

**Vzorec osifikacije skeleta pri ličinkah navadne krastače *Bufo bufo***

Ossification patterns of the skeleton in the larvae of the common European toad *Bufo bufo*

Ane-Mary Arčan, Tina Koželj Nyambe, Mojca Strgar in Lilijana Bizjak Mali\*

Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Večna pot 111, 1000 Ljubljana  
Department of Biology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana,  
Večna pot 111, 1000 Ljubljana, Slovenia  
\*korespondenca: lila.bizjak@bf.uni-lj.si

**Izvleček:** Z uporabo presvetlitvene tehnike in barvanja skeleta za hrustančno in kostno tkivo smo spremljali vzorec osifikacije skeleta pri navadni krastač *Bufo bufo*, katerih ličinke imajo izredno hiter razvoj. Osredotočili smo se na osifikacijo hrbtenice, oplečja in okolčja ter okončin, s poudarkom na osifikaciji njihovih distalnih delov. Ugotovili smo, da so hrustančne zasnove skeleta ob koncu premetamorfoznega obdobja (faza 34) že oblikovane. Prve pokostenitve se pojavijo v prometamorfozi (faza 39) in sicer, sočasno v nevrnalnih lokih, v diafznem delu proksimalnih elementov sprednjih in zadnjih okončin in v proksimalnem delu črevnic okolčja. Oplečje je v tej fazi še v celoti hrustančno. Osifikacija je med prometamorfozo bolj intenzivna in postopoma napreduje v kranio – kavdalni smeri vzdolž hrbtenice in od proksimalnih v distalne dele okončin, prav tako se širi iz osrednjega dela dolgih kosti okončin proti epifiznim koncem. Osifikacija prstov poteka v posteriorno – anteriorni smeri glede na os okončine. Tako kot pri večini brezrepecev, je skelet krastače ob zaključku metamorfoznega klimaksa (faza 46) skoraj popolnoma osificiran. Hrustančni ostajajo osrednji dorzalni del hrbtenice in distalni konci prečnih odstavkov vretenc, kavdalni del postsakralne regije, epifizni konci dolgih kosti okončin in karpus ter metakarpus, ter nadlopatici oplečja in sramnici okolčja. Rezultati raziskave so potrdili konzervativnost splošnega vzorca osifikacije skeleta dvoživk, navkljub da je razvoj ličink krastače v primerjavi z ostalimi brezrepci bistveno hitrejši.

**Ključne besede:** skelet, osifikacija, *Bufo bufo*, presvetlitvena tehnika in barvanje skeleta

**Abstract:** We used a clearing and staining method for cartilage and bone to analyse the pattern of ossification in the skeleton of the common European toad, *Bufo bufo*, a species with rapid larval development. We focused on the ossification of vertebrae, pectoral and pelvic girdles, and limbs with an emphasis of the ossification in their distal parts. We found that the cartilage primordia of the skeleton were formed by the end of premetamorphosis (Stage 34). The first ossifications appeared in early prometamorphosis (Stage 39) and occurred concurrently in the neural arches, diaphyses of proximal elements of front and hind limbs, and in the proximal part of the ileum. The pectoral girdle was still completely cartilaginous at this stage. Ossification intensifies during prometamorphosis and gradually progresses in a cranial - caudal direction along the

spine and from proximal to distal parts of the skeleton, as well as to the epiphyses of the long bones. Fingers ossified in a postero-anterior direction according to the main limb axis. As in most other anurans, the skeleton of *Bufo* is almost completely ossified by the end of the metamorphic climax (Stage 46). At this time, cartilage remains in the dorsal midline of the spine, in the distal parts of transverse processes of the vertebrae, the caudal part of the post-sacral region, as well as in the epiphyses, and carpals and metacarpals of the limbs, and in the suprascapula and the pubis of the girdles. These results show a conserved pattern of ossification in *B. bufo* common to other anurans despite its rapid rate of larval development.

**Keywords:** skeleton, ossification, *Bufo bufo*, clearing and staining method for skeleton

## Uvod

Skelet vretenčarjev se razvije iz treh različnih linij embrionalnega tkiva: somiti paraksialnega mezoderma so zasnova za osni skelet, mezoderm lateralne plošče za skelet okončin in kranialni nevralni greben za škržne loke in obrazni del lobanje (Gilbert 2000). Poznana sta dva glavna načina tvorbe kosti oz. osteogeneze, ki vključujeta transformacijo mezenhimskega tkiva v kostno tkivo ter rezultira v podaljševanju in debelitvi kosti. Neposredna pretvorba mezenhimskega tkiva v kost je t.i. dermalna (intramembranska) osifikacija. Na ta način nastajajo ploščate kosti lobanje in del oplečja (ključnici in klejtruma). Pri endohondralni osifikaciji pa se mezenhimske celice najprej diferencirajo v hrustanec, ki ga postopoma nadomesti kostno tkivo. Z endohondralno osifikacijo nastajajo nevrokranium, splahnokranium ali visceralni skelet, vretenca, del oplečja (lopatici, krokarnici), okolčje in okončine (Gilbert 2000).

Dolge kosti okončin vretenčarjev kostenijo s perihondralno osifikacijo (pod perihondrijem, ki obdaja hrustančno zasnovo) in z endohondralno osifikacijo. Perihondralna osifikacija poteka pred ali pa sočasno z endohondralno (Carter in sod.1998). Pri sesalcih in pticah je razvoj dolgih kosti okončin predvsem rezultat endohondralne osifikacije, pri kateri hrustanec služi kot začetni skeletni element, ki ga kasneje nadomesti kostno tkivo (Simsa in Monsonegro Ornan 2007). Pri kuščarjih perihondralna in endohondralna osifikacija potekata sočasno (Carter in sod.1998). Pri dvoživkah prevladuje perihondralna osifikacija okončin (Felisbino in Carvahlo 2002). V tem primeru se zunanji sloji hrustančnih zasnov diferencirajo v pokostnico, ki nalaga kostnino.

Tako kost imenujemo periostalna kost. Kostno tkivo se najprej nalaga na centralnih delih diafize, nato nalaganje med razvojem počasi napreduje proti epifizam, ki dokončno mineralizirajo šele po četrti hibernaciji (Rozenblut in Ogielska 2005). Pri ličinkah brezrepecev se prične osifikacija hrustančnih primordijev okončin ob koncu premetamorfoze (faza 34 po Gosnerju, 1960), je najbolj intenzivna v času prometamorfoze (faze 36-41) in se zaključi v obdobju metamorfoznega klimaksa (faze 42-46) (Rozenblut in Ogielska 2005). Ta tip osifikacije pri dvoživkah napreduje hitreje kot endohondralna osifikacija pri ostalih skupinah vretenčarjev (Gilbert 2000). Ob formaciji periostalne kosti hondrociti hrustančne zasnove hipertrofirajo in so nepravilnih oblik, sledi njihova degeneracija in oblikovanje mezgovne votline, v kateri začne nastajati kostni mozeg (Čiçek in sod. 2011). V kostnem tkivu se oblikujejo prehranjevalni kanali in krvne žile. Diafize se podaljšujejo z longitudinalno rastjo, kar je posledica aktivnosti posebnega dela pokostnice v epifizah, ki nalaga kostno tkivo na svojih terminalnih delih (Rozenblut in Ogielska 2005). Sočasno se kost tudi debeli z nalaganjem kostnega tkiva z robnega dela pokostnice vzdolž celotne dolžine periostalne kosti.

Za razliko od večine vretenčarjev, pri katerih proces osifikacije poteka v fetalnem obdobju, poteka osifikacija pri dvoživkah v postembriionalnem obdobju, torej med razvojem ličink. Navkljub konzervativizmu ontogenetskega razvoja pri vretenčarjih, prihaja do časovnih razlik in razlik v hitrosti dejanskega poteka dogodkov med razvojem (Rieppel 1994). To velja tudi za postembriionalno osifikacijo skeleta brezrepecev, kjer sta časovni potek in hitrost osifikacije skeleta vrstno specifična, medtem ko je osnovni vzorec

osifikacije skeleta ohranjen med različnimi vrstami dvoživk (Kemp in Hoyt 1969, Duellman in Trueb 1986, Rozenblut in Ogielska 2005, Çiçek in sod. 2011, Yildirim in Ugor 2014). Osifikacija skeleta brezrepcev se prične v proksimalnih delih skeleta in postopoma napreduje proti distalnim delom. Pri večini dvoživk osifikacija nastopi proti koncu premetamorfoze in je bolj izrazita v prometamorfozi ter se zaključi pred koncem metamorfoze in prehodom na terestrični način življenja (Dunlap in Sanchiz 1996, Hass 1999, Yildirim in Ugor 2014).

Skelet ličink je kompleksna struktura, ki zagotavlja pomembno informacijo o filogenetskih odnosih brezrepcev (Pugener et al. 2003). Raziskave razvoja in osifikacije skeleta imajo pomembno vlogo pri razumevanju raznolikosti dvoživk in njihovi evoluciji (Yildirim in Ugor 2014). V raziskavi smo se osredotočili na vzorec osifikacije skeleta navadne krastače *Bufo bufo*, saj je razvoj ličink v primerjavi z večino brezrepcev izredno hiter (28 do 31 dni pri sobni temperaturi) (Semlitsch 1994). Npr. pri žabi krempeljarki *Xenopus laevis* poteka razvoj ličink okoli 58 dni (Nieuwkoop in Faber 1956) in pri žabi *Rana pipiens* 75 do 90 dni (Taylor in Kollros 1946). Namen raziskave je opisati zaporedje in časovni potek osifikacije skeleta ličink navadne krastače in primerjati s poznanimi podatki za ostale brezrepce, s poudarkom na osifikaciji distalnih delov okončin, saj v literaturi za to vrsto dvoživke ni poznanih podatkov.

## Metode in materiali

Potek osifikacije skeleta smo preučili v različnih razvojnih fazah ličink navadne krastače *Bufo bufo*, ki smo jih določili v skladu s tabelo faz razvoja za brezrepce po Gosnerju (1960). Embrionalni razvoj vretenčarjev in razvoj ličink dvoživk namreč sledi zaporedju dogodkov, ki so ohranjeni med osebki iste vrste, kot tudi med sorodnimi vrstami (Wake in Roth 1989). Na osnovi konzervativnosti razvoja pa so oblikovane table razvojnih stadijev, ki temeljijo na zunanjih morfoloških lastnostih.

Skelet smo analizirali z metodo presvetlitve tkiv in barvanja hrustančnega in kostnega tkiva (Hanken in Wassersug 1981), ki omogoča vizualizacijo skeleta v organizmu, brez predhodnega

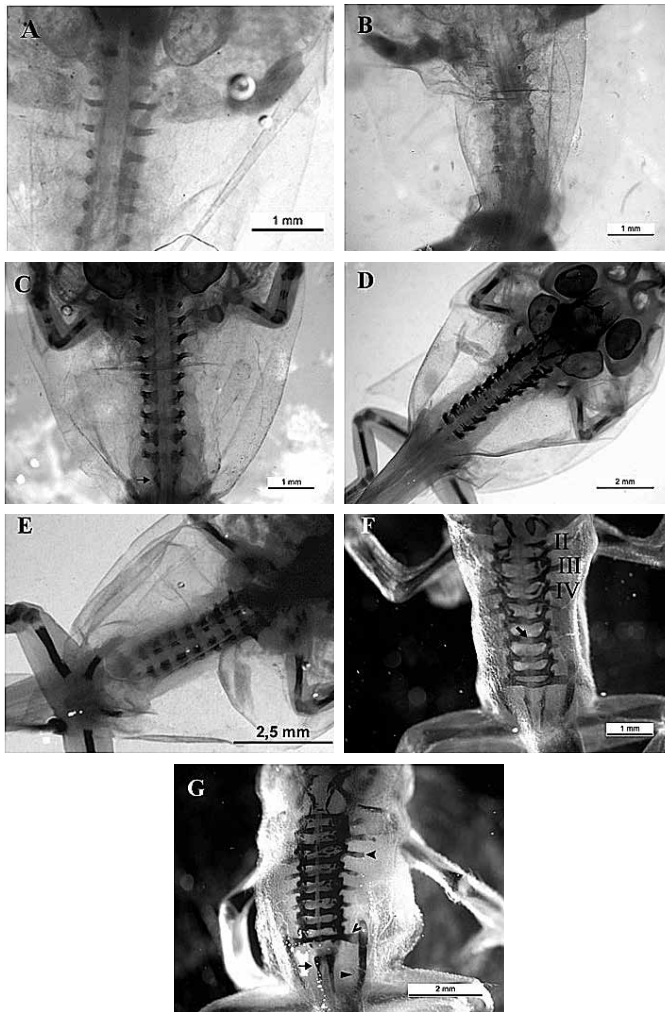
odstranjevanja okolnih mehkih tkiv. Velika prednost metode je, da lahko sledimo osifikaciji skeleta med razvojem, prav tako omogoča prostorsko predstavo pozicije skeletnih elementov ter njihovo medsebojno povezovanje. V raziskavo smo vključili ličinke premetamorfozne faze (faza 34), štiri faze v prometamorfoznem obdobju (faza 36, 39, 40, 41) in tri faze v obdobju metamorfoznega klimaksa (faza 42, 44, in 46). Skupno smo pregledali 16 živali, in sicer po dve živali vsake od izbranih razvojnih faz. Material je bil fiksiran v 10% formaldehidu v PBS pufru in shranjen v 70% etanolu. Živalim smo odstranili visceralne organe in jih za 24 ur inkubirali v barvilu alcian modro, ki obarva hrustanec modro. Sledilo je enourno izpiranje odvečnega barvila z raztopino etanola in očetne kisline (v razmerju 50 : 50) in s 100% etanolom čez noč ter rehidracija v vodi za 24 ur. Kožo smo razbarvali s 3% vodikovim peroksidom. Tkiva smo nato razmehčali v raztopini 30% natrijevega borata in tripsina (24 ur). Sledilo je barvanje tkiva z barvilom alizarin rdeče v 0,5% KOH za 24 ur, ki obarva kostno tkivo rdeče in izpiranje odvečnega barvila z 0,5% KOH. Postopoma (v razmiku nekaj dni) smo KOH nadomeščali z glicerolom v naslednjih razmerjih: 2:1, 1:1, 1:2 in 100% glicerol.

Za analizo osifikacije skeleta osebkov smo uporabili stereolupo MZ FLIII (Leica). Slike smo zajeli s pomočjo digitalne kamere DFC 290 HD (Leica) in programom Las V4.0 (Leica).

## Rezultati

### *Hrbtenica*

Hrbtenico gradijo tri regije: presakralna, sakralna in postsakralna. Presakralna regija je iz 8 vretenc, sakralno vretenca je eno samo in se povezuje z okoljem, postsakralna vretenca pa so medsebojno zlita in oblikujejo enotno strukturo, imenovano urostil. Prve hrustančne zasnove hrbtenice so oblikovane v fazi 34 prometamorfoze (slika 1A) in so očitneje razvidne v fazi 36 (slika 1B). V fazi 39 je vidna prva osifikacija v predelu zigapofiz nevrnalnih lokov vretenc in sicer intenzivneje v kranialnem delu hrbtenice (slika 1C). Izraziti so tudi hrustančni zametki prečnih odstavkov vretenca II do IV (slika 1C). Prvo vretenca nima odstavkov. Hrustančni zametki post-



Slika 1: Vzorec osifikacije hrbtenice pri navadni krastači *Bufo bufo*. **A** – Faza 34, zgodnje hrustančne zasnove hrbtenice. **B** – Faza 36, hrustančne zasnove vretenc so izrazitejšje. **C** – Faza 39, osifikacija v zigapofizah nevrvalnih lokov vretenc, ki je intenzivnejša v kranialnem delu hrbtenice. Postsakralna regija je hrustančna (puščica). **D** – Faza 40 (dorzalno), osifikacija v bočnih delih nevrvalnih lokov. **E** – Faza 40 (ventralno), osifikacija v bočnih delih centrumov. **F** – Faza 44, osifikacija v dorzalnih delih nevrvalnih lokov in v prečnih odstavkih vretenc II - IV. Prvo vretence je brez odstavkov. **G** – Faza 46, vretenca so osificirana, vključno s križnim vretencem (odprta glava puščice) in kranialnim delom urostila (puščica). V kavalnem delu urostila je osifikacija šibka. Centralni deli nevrvalnih lokov in distalni deli prečnih odstavkov (glava puščice) so hrustančni.

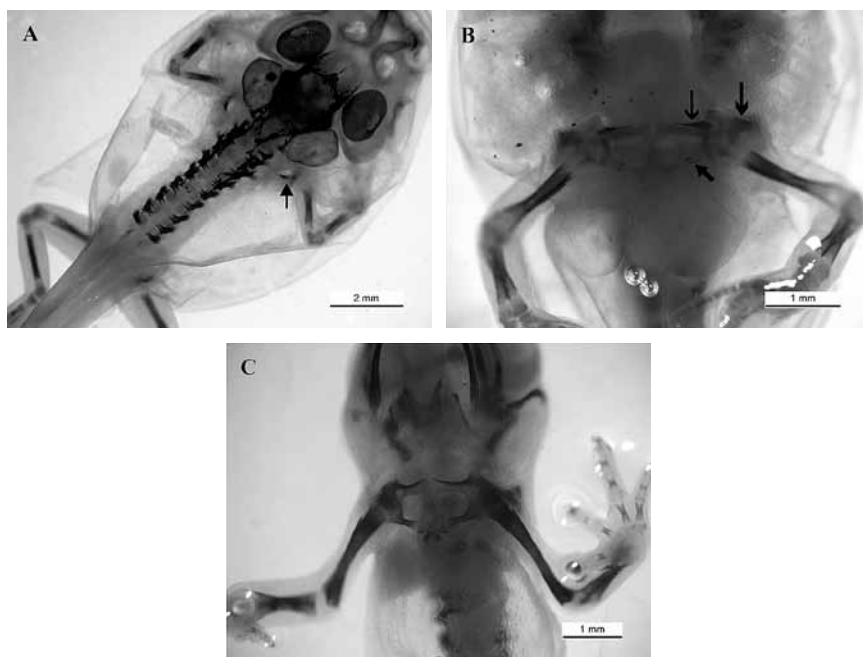
Figure 1: Ossification pattern in the backbone of *Bufo bufo*. **A** – Stage 34, early cartilaginous primordial for vertebrae. **B** – Stage 36, cartilaginous vertebrae are more pronounced. **C** – Stage 39, ossification in zigapophyses of the neural arches of vertebrae, which is more intense in cranial part of the spine. The postsacral region is cartilaginous (arrow). **D** – Stage 40 (dorsal), ossification in lateral parts of neural arches of vertebrae. **E** – Stage 40 (ventral), ossification in lateral parts of vertebral centra. **F** – Stage 44, ossification in dorsal parts of neural arches and in transverse processes of vertebrae II - IV. First vertebra is without of processes. **G** – Stage 46, vertebrae are ossified, including sacral vertebra (open arrow head) as well as cranial part of urostylel (arrow). The ossification in the caudal part of urostylel is weak. Central parts of neural arches and distal parts of transverse processes (arrow head) are cartilaginous.

sakralne regije so v tej fazi tudi bolj izraziti (slika 1C). V fazi 40 osifikacija postopoma napreduje proti bočnim delom nevrlnih lokov in v prečne odstavke vretenc (slika 1D - dorzalno). Proces osifikacije je viden tudi v bočnih delih ventralno ležečih centrumov vretenc (slika 1E - ventralno). V fazi 44 so nevrlni loki trupne regije osificirani tudi v dorzalnem delu, medtem ko njihov centralni del ostaja hrustančen (slika 1F). Osifikacija je tudi že obsežnejša v prečnih odstavkih kranialne regije (slika 1F). Prečna odstavka sakralnega vretenca sta hrustančna in večja od ostalih. Vidna je tudi šibka osifikacija v hrustančnih zasnovah postsakralne regije (slika 1F). V fazi 46 je večina hrbtenice osificirana, vključno s kranialnim delom postsakralne regije, ki že oblikuje kratek urostil (slika 1G). V kavalnem delu postsakralne regije je osifikacija šibka. Centralni del nevrlnih lokov hrbtenice ostaja hrustančen, kot tudi distalni deli prečnih odstavkov vretenc (slika 1G). Hrustančni

so tudi stiki med centrumom in nevrlnim lokom vsakega posameznega vretenca.

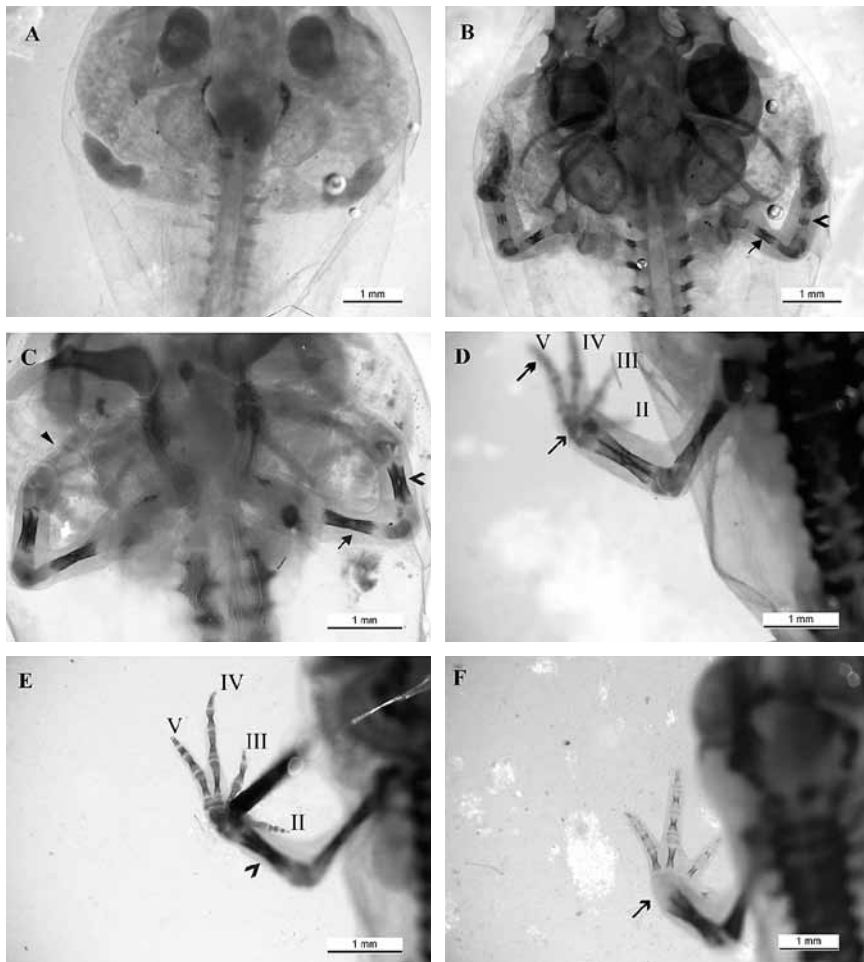
#### Oplečje in sprednje okončine

Oplečje leži neposredno za glavo in ga gradi parna ključnica ali klavikula, krokarnica ali korakoid, lopatica ali skapula in nadlopatica ali supraskapula s kljetrumom. V fazi 39 je ramenski obroč še popolnoma hrustančen. Prva osifikacija se pojavi v fazi 40, v področju kljetrumov, ki sta na kranialnem robnem delu nadlopatic (slika 2A). V fazi 42 je vidna izrazita osifikacija lopatic in ključnic ter šibka osifikacija v osrednjem delu krokarnic (slika 2B). Osifikacija elementov oplečja je skoraj popolnoma zaključena v fazi 46 (slika 2C), hrustančni ostaneta nadlopatice in stiki med krokarnico in ključnico. Hrustančna je tudi prsnica, s katero sta v stiku ključnici in krokarnici (slika 2C).



Slika 2: Vzorec osifikacije oplečja pri navadni krastači *Bufo bufo*. **A** - Faza 40 – šibka osifikacija v kljetrumu (puščica). **B** - Faza 42, izrazita osifikacija v lopatici (debela puščica) in ključnici (tanka puščica) ter šibka v krokarnici (kratka puščica). **C** - Faza 46, oplečje je osificirano, hrustančni ostaneta nadlopatice in prsnica.

Figure 2: Ossification pattern in the pectoral girdle of *Bufo bufo*. **A** – Stage 40 – weak ossification in cleithrum (arrow). **B** – Stage 42, strong ossification in scapula (thick arrow) as well as in clavicle (thin arrow) and weak in coracoid (short arrow). **C** – Stage 46, pectoral girdle is ossified, sub-scapula and sternum remain cartilaginous.



Slika 3: Vzorec osifikacije sprednjih okončin pri navadni krastači *Bufo bufo*. **A** - Faza 34, zasnove sprednjih okončin so podaljšane in hrustančne, nakazana sta dva prsta. Okončine so znotraj škržnih komor. **B** - Faza 39, osifikacija je izrazita v diafizi nadlahtnice (puščica) in šibka v podlahtnici in koželjnici (glava puščice). **C** - Faza 40, osifikacija je napredovala proti epifizam nadlahtnice (puščica) in podlahtnice s koželjnico (odprta glava puščice). Izoblikovane so tudi že vse hrustančne prstnice prstov (glava puščice). **D** - Faza 42, sprednje okončine niso več v škržnih komorah, osifikacija v proksimalnih delih okončine je obsežnejša. Vidna je tudi šibka osifikacija v dlančnicah prsta IV in V. Zapestnice (odprta puščica) in prstnice prstov (zaprta puščica) so hrustančne. **E** - Faza 44, podlahtnica in koželjnica sta združeni v enotno kost (glava puščice). Osificirane in podaljšane so tudi vse prstnice prstov, razen v prstu II. **F** - Faza 46 – Okončine so osificirane, hrustančni ostajajo epifizni konci in zapestnice (puščica).

Figure 3: Ossification pattern in the front limbs of *Bufo bufo*. **A** – Stage 34, the forelimb buds are elongated and they are cartilaginous. The first two fingers are barely visible. The limbs develop inside the gill chambers until the stage 42. **B** – Stage 39, ossification is strong in diaphysis of the humerus (arrow) and weak in ulna and radius (arrow head). **C** – Stage 40, ossification progresses towards the epiphyses of the humerus (arrow), ulna and radius (open arrow head). All cartilaginous phalanges are formed (closed arrow head). **D** – Stage 42, the forelimbs are no longer in the gill chambers, the ossification of the proximal parts of forelimbs is extensive. The ossification in metacarpus of finger IV and V is weak. Carpus (closed arrow) and phalanges (open arrow) are cartilaginous. **E** – Stage 44, ulna and radius are already fused in one bone (arrow head). All phalanges, except in finger II are ossified and elongated. **F** – Stage 46 – Forelimb are ossified, epiphyses and carpus (arrow) remain cartilaginous.

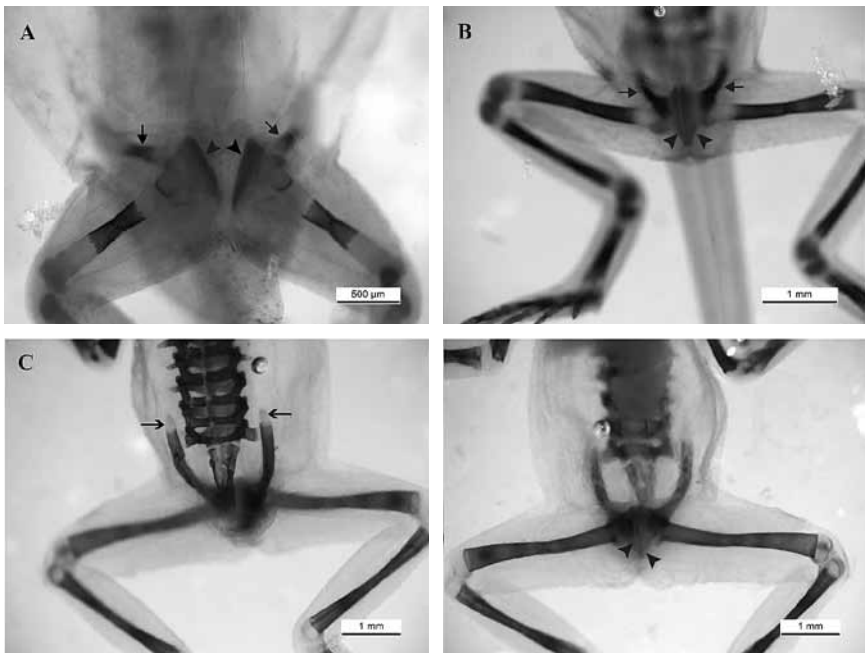
Sprednje okončine gradi nadlahtnica ali humerus in zliti podlahtnica in koželjnica ali radio-ulna, sledijo elementi zapestja in dlani (karpalne in metakarpalne kosti) ter prstnice štirih prstov (II – V). V pre- in prometamorfoznih fazah (slika 3A-C), so zasnove sprednjih okončin še znotraj telesa, natančneje znotraj škržnih komor. V fazi 34 sta okončini hrustančni in podaljšani, oblikovani sta zasnovi za dva prsta (slika 3A). V fazi 39 je izrazita osifikacija v diafizah nadlahtnic, vidna pa je tudi šibka osifikacija v centralnih delih diafiz podlahtnic in koželjnic (slika 3B). Oblikovani so vsi štirje prsti, ki so še hrustančni. V fazi 40 je osifikacija napredovala proti epifizam nadlahtnic in podlahtnic s koželjnicama. Izoblikovane so tudi že vse prstnice prstov, ki so še hrustančne (slika 3C). V fazi 42, ki predstavlja začetek metamorfoznega klimaksa, sta sprednji okončini že vidni, pred tem je njun razvoj potekal znotraj škržne komore. Osifikacija proksimalnih delov okončin je v tej fazi že obsežnejša, širi pa se tudi v distalne dele okončin (slika 3D). Osificirane so tudi že prve dlančnice, in sicer prsta IV in V. Zapestnice in prstnice prstov so hrustančne. V fazi 44 (slika 3E) so dlančnice in prstnice podaljšane in osificirane, z izjemo II. prsta, ki ima hrustančne prstnice. V fazi 46 (slika 3F) so osificirani skoraj vsi elementi zadnjih okončin. Hrustančno ostane zapestje, in epifizni konci vseh kosti okončine.

#### *Okolčje in zadnje okončine*

Okolčje je zgrajeno iz treh parnih elementov (črevnice ali iliuma, sednice ali ishiuma in sramnice ali pubisa), ki se združujejo v osrednjem kavdalnem delu hrbtenice in oblikujejo jamico (acetabulum) za sklepno vezavo stegenic. V fazi 39 (slika 4A) so parne zasnove za sednico in sramnico še hrustančne, medtem ko v črevnicah že poteka

osifikacija, in sicer v njunem posteriornem delu. Lega črevnic je še horizontalna, prav tako parni elementi sednice in sramnice še niso združeni. Združevanje poteče v fazi 44 (slika 4B). Osifikacija črevnic je v tej fazi izrazitejša, prav tako je njuna lega že bolj vertikalna. V fazi 46 je glavna okolčja osificirana, hrustančni ostajata sramnici in distalna konca črevnic (slika 4C). Črevnici sta že postavljeni paralelno s hrbtenico in se povezujeta z osificiranima prečnima odstavkoma (diafizama) križnega vretenca.

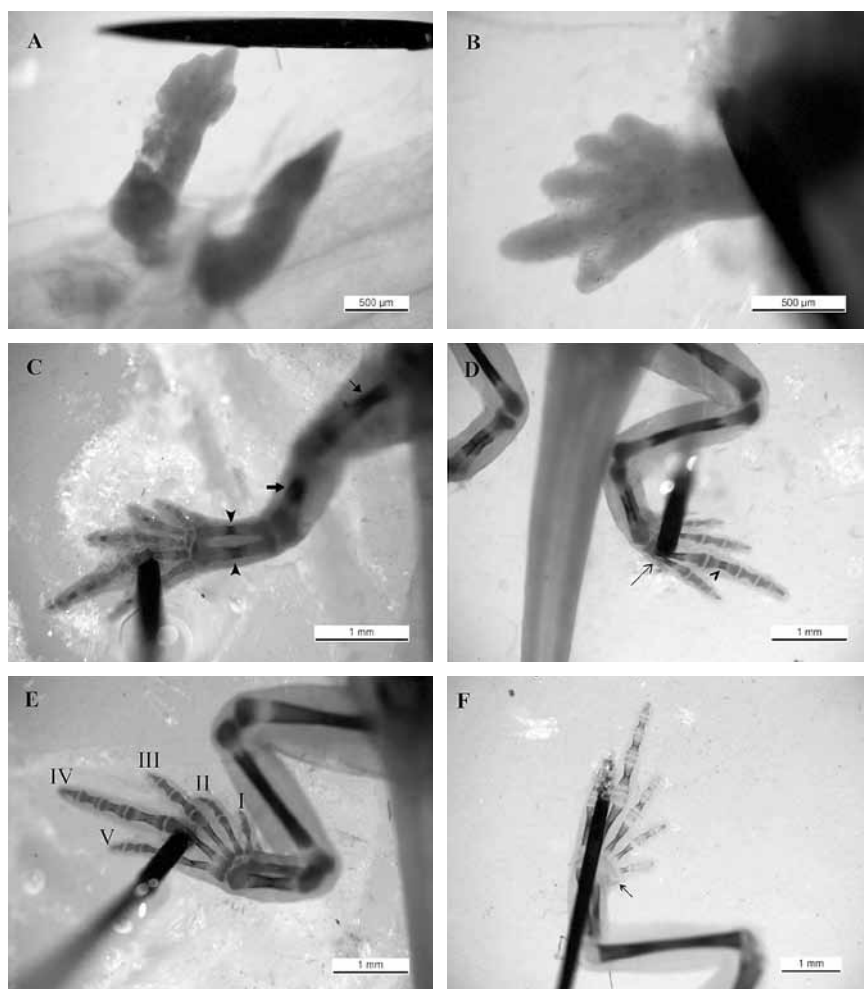
Zadnje okončine gradi stegenica ali femur, ki je v stiku z okolčjem, ter zraščeni golenica in mečnica ali tibiofibula. Sledita parna in podaljšana proksimalna tarzalna elementa ter preostale tarzalne kosti, podaljšane nartnice ali metatarzalni elementi in prstnice prstov. Zadnja okončina ima pet prstov. V fazi 34 in 36 so zadnje okončine še v celoti hrustančne (slika 5A, B). Vseh pet prstov je izoblikovanih v fazi 36, vendar posamezne prstnice še niso vidne. V fazi 39 je že dobro vidna osifikacija v diafizah stegenice in tibio-fibule, ki je v tem obdobju še iz ločenih zasnov (slika 5C). V proksimalnih tarzalnih elementih je vidna šibka osifikacija. Distalni del okončine je še hrustančen. Prsti so podaljšani, razvidne so tudi že posamezne hrustančne prstnice (slika 5C). V fazi 40 je razvidno napredovanje osifikacije proti epifiznim predelom pri stegenici, tibio-fibuli (zasnovi sta že združeni) in tarzusu (slika 5D). Vidna je tudi šibka osifikacija v nartnicah vseh štirih prstov in v prvi prstnici najdaljšega prsta (slika 5D). V fazi 44 so dolge kosti proksimalnega dela okončin že osificirane, epifize ostajajo hrustančne (slika 5E). Osifikacija je vidna v proksimalnih prstnicah prstov od III do V ter druga prstnica prsta III. V fazi 46 je skoraj celotna okončina koščena, hrustančne so epifize in distalni elementi gležnja (slika 5F).



Slika 4: Vzorec osifikacije okolčja pri navadni krastači *Bufo bufo*. **A** - Faza 39, osifikacija v proksimalnem delu črevnic (puščica). Sramnici (glava puščice) sta hrustančni. **B** - Faza 44, osifikacija črevnic (puščica) je obsežnejša. Parni hrustanci sramnice (glava puščice) in sednice so v osrednjem delu hrbtenice. **C** - Faza 46, okolčje je osificirano, razen v distalnih koncih črevnic (puščica) (slika levo z dorzalne strani) in v predelu sramnic (glava puščice) (slika desno z ventralne strani).

Figure 4: Ossification pattern in the pelvic girdle of *Bufo bufo*. **A** – Stage 39, ossification in the proximal part of ileum (arrow). Pubic bones (arrow head) are cartilaginous. **B** – Stage 44, ossification of the ileum is more extended (arrow). Dual cartilaginous elements of pubic bones (arrow head) and ischium are moved in central part of the spine. **C** – Stage 46, pelvic girdle is ossified except in distal parts of the ileum (arrow) (left figure from dorsal side) and in the pubic bones (arrow head) (right figure from ventral side) which are cartilaginous.





Slika 5: Vzorec osifikacije zadnjih okončin pri navadni krastači *Bufo bufo*. **A** - Faza 34, zasnove za okončini so podaljšane in hrustančne. **B** - Faza 36, izoblikovanih je vseh pet prstov. **C** - Faza 39, izrazita osifikacija v diafizah stegenice (tanka puščica) in tibio-fibule (debela puščica) ter šibkejša v diafizah proksimalnih kosti gležnja (glava puščice). Izoblikovane so tudi že vse hrustančne prstnice. **D** - Faza 40, osifikacija je napredovala proti epifizam v stegenici, tibio-fibuli in proksimalnih kosteh gležnja. Vidna je tudi šibka osifikacija v nartnicah (puščica) vseh štirih prstov in v prvi prstnici najdaljšega prsta (glava puščice). **E** - Faza 44, obsežna osifikacija v vseh dolgih kosteh okončine, razen v najbolj distalnih prstnicah, ki so hrustančne. **F** - Faza 46, osificirane so vse kosti okončine, vključno s prstnicami. Epifizni konci in distalni elementi gležnja (puščica) so hrustančni.

Figure 5: Ossification pattern in the hind limbs of of *Bufo bufo*. **A** – Stage 34, limb buds are elongated and cartilaginous. **B**. – Stage 36, all five fingers are formed. **C** – Stage 39, strong ossification in diaphysis of femur (thin arrow) and in tibiofibula (thick arrow), and weak ossification in diaphyses of proximal tarsal bones (arrow head). All cartilaginous phalanges are formed. **D** – Stage 40, ossification progresses towards the epiphyses of femur and tibiofibula as well as to the epiphyses of proximal tarsal bones. The ossification in metatarsus of all four fingers (arrow) and in first phalanx of the longest finger (arrow head) is weak. **E** - Stage 44, extensive ossification in all long bones of the limb, except in the most distal phalanges which are cartilaginous. **F** – Stage 46, all limb bones are ossified including phalanges. The epiphyseal ends and distal tarsal elements (arrow) are cartilaginous.

Zaporedje in časovni potek osifikacije skeleta pri ličinkah navadne krastače *B. bufo* povzemamo v Tabeli 1. Prva osifikacija skeleta nastopi v zgodnjem prometamorfoznem obdobju (faza 39) in se postopoma širi v kranialno - kavdalni smer

vzdolž hrbtenice, ter v proksimalno – distalni smeri v okončinah, oplečju in okolčju. Ob zaključku metamorfoze (faza 46) je skelet skoraj popolnoma osificiran.

Tabela 1: Vzorec osifikacije skeleta navadne krastače *Bufo bufo*.

Table 1: Skeleton ossification pattern in common European toad *Bufo bufo*.

Razvojne faze po Gosnerju	Osni skelet	Sprednje okončine in oplečje	Zadnje okončine in okolčje
39	zigapofize nevrlnih lokov I-VIII*	nadlahtnica podlahtnica s koželjnico	stegnenica tibio-fibula proksimalni tarzalni kosti proksimalni del črevnice
40	bočni deli nevrlnih lokov I-VIII* in IX bočni deli centrumov I-VIII*	klejtrum	nartnice proksimalna prstnica prsta IV
42	dorzalni deli nevrlnih lokov I-III* prečni odstavki II-III* kranialni del post-sakralne regije	lopatica ključnica krokarnica dlančnice prstov IV-V	
44		dlančnice prstov II-III prstnice prstov III-V	proksimalne prstnice prstov III in V druga prstnica prsta III
46	prečni odstavki IV-VII prečna odstavka vretenca IX kavdalni del post-sakralne regije	prstnici prsta II	sednica distalne prstnice prstov I-V

\*\_ osifikacija intenzivnejša v sprednjem delu hrbtenice

Skeletni elementi so navedeni glede na najbolj zgodnji pojav osifikacije, ki smo ga zasledili s pomočjo barvanja kostnega tkiva z barvilom alizarin rdeče.

\*- ossification is intense in cranial part of the spine

Skeletal elements are listed according to the earliest appearance of ossification process, which was detected by using the alizarin red stain for bone tissue.

## Diskusija

V raziskavi smo analizirali postembrionalno osifikacijo skeleta pri navadni krastači *Bufo bufo*, ki imajo izredno hiter razvoj ličink. Osredotočili smo se na zaporedje in časovni potek osifikacije skeletnih delov v hrbtenici, oplečju in okolčju ter okončinah, s pudarkom na distalnih delih okončin, saj v literaturi za navadno krastačo ni podanih podrobnih opisov. Tako kot pri ostalih brezrepcih (Kepm in Hoyt 1969, Duellman & Trueb 1986, Dunlap in sod. 1996) se hrustančne zasnove skeleta krastače oblikujejo v obdobju premetamorfoze in so v fazi 34 tudi že jasno razvidne. Prva osifikacija skeleta nastopi v prometamorfornem obdobju

(faza 39), in sicer sočasno v hrbtenici, proksimalnih delih okončin in črevnicah okolčja, ter se postopoma širi v kranialno - kavdalni smeri vzdolž hrbtenice ter od proksimalnih v distalne dele okončin, okolčja in oplečja, kot tudi od osrednjega dela dolgih kosti okončin proti njihovim epifiznim koncem.

Zasnove vretenc nastanejo iz mezenhimskih celic embrionalnega sklerotoma, ki se diferencirajo v hondrocite in obdajo hrbtenjačo in hrbtno struno (Gilbert 2000). V dorzalnem delu se oblikujejo ločene parne zasnove nevrlnih lokov, ki zaščitijo hrbtenjačo, zasnove okoli hrbtno strune oblikujejo centume vretenc, ki embrionalno hrbtno struno v celoti nadomestijo (Liem in sod. 2001). Prva

osifikacija hrbtenice pri navadni krastači je opazna v zigapofizah nevrnalnih lokov vretenc presakralne regije v obdobju prometamorfoze (faza 39). Vzorec osifikacije ločenih zasnov nevrnalnih lokov poteka podobno kot opisujejo za nekatere druge brezrepce (Haas 1999, Ročkova in Roček 2005, Yirdirim 2014), in sicer se postopoma širi iz proksimalnega dela leve in desne polovice nevrnalnih lokov proti njihovemu centru. Osifikacija hrbtenice poteka v kranialno – kavdalni smeri, kar se odraža tudi v intenzivnejši osifikaciji elementov hrbtenice kranialne regije, vključno s prečnimi odstavki vretenc. Slednji v kavdalni regiji presakralnih vretenc osificirajo šele v metamorfoznem klimaksu, njihovi distalni konci pa so ob zaključku metamorfoze še vedno hrustančni. Hrustančni distalni konci odstavkov vretenc pri krastači so zasnove embrionalnih reber, ki pri dvoživkah ostajajo kratka in zlita z odstavki in ne tvorijo rebre košare, kot je značilno za ostale vretenčarje (Liem in sod. 2001). Ob zaključku metamorfoze ostaja pri krastači hrustančen tudi osrednji dorzalni del nevrnalnih lokov, ki najverjetneje osificira po metamorfozi. Pri nekaterih vrstah brezrepcev se obe polovici nevrnalnih lokov na področju sprednjih vretenc ne združijo, vendar je pri večini vrst lok popoln in koščen (Duellman in Trueb 1986). Pri večini dvoživk poteka sočasna osifikacija centrumov in nevrnalnih lokov vretenc (Haas 1999, Ročkova in Roček 2005, Yirdirim 2014). To naj bi veljalo tudi za navadno krastačo (Dunlap in Sanchiz 1996), vendar se je v našem primeru osifikacija centrumov pojavila kasneje (faza 42). Vse do faze 42 so centrumi še hrustančni, medtem ko je v nevrnalnih lokih že intenzivna osifikacija. Podobno kot v nevrnalnih lokih, tudi v predelu centrumov poteka osifikacija najprej v bočnih delih hrustančnih centrumov, in se nato širi v proti osrednjemu delu posameznih centrumov vretenc.

Postsakralna vretenca so pri brezrepcih zlita v enotno osrednje ležečo stukturo ali urostil, ki je pomembna vzmet pri skakajočem načinu lokomocije, blažilec pri doskoku, nanj se pripenjajo mišice, ki omogočajo rotacijo okolčja (Kemp 1969, Duellman in Trueb 1986, Pough in sod. 2013). Do zlivanja postsakralnih elementov pri brezrepcih prihaja ob koncu metamorfoze in se nadaljuje tudi po zaključku metamorfoze (Duellman in Trueb 1986). V raziskavi smo ločene hrustančne zametke postsakralne regije

hrbtenice opazili v fazi 39, prvo osifikacijo pa v kranialnem delu postsakralne regije, v fazi 42, torej na začetku metamorfoznega klimaksa. V fazi 46 je kranialni del postsakralne regije že zlit v strukturo imenovano urostil in tudi že osificiran, medtem ko je v kavdalnem koncu zastopana šele šibka osifikacija. Proces mineralizacije urostila pri krastači in ostalih brezrepcih se zaključi po metamorfozi (Dunlap in Sanchiz 1996).

Oplečje brezrepcev v osnovi gradita dve dermalni kosti, ključnica ventralno in klejtrum z dorzalne strani ter lopatica z nadlopatico dorzalno in korakoid z ventralne strani, ki so endohondralnega nastanka (Duellman in Trueb 1986). Obe polovici oplečja na trebušni strani povezujejo elementi prsnice. Vzorec osifikacije oplečja ličink krastače *B. bufo* je podoben, kot ga opisujeta Dunlap in Sanchiz (1996) za različne vrste rodu *Bufo*, in je značilen tudi za ostale brezrepce (Duellman in Trueb 1986, ). Prva osifikacija oplečja je bila opazna v klejtrumu (faza 40). Ta se nato širi v proksimalni del lopatice. Sočasno poteka osifikacija korakoida, kar sovпада z zaključkom osifikacije nadlahtnice sprednjih okončin. Sledi širjenje osifikacije v distalni konec lopatice in na področje ključnice (faza 42). Ob zaključku metamorfoze (faza 46) je oplečje pri krastači koščeno, razen nadlopatice, ki sta v celoti hrustančni. Obseg osifikacije nadlopatice je vrstno specifičen, npr. pri vrstah iz družine pravih žab (Ranidae) obsega približno 2/3 celotne nadlopatice (Duellman in Trueb 1986).

Okolčje brezrepcev je v primerjavi z repatimi dvoživkami zelo modificirano, parni elementi okolčja so namreč združeni v osrednjem delu okolčja, tako da je sklepna vezava zadnjih okončin na okolčje v centralni osi hrbtenice (Duellman in Trueb 1986, Liem 2001, Pough in sod. 2013). Podaljšani sta tudi črevnici in ležita vzporedno s hrbtenico in se pripenjata na diafizo križnega vretenca. Posteriorna dela črevnic sta razširjena in oblikujeta anteriorno polovico kolčnične ponvice, ki je mesto sklepne vezave stegenice zadnje okončine (Duellman in Trueb 1986). Preostali del ponvic oblikujeta sednici in sramnici. Čeprav je lega parnih sednic in sramnic okolčja odraslih brezrepcev v centralni osi hrbtenice, se elementi okolčja razvijejo iz parnih hondrifkacijskih centrov na vsaki strani hrbtenice (Ročkova in Roček 2005, Yirdirim 2014), kar je tudi lepo razvidno v našem

primeru pri ličinkah krastače. Parne hrustančne zasnove so jasno razvidne v fazi 34 premetamorfoze in ležijo na vsaki strani hrbtnice. Prvo osifikacijo okolčja smo opazili v prometamorfozi (faza 39), in sicer v posteriornem delu črevnic sočasno s stegenico in tibiofibulo. Osifikacija sednice nastopi šele ob koncu metamorfoznega klimaksa, medtem ko pubisa ostajata hrustančna. Vzorec razvoja okolčja je pri vseh brezrepcev podoben, časovno različno pa je zlivanje obeh polovic okolčja, ki se pri nekaterih rodovih brezrepcev pojavi predno črevnici dosežeta svojo končno dolžino (npr. *Discoglossus*, *Bombina* in *Xenopus*), pri drugih (npr. *Bufo*, *Pelobates* in *Rana*) pa se pojavi kasneje, čeprav sta črevnici že podaljšani (Ročkova in Roček 2005). V našem primeru prihaja do združevanja ločenih parnih zasnov sednice in sramnice v fazi 44 metamorfoznega klimaksa. Dunlap in Sanchi (1996) za *Bufo bufo* tega podatka ne navajata. Osifikacija okolčja krastače se pojavi v prometamorfozi (faza 39) v posteriornem delu črevnic sočasno s stegenico in tibiofibulo, medtem ko nastopi osifikacija sednice šele ob koncu metamorfoznega klimaksa. Razen sramnice, ki ostajata hrustančni, je okolčje koščeno ob zaključku metamorfoznega klimaksa. Dunlap in Sanchi (1996) za krastačo *Bufo bufo* sicer navajata zgodnejšo osifikacijo črevnic (faza 37) in sednic (faza 44) ter popolno osifikacijo okolčja pred zaključkom metamorfoze (faza 45).

Tako kot je značilno za ostale dvoživke (Duellman in Trueb 1986), se osifikacija v okončinah krastače *B. bufo* pojavi najprej v proksimalnih delih in se nato postopoma širi v distalne dele. Proksimalni deli okončin krastače osificirajo v zgodnjem prometamorfoznem obdobju, saj so v fazi 39 že intenzivno osificirani, kar se sklada z opisom od Dunlap in Sanchi (1996). Prav tako nastopi proces osifikacije najprej v zadnjih okončinah, saj je bilo obarvanje kostnega tkiva v stegenicah intenzivnejše in obsežnejše. Zanimiv je vzorec osifikacije distalnega dela okončin (t.i. autopodija), ki ga Dunlap in Sanchi (1996) pri svojem opisu razvoja in osifikacije skeleta pri *B. bufo* ne podajata. Osifikacija nartnic zadnjih okončin (faza 40) se pojavi pred dlančnicami sprednjih okončin (faza 44). Sočasno z nartnicami poteka tudi osifikacija proksimalne prstnice IV. prsta, medtem ko nastopi osifikacija v preostalih proksimalnih prstnicah bistveno kasneje, in sicer proti koncu

metamorfoznega klimaksa (faza 44). Osifikacija distalnih prstnic vseh petih prstov zadnje okončine se pojavi šele ob zaključku metamorfoze. Sočasno z dlančnicami sprednje okončine poteka osifikacija proksimalnih prstnic vseh prstov sprednje okončine, z izjemo II. prsta (faza 42). Proksimalna prstnica prsta II sprednje okončine osificira sočasno z distalnimi prstnicami preostalih prstov (faza 44). Prst I je v evoluciji brezrepcev reducirani, tako da ima sprednja okončina štiri prste (Liem in sod. 2001). Pri zadnji okončini sočasno z nartnicami osificira le proksimalna prstnica prsta IV (faza 40), proksimalne prstnice preostalih prstov osificirajo kasneje (faza 44). Razen proksimalno – distalne osifikacije v okončinah je zaslediti tudi posteriorno – anteriorno osifikacijo prstov, ki pravzaprav sledi postopnemu izraščanju prstov med razvojem okončin paglavcev (Badawy in sod. 2012). Ob zaključku metamorfoze (faza 46) so okončine pri krastači koščene, z izjemo epifiznih koncev ter karpalnih in metakarpalnih elementov. Tudi pri večini ostalih brezrepcev karpalni in metakarpalni elementi pokostenijo šele po metamorfozi (Kemp in Hoyt 1969, Duellman in Trueb 1986, Dunlap in Sanchi 1996, Hass 1999). Epifizni konci pa so pri večini brezrepcev popolnoma mineralizirani šele po četrti hibernaciji (Rozenblut in Ogielska 2005).

Pri večini vrst brezrepcev je relativni čas osifikacije posameznih enot skeleta (lobanja, hrbtnica in okončine) dokaj podoben (Hass 1999), prav tako se osifikacija najprej pojavi v lobanjskem delu, ki ji sledi osifikacija v hrbtnici, nato v zadnjih okončinah in nazadnje še v sprednjih okončinah. Običajno se osifikacija v okončinah dvoživk pojavi tudi z večjim časovnim zamikom glede na lobanjo in hrbtnico. V primeru navadne krastače *B. bufo* se prva osifikacija okončin pojavi sočasno z osifikacijo hrbtnice. Rezultati raziskave pri navadni krastači *B. bufo* kažejo tudi na to, da je osnovni vzorec osifikacije skeleta dvoživk ohranjen, neglede na to, da je razvoj ličink krastače v primerjavi z ostalimi brezrepci bistveno hitrejši.

## Summary

Ossification is a process in which pre-existing mesenchymal tissue or cartilage transforms into bone. In amphibia, this process occurs in the post-

embryonic period during larval development. The basic pattern of ossification is strongly conserved among closely related species, but the precise timing of skeletal ossification is species-specific.

In our research we analyzed the pattern of skeletal ossification in larvae of the common European toad, *Bufo bufo*, a species of anuran with very rapid larval development. We focused on post-embryonal ossification of the axial skeleton with an emphasis on the distal parts of the limbs. We used a clearing and staining method for cartilage and bone. The developmental stages of the larvae were identified using the Gosner (1960) Staging System for Anurans. Our results suggest that at the end of the prometamorphosis stage (Stage 34), the skeleton is entirely cartilaginous. The first visible ossification by the applied method is evident in prometamorphosis (Stage 39), and occurs simultaneously in the zygapophyses of the neural arches of the spine, in the diaphyses of proximal parts of the forelimbs (humerus, radius-ulna) and hind limbs (femur and tibia-fibula), as well as in the proximal part of the ileum of the pelvic girdle. The process intensifies during prometamorphosis and gradually progresses in a cranial - caudal direction along the spine and from proximal to distal parts of the limbs, and in the pelvic and pectoral girdles, as well as to the epiphyses of the long bones. Fingers ossified in a posterior-anterior direction. Ossification of the postsacral vertebrae begins at the onset of the metamorphic climax (Stage 42), while their distal ends are still cartilaginous at the end of metamorphosis and, only weak ossification is visible. The retardation of ossification in the postacral region is common also for other anuran species.

In most amphibians, ossification takes place simultaneously in vertebral centra and neural arches of the vertebrae. We noticed that ossification of vertebral centra began later (Stage 40) in *B. bufo* than the neural arches. The ossification process in neural arches occurs in prometamorphosis (Stage 39) with the ossification of zygapophyses.

Overall, the basic ossification pattern in the limbs and girdles of *B. bufo* is also similar to that reported for other amphibian species and begins in the diaphyses of the proximal parts of limbs and then gradually progresses to the distal parts, as well as from the diaphyse to the epiphyses of the long bones. The first evidence of ossification

in the pectoral girdle is in the cleithrum (Stage 40) which then gradually continues to the other parts of the girdle (scapula, clavicle, coracoid). The ossification of the pelvic girdle occurs before the pectoral girdle, in prometamorphosis (Stage 39), with the ossification of the posterior part of the ileum, and simultaneously with the femur and tibia-fibula. By the start of the metamorphic climax (Stage 44), the dual and laterally placed cartilaginous elements of the girdle, the ischium and pubis, have moved to the central part of the spine, where, together with the ileum, they form the articulation site (acetabulum) for hind limbs. At the end of metamorphosis (Stage 46), the ischium begins the ossification process while the pubis remains cartilaginous.

At the end of the metamorphic climax (Stage 46), the skeleton of *B. bufo* is still not completely ossified. At this stage, cartilage remains in the dorsal midline of the spine, in the distal parts of the transverse processes of the vertebrae, as well as in the epiphyses, the mesopodial elements (carpals and metatarsals) of the limbs, and in the suprascapula and pubis of both girdles. Although all of these elements (except the suprascapula) are fully ossified in amphibians by the end of metamorphosis, the carpals in the front limbs and metatarsals in the hind limbs usually remain cartilaginous.

Most Anuran species are similar in the relative timing of ossification of the major skeletal units (cranium, vertebral column, hind and front limbs); the very first ossification appears in the cranium, shortly followed by ossifications of the vertebral column, then the hindlimb, and last the forelimb (Haas 1999). Usually hind- and forelimbs start ossification with a clear delay relative to the cranium and vertebral column. In the case of common toad *B. bufo*, it appears that the vertebral column, hind and front limbs begin to ossify simultaneously. In most other respects, however, the results of the research also show that despite rapid larval development, the patterns of ossification seen in *B. bufo* are very similar to those of other anuran species, underlining the fact that they are strongly conserved.

## Literatura

- Badawy, G.M., Sakr, S.A., Atallah, M.N., 2012. Comparative study of the skeletogenesis of limb autopods in the developing chick *Gallus domesticus* and toad *Bufo regularis*. RJPBCS, 3 (4), 966-988.
- Carter, D.R., Mikic, B., Padian, K., 1998. Epigenetic mechanical factors in the evolution of long bone epiphyses. Zool. J. Linn. Soc., 123, 163-168.
- Çiçek, K., Kumaş, M., Dınçer, A., 2011. Differentiation of bone tissue and long bone development in the Uludağ frog, *Rana macrocnemis* tadpoles. Biharean Biol., 5(2), 123-126.
- Duellman, W., Trueb, L., 1986. Biology of Amphibians. In: Duellman, W. (ed.): Musculo-Skeletal System, 1st ed. McGraw-Hill, New York, pp. 289-365.
- Dunlap, K.D., Sanchiz, B., 1996. Temporal dissociation between the development of the cranial and appendicular skeletons in *Bufo bufo* (Amphibia: Bufonoidae). J. Herpetol., 30 (4), 506-513.
- Felisbino, S.L., Carvalho, H.F., 2002. Ectopic mineralization of articular cartilage in the bullfrog *Rana catesbeiana* and its possible involvement in bone structure. Cell Tissue Res., 307 (3), 357-365.
- Gilbert, S.F., 2000. Developmental Biology. In: Gilbert, S.F. (ed.): Osteogenesis: The Development of Bones, 6th ed. Sinauer Associates Inc., U.S., 695 pp.
- Gosner, K.L., 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. Herpetologica, 16 (3), 183-190.
- Hanken, J., Wassersug, R.J., 1981. The visible skeleton. Functional Photography, 16(4), 22-26.
- Haas, A., 1999. Larval and metamorphic skeletal development in the fast-developing frog *Pyxicephalus adspersus* (Anura, Ranidae). Zoomorphology, 119(1), 23-35.
- Kemp, N., Hoyt, J., 1969. Sequence of ossification in the skeleton of growing and metamorphosing tadpoles of *Rana pipiens*. J. Morph., 129(4), 415-443.
- Liem, K.F., Bemis, W.E., Walker, W.F., Grande, L., 2001. Functional anatomy of the vertebrates: An evolutionary perspective, 3rd ed. Thomson Brooks/Cole. USA, 784 pp.
- Nieuwkoop P.D., Faber J. 1956. Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). A Systematical and Chronological Survey of the Development from Fertilized Egg till the End of Metamorphosis. Elsevier, Amsterdam.
- Pough, F.H., Janis, C. M., Heiser, J. B., 2013. Vertebrate life, 9th ed. Pearson Educations, Inc. USA, 634 pp.
- Pugener, L.A., Maglia, A.M., Trueb, L., 2003. Revisiting the contribution of larval characters to an analysis of phylogenetic relationships of basal anurans. Zool. J. Linn. Soc. 139, 129-155.
- Rieppel, O., 1994. Studies on skeleton formation in reptiles. Patterns of ossification in the skeleton of *Lacerta agilis exigua* Eichwald (Reptilia, Squamata). J. Herpetol., 28, 145-153.
- Ročková, H., Roček, Z., 2005. Development of the pelvis and posterior part of the vertebral column in the Anura. J. Anat., 206(1), 17-35.
- Rozenblut, B., Ogielska, M., 2005. Development and Growth of Long Bones in European Water Frogs (Amphibia: Anura: Ranidae), With Remarks on Age Determination. J. Morphol., 265, 304-317.
- Semlitsch, R. 1994. Evolutionary consequences of non-random mating: do large male increase offspring fitness in the anuran *Bufo bufo*? Behav. Ecol. Sociobiol., 34, 19-24.
- Simsa, S., Monsonego Ornan, E., 2007. Endochondral ossification process of the turkey (*Meleagris gallopavo*) during embryonic and juvenile development. Poult. Sci., 86, 565.
- Taylor, A.S., Kollros, J.J., 1946. Stages in the normal development of *Rana pipiens* larvae. Anat. Rec., 94, 7-23.
- Yildirim, E., Ugur, K., 2014. Comparative skeletogenesis of the Oriental Tree Frog *Hyla orientalis* (Anura: Hylidae). Zool. Anz., 253, 361-371.
- Wake, D.B., Roth, G., 1989. The linkage between ontogeny and phylogeny in the evolution of complex systems. In Wake, D.B., and Roth, G., (eds.): Complex Organismal Functions: Integration and Evolution in Vertebrates, John Wiley & Sons, pp. 361-377.