contiene mediana cantidad de vitelo, por lo que se le ha caracterizado como oligolecito. El citoplasma en el polo animal es gris oscuro y más claro en el polo vegetativo. Están rodeados por una membrana secundaria, la cual es gelatinosa y a la que se conoce como ganga, cuya función es proteger al huevo de la desecación, así como adherirlo a un sustrato.

Los espermatozoides tienen la cabeza alargada, blanca. La parte media contiene las mitocondrias y poseen un flagelo muy largo aproximadamente dos tantos la longitud de la cabeza (**Figura 4**).

Estadio 2. Huevo recién fertilizado (10'). La ganga se hidrata, por lo que es notorio el aumento de volumen de la ganga ya que esta membrana alcanza casi el doble de su grosor.

Estadio 3. Cambios citoplasmáticos del huevo (20'). Se efectúa el movimiento citoplasmático, por lo que se observa la polaridad del embrión. Se distingue un citoplasma animal de color gris intenso, uno mesodérmico o creciente gris y otro vegetativo de color gris tenue. En el polo vegetativo sobresalen las células germinales primordiales o futuras células sexuales (**Figura 5A**).

Estadio 4. Inicio de segmentación (43'). Se lleva a cabo la primera división de segmentación de la que derivan dos blastómeras de igual tamaño (**Figura 5B**).

Estadio 5. Segunda división de segmentación (1 Hr. 43'). Se originan cuatro blastómeras.

Estadio 6. Mórula inicial (2 Hrs. 43'). Es posible contar 32 blastómeras (**Figura 5E**).

Estadio 7. Mórula media (6 Hrs. 20'). Prosigue la división y se generan 64 blastómeras (**Figura 5F**).

Estadio 8. Blástula inicial (7 Hrs. 50'). El polo animal posee numerosas micrómeras, en la media luna gris se distribuyen las mesómeras y en el polo vegetativo se observan las macrómeras.

Estadio 9. Blástula final (9 Hrs.). La blástula final presenta un blastodermo pluriestratificado con un blastocele excéntrico.

Estadio 10. Gástrula inicial (18 Hrs.). En la media luna gris se insinúa una hendidura llamada labio dorsal del blastoporo, sitio de inicio de la gastrulación (**Figura 5G**).

Estadio 11. Gástrula media (19 Hrs. 45'). Se observa la invaginación del meso-endodermo, ya que externamente se distinguen los labios laterales del blastoporo (**Figura 5H**).

Estadio 12. Gástrula final (21 Hrs. 40'). El fin de la gastrulación se marca con la aparición del tapón vitelino y el blastoporo completamente formado (**Figura 5I**).

Estadio 13. Disminución del tapón vitelino (27 Hrs.). Continúa la reducción del tapón vitelino (**Figura 5J**).

Estadio 14. Obliteración total del tapón vitelino (31 Hrs. 50'). El tapón vitelino desaparece por completo (**Figura 5K**).

Estadio 15. Pre-néurula (37 Hrs. 20'). El embrión se alarga como consecuencia de la formación del tubo neural, la superficie dorsal se aplanar lo que da lugar a la placa neural. Los pliegues neurales se elevan y generan las llamadas crestas neurales, separadas por el surco neural (**Figura 5L**).

Estadio 16. Néurula media (43 Hrs. 20'). Los pliegues neurales se cierran formando un tubo neural hueco. En la yema cefálica aparece la placa sensorial en forma de escudo; las láminas branquiales darán lugar al aparato branquial (**Figura 5M**).

Estadio 17. Néurula final (46 Hrs. 20'). Culmina la formación del tubo neural y el embrión muestra una forma fuertemente arqueada. Se advierte la futura cabeza con las vesículas ópticas y un cristalino, además aparece la yema caudal. En la placa sensorial se observan unas depresiones que formarán posteriormente los arcos viscerales.

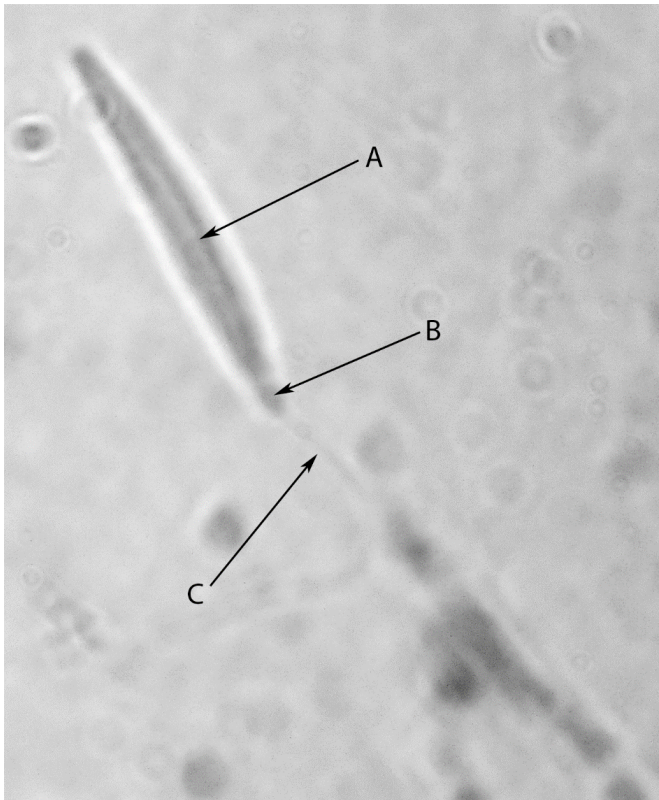


Figura 4. Morfología típica de espermatozoide de *L. catesbeianus*. A-cabeza; B-parte media; C-flagelo.

Estadio 18. Organogénesis primaria (48 Hrs. 20'). El embrión es más alargado, se advierten los esbozos branquiales, además de iniciarse el movimiento muscular que se manifiesta con espasmos (**Figura 5N**).

Estadio 19. Organogénesis secundaria (64 Hrs. 50'). Se ha constituido el esbozo de la cola (yema caudal). Se percibe la metamerización en la parte dorsal del embrión, lo que constituye los somitas (**Figura 5Ñ**).

Estadio 20. Eclosión (90 Hrs. 38'). El embrión se ha liberado de la ganga, mediante el órgano suctor oral se adhiere a un sustrato hasta alcanzar la vida libre, en tanto, persiste la alimentación mediante el vitelo que aun conserva en el intestino medio.

De un total de 3,565 huevos incubados, se logró 90.4% de eclosión; mientras que la sobrevivencia fue de 99.9%.

Las larvas recién eclosionadas presentan una coloración gris oscuro, de hábitos gregarios y nadan vigorosamente para evitar el arrastre. Al eclosionar miden en promedio 5.7 mm de longitud total (LT), la mandíbula aun no es funcional por lo que todavía permanece cerrada la membrana estomodeal o futura boca, en tanto, es visible el órgano suctor oral en la parte ventral del estomodeo lo que les permite adherirse

a un sustrato (generalmente vegetación acuática) y mantenerse en suspensión.

La larva conserva vitelo en el intestino medio del cual se nutre y cuya longitud promedio fue de 2.7 mm. Es notorio el cristalino en la región cefálica, a lo largo de la región dorsal se distribuyen los miómeros, la aleta caudal es transparente y en la parte ventro-posterior se encuentra la cloaca (**Figura 6**).

Discusión

La reproducción en los anuros es influenciada por factores bióticos y abióticos, principalmente por la precipitación y la temperatura (Kaefer *et al.* 2007). La época de reproducción reportada en México en condiciones de cautiverio inicia en abril (CIDEM, 2010), por lo que en este estudio la reproducción artificial se llevó a cabo en este mes para asegurar la obtención de los gametos. Los índices hepatosomático y gonadosomático permitieron corroborar la acción hormonal a la que fueron sometidas las hembras, dado que en vertebrados el hígado es el órgano que sintetiza vitelogeninas y almacena lípidos para la síntesis de vitelo durante la vitelogénesis (Love, 1970). Por tanto, éstos mostraron una relación inversa ya que los elevados valores del IGS exhibieron el grado de madurez reproductiva de las hembras, sin embargo, el tamaño de las gónadas varió de acuerdo al estado de madurez de los ovocitos.

Los valores del IGS (**Tabla 1**) fueron relativamente elevados como consecuencia de la inducción hormonal, empero, en estudios con rana toro en cautiverio en estadio de maduración intermedia y maduración avanzada dicho índice también mostró valores altos (3.25 y 11.63 respectivamente), los que se atribuyen a una buena alimentación y a las condiciones ambientales favorables (Costa *et al.* 1998).

En lo referente a los machos, éstos presentan un ciclo espermático continuo, por lo que el peso de los testículos es una medida inadecuada para determinar la condición reproductiva (Sasso-Cerri, 2004).

Es de tomar en consideración que la calidad del semen es importante para el mejoramiento animal, la criopreservación y la fertilización artificial (Mansano *et al.* 2010), por lo que, la viabilidad aporta información acerca de la eficiencia de los espermatozoides para la fecundación. En este trabajo se obtuvo una viabilidad elevada (99.9%), no obstante, para realizar un diagnóstico completo del potencial reproductivo es necesario realizar pruebas de motilidad, morfología y espermatobioscopia, las cuales están asociadas a la densidad y por lo tanto a la fertilidad de cualquier especie (Segura-García, 1997, Mansano *et al.* 2010).

En cuanto al diámetro del óvulo de rana toro, éste presenta diferencias con respecto otras especies de anuros como puede advertirse en el **Tabla 3**. Si bien FIRA (1999) reportó que el diámetro del huevo ya fertilizado de esta especie es de 1.3 mm, no proporciona datos específicos acerca de las variables fisicoquímicas del

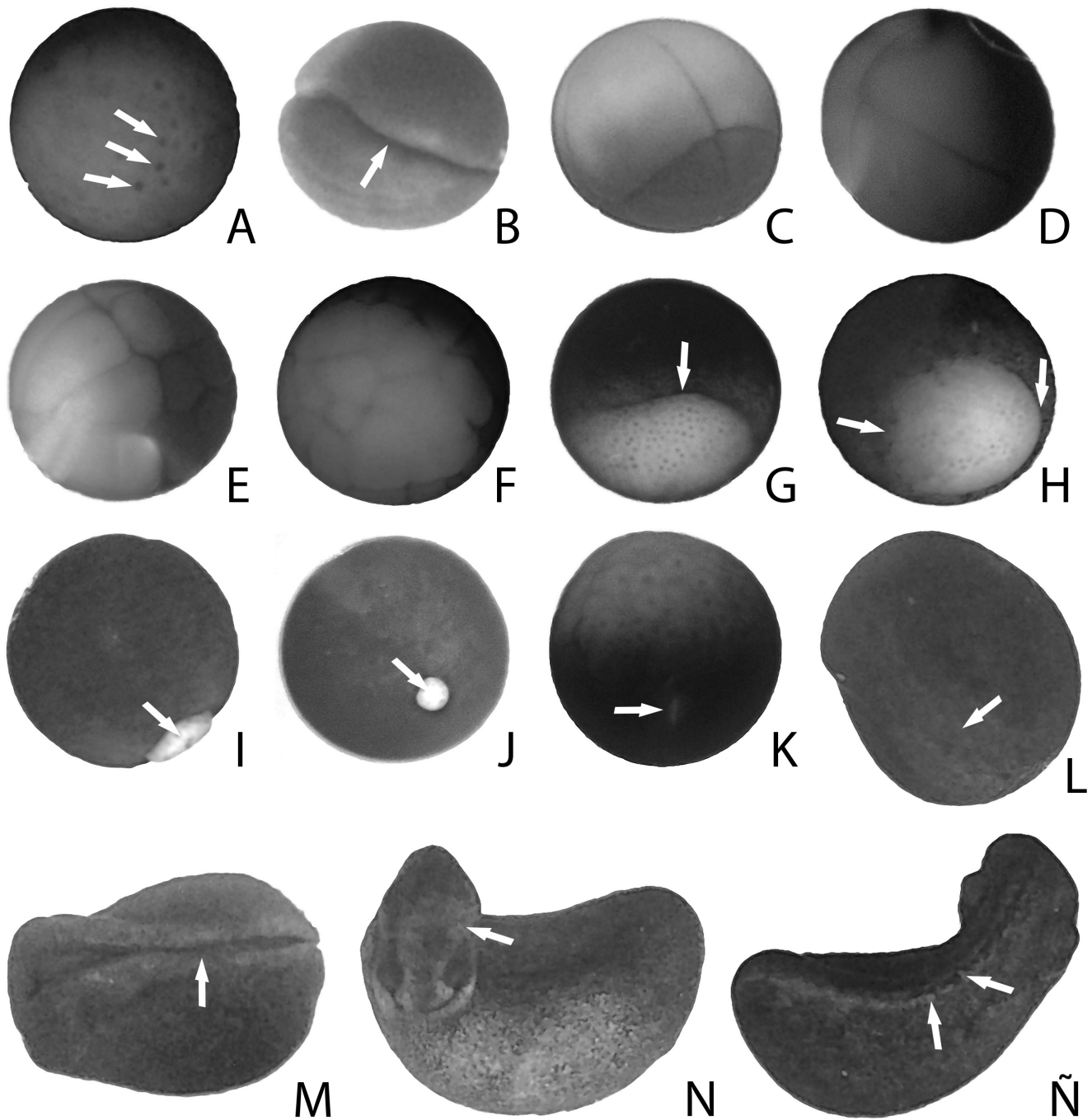


Figura 5. Desarrollo embrionario de *L. catesbeianus*. **A)** Estadio 3. Las flechas señalan las células germinales primordiales. **B)** Estadio 4. La flecha señala el surco de segmentación. **C)** y **D)** Tercera división de segmentación. **E)** Estadio 6. **F)** Estadio 7. **G)** Estadio 10. La flecha señala el labio dorsal del blastoporo. **H)** Estadio 11. Las flechas señalan los labios laterales del blastoporo. **I)** Estadio 12. La flecha señala el tapón vitelino. **J)** Estadio 13. La flecha señala la disminución del tapón vitelino. **K)** Estadio 14. La flecha señala la desaparición del tapón vitelino. **L)** Estadio 15. La flecha señala el surco neural. **M)** Estadio 16. La flecha señala los pliegues neurales. **N)** Estadio 18. La flecha señala el esbozo branquial. **Ñ)** Estadio 19. Las flechas señalan los somitas. 4X.

agua o de las condiciones de alimentación en las que se encuentran los organismos.

Así mismo, se verificó que las variables fisicoquímicas se mantuvieran estables durante la incubación, puesto que existen dos parámetros fundamentales para el desarrollo embrionario. Uno es el oxígeno disuelto, ya que es decisivo para el buen funcionamiento del

metabolismo, el valor óptimo reportado por Cribb *et al.* (2013) es mayor o igual a 4 mg/l, en este estudio el promedio fue de 4.4 mg/l. Otra variable es la temperatura, ya que según Morgan (1987) ésta incide directamente en la velocidad del desarrollo a la cual se dan los procesos embrionarios. Así, Cribb *et al.* (2013) recomiendan no exceder los 25 °C, puesto que se pueden generar

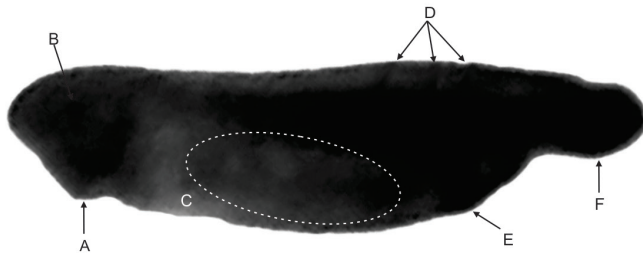


Fig. 6. Larva de *L. catesbeianus* recién eclosionada. A- órgano suctor oral; B- cristalino; C- vitelo; D- miómeros; E- cloaca; F- aleta caudal.

daños histológicos, morfológicos y aun la interrupción del desarrollo (Bachman, 1969). Sin embargo, en estudios realizados por Moore (1942) con embriones de la especie en estudio, éstos se desarrollaron entre 15 y 32 °C, aunque el desarrollo normal se lleva a cabo a 18 °C. En este sentido, en el **Tabla 4** se muestra la duración del desarrollo embrionario hasta la eclosión, para diferentes especies.

Los elevados porcentajes de eclosión y sobrevivencia (90.4% y 99.9% respectivamente) se debieron a las precauciones de sanidad acuícola y al manejo de la puesta. Según el CIDEM (2010) se ha reportado una sobrevivencia de 90% en condiciones controladas.

En cuanto a las larvas, la de rana toro tiene una longitud total promedio de 5.7 mm a diferencia de *Rana temporaria* Linneus, 1758 que mide 4.3 mm (Balcells, 1957).

Los resultados de esta investigación forman parte de la historia de vida de la especie, que como menciona Gosner (1960): “The chief value of staging tables lies in their use as a shorthand annotation in describing ontogenetic changes and comparing such data for different species...”, lo que puede constituir la base para futuras investigaciones comparativas acerca de la morfología, histología, problemas teratológicos y toxicológicos con otros anfibios.

Mediante el conocimiento de los aspectos reproductivos de una especie será posible llevar a cabo mejoras en la producción y cultivo de rana toro, situación que pudiera coadyuvar en ofertar carne de buena calidad (CIDEM, 2010). Por otro lado, coadyuvará a disminuir la presión de explotación que se ejerce en especies nativas.

Agradecimientos

La presente investigación se efectuó como parte del proyecto “Descripción de Tabla de Gosner para rana toro americana *Lithobates catesbeianus* Shaw, 1802”, apoyado por la CIC (Programa de Investigación 2017), de la UMNSH. Las autoras agradecen al Biól. José Salvador Almanza por la edición fotográfica y al D. en C. Orlando Miguel Espinoza Ojeda por la elaboración del Abstract.

Referencias

- Afonso MA** (2016) Desenvolvimento de produtos alimentícios a partir da musculatura da cauda de girinos de rã-touro americana (*Lithobates catesbeianus* Shaw, 1802). *Tesis de Doctorado*. Universidad Federal Fluminense. Brasil. 109 pp.
- Afonso MA** (2004) Efeito do acetato de buserelina na indução a reprodução da rã-touro americana (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802) naturalmente portadora de micobacteriose. *Tesis de Maestría*. Universidad Federal Fluminense. Brasil. 88 pp.
- AmphibiaWeb** (2015) *Information on amphibian biology and conservation [web application]*, Berkeley, California: AmphibiaWeb. Disponible en: <http://amphibiaweb.org/>. Consultado el 8 de marzo de 2015.
- Balcells E** (1957) Datos para el estudio del ciclo biológico de *Rana temporaria*, L. del Pirineo. *Pirineos* 43-46: 327-346
- Bachmann K** (1969) Temperature adaptations of amphibian embryos. *Amer. Naturalist* 103: 115-130

Tabla 3. Diámetro del óvulo de algunas especies del Orden Anura.

Especie	Diámetro (mm)	Criterio
<i>Lithobates catesbeianus</i> Shaw, 1802	2.45	Avalos, 2015
<i>Hyalinobatrachium fleischmanni</i> Boettger, 1893	2.1	Salazar-Nichols y M. del Pino, 2015
<i>Espadarana callistomma</i> Guayasamin & Trueb, 2007	2.1	Salazar-Nichols y M. del Pino, 2015
<i>Hylarana leptoglossa</i> Cope, 1868	0.5	Saha y Gupta, 2011
<i>Hyla arborea</i> Linnaeus, 1758	1.4	Sayim y Kaya, 2008
<i>Spicospina flamocaerulea</i> Roberts, Horwitz, Wardell-Johnson, Maxson & Mahony 1997	2.38	Dziminsky y Anstis, 2004

Tabla 4. Comparación de desarrollo embrionario en diferentes especies del Orden Anura.

Especie	Eclosión (Horas)	Temperatura (°C)	Criterio
<i>Lithobates catesbeianus</i> Shaw, 1802	90 Hrs. 38'	21.5	Avalos et al., 2015
<i>Hyla arborea</i> Linnaeus, 1758	88	20±1	Sayim y Kaya (2008)
<i>Rana pipiens</i> Schreber, 1782	140	18	Rugh (1951)

- Carlos J, Pinto da Matta SL** (2009) Microscopic morphology and testis morphometry of captivity-bred adult bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 52: 1461-1472
- Centro de Investigación y Desarrollo del Estado de Michoacán [CIDEM]** (2010) *Manual de cultivo de Rana catesbeiana (rana toro)*. Michoacán. 71 pp.
- CONAPESCA** (2017) http://www.conapesca.gob.mx/work/sites/cona/resources/LocalContent/3941/15/rana_toro.pdf Consultado el 13 de diciembre de 2017.
- Costa CS, Lima SL, Andrade DR, Agostinho CA** (1998) Caracterização morfológica dos estádios de desenvolvimento do aparelho reprodutor feminino da rã-touro, *Rana catesbeiana*, no sistema anfigranja de criação intensiva. *R. Bras. Zootec.* 27: 642-650
- Cribb AY, Afonso MA y Ferreira MCM** (2013) *Manual Técnico de Ranicultura*. Curso de agentes multiplicadores em Ranicultura. Río de Janeiro. Embrapa, Universidade Federal do Parana, Instituto de Pesca. 54 pp.
- FAO** (2005-2015) Programa de información de especies acuáticas. *Rana catesbeiana*. Programa de información de especies acuáticas. Texto de Flores Nava, A. In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. Actualizado 9 Febrero 2005. Disponible en: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Rana_catesbeiana/es#tcNA0126 Consultado el 13 de diciembre de 2017.
- Ficetola GF, Thuiller W, Miaud C** (2007) Prediction and validation of the potential global distribution of a problematic alien invasive species the american bullfrog. *Divers. Distrib.* 13: 476-485
- Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura [FIRA]** (1999) *Boletín Informativo*. Nuevas oportunidades de negocios en acuicultura. El cultivo de la rana toro. 310: 64
- GOB** (2017) https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/167795/9_Manual_Produccion_de_Rana_Toro.pdf Consultado el 13 de diciembre de 2017.
- Gosner K** (1960) A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16:183-190
- Kaefer IL, Boelter RA, Cechin SZ** (2007) Reproductive biology of the invasive bullfrog *Lithobates catesbeianus* in southern Brazil. *Ann. Zool. Fenn.* 44: 435-444
- Love RM** (1970) *The chemical biology of fishes*, ed. Academic Press. Londres. 547 pp.
- Lynch R, Mellor S, Sapare L, Inwood P** (1972) *Métodos de laboratorio*, ed. Interamericana. México. 1522 pp.
- Mansano CFM, Pereira MM, Filho OPR, Filho CBC, Takamura AE, Zanuncio JC** (2010) *Avaliação seminal de duas faixas de peso de machos de rã-touro Lithobates catesbeianus*. 47a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia Salvador, BA-UFBA. Salvador. Pp: 1-3.
- Morgan TH** (1987) *The development of the frog's egg*. The McMillan Company. Nueva York. 192 pp.
- Moore JA** (1942) Embryonic temperature tolerance and rate of development in *Rana catesbeiana*. *Biol. Bull.* 83: 375-388
- Rizzi GM, Silva-Zacarin ECM, Oliveira CR, Costa MJ, Salla RF y Abdalla FC** (2015) Morphological characterization of the gonads of bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). *J. Morphol. Sci.* 32: 245-252
- Rossenblum M, Pudney J, Callard I** (1987) Gonadal morphology enzyme histochemistry and plasma steroid levels during the annual reproductive cycle of male and female Brown bullhead catfish, *Ictalurus nebulosus* Lesueur. *J. Fish Biol.* 31: 325-341
- Sasso-Cerri E, Faria FP, Freymuller E, Miraglia SM** (2004) Testicular morphological changes during the seasonal reproductive cycle in the bullfrog *Rana catesbeiana*. *J. Exp. Zool.* 301: 249-260
- SEDAGRO** (2017) <http://sedagro.edomex.gob.mx/sites/sedagro.edomex.gob.mx/files/files/cultivo%20rana%281%29.pdf> Consultado el 13 de diciembre de 2017.
- Segura-García V** (1997) Ecología reproductiva del pez blanco *Chirostoma estor estor* Jordan, 1879 (Pisces: Atherinidae) del lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. *Tesis de maestría*. Instituto Politécnico Nacional. 114 pp.
- Teixeira RD, Silva CS, Mello P, Lima dos Santos CAM** (2001) The world market for frog legs. *Globefish* 68: 1-44
- WILEY** (2017) <http://www.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-0471291013.html> Consultado el 13 de diciembre de 2017.