

ESTADIOS EMBRIONARIOS POST-OVIPOSICION DE *ATRACTUS RETICULATUS* (SERPENTES: DIPSADIDAE)

María T. SANDOVAL; Soledad PALOMAS y Blanca B. ALVAREZ⁽¹⁾

RESUMEN: Los Squamata constituyen un clado muy diverso en cuanto al número de taxones, distribución geográfica, formas corporales, hábitos ecológicos y modelos de desarrollo. En los últimos años se ha incrementado el interés por el conocimiento de la ontogenia embrionaria de los reptiles ya que conservan caracteres reproductivos y de desarrollo primitivos de los amniotas y brindan importante información aplicable a estudios de la evolución y diversificación morfológica dentro del clado. A pesar de la gran diversidad de serpientes, existe poca información acerca de los eventos del desarrollo. En el presente trabajo se analizó la morfología embrionaria de *Atractus reticulatus* desde la oviposición hasta la eclosión. A partir de los resultados obtenidos se concluye que en dicha especie, a semejanza de la mayoría de los Squamata, los embriones al momento de la oviposición se encuentran en un estado avanzado del desarrollo y que los eventos post-oviposición incluyen la organización y diferenciación final de los sistemas de órganos, el desarrollo de las escamas y el establecimiento del patrón de pigmentación.

ABSTRACT: Squamata is a diverse clade with respect to the number of species, geographical distribution, body shapes, ecological habits and developmental modes. In recent years, the interest in the ontogeny of reptiles has increased because they conserve primitive reproductive and developmental characters, and provide useful information for morphological and evolutive approaches. Despite the great diversity of snakes, there is little knowledge about their developmental events. In this paper the embryonic morphology of *Atractus reticulatus*, from oviposition to hatching, was analyzed. The results show that in this species, like most Squamata, the embryos are in an advanced state of development at the time of oviposition and the post-oviposition events include the final organization and differentiation of organ systems, scale development and body pigmentation.

Palabras claves: Serpentes, oviparidad, estadios del desarrollo, caracteres embrionarios.

Key words: Serpentes, oviparity, developmental stages, embryonic characters.

INTRODUCCIÓN

Los Squamata representan el clado más diverso de reptiles en cuanto al número de taxones, distribución geográfica, formas corporales, hábitos ecológicos y modelos reproductivos y de desarrollo (Blackburn, 2006). El desarrollo embrionario y los caracteres anatómicos de los embriones son bastante conservados dentro del clado, manteniéndose el patrón general típico de los amniotas. Los embriones presentan 4 anexos o membranas extraembrionarias (saco vitelino, alantoides, amnios y corion) que conservan la disposición ancestral o bien adquieren nuevas relaciones, principalmente en las especies vivíparas, para la formación de estructuras placentarias organizadas a partir del saco vitelino o de la membrana corion-alantoidea (Blackburn, 1981, 1995, 1998, 2000; Andrews y Rose, 1994; Andrews y Mathies, 2000; Andrews, 2002; Blackburn y Flemming, 2009).

(1) Laboratorio de Herpetología, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, UNNE. Av. Libertad 5470 (3400), Corrientes, Argentina.

E-mail: tetesandoval@hotmail.com; palomassoledad@yahoo.com.ar; alvarezherpetologia1@yahoo.com.ar

Una característica ampliamente extendida dentro del clado es la retención embrionaria intrauterina, lo que significa que al momento de la oviposición los embriones se encuentran en un estado avanzado del desarrollo (Shine, 1983).

Vickaryous y McLean (2011) plantean que en los últimos años se ha incrementado el interés por el conocimiento de la ontogenia embrionaria de los reptiles ya que, a diferencia de los mamíferos, conservan caracteres reproductivos y de desarrollo primitivos y brindan importante información aplicable a estudios de la evolución y diversificación morfológica dentro del clado. Los estudios del desarrollo embrionario en los Squamata se restringen a unas pocas especies y muchos de ellos presentan información parcial de la ontogenia. Respecto a las serpientes se ha descrito la morfología embrionaria completa de unas pocas especies como *Natrix natrix* (Krull, 1906, Vielhaus, 1907), *Natrix tessellata* (Korneva, 1969) y *Thamnophis sirtalis sirtalis* (Zehr, 1962), de la familia Natricidae y *Vipera aspis* (Hubert y Dufaure, 1968), de la familia Viperidae. En estos trabajos se caracteriza la ontogenia sobre la base de caracteres morfológicos externos y se proponen tablas de desarrollo que se utilizan comúnmente como referencia para la identificación de los estadios embrionarios. Jackson (2002) analiza el desarrollo post-oviposición de *Naja kaouthia* (Elapidae) y describe la osificación del esqueleto craneal. Boughner *et al.* (2007) y Buchtová *et al.* (2007) establecen para *Python sebae* (Pythonidae) diez estadios embrionarios post-oviposición y caracterizan la esquelotogénesis craneo-facial y del esqueleto apendicular. El desarrollo post-oviposición de *Boaedon fuliginosus* (Lamprophiidae) fue estudiado por Boback *et al.* (2012), sobre la base de caracteres morfológicos externos y el desarrollo craneo facial.

En el presente trabajo se analiza el desarrollo post-oviposición de *Atractus reticulatus* (Dipsadidae), especie de pequeño tamaño cuya distribución comprende Brasil, desde el estado de São Pablo hasta el sur de Rio Grande do Sul, este de Paraguay y Nordeste de Argentina. En nuestro país está citada para la provincia de Misiones y norte de Corrientes (Alvarez *et al.*, 1992; Giraud y Scrocchi, 2000; Carreira *et al.*, 2005). Debido a sus hábitos semifosoriales y escasos registros en la región, la biología de *A. reticulatus* es poco conocida, estando actualmente dentro de la categoría de No Amenazada (Giraud *et al.*, 2012). De acuerdo a lo descrito por Ballestrin y Di-Bernardo (2005) y Sandoval *et al.* (2009), es una especie de fecundidad variable cuyo tamaño de camada varía entre 1 y 8 huevos, siendo el periodo de puesta de noviembre a enero. Los huevos son blancos, oblongos con un diámetro mayor promedio que oscila entre los 23,1 mm y los 35,5 mm. En este marco los resultados presentados aportan información acerca de la biología reproductiva de la especie y contribuyen a ampliar los conocimientos del desarrollo embrionario en serpientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 22 embriones provenientes de 4 puestas de huevos de *Atractus reticulatus* obtenidas a campo. Las puestas fueron colectadas el 28 de diciembre de 2007 en Paraje Galarza (28°06'04"S y 56°39'46"O, Departamento Santo Tomé) y Colonia Carlos Pellegrini (28°30'25"S y 57°07'15"O, Departamento San Martín), provincia de Corrien-

tes, Argentina. Al momento de la colecta se realizó la fijación en formol 10%, de un huevo de cada puesta. El resto de los huevos fue llevado al laboratorio donde fueron incubados en bateas plásticas a 26°-28°C y con 66% de humedad, constantes en el mismo sustrato donde fueron hallados. Se realizó la fijación de un huevo de cada camada en formol 10%, previa inyección de 0,1 ml de Pentobarbital sódico como anestésico (American Veterinary Medical Association's, 2007), cada 4 días durante la etapa temprana y media del desarrollo y cada 7 días durante la etapa avanzada. Para su análisis, los embriones fueron aislados del vitelo y coloreados con azul de metileno para destacar las estructuras anatómicas. Las observaciones fueron realizadas bajo lupa estereoscópica Leica ES2. Las fotografías fueron tomadas con cámara digital Canon Power Shot A2000 IS. La identificación específica se realizó a partir del patrón de escutelación cefálica y patrón de pigmentación de los embriones en estadios avanzados del desarrollo siguiendo a Carreira *et al.* (2005).

En base a lo propuesto en trabajos previos (Sandoval *et al.*, 2009, 2013) se consideró al estadio 1 como el correspondiente a los primeros días post-oviposición (dpo). Para estimar los dpo de los restantes estadios, se consideró la fecha de fijación. Para la caracterización de los estadios embrionarios se consideraron los siguientes caracteres: encéfalo, órganos de los sentidos, esplacnocráneo, corazón, riñón, musculatura troncal, hemipenes, escamas y patrón de pigmentación, caracteres considerados en descripciones de referencia (Zehr, 1962; Hubert y Dufaure, 1968; Jackson, 2002 y Boughner *et al.*, 2007). El sexo de los ejemplares se determinó a partir de la presencia/ausencia de hemipenes o sus esbozos.

El material analizado forma parte de la Colección Herpetológica de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNEC 10.123-1, UNNEC 10.124-1, 10.124-2, 10.124-3, 10.124-4, 10.124-5, 10.124-6; UNNEC 10.125-1, 10.125-2, 10.125-3, 10.125-4, 10.125-5, 10.125-6, 10.125-7; UNNEC 10.126-1, 10.126-2, 10.126-3, 10.126-3, 10.126-4, 10.126-5, 10.126-6, 10.126-7).

RESULTADOS

Características generales de los embriones y membranas extraembrionarias

Dentro del huevo el embrión temprano ocupó la zona central dorsal de la masa de vitelo, con una orientación anterior-posterior paralela al eje mayor del huevo y con el flanco derecho hacia dorsal y el izquierdo apoyado sobre la masa vitelina. Excepto en los estadios avanzados próximos a la eclosión, el vitelo cubría casi completamente al embrión, siendo éste visible a través de una pequeña hendidura dorsal. Con respecto a las membranas extraembrionarias, en todos los casos analizados se observó el amnios y corion completos y la membrana del saco vitelino bien organizada y vascularizada. El grado de desarrollo del alantoides fue diferente según la etapa del desarrollo. En los estadios 1 a 4 dicho órgano se observó como una estructura globosa bien vascularizada, ubicada sobre el embrión ocupando la zona central del huevo, íntimamente adherida a la membrana coriónica y formando la membrana corion-alantoidea. En los estadios 5 a 10 la membrana corion-alantoidea se extendió ocupando toda la porción dorsal y lateral y ven-

tral del huevo, observándose además un aumento en el diámetro de los vasos sanguíneos extraembrionarios (Fig. 1).

Caracterización de estadios embrionarios

Se identificaron 10 estadios embrionarios, los cuales se describen a continuación.

Estadio 1 (entre 3 y 5 dpo) (Fig. 2)

Tegumento trasparente. Cabeza, tronco y cola bien definidos. Encéfalo bien organizado. Bulbos olfatorios bien desarrollados, visibles en la región dorsal anterior de la cabeza. Vesículas del telencéfalo prominentes, expandidas lateralmente sin sobrepasar la región ocular. Diencéfalo con glándula pineal visible. Mesencéfalo prominente con curvatura mesencefálica pronunciada. Rombencéfalo con IV ventrículo amplio y placa del techo transparente. Curvatura cervical pronunciada. Globo ocular ovoide en sentido anteroposterior, retina bien desarrollada y pigmentada, cristalino blanquecino y de posición central, pupila vertical, fisura coroidea ausente. Oído interno con canales semicirculares anterior, horizontal y posterior bien organizados, conducto endolinfático digitiforme dirigido hacia dorsal y medial. Proceso frontonasal prominente. Procesos maxilares extendidos anteriormente sobrepasando la región ocular. Se observa a cada lado una pequeña escotadura entre la porción lateral del proceso frontonasal y el proceso maxilar que corresponde a la invaginación de la placoda nasal. Procesos mandibulares pequeños dirigidos ventro-medialmente, no fusionados. Arcos faríngeos II, III y IV no distinguibles en vista lateral. Tronco con miótomos bien desarrollados. Corazón bien organizado con aurículas derecha e izquierda y ventrículo en su posición final, con crestas endocárdicas visibles. Esbozo hepático visible como una masa oscura en posición posterior al corazón. Pared del cuerpo sin fusionar en la línea media ventral. Riñón pronéfrico aún evidente. Mesonefros con túbulos bien organizados. Esbozo gonadal presente en la región ventro-medial de los riñones mesonéfricos. Esbozos de hemipenes visibles lateralmente a la cloaca.

Estadio 2 (10 dpo) (Fig. 3)

Tegumento blanquecino de modo que ciertas estructuras y órganos internos ya no son visibles por transparencia. Vesículas telencefálicas se extienden lateral y dorsalmente sobrepasando la región ocular y cubriendo al diencéfalo del cual sólo es visible dorsalmente la glándula pineal. Mesencéfalo y rombencéfalo semejantes al estadio anterior. Procesos maxilares fusionados entre sí en la línea media y unidos anteriormente al proceso frontonasal. Procesos mandibulares sin fusionar se extienden hasta la región anterior de los procesos maxilares. Proceso hioideo visible en posición ventral y medial a los procesos mandibulares. Orificios nasales externos ubicados dorsalmente al punto de unión de los procesos frontonasales y maxilares. Pared lateral del cuerpo sin fusionar en la línea media. Ventralmente se observa una membrana delgada y transparente que cubre la región cardíaca. Mesonefros visible como una masa conspicua de coloración oscura. Hemipenes digitiformes. Sobre el margen ventro-lateral, a cada lado de la región anterior del tronco, se observa un engrosamiento del tegumento correspondiente a esbozos de las escamas ventrales.

Estadio 3 (18 dpo) (Fig. 4)

Tegumento blanquecino. Mesencéfalo dividido en dos lóbulos. Ojos redondeados cubiertos parcialmente por una membrana trasparente (brille). Procesos maxilares y mandibulares más desarrollados que en el estadio anterior, se delimita el hocico. Lengua visible. Pared del tronco fusionada en la región del cuello (no alcanza la región cardíaca), resto sin fusionar cubierto por una membrana transparente. Corazón con organización y posición del adulto, con tronco arterioso y arcos carotideos y sistémicos bien organizados. Hígado prominente. Cabeza y cola sin esbozos de escamas. Escamas ventrales del cuerpo definidas y extendiéndose hasta la región posterior a cada lado del margen ventrolateral del tronco, región lateral del tronco con 2 hileras de escamas laterales bien definidas y dos hileras latero-dorsales de esbozos cónicos.

Estadio 4 (25 dpo) (Fig. 5)

Tegumento blanquecino opaco con escamas ventrales y laterales del tronco más desarrolladas que en el estadio anterior y esbozos de escamas dorsales. Pared del cuerpo y escamas ventrales de la porción anterior del tronco hasta la región cardíaca, fusionadas en la línea media. Cabeza con esbozos de escamas supralabiales, infralabiales y mentonianas, región nucal con escamas más definidas que en el estadio anterior. Esbozos de escamas en la porción anterior de la cola. Cabeza con hocico más desarrollado que el estadio anterior. Ojos completamente cubiertos por el brillo. Orificios nasales externos bien delimitados. Lengua bífida.

Estadio 5 (32 dpo) (Fig. 6)

Pared ventral del tronco con placas ventrales fusionadas y bien definidas. Escamas laterales y dorsales del tronco bien organizadas. Cabeza con escamas rostral, internasales, prefrontales, frontal, parietales (porción anterior) y circumorbitales bien definidas y con algunos cromatóforos dispersos. Escamas supra e infralabiales semejantes al estadio anterior. Escamas nucales bien definidas y con pigmentación incipiente. Cola con escamas mejor definidas que en el estadio anterior, dos hileras de subcaudales bien definidas. Pared del cuerpo fusionada ventralmente, excepto en la región periumbilical. Hemipenes con porción distal globosa dividida en dos lóbulos por una escotadura medial.

Estadio 6 (36 dpo) (Fig. 7)

Cabeza más elongada y aplanada que en el estadio anterior, hocico de mayor longitud. Sacos endolinfáticos con depósito de cristales de calcio, visibles detrás de las escamas parietales. Patrón de escutelación de la cabeza, tronco y cola bien definido. Escamas cefálicas rostral, nasales, internasales, circumorbitales, prefrontales y frontal pigmentadas. Dos primeras filas de escamas nucales, parietales, temporales, supralabiales, infralabiales y placas mentonianas sin pigmentar. Tercera a quinta fila de escamas nucales con abundantes cromatóforos en la porción media y apical. Inicio de pigmentación de escamas laterales y dorsales del tronco y cola, con cromatóforos dispersos en el ápice. Placas ventrales y escamas subcaudales sin pigmentar. En los ejemplares machos se observan los hemipenes con porción distal bifurcada de aspecto liso y porción basal con espinas, surco espermático en forma de Y, bien definido.

Estadio 7 (39 dpo) (Fig. 8)

Escamas cefálicas más coloreadas que en el estadio anterior, porción anterior de escamas parietales también pigmentadas. Inicio de pigmentación de escamas supra e infralabiales. Escamas nucales más pigmentadas que en el estadio anterior delimitando un collar marrón. Escamas dorsales del tronco con mayor cantidad de cromatóforos que en el estadio anterior. Se observan esbozos de dientes maxilares y mandibulares. Diente del huevo presente en la región premaxilar, visible en la porción anteroventral de la escama rostral.

Estadio 8 (42 dpo) (Fig. 9)

Escamas cefálicas más pigmentadas que el estadio anterior. Escamas dorsales centrales del tronco con cromatóforos dispersos en el margen lateral y posterior. Resto de las escamas dorsales y laterales del tronco con pigmentos dispersos en el margen y zona central clara. Escamas ventrales sin pigmentar. Collar nual bien definido.

Estadio 9 (48 dpo) (Fig. 10)

Pigmentación del cuerpo más definida que en el estadio anterior. Pigmentación de las escamas del cuerpo definen el reticulado característico de la especie. Escamas de la región nual se caracterizan y diferencian de las troncales por presentar una coloración uniforme sin zona central clara. Escamas dorsales centrales con mayor cantidad de cromatóforos delimitan una línea vertebral más pigmentada que el resto del tronco. Esbozos de dientes palatinos presentes.

Estadio 10 (53 dpo) (Fig. 11)

Embrión con características generales semejantes al estadio anterior. Se observa una delgada capa córnea que le da un aspecto opaco al tegumento del embrión, y que corresponde a la primera muda. En el tronco, los cromatóforos se distribuyen uniformemente en toda la escama salvo en una pequeña zona central. Línea vertebral más pigmentada ya no es evidente. Porción posterior de la cabeza sin pigmentar. Collar nual más oscuro que el resto del tronco. Hemipenes aún evertidos con porción basal con espinas más desarrolladas y cabeza bilobulada y de aspecto rugoso, con surco espermático bien definido. Embrión próximo a la eclosión, con escasa cantidad de vitelo.

DISCUSIÓN

Blackburn (1995) propone que el modelo de desarrollo de la mayoría de los reptiles ovíparos incluye la retención embrionaria intrauterina hasta completar la diferenciación primaria que comprende la organización de los esbozos de los principales sistemas de órganos (Shine, 1983). Como se describe en el presente trabajo, al momento de la oviposición los embriones de *Atractus reticulatus* se encuentran en una etapa de organogénesis temprana, similar a lo reportado para *Naja kaouthia* (Jackson, 2002), *Python sebae* (Boughner *et al.*, 2007), *Mussurana bicolor*, *Erythrolamprus poecilogyrus*, *E. almadensis*, *E. semiaureus* y *Lygophis anomalus* (Sandoval *et al.*, 2013). A partir de las estructuras embrionarias descritas para los primeros estadios analizados se puede com-

probar que durante la permanencia en el oviducto, que según Shine (*op. cit.*) es de aproximadamente el 40% de tiempo total de desarrollo para la mayoría de los escamados ovíparos, ocurre la organización del sistema nervioso central y órganos de los sentidos, parte del sistema digestivo, sistema circulatorio y sistema urinario principalmente. Los eventos ontogenéticos post-oviposición incluyen la organización y diferenciación final de dichos sistemas de órganos, y el desarrollo de caracteres anatómicos externos principalmente las escamas y el establecimiento del patrón de pigmentación.

En la tabla 1 se resume las características más generales que definen a cada estadio del desarrollo de *Atractus reticulatus* y las posibles equivalencias con los estadios propuestos para *Tamnophis sirtalis sirtalis* (Zerh, 1962), *Naja kaouthia* (Jackson, 2002) y *Python sebae* (Boughner *et al.*, 2007). Estas equivalencias deben tomarse en forma general ya que son pocos los caracteres comunes a partir de los cuales se pudo establecer comparaciones debido a que en los trabajos citados se consideran diferentes estructuras para definir los estadios embrionarios. A este respecto las equivalencias asignadas fueron posible particularmente para los primeros estadios del desarrollo y no para los últimos. Esto tiene que ver con que los caracteres considerados para describir estadios tempranos (procesos maxilares y mandibulares, ojos, fusión de la pared del cuerpo, aparición de las escamas, hemipenes, etc.) son estructuras morfológicas comunes a todos los reptiles que se organizan durante la primera mitad del desarrollo embrionario. Por ello la morfología general de los embriones es semejante independientemente del modelo de desarrollo vivíparo (*Tamnophis sirtalis sirtalis*) u ovíparo (*Atractus reticulatus*, *Naja kaouthia* y *Python sebae*) o de la familia a la que pertenezca la especie analizada (Colubridae, Dip-sadidae, Elapidae o Pythonidae, respectivamente). La equiparación de los estadios más avanzados, a partir del estadio 6, es menos precisa ya que en la etapa final del desarrollo a nivel externo ocurren eventos, como el establecimiento del patrón de escutelación y pigmentación, que son propios de cada especie y por lo tanto no comparables.

En relación al tiempo de desarrollo post-oviposición se estima que para *A. reticulatus* sería de aproximadamente 53 días, lo que coincide con el valor promedio reportado para otras serpientes (Birchard y Marcellini, 1996). El tiempo de incubación en los reptiles ha sido relacionado con ciertas variables, principalmente la temperatura (Deeming y Ferguson, 1991; Braña y Xiang, 2000; Booth, 2006). En estos trabajos se concluye que el aumento de la temperatura de incubación acelera el tiempo de eclosión y viceversa, pudiendo verse afectado el desarrollo embrionario y el fenotipo de la cría. En el presente estudio la temperatura de incubación, así como también la humedad ambiente, estuvo comprendida dentro del rango registrado a campo, por lo que consideramos que estas variables no influyeron sobre la morfogénesis embrionaria. En la tabla 2 se compara los dpo de *Atractus reticulatus*, *Naja kaouthia* y *Python sebae*. Como se observa existen semejanzas para los primeros estadios del desarrollo encontrándose mayor disparidad en los últimos, principalmente en *Python sebae*. Esto puede deberse a diferencias en el tiempo de desarrollo post-oviposición propio de cada especie y en función de las características morfológicas inherentes a cada taxón, como por ejemplo el tamaño de la cría al momento de la eclosión.

Tabla 1: Características generales de los estadios embrionarios post-oviposición de *Atractus reticulatus* y su equiparación con los estadios propuestos para *Tamnophis sirtalis sirtalis* (Zehr, 1962), *Naja kaouthia* (Jackson, 2002) y *Python sebae* (Boughner *et al.*, 2007).

Estadios del desarrollo embrionario post- oviposición de <i>Atractus reticulatus</i>	Equiparación tabla de <i>Tamnophis sirtalis sirtalis</i>	Equiparación tabla de <i>Naja kaouthia</i>	Equiparación tabla de <i>Python sebae</i>
Estadio 1 Tegumento transparente. Encéfalo bien organizado. Retina pigmentada. Procesos maxilares sobrepasan el ojo. Corazón bien organizado. Esbozo hepático prominente. Esbozo gonadal presente. Pared del cuerpo sin fusionarse ventralmente. Esbozos de hemipenes.	Estadio 26	Estadio 1	Estadio 1
Estadio 2 Tegumento blanquecino. Vesículas telencefálicas se extienden lateralmente sobrepasando la región ocular. Procesos maxilares unidos medialmente. Procesos mandibulares sin fusionarse. Hemipenes digitiformes. Esbozo de escamas ventrales del tronco.	Estadio 28-31	Estadio 2	Estadio 3
Estadio 3 Ojos cubiertos parcialmente por el brillo. Se delimita el hocico. Pared del tronco fusionada en la región del cuello. Cabeza y cola sin escamas. En el tronco escamas ventrales y 2 hileras laterales bien definidas, esbozos cónicos en la porción latero-dorsal	Estadio 32-33	Estadio 3	Estadio 4
Estadio 4 Esbozos de escamas cefálicas y caudales. En el tronco escamas ventrales y laterales bien definidas con esbozos de escamas dorsales. Lengua bífida. Pared del cuerpo fusionada hasta la región cardíaca.	Estadio 34	Estadio 6	Estadio 6
Estadio 5 Escamas cefálicas y nucales con inicio de pigmentación. Escamas laterales y dorsales del tronco bien definidas. Dos hileras de subcaudales bien definidas. Pared del cuerpo completamente fusionada excepto en la región umbilical. Hemipenes con cabeza bilobulada y una escotadura medial.	Estadio 35	Estadio 8	Estadio 8
Estadio 6 Sacos endolinfáticos con cristales de calcio. Escamas cefálicas con abundantes cromatóforos dispersos, excepto parietales, temporales, primeras nucales, supra e infralabiales y mentonianas. Inicio de pigmentación en escamas laterales y dorsales del tronco y cola. Escamas ventrales y subcaudales sin pigmentar. Hemipenes con espinas en la porción basal y surco espermiático en Y.	No equiparable	No equiparable	No equiparable
Estadio 7 Inicio de pigmentación de escamas supra e infralabiales. 3 ^{ra} a 5 ^{ta} fila de nucales con abundantes cromatóforos delimitando un collar marrón. Esbozos de dientes maxilares y mandibulares. Diente del huevo visible.	No equiparable	No equiparable	No equiparable
Estadio 8 Escamas dorsales y laterales del tronco con cromatóforos definiendo reticulado característico de la especie.	No equiparable	No equiparable	Estadio 9
Estadio 9 Línea vertebral más pigmentada. Escamas troncales con patrón de pigmentación reticulado característico de la especie. Esbozos de dientes palatinos.	No equiparable	No equiparable	No equiparable
Estadio 10 Patrón de pigmentación bien establecido. Línea vertebral ya no es perceptible. Región cefálica posterior sin pigmentar, collar nugal marrón oscuro. Escasa cantidad de vitelo.	Estadio 37	Estadio 10	Estadio 10

Tabla 2: Comparación de los **dpo** de los estadios embrionarios de *Atractus reticulatus* (presente trabajo), *Naja kaouthia* (Jackson, 2002) y *Python sebae* (Boughner *et al.*, 2007). S/D: sin datos.

Estadio	Días post-oviposición										Tiempo de incubación	T° de incubación
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
<i>Atractus reticulatus</i>	3-5	10	18	25	32	36	39	42	48	53	53 días	26°-28°C
<i>Python sebae</i>	1-3	S/D	11-12	18	S/D	33	44	54	61	75	80-90 días	30°C
<i>Naja kaouthia</i>	2-6	6-9	9-15	15-20	20-23	22-25	24-28	28-38	36-53	51	60-65 días	33°C

El número y disposición de las escamas y la coloración del cuerpo son dos de los caracteres utilizados en taxonomía de ofidios que permiten la identificación de los ejemplares a nivel específico (Cei, 1993, Giraudo y Arzamendia, 1997). En el presente trabajo se describe la secuencia de organización de dichos caracteres en *Atractus reticulatus*, evidenciando una sucesión determinada de modo que al final del periodo embrionario queda establecido el patrón de escutelación y pigmentación característico de la especie tal como los describen Alvarez *et al.* (1992) y Giraudo y Srocchi (2000).

En la mayoría de los trabajos de desarrollo embrionario de escamados la consideración del carácter escamas se realiza sólo a partir de datos de presencia/ausencia, lo que no permite evaluar posibles diferencias interespecíficas en la secuencia de organización y pigmentación de las mismas. Swadzba *et al.* (2009) describen para *Natrix natrix* una secuencia según la cual las escamas inician su desarrollo en la región caudal y ventrolateral del tronco, diferenciándola de lo caracterizado para *Vipera berus* (Maderson, 1965) y *Liasis fuscus* (Alibardi y Thompson, 2003) especies donde el proceso se inicia en la región dorso-lateral del tronco extendiéndose luego a la región cefálica. En *Atractus reticulatus* el desarrollo de la lepidosis se inicia en la región ventral del tronco, continuándose las escamas laterales y finalmente las dorsales completándose el patrón de organización y pigmentación en los últimos estadios embrionarios.

Asimismo es importante destacar la escasez de trabajos referentes al desarrollo ontogenético de escamados de la región, particularmente de serpientes, por lo que consideramos necesario incrementar este tipo de estudios ya que aportan interesante información de posible aplicación en análisis de tipo ecológico-evolutivo. En este marco los resultados aquí presentados representan la primera contribución al conocimiento de la embriogénesis de *Atractus reticulatus*, especie de alto valor biológico por su distribución restringida en nuestro país y particulares hábitos ecológicos.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo fue financiado por proyectos acreditados de la SGCyT-UNNE (F12 007 y 008).

BIBLIOGRAFÍA

- ALIBARDI, L. & M.B. THOMPSON, 2003. Epidermal differentiation during ontogeny and after hatching in the snake *Liasis fuscus* (Pythonidae, Serpentes, Reptilia), with emphasis on the formation of the shedding complex. *Journal of Morphology*, 256: 29-41.
- ALVAREZ, B.B.; L. REY & J.M. CEI, 1992. A new subspecies of the *reticulatus* group, genus *Atractus*, from southeastern South America (Serpentes: Colubridae). *Bollettino del Museo regionale di Scienze naturali*, 10 (2): 249-256.
- AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION'S, 2007. AVMA Guidelines on Euthanasia. http://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf.
- ANDREWS, R.M., 2002. Low oxygen: a constraint on the evolution of viviparity in reptiles. *Physiological and Biochemical Zoology*, 75(2): 145-154.
- ANDREWS, R.M. & B.R. ROSE, 1994. Evolution of viviparity: constraint on egg retention. *Physiological Zoology*, 67: 1006-1024.
- ANDREWS, R.M. & T. MATHIES, 2000. Natural history of reptilian development: constraints on the evolution of viviparity. *BioScience*, 50: 227-238.
- BALESTRIN, R.L. & M. DI BERNARDO, 2005. Reproductive biology of *Atractus reticulatus* (Boulenger, 1885) (Serpentes: Colubridae) in southern Brazil. *Herpetological Journal*, 15:195-199.
- BIRCHARD, G. & F.D. MARCELLINI, 1996. Incubation time in reptilian eggs. *Journal of Zoology*, 240 (4): 621-635.
- BLACKBURN, D.G., 1981. An evolutionary analysis on vertebrate viviparity. *American Zoologist*, 21 (4): 120.
- BLACKBURN, D.G., 1995. Saltationist and punctuated equilibrium models for the evolution of viviparity and placentation. *Journal of Theoretical Biology*, 174: 199-216.
- BLACKBURN, D.G., 1998. Structure, function and evolution of the oviducts of squamate reptiles, with special reference to viviparity and placentation. *Journal of Experimental Zoology*, 282: 560-617.
- BLACKBURN, D.G., 2000. Reptilian viviparity: past research, future directions, and appropriate models. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part A. 127: 391-409.
- BLACKBURN, D.G., 2006. Squamate reptiles as model organisms for the evolution of viviparity. *Herpetological Monographs*, 20: 131-146.
- BLACKBURN, D.G. & A.F. FLEMMING, 2009. Morphology, development, and evolution of fetal membranes and placentation in squamate reptiles. *Journal of Experimental Zoology*, 312B (6): 579-589.
- BOBACK, S.M.; E.K. DICHTER & H.L. MISTRY, 2012. A developmental staging series for the African house snake, *Boaedon (Lamprophis) fuliginosus*. *Zoology*, 115: 38-46.
- BOOTH, D.T., 2006. Influence of incubation temperature on hatchling phenotype in Reptiles. *Physiological and Biochemical Zoology*, 79 (2): 274-281.
- BOUGHNER, J.C.; M. BUCHTOVÁ; K. FU; V.M. DIEWERT; B. HALLGRÍMSSON & J.M. RICHMAN, 2007. Embryonic development of *Python sebae* – I: Staging criteria and macroscopic skeletal morphogenesis of the head and limbs. *Zoology*, 110: 212-230.
- BRAÑA, F. & J.I. XIANG, 2000. Influence of incubation temperature on morphology, locomotors performance, and early growth of hatchling wall lizards (*Podarcis muralis*). *Journal of Experimental Zoology*, 286: 422-433.
- BUCHTOVÁ, M.; J.C. BOUGHNER; K. FU; V.M. DIEWERT & J.M. RICHMAN, 2007. Embryonic development of *Python sebae* – II: Craniofacial microscopic anatomy, cell proliferation and apoptosis. *Zoology*, 110: 231-251.
- CARRERIRA, S.; M. MENEGHEL & F. ACHAVAL, 2005. Reptiles de Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Ciencias. Montevideo.

- CEI, M.J., 1993. Reptiles del noroeste, nordeste y este de la Argentina. Herpetofauna de las selvas subtropicales, Puna y Pampas. Monographie. *Museo Regionale di Scienze Naturali*. Torino.
- DEEMING, .D.C. & M.W.J. FERGUSON, 1991. Physiological effects of incubation temperature on embryonic development in reptiles and birds. En: Deeming y Ferguson (Eds.): *Egg Incubation: Its effects on embryonic development in birds and reptiles*. Cambridge University Press.
- GIRAUDO, A.R. & V. ARZAMENDIA, 1997. Clave para identificación de serpientes (Reptilia: Serpentes) de la Provincia de Santa Fe, Argentina. *Natura Neotropicalis*, 28 (2):134-145.
- GIRAUDO, A.R. & G.J. SCROCCHI, 2000. The genus *Atractus* (Serpentes: Colubridae) in north-eastern Argentina. *Herpetological Journal*, 10:81-90.
- GIRAUDO, A.R.; V. ARZAMENDIA; G.P. BELLINI; C. BESSA; C.C. CALAMANTE; G. CARDOZO; M. CHIARAVIGLIO; B. COSTANZO; E.G. ETCHEPARE; V. DI COLA; D.O. DI PIETRO; S. KRETZSCHMAR; S. PALOMAS; S.J. NENDA; P. RIVERA; M.E. RODRIGUEZ; G.J. SCROCCHI. & J. WILLIAMS, 2012. Categorización del estado de conservación de las serpientes de la República Argentina. *Cuadernos de Herpetología*, 26 (S1): 303-326.
- HUBERT, J. & J.P. DUFAURE, 1968. Table de development de la vipere aspic, *Vipera aspis*. *Bull. Soc. Zool. France*, 93:135-148.
- JACKSON, K., 2002. Post-ovipositional development of the monocled cobra, *Naja kaouthia* (Serpentes: Elapidae). *Zoology*, 105: 203-214.
- KORNEVA, L.G., 1969. Embryonic development of the water snake (*Natrix tessellata*). *Zool. Zhour.*, 98:110-120.
- KRULL, J., 1906. Die entwicklung der ringelnatter (*Tropidonotus natrix* Boie) vom ersten Aufstehen des proamnion bis zum schlusse des amnion. *Z. Wiss. Zool.*, 85:107-155.
- MADERSON, P.F.A., 1965. The embryonic development of the squamate integument. *Acta Zoologica*, 46: 275-295.
- SANDOVAL, M.T.; S. PALOMAS; M. AYARRAGARAY & B.B. ALVAREZ, 2009. Nesting site, clutch size and development of *Atractus reticulatus* (Serpentes, Colubridae) from Corrientes, Argentina. *Herpetological Bulletin*, 109: 11-16.
- SANDOVAL, M.T.; J.A. RUIZ GARCÍA & B.B. ALVAREZ, 2013. Desarrollo embrionario y retención intrauterina en colúbridos del nordeste de Argentina. *Boletín de la Asociación Española de Herpetología*, 24 (1): 37-43.
- SHINE, R., 1983. Reptilian reproductive modes: The oviparity-viviparity continuum. *Herpetologica*, 39 (1): 1-8.
- SWADZBA, E.; R. MASLAK & W. RUPIK, 2009. Light and scanning microscopic studies of integument differentiation in the grass snake *Natrix natrix* L. (Lepidosauria, Serpentes) during embryogenesis. *Acta Zoologica* (Stockholm), 90: 30-41.
- VICKARYOUS, M.K. & K.E. MCLEAN, 2011. Reptile Embryology. En: Pelegri F.J. (Ed.): *Vertebrate Embryogenesis. Embryological, Cellular and Genetic Methods*. Humana Press.
- VIELHAUS, T., 1907. Die entwicklung der rhingelnatter (*Tropidonotus natrix* Boie) nach ausbildung der falterform bis zur erhebung des proamnions. *Z. Wiss. Zool.* 86:55-99.
- ZEHR, D.R., 1962. Stages in the normal development of the common Garter Snake *Thamnophis sirtalis sirtalis*. *Copeia*, (2): 322-329.

Recibido/Received/: 04-Abr-2014
Aceptado/Accepted/: 20-Ago-2014

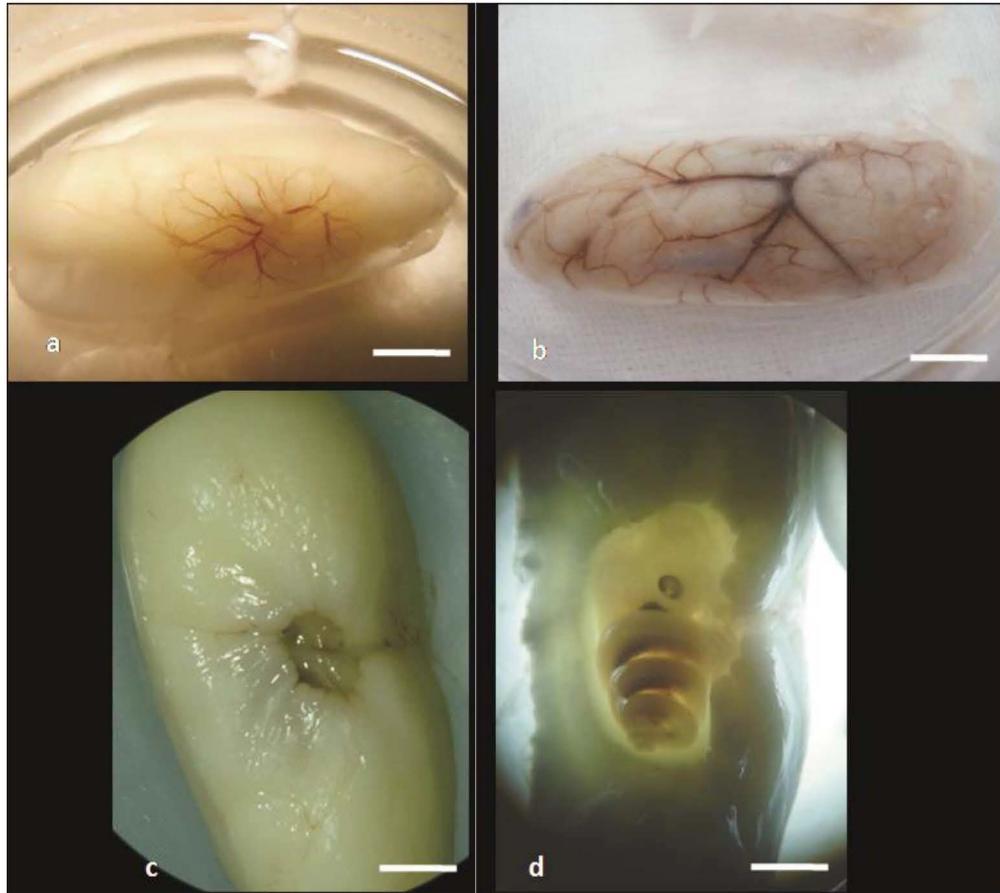


Fig. 1: a) Vista dorsal de un huevo de *Atractus reticulatus*, desprovisto de cáscara, correspondiente a la etapa temprana del desarrollo (estadio 1). b) Vista dorsal de un huevo correspondiente a la etapa tardía del desarrollo (estadio 7). c) Vista dorsal de un huevo desprovisto de la cáscara y membrana corion-alantoidea. d) Mismo huevo al cual se le retiró parte del vitelo para visualizar el embrión. Escala: a y b = 5 mm, c y d = 0,5 mm.

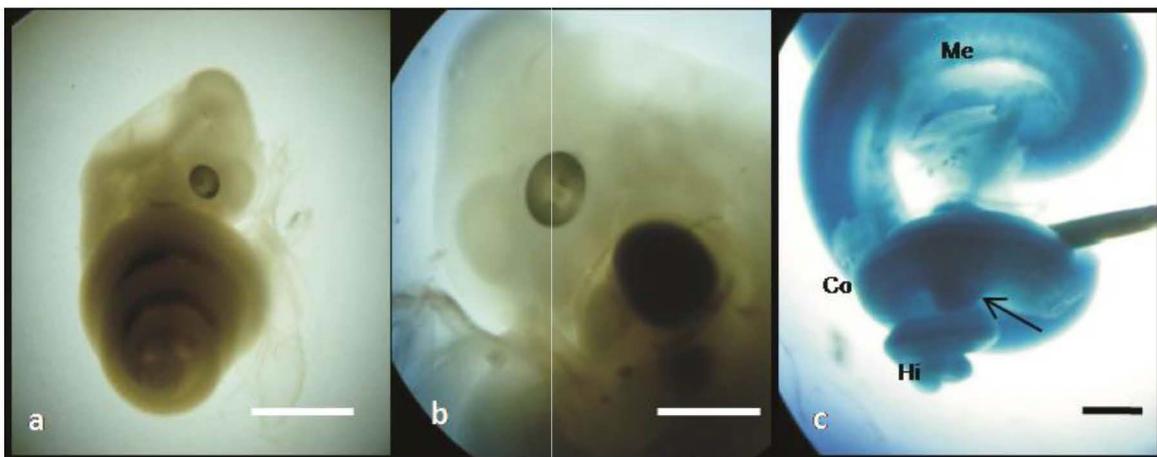


Fig. 2: Estadio 1 de *Atractus reticulatus*. a) Vista lateral derecha. b) Detalle de la región cefálica. c) Detalle de la región posterior y caudal donde se visualizan los esbozos de la hemipenes (flecha). Co: corazón, Hi: hígado. Me: mesonefros. Escala: a = 0,5 mm, b y c = 0,1 mm.

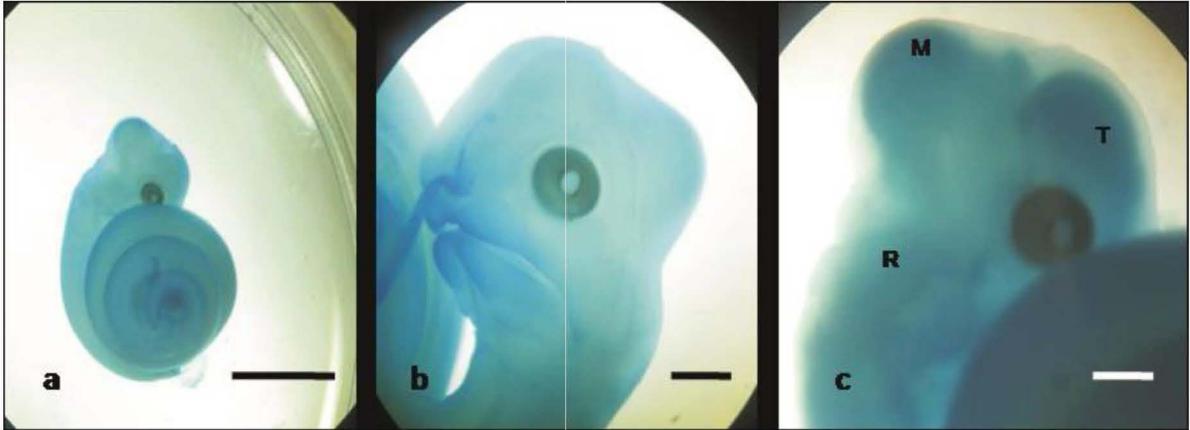


Fig. 3: Estadio 2 de *Atractus reticulatus*. a) Vista lateral derecha. b) Detalle región cefálica. c) Detalle del encéfalo. T: telencéfalo, M: mesencéfalo, R: rombencéfalo. Escala: a = 0,5 mm, b y c = 0,1 mm.

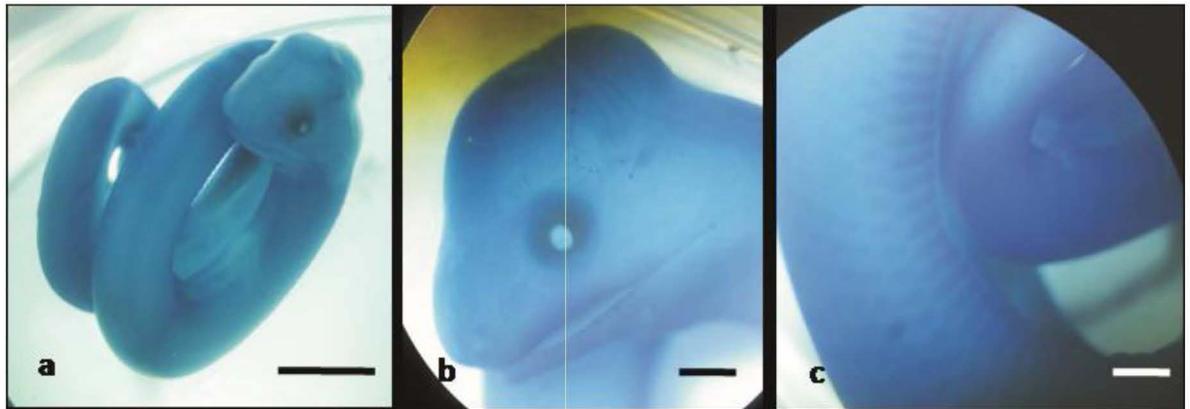


Fig. 4: Estadio 3 de *Atractus reticulatus*. a) Vista ventral. b) Detalle región cefálica. c) Detalle del tegumento de la región del tronco. Obsérvese los esbozos de las placas ventrales y escamas laterales. Escala: a = 0,5 mm, b y c = 0,1 mm.

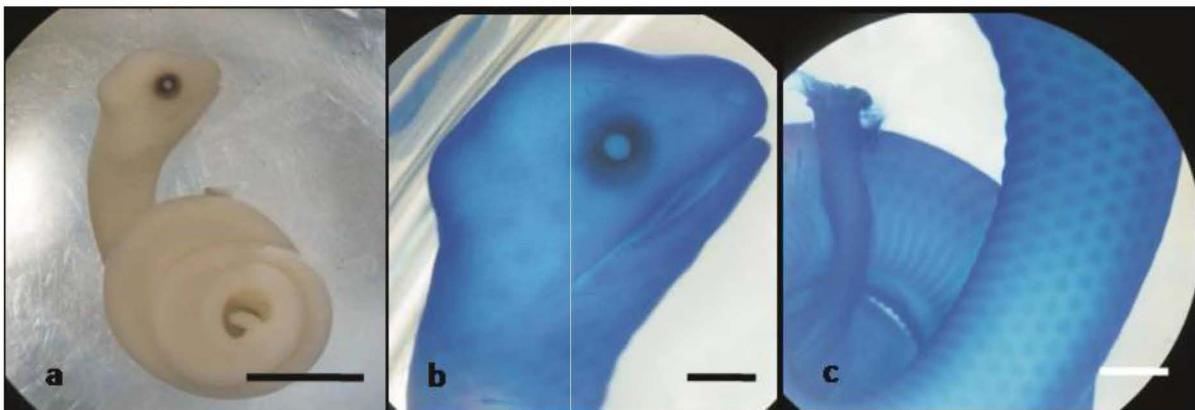


Fig. 5: Estadio 4 de *Atractus reticulatus*. a) Vista lateral derecha. b) Detalle región cefálica, obsérvese los esbozos de escamas nucales y labiales. c) Detalle del tegumento de la región del tronco. Escala: a = 0,5 mm, b y c = 0,1 mm.

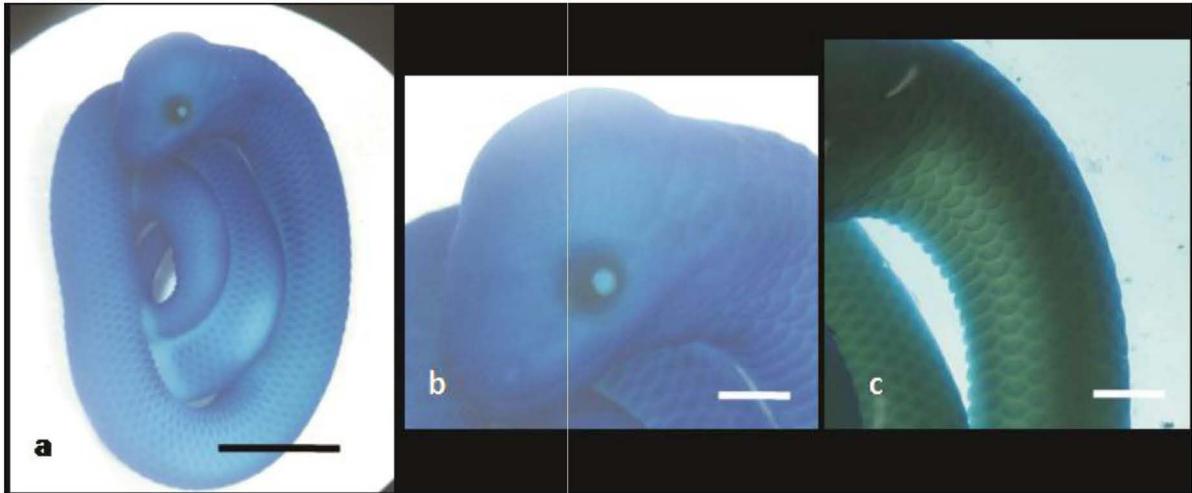


Fig. 6: Estadio 5 de *Atractus reticulatus*. a) Vista lateral izquierda. b) Detalle región cefálica, c) Detalle del tegumento del cuello. Escala: a = 0,5 mm, b y c = 0,1 mm.

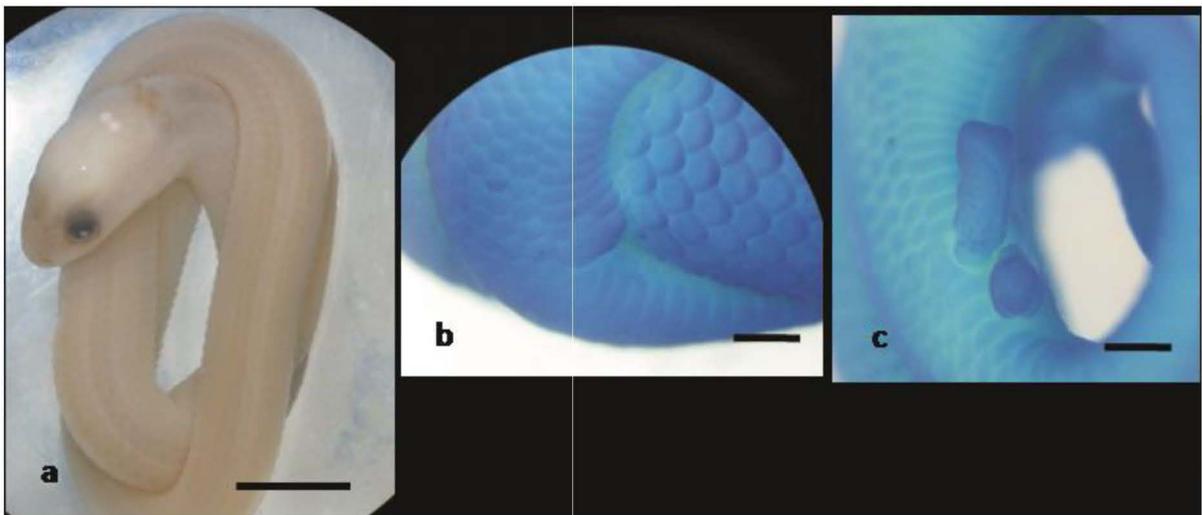


Fig. 7: Estadio 6 de *Atractus reticulatus*. a) Vista dorsal. b) Detalle de la región caudal en un ejemplar hembra. c) Detalle de los hemipenes en un ejemplar macho. Escala: a = 0,5 mm, b y c = 0,1 mm.

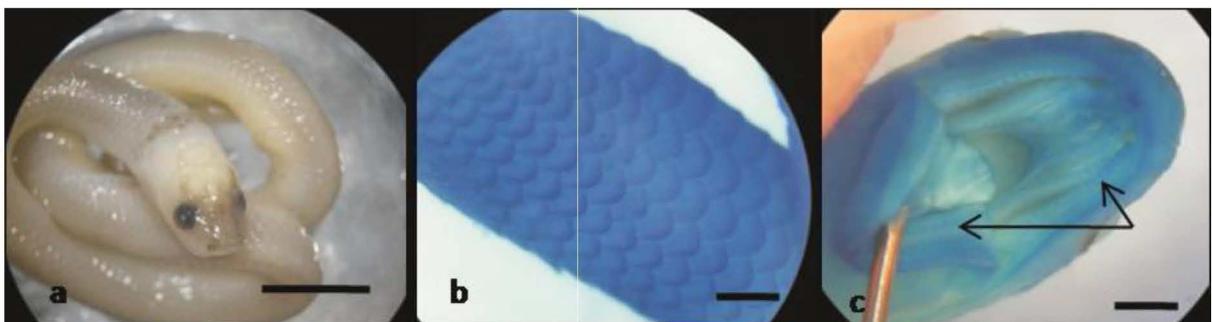


Fig. 8: Estadio 7 de *Atractus reticulatus*. a) Vista dorsal. b) Detalle del tronco. Obsérvese el grado de desarrollo de las escamas dorsales. c) Detalle de la cavidad bucal. Obsérvese los esbozos de los dientes maxilares y mandibulares (flecha). Escala: a = 0,5 mm, b y c = 0,1 mm.

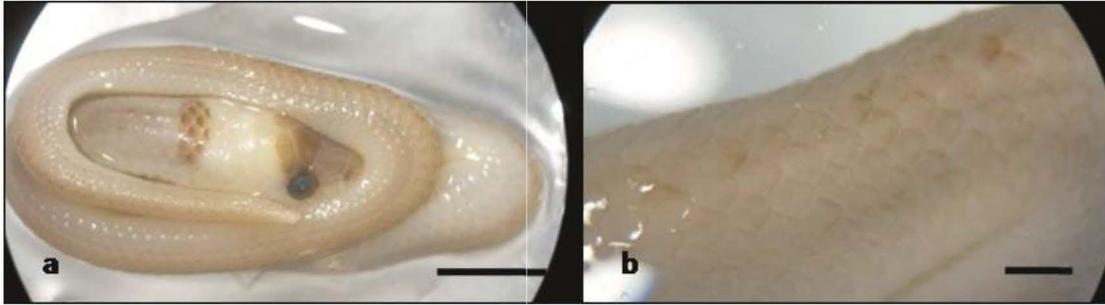


Fig. 9: Estadio 8 de *Atractus reticulatus*. a) Vista dorsal. b) Detalle de las escamas del tronco. Obsérvese el patrón de pigmentación. Escala: a = 0,5 mm, b = 0,1 mm.

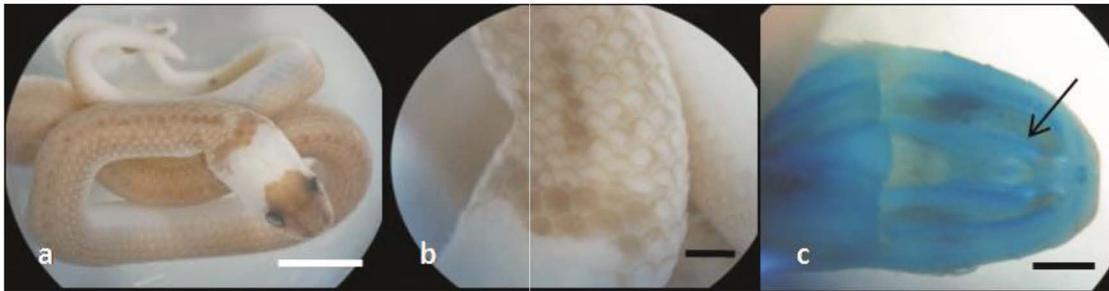


Fig. 10: Estadio 9 de *Atractus reticulatus*. a) Vista dorsal. b) Detalle de las escamas nucales y del tronco. Obsérvese el patrón de pigmentación. c) Detalle de la cavidad bucal. Obsérvese los esbozos de dientes maxilares y palatinos (flecha). Escala: a = 0,5 mm, b y c = 0,1 mm.

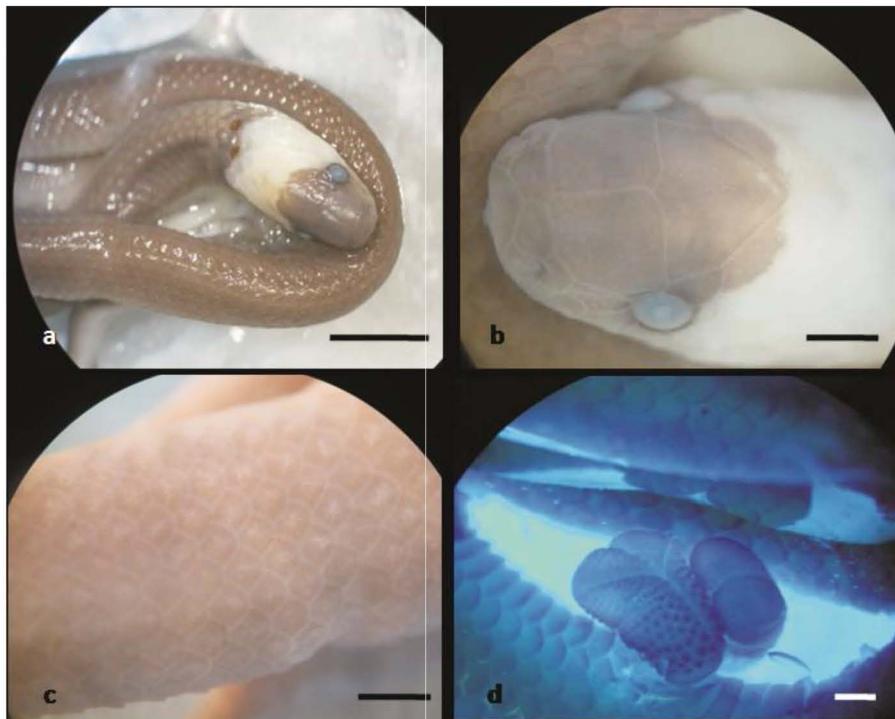


Fig. 11: Estadio 10 de *Atractus reticulatus*. a) Vista dorsal. b) Detalle de la región cefálica. c) Detalle de las escamas del tronco. Obsérvese el patrón de pigmentación. d) Detalle de los hemipenes. Escala: a = 0,5 mm, b-d = 0,1 mm.