

## Ultraestructura de la cáscara de huevos eclosionados y no eclosionados de *Kinosternon angustipons* (Testudinata: Kinosternidae)

R. Acuña-Mesén<sup>1</sup>, S. Segura -Solís<sup>2</sup>, L. Alvarado<sup>3</sup> y W. Sachsse<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Universidad de Costa Rica, Sede Rodrigo Facio, Escuela de Biología. Fax 207-4216; corel: ramesen@cariari.ucr.ac.cr

<sup>2</sup> Universidad de Costa Rica, Sede Rodrigo Facio, Escuela de Geografía. Fax 234-7246; corel: ssegura@fcs.ucr.ac.cr

<sup>3</sup> Universidad de Costa Rica, Sede Rodrigo Facio, Escuela de Biología Fax 207-4216; corel: lalvarad@cariari.ucr.ac.cr

<sup>4</sup> Institut für Molekulargenetik Johannes Gutenberg-Universität Saarstrasse 21-55099, Mainz- Germany.

Recibido 12-V-2000. Corregido 22-I-2001. Aceptado 08-II-2001.

**Abstract:** The ultrastructure of eggshells of *Kinosternon angustipons* is described and compared with the ones of *K. leucostomum* and *K. scorpioides*. Four eggs from captive turtles (30 sections) were studied with Scanning Electron Microscopy (SEM). The shell has three layers: cuticle or external, calcareous or intermediate and testacean or internal. Hatched and non hatched eggs have similar characteristics in their external surface: fanned units and proteic fibers superposed at random. They differ in the presence of spongelike structures and more external porosity in non hatched eggs. The intermediate and testacean layers of the hatched eggs have lance point like spaces and are thin in the proteic fibers. The ultrastructural evidence shows that during the embryonic development the thickness of the peel decreases. Non hatched *K. angustipons* shells are thicker than in the other two kinosternon species of Costa Rica.

**Key words:** Kinosternidae, *Kinosternon*, *K. angustipons*, ultrastructure, eggshell, turtles, comparative anatomy.

El conocimiento sobre la ultraestructura de la cáscara de los huevos de los reptiles contribuye a una visión más profunda de su fisiología y más realista sobre los procesos que se dan entre el huevo y el ambiente. Es un sistema estructural sobre el que ha actuado la selección natural y que, por ende, ayuda a plantear con más claridad las relaciones filogenéticas y evolutivas entre los distintos grupos taxonómicos (Ewert 1979). La cáscara de los huevos de los reptiles escamosos y de las tortugas contemporáneas muestra rasgos muy particulares correspondientes a cada especie y que son de utilidad taxonómica. Por ejemplo, se ha determinado que sus cáscaras pueden ser flexibles o rígidas y usualmente están compuestas por una capa fibrosa que descansa sobre una capa calcárea de carbonato de calcio. El material cristalino de los huevos de los escamosos se encuentra, por lo general, en forma de calcita.

Ewert (1979) propuso para las observaciones macroscópicas de las cáscaras de los huevos de las tortugas, una clasificación en tres categorías: 1. Con cáscaras apergamizadas y tendencia a expandirse al absorber agua en la incubación (ej. *Dermochelys coriacea*); 2. Con cáscaras frágiles o quebradizas, no expansibles durante la incubación (ej. *Kinosternon scorpioides* y *Rinoclemmys pulcherrima*) y 3. Con cáscaras duras y expansibles (ej. *Chelydra serpentina*). Pero para poder establecer comparaciones más precisas entre géneros y especies, también debe realizarse microscópicamente un estudio exhaustivo. A este nivel se observa que las cáscaras rígidas o flexibles están compuestas por bloques estructurales o unidades de cáscara. En los huevos de cáscara dura las unidades calcáreas colindan muy estrechamente y la penetran muy pocos poros. En contraste, los de cáscara flexible exhiben gran número de

espacios o poros en el material cristalino (Packard y Hirsch 1986). Existen descripciones sobre la ultraestructura de la cáscara de los huevos de varias especies de quelonios. De la familia Kinosternidae, se describió la cáscara del huevo de siete especies: *Sternotherus minor*, *K. flavescens*, *K. baurii*, *K. hirtipes*, *K. alamosae*, *K. leucostomum* y *K. scorpioides* (Packard *et al.* 1984, Packard y Hirsch 1986, Acuña-Mesén 1990) y en la familia Emydidae se describieron las cáscaras de *Pseudemys scripta* (Acuña-Mesén 1989). Químicamente sus cáscaras están compuestas por sales de calcio, en la forma de aragonito (Silyn-Roberts y Sharp 1985), tienen un centro común o núcleo de cristalización del cual radian estructuras en forma de agujas. Esto ha sido determinado por observaciones al microscopio de barrido o por análisis de difracción de rayos X (Packard *et al.* 1982, Acuña-Mesén 1987, 1990). También la porosidad en las superficies externa e interna podría ser un rasgo importante en la caracterización de la ultraestructura de estas cáscaras. En los kinosternidos y probablemente en otras tortugas las diferencias se deben además al espesor de la cáscara y al ondulado de su superficie externa (Packard *et al.* 1984).

La tortuga pecho en cruz (*K. angustipons*) pone huevos de color blanco, elípticos y miden aproximadamente 40 x 22 mm. Su superficie es irregular. Muestra poros que semejan cráteres simétricos de 0.4 mm de diámetro y la mitad de profundidad (Acuña-Mesén 1998). Esta tortuga es calificada como rara por la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza). Además, es el único kinosternido de Costa Rica cuya cáscara no ha sido descrita en detalle, lo cual ha motivado la realización de este trabajo. Se plantean como objetivos: primero, comparar interespecíficamente la cáscara de los huevos de *K. angustipons* con la de los otros congéneres costarricenses y, segundo, investigar similitudes y diferencias intraespecíficas entre sus huevos eclosionados y no eclosionados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Por ser *K. angustipons* una tortuga rara, los cuatro huevos (recién puestos): dos eclosionados y dos no eclosionados, se obtuvieron de tortugas en cautiverio debido a la fuerte limitación de recolectarlos en el campo. Se seleccionaron zonas equivalentes de ambas cáscaras, se fracturaron manualmente, se fijaron en bases metálicas con cinta de cara doble y con un cobertor iónico se les aplicó un recubrimiento de oro-paladio de 20 nm de grosor, a 6 mA durante 4 min. Luego fueron observadas en un microscopio electrónico de barrido. Los aumentos que se utilizaron para las observaciones microscópicas abarcaron desde 250 hasta 10 000 X. Con base en este registro fotográfico se tomaron las medidas promedio y desviación estándar del grosor de cada una de las capas, longitud máxima y mínima de la altura y de la base de los intersticios punta de lanza y se realizaron comparaciones para determinar las semejanzas y diferencias intraespecíficas entre los huevos eclosionados y no eclosionados e interespecíficas de los huevos no eclosionados

## RESULTADOS

La descripción de la cáscara de los huevos no eclosionados y eclosionados se muestra en los cuadros 1, 2 y 3 y en las Figs. 1-1 a 1-8 y 2-1 a 2-8. Ambos tipos de huevos presentan tres regiones: cutícula o capa externa; calcárea o intermedia y membrana testácea o interna.

### Huevos no eclosionados:

**Cutícula o capa externa:** Al tacto esta superficie se percibe lisa pero presenta gránulos (Fig. 1-1). Su matriz es irregular y porosa (Fig. 1-2 y 1-3). Sobre ella descansan ciertas estructuras morfológicamente muy variables denominadas estructuras esponjoideas (Fig. 1-3), las cuales son irregulares en su forma y tamaño y están distribuidas al azar. Su tamaño promedio es  $4.4 \pm 1.8 \mu\text{m}$  (Cuadro 1).

**Calcárea o capa intermedia:** Esta capa tiene un grosor promedio de unos  $574.8 \pm 3.4 \mu\text{m}$

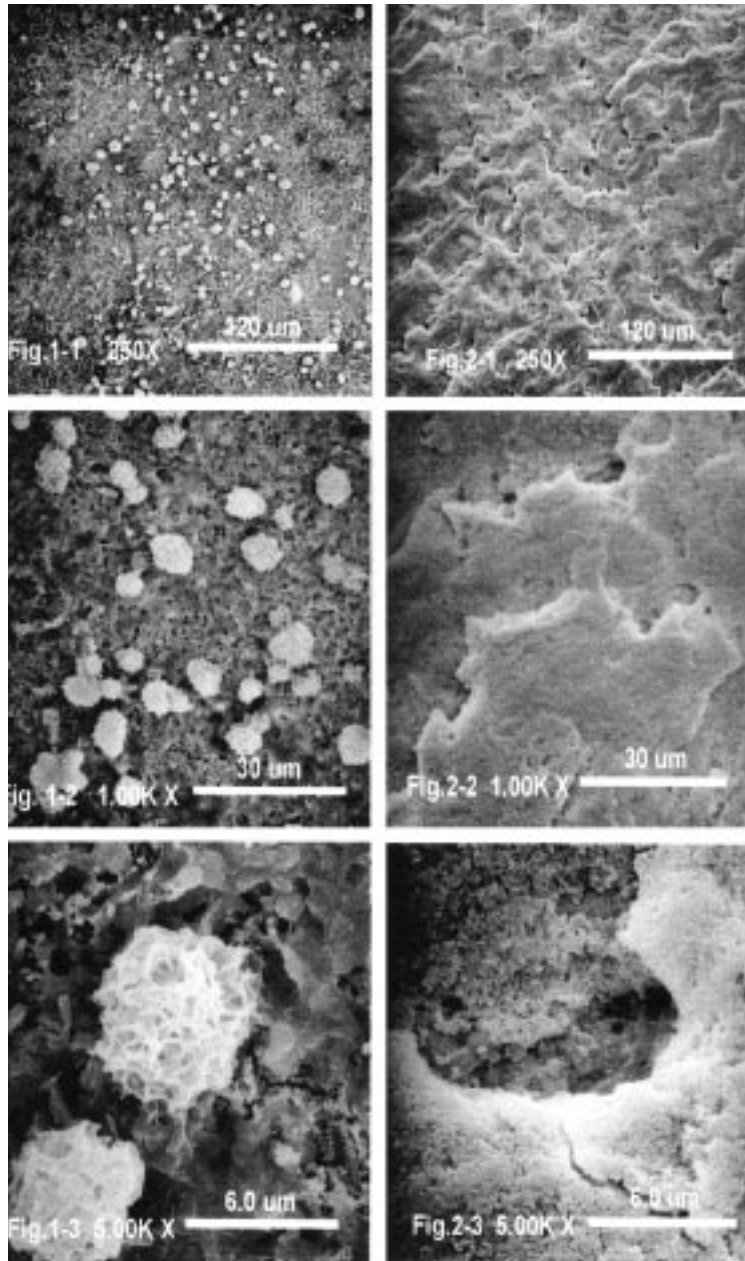


Fig. 1-1 a 1-3. Capa externa de la cáscara de un huevo no eclosionado de *K. angustipons*. 1-1. Gránulos. 1-2. Estructuras esponjoides. 1-3. Detalle de las estructuras esponjoides.

Fig. 1-1 to 1-3. External layer of the eggshell of a non hatched egg of *K. angustipons*. 1-1. Granules. 1-2. Spongelike structures. 1-3. Detail of the spongelike structures.

Fig. 2-1 a 2-3. Capa externa de la cáscara de un huevo eclosionado de *K. angustipons*. 2-1. Superficie exfoliada y pequeños poros. 2-2. Detalle de las exfoliaciones superpuestas. 2-3. Detalle de un poro.

Fig. 2-1 to 2-3. External layer of the eggshell of a hatched egg of *K. angustipons*. 2-1. Exfoliated surface and small pores. 2-2. Detail of the superimposed exfoliations. 2-3. Detail of a pore.

CUADRO 1  
 Medidas (\*m) de las estructuras de la cáscara de los huevos eclosionados y no eclosionados de la tortuga *Kinosternon angustipons* (n = 30)

TABLE 1  
 Measurements of the structures of the eggshells of hatched and non hatched eggs of the turtle *Kinosternon angustipons* (n = 30)

Estructura	No eclosionados	Eclosionados
Capa intermedia	574.8 ± 3.4 (Fig. 1-4)	221 ± 2.7 (Fig. 2-4)
Capa proteica	90 ± 2.4 (Fig. 1-4)	?
Estructuras esponjoides	4.4 ± 1.8 (Fig. 1-2)	Ausentes
Intersticios punta de lanza (Fig. 2-4)	Ausentes	Máximo: h*= 80 b**= 75 Mínimo: h*= 55 b**= 30
Capa mamilaria (Fig. 2-5)	?	Grosor: 22.3
Isosferita de la capa basal (Fig. 2-5)	?	Grosor: 23.6

h\* = altura, b\*\*= base

(Fig. 1-4, Cuadro 1). Su corte transversal muestra unidades calcáreas semejantes a las de las otras especies del género. Se determinaron depósitos de calcita y agujas agrupadas formando abanicos (Fig. 1-5). Las agrupaciones de agujas se colocan una a la par de la otra a manera de columnas. Es notoria la línea de contacto entre cada una de estas unidades. Las agujas muestran diferentes ángulos de contacto desde la región proximal hacia la distal (desde agudo hasta cercano a los 180 ° respectivamente), lo que provoca que en su parte distal el empuje sea suave, pero en la parte proximal el mismo es más fuerte. En la base de estas unidades se localiza el núcleo de cristalización del cual parten las agujas calcáreas (Figs. 1-4 a 1-6).

**Membrana testácea o capa interna:** Es de naturaleza proteica. Su superficie interna es de apariencia tenuemente ondulada. Muestra restos de la membrana coriónica (Fig. 1-7). Como se observa en la Fig. 1-8 es sumamente fibrosa. Estas fibras forman una red tridimensional que interviene seleccionando la entrada y salida de sustancias a través de la cáscara. Constituye una verdadera red de fibras colocadas en aparente desorden. Su grosor promedio es de 90 ± 2.4 μm (Cuadro 1).

### Huevos eclosionados:

**Cutícula o capa externa:** Es una matriz irregular de superficie escamosa o exfoliada, más o menos rugosa, con poros grandes, medianos y pequeños (Figs. 2-1 a 2-3). No están presentes las estructuras esponjoides de los huevos no eclosionados (comparar las Figs. 1-2 y 1-3 con la 2-2 y 2-3). Además, pruebas de raspado en la superficie muestran que esta capa es propensa a la descamación.

**Calcárea o capa intermedia:** Tiene un grosor de promedio de 221 ± 2.7 μm (Cuadro 1). Radialmente se observa la misma ultraestructura en los huevos no eclosionados, con la excepción de que en los eclosionados hay levantamientos en la parte proximal entre las uniones de los abanicos. Pero además, aquí se intercalan intersticios o grandes espacios en forma de punta de lanza (Fig. 2-4).

Otra de las características más sobresalientes de la capa son sus núcleos de cristalización. Si hacemos un recorrido por estos, desde la región externa a la interna, encontramos dos estructuras: la capa mamilaria y la esfera primaria (Fig. 2-5). Ambas porciones son semiglobosas. De la primera surgen las agujas calcáreas abanicadas (Fig. 2-6). La segunda

CUADRO 2

*Anatomía comparada de la ultraestructura de la cáscara de los huevos no eclosionados y eclosionados de Kinosternon angustipons (n= 30)*

TABLE 2

*Compared anatomy of the ultrastructure of the eggshell of hatched and non hatched eggs of Kinosternon angustipons (n = 30)*

Capa	Característica	No eclosionados	Eclosionados
Cutícula (Figs. 1-2 y 2-2)	Superficie porosa	++	+
	Superficie lisa	-	-
	Superficie escamosa	-	++
	Estructuras esponjoides	+	-
	Superficie plana	+	+
Capa intermedia (Figs. 1-4 y 2-4)	Intersticios (punta de lanza)	-	+
	Columnas altas	+	-
	Columnas cortas	-	+
	Unidades abanicadas	+	+
Membrana testácea (Figs. 1-8 y 2-8)	Fibras superpuestas a azar	+	+
	Corión adherido	+	-
	Poros visibles	-	+

(++)= Mucho, (+)= Poco, (-)= Ausente

descansa sobre lo que se llama isosferita de capa basal que pertenece a la membrana testácea. Generalmente en la base de los núcleos de cristalización se ven nódulos. Estos son abundantes alrededor del poro y se extienden por los rayos de calcita pero en menor densidad.

**Membrana testácea o capa interna:** Es semejante a la de los huevos no eclosionados, con la diferencia de que sus fibras son más delgadas en los huevos (Fig. 2-7). Son similares en que la red que forman carece de ordenamiento. Las fibras están dispuestas al azar y se interconectan (Fig. 2-8). Toda la red de fibras constituye una unidad anatómica y fisiológica. Se observan incontables orificios que la atraviesan a lo largo, a lo ancho y a lo alto, que podrían interconectarse con los poros o espacios de las capas más externas (Fig. 2-7). Los orificios al internalizarse semejan un filtro.

## DISCUSIÓN

La aparición de los intersticios o grandes espacios en forma de punta de lanza (Fig. 2-4) únicamente en la capa calcárea de huevos eclo-

sionados, sugiere sustracción de sales de calcio *in situ* durante el desarrollo embrionario. La aparición de estas estructuras nos remite a un aumento de la circulación de gases hacia y desde el embrión.

En general los huevos eclosionados poseen una cáscara más delgada que los no eclosionados por varias razones: 1-) aquellos carecen de estructuras esponjoides, 2-) la capa intermedia es menos gruesa puesto que las columnas de unidades calcáreas se acortan y 3-) las fibras de la capa testácea se adelgazan, lo que trae como consecuencia el adelgazamiento de esta misma capa. Tal condición facilita eventualmente el rompimiento de la cáscara durante el nacimiento de las tortugas.

Por otro lado, es probable que la formación de grandes espacios (como por ejemplo los punta de lanza) contribuya a aumentar el aireamiento (entrada de oxígeno y la salida del CO<sub>2</sub>) resultado del metabolismo embrionario. Contrario a lo esperado, en la cutícula de los huevos no eclosionados se observa más densidad de poros que en los eclosionados (Cuadro 2). Esta evidencia sugiere que el intercambio de sustancias entre el huevo y el medio sufre

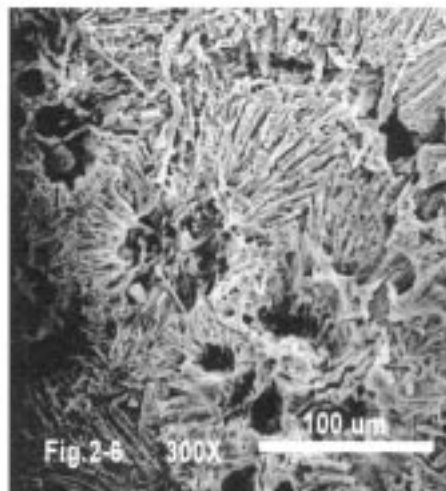
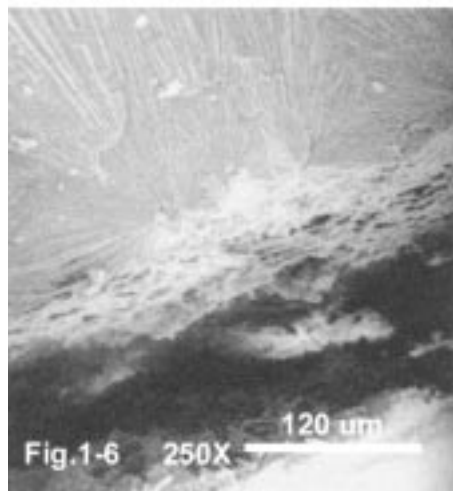
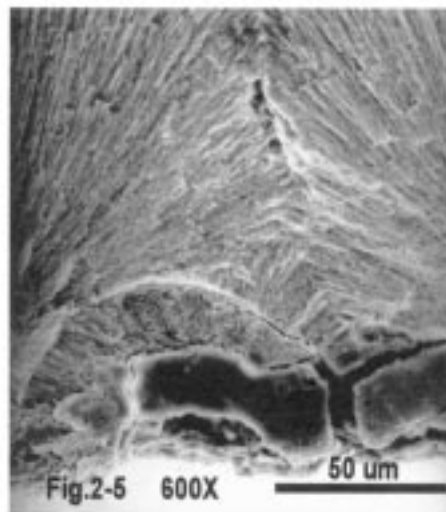
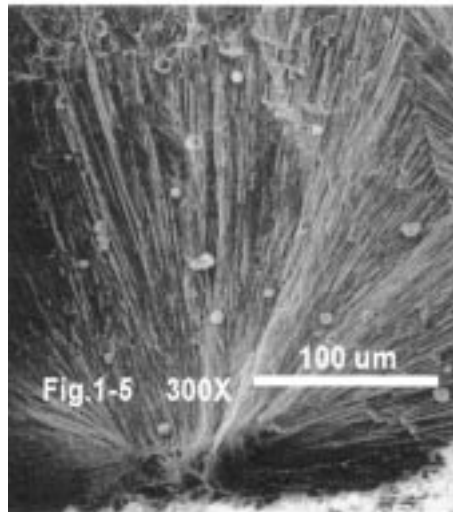
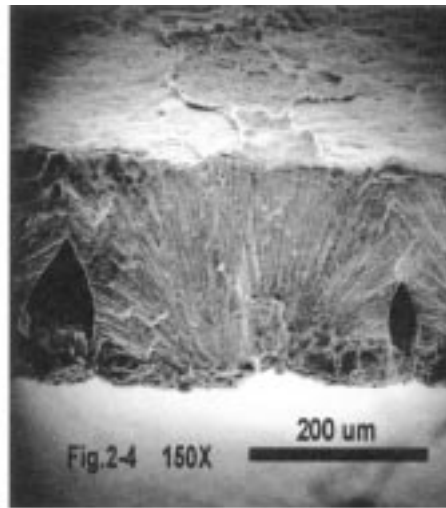
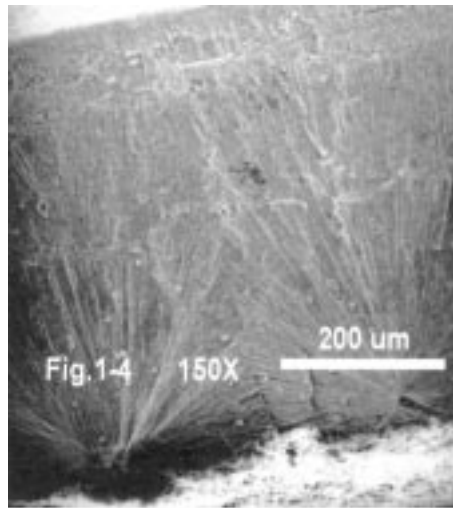


Fig. 1-4 a 1-6. Corte transversal de la cáscara del huevo no eclosionado de *K. angustipons*. 1-4. Capa calcárea (parte superior) con dos núcleos de cristalización y membrana testácea (parte inferior). 1-5. Detalle de una unidad estructural de la capa calcárea. Nótese el abanico de agujas largas y finas de constitución calcárea que parten del núcleo de cristalización en la parte media inferior de la fotografía. 1-6. Capa calcárea (parte superior) y membrana testácea (parte inferior).

Fig. 1-4 to 1-6. Transversal cut of the eggshell of non hatched eggs of *K. angustipons*. 1-4. Calcareus layer (superior part) with two crystalization nuclei and testcean membrane (inferior part). 1-5. Detail of a structural unit of the calcareus layer. Note the fan of long and fine needles of calcareus constitution that part from the crystalization nucleus in the median inferior part of the photograph. 1-6. Calcareus layer (superior part) and testacean membrane (inferior part).

Fig. 2-4 a 2-6. Capa calcárea de un huevo eclosionado de *K. angustipons*. 2-4. Intersticios en punta de lanza, los vértices apuntan hacia la parte externa del huevo. 2-5. Estructuras semiglobosas (cuarta parte inferior de la fotografía) que constituyen los núcleos de cristalización. 2-6. Superficie interna. Son visibles a manera de flor los extremos internos de las unidades cálcareas y los agujeros correspondientes a sus respectivos núcleos de cristalización. El material evidencia desorganización debido a la sustracción de las sales de calcio durante el desarrollo embrionario.

Fig. 2-4 to 2-6. Calcareus layer of a hatched egg of *K. angustipons*. 2-4. Interstices in spear point, the apex point towards the external part of the egg. 2-5. Semiglobose structures (fourth inferior part of the photograph) that constitute the crystalization nuclei. 2-6. Internal surface. The internal ends of the calcareus units in the form of a flower and the corresponding holes to their respective crystalization nuclei are shown. The material evidences disorganization due to the subtraction of calcium salts during the embryonic development.

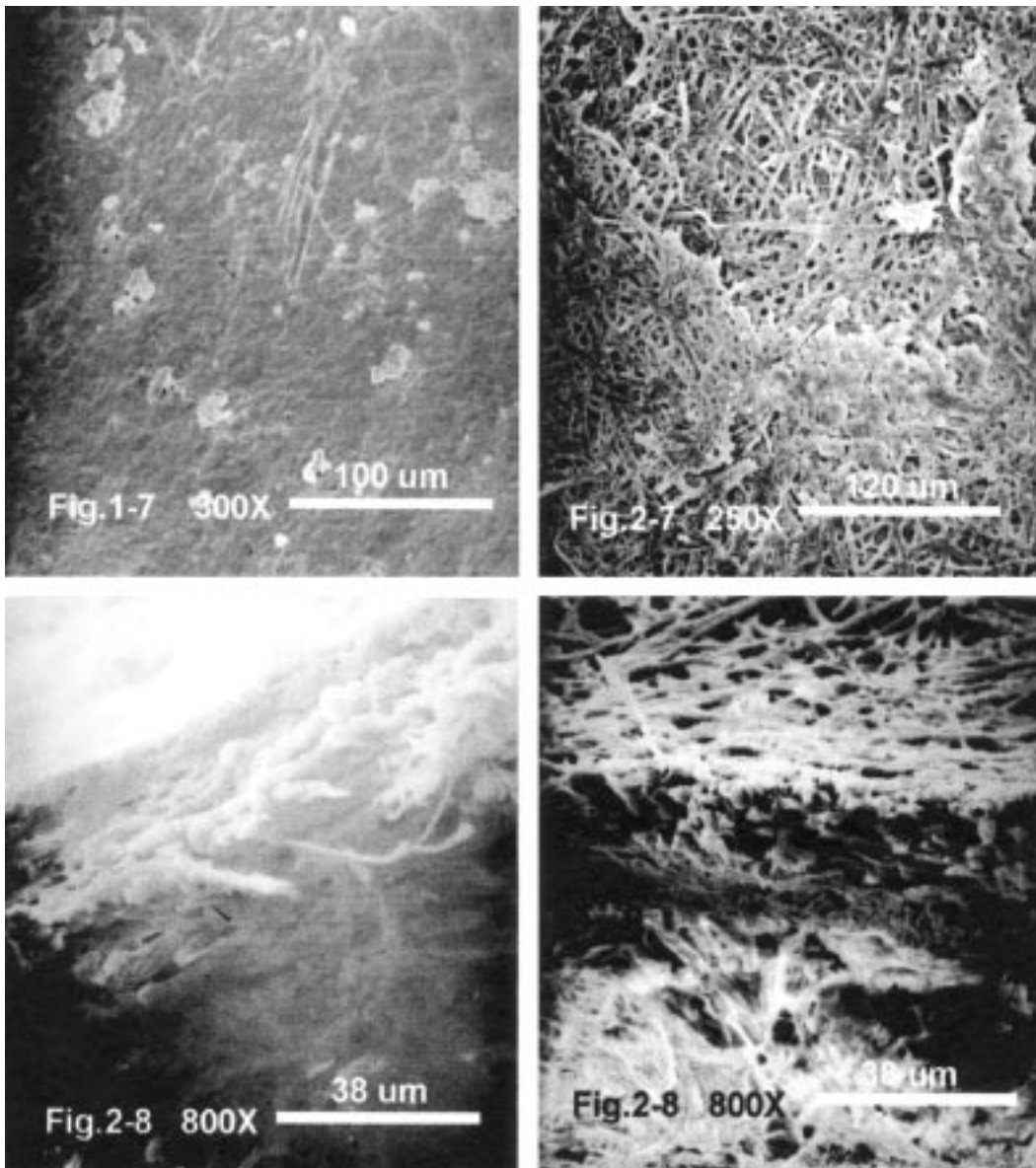


Fig. 1-7 a 1-8. Membrana testácea de un huevo no eclosionado de *K. angustipons*. 1-7. Membrana testácea. Se observan pegada a ella algunos restos de membrana coriónica. 1-8. Corte radial. Son visibles sus fibras.

Fig. 1-7 to 1-8. Testacean membrane of a non hatched egg of *K. angustipons*. 1-7. Testacean membrane. Rests of the chorionic membrane adhered to it are shown. 1-8. Radial cut. Fibers are shown.

Fig. 2-7 a 2-8. Membrana testácea de un huevo eclosionado de *K. angustipons*. 2-7. Fibras proteicas y poros. 2-8. Apariencia general muy amplificada de fibras de un corte radial.

Fig. 2-7 to 2-8. Testacean membrane of a hatched egg of *K. angustipons*. 2-7. Proteic fibers and pores. 2-8. Amplified general appearance of a radial cut. Fibers randomly located and interconnected.



CUADRO 3

Comparación de las características presentes (+) o ausentes (-) en la cáscara de los huevos no eclosionados de los kinostérnidos costarricenses

TABLE 3

Comparison of the characteristics present (+) and absent (-) in the eggshell of the non hatched eggs of Costarrican kinosternids

Capa	Característica	<i>K. leucostomum</i>	<i>K. scorpioides</i>	<i>K. angustipons</i>
Cutícula	Superficie ornamentada	-	+	+
	Superficie lisa al tacto	+	-	-
	Constitución orgánica	+	+	+
	Poros	+	-	+
	Grietas sustituyendo los poros	-	+	-
Intermedia	Constitución inorgánica	+	+	+
	Unidades estructurales con superficie externa plana	+	-	+
	Unidades estructurales con superficie externa redondeada	-	+	-
	Depósitos de calcita en forma de abanicos	+	+	+
	Membrana testácea	+	+	+
	Constitución proteica	+	+	+
	Membrana de la cáscara con fibras y una película interna	+	+	+

ciertas variaciones a lo largo del desarrollo embrionario, puesto que la disminución en la densidad de los poros está relacionada principalmente con tres factores: 1-) los poros pequeños sufren obliteración durante el desarrollo embrionario por las excrecencias y exudaciones provenientes del embrión, 2-) el diámetro de los poros no obliterados se incrementa y 3-) la descamación superficial puede esconder, pero no bloquear, la salida de muchos de ellos. Adicionalmente, es interesante notar que la membrana testácea en los huevos no eclosionados no presenta poros visibles, sí los muestra en los eclosionados. La razón es que durante la ovoposición es necesario retener el agua y las otras sustancias en el interior del huevo, por tal motivo inicialmente se prioriza la absorción a través de los poros de la cutícula hacia el embrión y posteriormente, conforme avanza el desarrollo embrionario esta situación se va invirtiendo, aumentando la porosidad de la capa interna para facilitar la eliminación de los desechos.

**Ultraestructura comparada de la cáscara de los huevos de *K. angustipons*, *K. leucos-***

*tomum* y *K. scorpioides*: La morfología de la cutícula de los huevos de los kinostérnidos depende de la especie. *Kinosternon angustipons* y *K. scorpioides* presentan una superficie ornamentada no así *K. leucostomum* que al tacto se siente lisa. Además, los poros no se observan en *K. scorpioides*, pero sí en las otras dos especies y ello se debe a que en *K. scorpioides* son sustituidos por grietas. Químicamente, la cutícula de las tres especies coincide en cuanto a su composición orgánica. También existe similitud de las tres especies en la capa intermedia. Sus depósitos de aragonito tienen forma abanicada. Sin embargo, cualitativamente se parecen más la capa intermedia de *K. angustipons* y la de *K. leucostomum*. En la de *K. scorpioides* se observan unidades estructurales con superficie externa redondeada (Acuña-Mesén 1990), mientras en las otras dos es plana (Cuadro 3). Además, *K. angustipons* posee la capa intermedia más gruesa de las tres especies. Mide un promedio de 574.8  $\mu\text{m}$ . Más del doble de la de *K. leucostomum* (260  $\mu\text{m}$ ) y casi cinco veces la de *K. scorpioides* (117  $\mu\text{m}$ ). La membrana

testácea en las tres tortugas posee fibras proteicas. El grosor promedio de esta membrana en *K. angustipons* es de 90  $\mu\text{m}$ , mientras que en *K. leucostomum* y *K. scorpioides* es de 51  $\mu\text{m}$  y 83  $\mu\text{m}$  (Acuña-Mesén 1990).

Por otra parte, llama poderosamente la atención que la cáscara de los huevos no eclosionados de *K. angustipons* es más gruesa que la de las otras dos. Podemos concluir que el huevo de *K. angustipons* es menos frágil.

#### AGRADECIMIENTOS

A Guillermo Vargas y Rafael Angel Loaiciga de la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad de Costa Rica por su colaboración en el montaje de las muestras y observaciones al microscopio. A Rodolfo Ortiz y Rainer Greissl por su invaluable colaboración para traer las muestras desde Alemania. A la memoria del insigne amigo y colega Arnoldo Núñez Vetrano, quien siempre tuvo el profundo anhelo de realizar esta investigación. Aquí se la ofrecemos.

#### RESUMEN

Se describe la ultraestructura de la cáscara de los huevos de *Kinosternon angustipons* y se compara con la de *K. leucostomum* y *K. scorpioides*. Esta investigación se realizó con cuatro huevos provenientes de tortugas en cautiverio, para una muestra de 30 secciones analizadas en el Microscopio Electrónico de Barrido. Está constituida por tres capas: la cutícula o externa, la calcárea o intermedia y la testácea o interna. La comparación entre huevos eclosionados y no eclosionados de *K. angustipons* muestra similitudes en cuanto a su superficie externa que es plana, unidades abanicadas y fibras proteicas superpuestas al azar. Los huevos no eclosionados se diferencian por la presencia de estructuras esponjoides y mayor porosidad externa. Los espacios con forma de punta de lanza y el

adelgazamiento de las fibras proteicas son típicos en la capa calcárea y membrana testácea de los huevos eclosionados. La evidencia ultraestructural muestra que durante el desarrollo embrionario disminuye el grosor de la cáscara y, además que, la de los huevos no eclosionados de *K. angustipons* es más gruesa que la de los otros dos kinosternidos costarricenses.

#### REFERENCIAS

- Acuña-Mesén, R.A. 1987. Comparación de la ultraestructura de la cáscara del huevo de la tortuga *Rhinoclemmys pulcherrima* con la de los huevos de otros reptiles. *Rev. Biol. Trop.* 35: 41-48.
- Acuña-Mesén, R.A. 1989. Ultraestructura de la cáscara del huevo de la tortuga resbaladora *Pseudemys scripta* (Testudines, Emydidae). *Rev. Biol. Trop.* 37: 193-200.
- Acuña-Mesén, R.A. 1990. Estudio comparativo con el microscopio electrónico de barrido de la cáscara de los huevos de dos kinosternidos: *Kinosternon leucostomum* (Dumeril y Bibron) y *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus). *Rev. Biol. Univ. Oviedo* 8: 13-22.
- Acuña-Mesén, R.A. 1998. Las tortugas continentales de Costa Rica. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 96 p.
- Ewert, M. 1979. The embryo and its egg: Development and natural history, p. 333-413. *In* M. Harless & H. Morlock (eds.). *Turtles: Perspectives and research*. Wiley, Nueva York.
- Legler, J. 1966. Notes on the natural history of a rare Central American turtle. *Kinosternon angustipons* Legler. *Herpetologica* 22: 118-122.
- Packard, M., K. Hirsch & V. Meyer-Rochow. 1982. Structure of the shell from eggs of the tuatara, *Sphenodon punctatus*. *J. Morphol.* 174: 197-205.
- Packard, M., K. Hirsch & J. Iverson. 1984. Structure of shells from eggs of kinosternid turtles. *J. Morphol.* 181: 9-20.
- Packard, M. & K. Hirsch. 1986. Scanning electron microscopy of eggshells of contemporary reptiles. *Scan. Electr. Microsc.* 1986: 1581-1590.
- Silyn-Roberts, H. & R. Sharp. 1985. Preferred orientation of calcite and aragonite in the reptilian eggshells. *Proc. Roy. Soc. Lond. B* 225: 445-455.