

PREMIERES OBSERVATIONS HISTOLOGIQUES DE L'OVIDUCTE DE *BOULENGERULA TAITANUS*, LOVERIDGE 1935, AMPHIBIEN GYMNOPHIONE

*Michel RAQUET 1, John MEASEY 2, Jean-Marie EXBRAYAT 1

*mraquet@univ-catholyon.fr

(1) Université de Lyon, UMRS 449, Laboratoire de Biologie Générale, Université Catholique de Lyon et Laboratoire de Reproduction et de Développement comparé, Ecole Pratique des Hautes Etudes, 25, rue du Plat, F-69288 Lyon cedex 02 (France).

(2) Molecular Ecology and Evolution Program, Kirstenbosch Research Centre, South African National Biodiversity Institute, Private Bag X7, Claremont 7735, South Africa; Department of Biodiversity and Conservation Biology, University of the Western Cape, Private Bag X17, Bellville 7535, South Africa; Department of Herpetology, National Museums of Kenya, P.O. Box 40658-00100, GPO Nairobi, Kenya.

RESUME

Boulengerula taitanus est une espèce ovipare de Gymnophione, habitant les terrains humides des monts Taïta du Kenya. L'histologie de l'oviducte des femelles, prélevé en saison de reproduction, révèle une structure tripartite, typique des Amphibiens ovipares, composée d'une *pars recta*, d'une *pars convoluta* et avant le cloaque, d'une *pars utera*. Les techniques classiques d'histologie et d'histochimie permettent de distinguer le contenu cytoplasmique des cellules glandulaires de l'épithélium oviductal. Elles permettent aussi d'analyser la structure et la composition de la gangue des œufs retrouvés dans l'oviducte. Il apparaît alors que la première

couche de cette enveloppe, étant de nature plutôt glycoprotéique, a été produite par les cellules glandulaires de la *pars convoluta*. Quant à la seconde, plus externe, elle est composée de protéoglycannes sulfatés et acides et provient donc de la *pars utera*. Ces résultats révèlent les spécificités de *B. taitanus* en la rapprochant toutefois, d'une autre espèce de Gymnophione étudiée, *Ichthyophis glutinosus*.

INTRODUCTION

Boulengerula taitanus est un Amphibien Gymnophione, vivant dans les terrains d'altitude des monts Taita, au Kenya (Figure 1A). Cette petite espèce serpentine, d'une vingtaine de centimètres de

longueur, possède un mode de vie fouisseur (1). En période de reproduction, la femelle creuse une chambre sphérique à une profondeur d'environ 20 cm, où elle pond entre 6 et 10 œufs de 8 mm de diamètre environ. Après éclosion, les jeunes se nourrissent des sécrétions épidermiques de leur mère pendant quelques semaines (2).

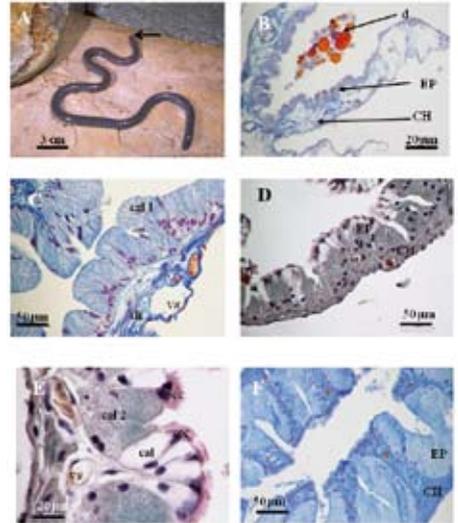
La biologie de la reproduction de cette espèce commence à être connue. L'ovaire a déjà été étudié, ainsi que des éléments de son cycle (3,4). Notre étude s'est intéressée à l'histologie de l'oviducte, dont la principale fonction est de capter le produit de l'ovulation et de l'acheminer vers l'extérieur, ainsi qu'aux analyses histochimiques de la gangue des œufs oviductaux. Les membranes ovulaires ont pour rôle de protéger l'embryon des chocs et de la dessiccation. Elles permettent à l'œuf proprement dit de tourner sur lui-même et de s'orienter par rapport à la pesanteur. Elles facilitent aussi la ponte (sortie du cloaque) et la fécondation.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les femelles de *B. taitanus* ont été collectées mensuellement et fixées *in situ* avec du formaldéhyde à 10 % neutralisé par du carbonate de calcium à saturation, lavées et placées dans une solution d'éthanol à 70% (1). Les oviductes d'environ 88 mm ± 5,8 ont été prélevés pendant la période d'ovulation, c'est-à-dire de janvier à février. Puis ils ont été déshydratés dans des solutions d'éthanol de concentration croissante, inclus dans la paraffine, coupés à l'aide d'un microtome de Minot en sections transversales de 5 à 7 µm, et collées sur lame de verre avec de l'eau albumineuse. Les dif-

férentes coupes ont été déparaffinées, puis hydratées progressivement dans des bains successifs de cyclohexane et d'éthanol de degrés décroissants.

Dans le but de décrire l'organisation tissulaire de l'oviducte, diverses colorations topographiques (5) ont été mises en œuvre : - L'azan de Roméis a permis de caractériser les différentes structures de l'oviducte. Cette coloration distingue bien le tissu conjonctif en colorant les fibres de collagène en bleu turquoise et les noyaux des fibroblastes en violet, les érythrocytes en jaune vif, le cytoplasme des globules blancs en bleu soutenu, leur noyau en violet-rouge;



Figures 1 : A : femelle *Boulengerula taitanus* *in vivo*, la flèche désigne la tête. B : pavillon février : azan. C : *pars recta*, février : azan. D : *pars convoluta*, février : trichrome de Masson-Goldner. E : détail. F : *pars utera*, décembre : azan, cal = cellule caliciforme, cc = cellule ciliée, CH = chorion, cgl 1 = cellule glandulaire de type 1, d = débris, EP = épithélium, vs = vaisseau sanguin.

- Le trichrome de Masson Goldner, complète l'azan, en révélant plus spécialement les fibres de collagènes et la membrane pellucide;
- l'hématoxyline-phloxine-safran (HPS) colore les fibres collagènes en jaune, les noyaux en bleu, les fibres musculaires et les hématies en rouge.

La coloration à l'azan donne déjà quelques caractéristiques biochimiques : la coloration bleu indigo correspond aux cytoplasmes basophiles contenant des protéines, l'orange pour les acidophiles et en brun-orange les corps lipidiques acidophiles.

Des colorations histochimiques complémentaires ont été mises en œuvre :

- La méthode à l'acide périodique et au réactif de Schiff (APS) et le bleu alcian-APS pour mettre en évidence les protéoglycannes neutres et acides;
- La coloration de Ravetto pour préciser la nature chimique des mucopolysaccharides (protéoglycannes) : en jaune les protéoglycannes carboxylés, en bleu les protéoglycannes sulfatés, en vert la présence conjointe des protéoglycannes sulfatés et carboxylés;
- Le rouge Sirius pour le collagène I et II.

RÉSULTATS

Colorations topographiques

Structure de base de l'oviducte :

La coloration à l'azan permet de distinguer clairement la structure histologique commune à tout l'oviducte. De l'extérieur vers la lumière du tube on distingue :

- une séreuse composée d'un chorion comprenant une séreuse conjonctive, un tissu conjonctif lâche avec des fibres mus-

culaires lisses et des vaisseaux sanguins, un épithélium pseudo-stratifié plus ou moins ondulé ou digité, des cellules ciliées plus ou moins nombreuses à la surface et essentiellement, des cellules hautes reposant sur une lame basale. Selon la morphologie de l'épithélium et les cellules qui le constituent, on peut définir plusieurs grandes sections dans l'oviducte.

Le pavillon :

Du côté rostral, le pavillon se présente, en coupe transversale, sous la forme d'une mâchoire en V, ouvert vers l'extérieur, et relié par un filament de conjonctif au corps de l'oviducte. Sa longueur oscille entre 10 et 15 % de celle de l'oviducte (pavillon compris). Son épithélium pavimenteux, légèrement ondulé est uniquement constitué de cellules ciliées cubiques, de 15 à 20 µm de côté (Figure 1B). Après le pavillon, l'oviducte se ferme en un tube continu débouchant dans le cloaque. Le chorion s'enrichit de fibres musculaires lisses, responsables des mouvements péristaltiques, permettant la progression des œufs.

La morphologie des plis de l'épithélium permet l'observation de trois parties distinctes dans l'oviducte.

La pars recta :

La première partie possède un épithélium épais, sans villosité, ou légèrement plissé. Sa longueur est estimée entre 10 et 15 % de la longueur totale. L'épithélium est prismatique. Il ondule légèrement et il ne contient presque plus de cellules ciliées, mais des cellules glandulaires, imposantes, de 70 µm de hauteur. Leurs noyaux sont basaux et mesurent 5 µm de diamètre. Leurs cytoplasmes possèdent un aspect «effiloché» caractérisant une fine granulation.

Les différentes colorations se concentrent un peu plus du côté apical. Leur limite extérieure apparaît floue. Cette caractéristique laisse entendre que leur sécrétion est du type holocrine, avec détachement de toute la cellule, ou de type apocrine ou holomérocine, avec amputation de la partie apicale du cytoplasme. L'absence de débris cellulaires dans la lumière de l'oviducte, fait pencher pour la deuxième définition (Figure 1C).

La pars convoluta :

La partie médiane représente 35 à 40 % de la longueur totale de l'oviducte avec des villosités nettement dessinées ou des digitations arrondies. Elle correspond à la *pars convoluta* (Figures 1D, E). Le chorion est épais, les vaisseaux sanguins particulièrement larges arrivent juste sous les crêtes. L'épithélium comprend outre des cellules ciliées situées sur les crêtes, deux types de cellules sécrétrices. D'abord des cellules hautes, de 24 à 32 μm de hauteur, ayant un noyau basal (4-6 μm de diamètre) et un cytoplasme souvent granuleux et abondant, ayant des affinités tinctoriales avec l'azan qui les colore en bleu. Ce sont des cellules glandulaires. Ensuite, des cellules plus petites situées près des cellules ciliées, et dont la majeure partie du cytoplasme est tournée vers la lumière de l'oviducte et s'évasant avec un aspect souvent vacuolaire. Leurs noyaux sont situés à mi hauteur de l'épithélium: ce sont des cellules caliciformes. La coloration au trichrome de Masson-Goldner est particulièrement adaptée pour décrire leur remarquable morphologie.

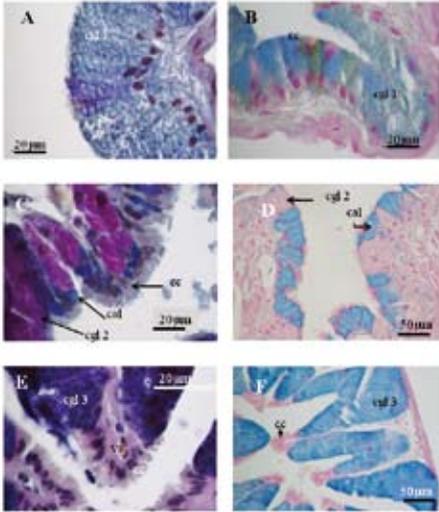
La pars utera :

La dernière partie avant le cloaque est

très digitée et ne contient plus qu'un seul type de cellules glandulaires. En janvier et février (période d'ovulation de *Boulengerula taitanus*), elles représentent entre 35 à 40 % de la longueur totale de l'oviducte. Cette partie se distingue de la précédente par ses crêtes hautes, aplaties et couvertes de cellules ciliées. Un large vaisseau sanguin est visible sous le plateau des crêtes. Le chorion est écrasé par la partie glandulaire. L'épithélium est organisé de façon très particulière. La partie glandulaire se manifeste sous forme de capuchons serrés et très développés, avec un seul type de grosses cellules glandulaires (80 μm de haut, 18 μm de large, noyau basal de 9 μm) qui tapissent les creux des villosités. A certains endroits, elles semblent se regrouper sous forme de rosaces (mais sans canal sécréteur central visible), à cause de la taille et de la complexité du dessin des villosités (Figure 1F).

Colorations histochimiques des cellules sécrétrices de l'oviducte

Les cellules glandulaires de la *pars recta* possèdent un cytoplasme coloré en violet par le bleu alcian-APS révélant la présence de protéoglycannes acides (cellules glandulaires de type 1 dans la Figure 2A). Dans les zones qui s'invaginent légèrement dans le chorion, la coloration de Ravetto montre parfois des cellules semblables, mais dont le cytoplasme contient une large vacuole, d'aspect un peu réfringent et de contour bleu plus vif (protéoglycannes sulfatés). Parfois, le cytoplasme se colore en jaune-vert, correspondant à divers protéoglycannes (Figure 2B). Les cellules caliciformes de la *pars convoluta*



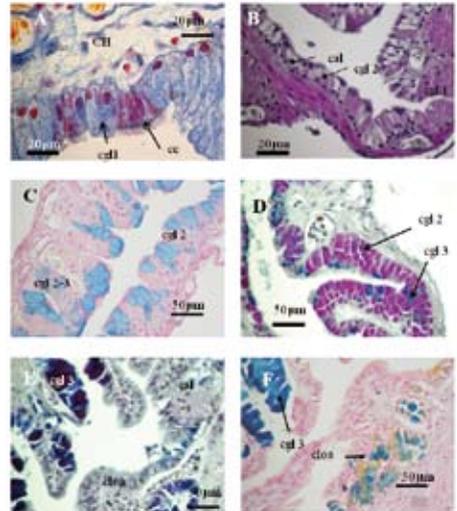
Figures 2 : A : *pars recta*, février, bleu-alcian APS. B : *pars recta*, février : coloration de Ravetto. C : *pars convoluta*, septembre : bleu-alcian APS. D : *pars utera*, décembre : coloration de Ravetto. E : *pars utera*, décembre : bleu-alcian APS. F : *pars utera*, septembre : coloration de Ravetto.

ont un cytoplasme bleu foncé coloré par le bleu alcian (Figure 2C) et bleu vif par la coloration de Ravetto (Figure 2D). Leur cytoplasme contient des protéoglycannes sulfatés et acides. Les cellules glandulaires granuleuses (type 2), sont fortement APS positif, et bien colorées en bleu par l'azan : signes de la présence de glucides et de protéines. Le bleu alcian et la coloration de Ravetto ne colorent pas leur cytoplasme : les protéoglycannes sont neutres. Les cellules glandulaires (type 3) de la *pars utera* sont très colorées par l'azan, par le bleu alcian, par l'APS et par la coloration de Ravetto, ce qui révèle la forte concentration en protéoglycannes acides et sulfatés en protéines, et en glucides (Figures 2 E, F).

En plus de ces trois grandes parties,

il existe des zones intermédiaires plus ou moins différenciées au cours de l'année. La transition du pavillon avec la *pars recta* se manifeste par la diminution du nombre de cellules ciliées et l'épaississement de l'épithélium, de façon très rapide (Figure 3A). Le passage de la *pars recta* avec la *pars convoluta* est plus progressif (Figure 3B). On soulignera le fait que les quelques cellules caliciformes de la *pars recta* contiennent des protéoglycannes carboxylés et acides, ainsi que des glucides, tandis que celles, plus nombreuses, de la *pars convoluta* possèdent un cytoplasme riche en protéoglycannes acides et sulfatés.

Entre la *pars convoluta* et la *pars utera*, on observe une zone où les cellules glandu-



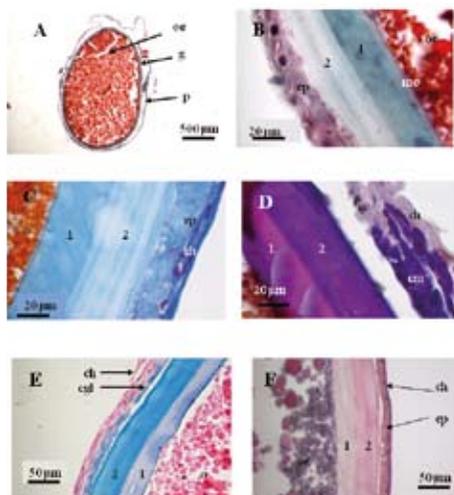
Figures 3 : Parties intermédiaires de l'oviducte. A : pavillon-*pars recta*, février : azan. B : *pars recta*-*pars convoluta*, février : HPS. C : *pars convoluta*-*pars utera*, février : Ravetto. D : *pars convoluta*-*pars utera*, février : Bleu-alcian APS. E : *pars utera*-cloaque, janvier : Bleu-alcian APS. F : *pars utera*-cloaque, janvier : Ravetto. cloa = cellules de l'épithélium cloacal.

lares possèdent les caractéristiques mixtes (Figures 3C, D). Dans le prolongement de la *pars utera*, avant le cloaque, une autre zone intermédiaire se distingue par un dessin interne complexe. Cette zone est caractérisée par la prolifération des cellules ciliées, avec une ciliature très haute. Les cellules glandulaires sont moins nombreuses, semblent se regrouper sous la couche de cellules ciliées. Leur cytoplasme contient des protéoglycannes très divers : sulfatés et carboxylés (respectivement bleu et jaune à la coloration de Ravetto), (Figures 3E, F).

L'histologie et l'histochimie de la gangue des œufs

Les œufs, dans la *pars utera*, écrasent et distendent considérablement la paroi. Les cellules de l'épithélium «écrasé» se disposent en quinconce. L'œuf est entouré d'une couche acellulaire épaisse et grasse, la membrane ovulaire (Figure 4A). On repère une zone plus large que la membrane vitelline autour de l'œuf, c'est la membrane de fécondation ou membrane périvitelline.

Le trichrome de Masson-Goldner colore en verdâtre la gangue ovulaire. On y distingue deux sous-couches qui se différencient par leur densité. La sous-couche proche de l'œuf mesure entre 23 et 32 μm d'épaisseur, fortement colorée en vert, donc de nature semblable à celle du collagène. L'autre sous-couche est plus large mesurant entre 26 et 42 μm environ, faiblement colorée en vert, et de densité moins importante. Le contenu cytoplasmique des cellules glandulaires de la paroi de l'oviducte apparaît sous forme de granulations



Figures 4 : Gangue de l'œuf, février. A: section transversale de l'oviducte au niveau d'un œuf, trichrome de Masson-Goldner. B: détail de la vue précédente. C: Azan. D: bleu alcian APS. E: coloration de Ravetto. F: coloration rouge Sirius. g=gangue, mo=membrane ovulaire, p=paroi de l'oviducte, oe= œuf, 1 ou 2=sous-parties de la gangue de l'œuf.

rose foncé (Figure 4B). Les deux mêmes couches sont aussi mises en évidence par la coloration à l'azan. La première est bien colorée en bleu (donc de nature protéique) avec des sortes d'inclusions un peu plus pâles. La seconde est à peine teintée de bleu, avec une densité nettement plus faible. Les cellules glandulaires de l'épithélium de l'oviducte ont un cytoplasme d'aspect et de couleur très semblables à la première couche (Figure 4C). Le bleu alcian-APS colore moins la première couche de la gangue que la seconde, mais dans la même gamme chromatique. Le contenu cytoplasmique des cellules de l'épithélium de l'oviducte est coloré en violet vif comme la deuxième couche. Le bleu alcian-APS marque très bien la membrane de féconda-

tion, en limitant une zone plus large, moins colorée, située entre les deux zones (Figure 4D). La coloration de Ravetto distingue, elle aussi, les deux couches de la membrane ovulaire. La première couche apparaît cette fois-ci faiblement colorée, plutôt rosâtre avec des zones bleutées, situées près de la membrane périvitelline. La deuxième couche est fortement bleu roi. Ces deux teintes se retrouvent exactement dans les granules roses et bleutés du cytoplasme des cellules glandulaires de l'épithélium (Figure 4E). La coloration au rouge Sirius semble montrer que la couche externe de la gangue possède une nature plus fibreuse que la précédente (Figure 4F).

CONCLUSION

Structure de l'oviducte :

La structure tripartite de l'oviducte de *Boulengerula taitanus* est tout à fait semblable à celle rencontrée chez d'autres espèces d'Amphibiens (6, 7), et particulièrement chez les Gymnophiones ovipares étudiés, (8) notamment *Ichthyophis beddomei* (9), avec cependant, quelques particularités. La *pars recta* de l'oviducte de *B. taitanus* ne possède que peu de cellules ciliées, qui sont majoritairement des cellules hautes, au cytoplasme contenant des protéoglycannes acides, et quelques cellules séreuses à sécrétions plutôt acides. La *pars convoluta* des Gymnophiones présente la même constitution globale (10). Chez *B. taitanus*, la partie située près du tube digestif est plus aplatie et un peu plus ciliée, mais sans qu'il y ait une répartition globalement différente des cellules de l'épithélium. De même, les cellules glandulaires sont situées au fond des cryptes, sans être

organisées en glandes. Cependant, les crêtes ciliées étant de plus en plus développées en direction du cloaque, elles peuvent apparaître comme de «fausses glandes» en coupes transversales, ainsi que l'a décrit Wake (11).

Caractères histochimiques :

Les caractères histochimiques de l'oviducte de *B. taitanus* confirment les observations faites chez les autres Gymnophiones ovipares, spécialement chez *I. beddomei*. Dans la partie antérieure (*pars recta* et la partie intermédiaire avec la *pars convoluta*), le contenu cytoplasmique des cellules de type glandulaire est constitué, en plus des protéines, de protéoglycannes plutôt acides et sulfatés. L'épithélium glandulaire de la *pars convoluta* produit aussi des glucides, c'est-à-dire des sécrétions plutôt neutres. La partie postérieure (partie intermédiaire avec la *pars utera* et la *pars utera* elle-même) contient des glucides avec un peu de protéoglycannes sulfatés et acides.

Gangue de l'œuf

La concordance de la composition histochimique des gangues avec le contenu cytoplasmique des cellules glandulaires confirme bien que, comme chez les autres 1

La membrane ovulaire possède les mêmes caractéristiques histochimiques que les sécrétions des cellules glandulaires de l'épithélium. On en déduit que ces dernières sont responsables de l'élaboration de la gangue autour de l'œuf. Dans le détail, la première sous-couche apparaît composée surtout de glycoprotéines (APS+, très bleu à l'azan), la deuxième, plus externe,

de protéoglycannes sulfatés et acides. A l'appui des études précédentes, nous déduisons que les cellules glandulaires de la *pars convoluta* sont responsables du dépôt de la première sous couche, celles de la *pars utera* de la deuxième. Les cellules caliciformes ne semblent pas intervenir, puisque leur contenu ne se retrouve pas dans la gangue. Leur sécrétion muqueuse, située au niveau de la ciliature, pourrait faciliter le mouvement des cils et donc, la propulsion de l'œuf vers la zone postérieure de l'oviducte. L'aspect concentrique et homogène des couches ovulaires implique que, pendant son transit, l'œuf tourne sur lui-même et accroche les différentes sécrétions produites dans les cryptes de l'épithélium.

L'espèce *Boulengerula taitanus* produit des œufs revêtus d'une enveloppe peu épaisse, qui se subdivise en deux sous-couches. Mais alors que chez les autres Amphibiens, la formation de la gangue est imputable, dans sa plus grande partie à la *pars convoluta*, chez *B. taitanus*, la *pars utera* est responsable de la sous-couche externe de l'œuf. Cette gangue ressemble à celle rencontrée chez *Ichthyophis glutinosus* (12, 13), qui possède également deux couches. Toutefois, la couche externe de la gangue des œufs chez *B. taitanus*, est aussi épaisse que la couche interne, alors que chez *I. glutinosus*, elle est de 500µm contre 100 pour la couche interne. La cou-

che interne chez *I. glutinosus* est orange à l'azan et non bleu foncé, pourpre foncé au trichrome de Masson Goldner et magenta plus soutenu par l'APS. Cela laisse entendre que la gangue des œufs de *B. taitanus* est moins riche en fonctions acides que celle d'*I. glutinosus*. Il est intéressant de noter que la gangue de l'œuf s'apparente à la gangue fine observée chez l'espèce vivipare *Typhlonectes compressicauda*, gangue constituée de protéoglycannes plutôt acides et de glucides APS+ (14).

Chez *B. taitanus*, contrairement à beaucoup d'espèces d'Amphibiens, c'est la couche interne qui est glycoprotéique et donc plus hydrophile *a priori* que la couche externe faite de protéoglycannes sulfatés. Ce fait est certainement à interpréter comme une adaptation à la vie fouisseuse de l'espèce. Les œufs éclos étant protégés par la mère dans une chambre creusée sous terre, très humide, ne nécessitent pas une gangue complexe et encore moins une gangue gonflant avec l'eau.

Ces premiers résultats histologiques chez une espèce rare, montrent l'intérêt évident d'une analyse préliminaire des structures anatomo-morphologiques, par des colorations classiques. Une étude de l'évolution tissulaire de l'oviducte au cours du cycle de reproduction, par exemple, devra s'appuyer sur elle.

BIBLIOGRAPHIE

1. MALONZA P.K., MEASEY J.: Life history of an African caecilian: *Boulengerula taitanus* Loveridge 1935 (Amphibia Gymnophiona Caecilidae). *Trop. Zool.*, 2005, 18, 49-66.
2. KUPFER, A., KRAMER, A., HIMSTEDT, W., GREVEN, H.: Copulation and egg retention in an oviparous Caecilian (Amphibia : Gymnophiona). *Zool. Anz.*, 2006, 244, 223-228.
3. RAQUET M., MEASEY G.J. et EXBRAYAT J.-M. : Premières Observations histologiques de l'ovaire de *Boulengerula taitanus*, Loveridge, 1935, Amphibien Gymnophione. *Rev. Fr. Histotech.*, 2007, 19 (1), 9-15.
4. RAQUET M., MEASEY G.J. et EXBRAYAT J.-M. : Structure of ovaries and the ovarian cycle in *Boulengerula taitanus* (Loveridge, 1935) (Amphibia, Gymnophiona). *14th Ord. Gen. Meet. Soc. Eur. Herp., Porto* (Portugal), 2007, 285.
5. EXBRAYAT J.-M. -Méthodes classiques de visualisation du génome en microscopie photonique, Tec&Doc, Editions Médicales internationales Londres Paris New York, 182p., 2000.
6. WAKE, M.H., DICKIE, R. : Oviduct structure and function and reproductive modes in Amphibians. *The Journal of Experimental Zoology*, 1998, 282, 477-506.
7. VAN GANSEN P. : Ovogenèse des amphibiens Pp. 21-55, in GRASSE, P.P. et DELSOL, M. (ed.). *Traité de Zoologie, Amphibiens*, tome XIV fascicule IB, Masson, Paris, 1995.
8. EXBRAYAT J.-M. : Modes of parity and oviposition p. 303-323. In J.M. EXBRAYAT (Ed). *Reproductive Biology and Phylogeny of Gymnophiona (Caecilians)*. Vol.5 of series edited by B.G.M. JAMIESON, Science Publishers, Enfield, Jersey, Plymouth, 2006.
9. WAKE, M.H. Evolutionary morphology of the caecilian urogenital system. Part II: the kidneys and urogenital ducts. *Acta Anat.*, 1970, 75 : 321-358.
10. MASOOD PARVEEZ, U., NADKARNI, V.B. : Morphological, histological and Histochemical and annual cycle of the oviduct in *Ichthyophis beddomei* (Amphibia Gymnophiona). *J. Herp.*, 1991, 25 : 234-237.

11. SALTHER, N.S., MECCHAM, J.S. Reproductive and courtship patterns. Pp. 309-521. In *Physiology of Amphibia*, B. Lofts, Ed Academic Press New York, vol. 2, 1974.
12. WAKE, M.H. The reproductive biology of Caecilians. An evolutionary perspective. Pp. 73-100. In D.H. Taylor and S.I. Guttman (eds), *The Reproductive Biology of Amphibians*, Miami Univ., Oxford, Ohio; S.A.A., 1977.
13. BRECKENRIDGE, W.R., DE SILVA, G.I.S. : Observations on the eggs and larvae of *Ichthyophis glutinosus*. *Ceylon Journal of Sciences (Biological sciences)* 1973, 13 : 187-202.
14. BRECKENRIDGE, W.R., JAYASINGHE, S.: Observations on the Eggs and Larvae of *Ichthyophis glutinosus*. *Ceylon Journal of Sciences (Biology Sciences)* 1979, 13 : 187-204.