

Comparación de la ultraestructura de la cáscara del huevo de la tortuga *Rhinoclemmys pulcherrima* con la de los huevos de otros reptiles

Rafael Arturo Acuña Mesén
Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica

(Recibido el 3 de abril de 1986)

Abstract: The eggshell of the red turtle, *Rhinoclemmys pulcherrima* is composed of an external cuticle, a middle calcareous layer and the internal membrane. The cuticle is not sculptured as in those of the kinosternidae. The radial view is similar in eggs of *Geochelone elephantopus*. The cuticle of *R. pulcherrima* shows superficial fractures or crevices whose complementary edges are similar to a jigsaw puzzle. The calcareous layer is formed by structural units composed by groups of needle-like aragonite crystals. In the crocodilian egg, the shell shows calcite deposited in plates instead of aragonite. The calcareous units are interlocked, a situation that is not present in the shell of marine turtle eggs (*Lepidochelys olivacea* and *Chelonia mydas*). The inner extremes of the calcareous units are surrounded by a palisade of needle-like aragonite crystals. This type of structure is not observed in other reptilian eggshells.

Hirsch (1983) clasificó los huevos de los amniotos en tres categorías basándose en la cantidad de material calcáreo de sus cáscaras: 1) con poco o ningún material calcáreo, muy blandos; 2) con cáscara formada por una capa flexible con unidades estructurales no entrelazadas y 3) los de cáscara rígida con únicamente una capa calcárea de unidades muy entrelazadas. Los huevos de los reptiles también pueden clasificarse en estas categorías. Sus cáscaras generalmente están constituidas por carbonato de calcio. Sin embargo, se han observado entre las especies diferencias químicas y anatómicas que permiten comparar los grupos taxonómicos entre sí. El estudio sobre las características de los huevos de quelonios actuales es relativamente reciente. No así los estudios correspondientes a los huevos de quelonios fósiles que datan de hace más de 100 años (Hirsch, 1983).

La mayoría de los trabajos sobre la estructura de las cáscaras de los huevos de tortuga han sido realizados a partir de 1970. Estos no solo comprenden aspectos anatómicos sino también químicos. Por ejemplo, se determinó que la mayoría de las cáscaras de los huevos de tortugas

examinados hasta hoy, comparten la característica de estar constituídas químicamente por calcio en la forma de aragonito, excepto en la especie *Chelonia mydas* que presenta calcita combinada con aragonito durante la formación del huevo. Esto se determinó por medio de análisis por difracción de rayos x (Packard; Hirsch y Meyer-Rochow, 1982). Otros grupos de reptiles ovíparos como cocodrilos, lagartijas y serpientes también poseen huevos con cáscaras constituídas por calcita. Asimismo, Packard *et. al.* (1982) opinan que igual ocurre con el huevo de *Sphenodon punctatus*.

La primera descripción detallada de la estructura de la cáscara de los huevos de una tortuga marina la realizaron Solomon y Baird (1979). Ellos describen la ultraestructura de la cáscara del huevo de *C. mydas*. Posteriormente, Acuña (1980) describe la del huevo de la tortuga lora *Lepidochelys olivacea*. En 1984, este autor compara la ultraestructura de la cáscara del huevo de *C. mydas* y *L. olivacea* con la de los huevos de aves de corral.

Por otra parte, Ewert (1979) presentó una comparación entre algunas características sobre-

salientes de las cáscaras de los huevos de al menos una especie de Pelomedusidae, Chelidae, Kinosternidae, Chelydridae, Emydidae, Testudinidae, Carettochelidae, Trionychidae, Cheloniidae y Dermochelyidae.

Packard *et al.* (1984) indicaron que en quinostrónidos se observan similitudes entre las cáscaras de los huevos de varias especies (*Kinosternon flavescens*, *K. baurii*, *Sternotherus minor*, etc.), aunque existen diferencias en cuanto al grosor. Además, el ondulado observado en la superficie externa del huevo de estos quinostrónidos, reúne detalles que probablemente no se presentan en otros grupos.

En cuanto a las características generales de los huevos y de sus cáscaras, Castillo (1986) señala que la tortuga terrestre *Rhinoclemmys pulcherrima* pone huevos con forma ovalada. Su largo máximo es de 5,52 cm y su ancho máximo es de 3,61 cm. Su volumen fluctúa entre 28,6 y 7,90 ml y su peso entre 35,30 y 13,20 g. Fuera de estos datos biométricos, no hay trabajos asequibles que describan otras características adicionales ya sea anatómicas o fisiológicas. Por esta razón, se hizo indispensable realizar un estudio anatómico a nivel ultraestructural para obtener resultados comparables.

MATERIAL Y METODOS

Las cáscaras se obtuvieron de tortugas *R. pulcherrima* mantenidas en cautiverio. Para determinar la proximidad del momento de la ovoposición se utilizó el examen por palpación de Ewert (1979). La colecta se hizo inmediatamente después de la ovoposición. Los huevos se fracturaron y las cáscaras fueron lavadas con agua destilada durante 15 minutos y se dejaron secar al aire por 24 horas y a temperatura ambiente. Luego se procedió a fragmentarlas aún más y se montaron en soportes de aluminio, empleando para ello una cinta de doble superficie adhesiva y pintura conductora de plata.

RESULTADOS Y DISCUSION

De las observaciones macroscópicas directas de los huevos de *R. pulcherrima* se destacan varias características generales. Esta tortuga pone huevos de forma ovalada, con cáscaras quebradizas, de color blanco, lisos al tacto y sin poros observables a simple vista. Estas características coinciden con las de los huevos de otras

especies de reptiles. Por esta razón, conviene delimitar y resaltar aquellos rasgos más específicos de los huevos de *R. pulcherrima*. Tanto Hirsch (1983) como Ewert (1979) dan luz a este aspecto. Aunque el primero no se refiere en forma particular a los huevos de tortuga, permite localizar los huevos de estos organismos dentro de la clasificación general. Por otra parte, Ewert propone una clasificación, la cual a pesar de ser también general, es aplicable en forma específica al grupo de los quelonios. El considera que los huevos de las tortugas se pueden agrupar en las siguientes categorías: a) con cáscaras apergaminadas y con tendencia a expandirse cuando absorben agua durante la incubación (como los de la tortuga marina *Dermochelys coriacea*); b) con cáscaras frágiles o quebradizas, no expansibles durante la incubación (como los de la tortuga *K. scordioides*) y c) con cáscaras duras y expansibles (como los de los huevos de *C. serpentina*). De acuerdo a las observaciones obtenidas en este trabajo, los huevos de *R. pulcherrima* poseen cáscaras semejantes a las de la categoría "b". En esta especie la capa de aragonito constituye más del 60% del grosor de la cáscara. Este valor coincide con los resultados obtenidos por Ewert (1979). A pesar de que los huevos de *R. pulcherrima* poseen cáscaras constituídas por aragonito, se producen diferencias macro y microestructurales relativamente conspicuas entre ésta y otras especies de quelonios. Las descripciones presentadas por autores tales como Legler y Moll, Yntema, Ernst, Deraniyagala, Carr y Hirt, etc. a través de Ewert (1979) lo evidencian. Asimismo, las diferencias estructurales observadas por Packard *et al.* (1984) en cáscaras de los huevos de tortugas contemporáneas como *S. minor*, *K. flavescens*, *K. baurii*, *K. hirtipes* y *K. alamosae* y por Hirsch (1982) en *Lepidochelys kempi*, *C. serpentina* y *Geochelone elephantopus* y en varios quelonios fósiles lo corroboran aún más.

En su superficie externa la cáscara del huevo de *R. pulcherrima* presenta en ciertas áreas una capa orgánica (Figura 1). En las otras zonas lo que se observa es una cutícula desnuda. Esta muestra numerosas fracturas o grietas superficiales cuyos bordes se complementan a la manera de un rompecabezas (Figura 2).

Comparando la cáscara de los huevos de *R. pulcherrima* con la de las aves de corral se observa que ésta carece de una cutícula con caracteres similares a la de aquella. En su lugar, en las aves aparece una cobertura orgánica perforada

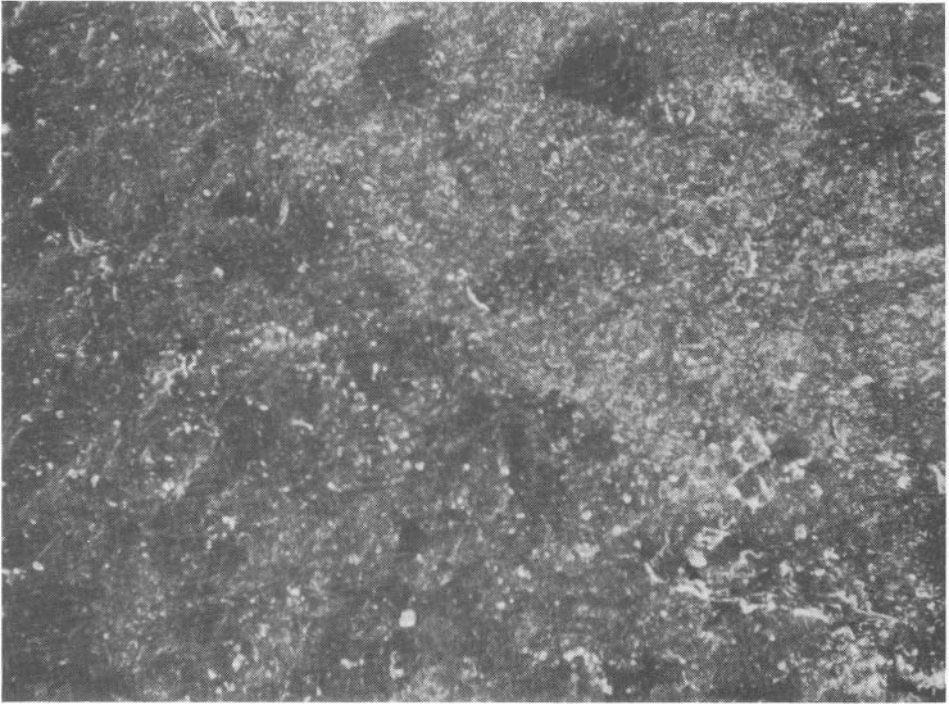


Fig. 1. Región de la superficie externa de la cáscara delhuevo de *Rhinoclemmys pulcherrima*, mostrando la capa orgánica constituída por pequeños gránulos (300 x).

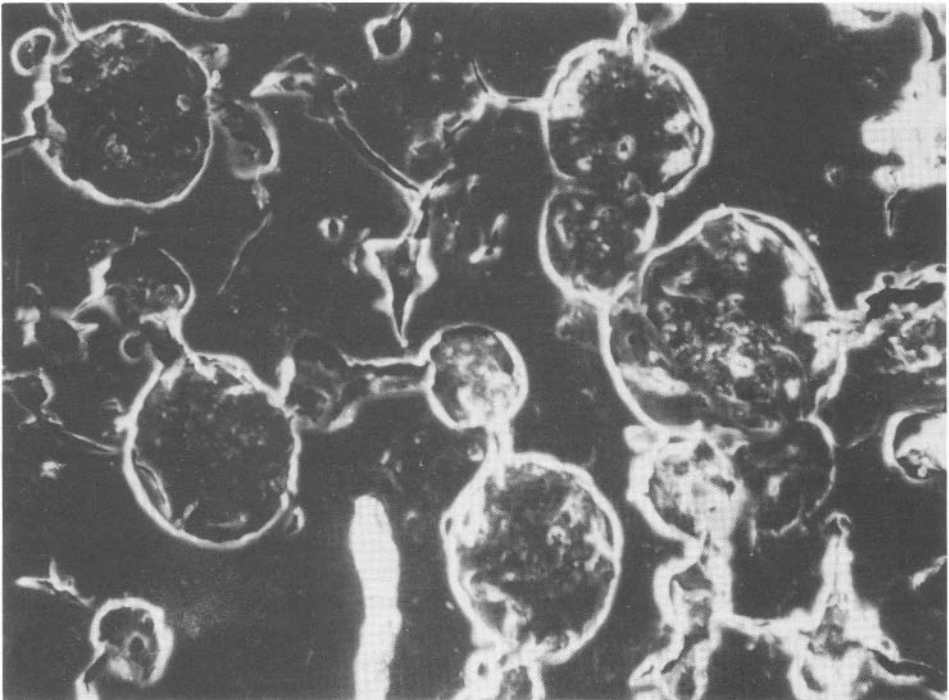


Fig. 2. Aspecto externo superficial de la cutícula de la cáscara del huevo de *Rhinoclemmys pulcherrima*. Se observan sus agujeros circularés, los cuales no equivalen a los poros de la cáscara (1000 x).

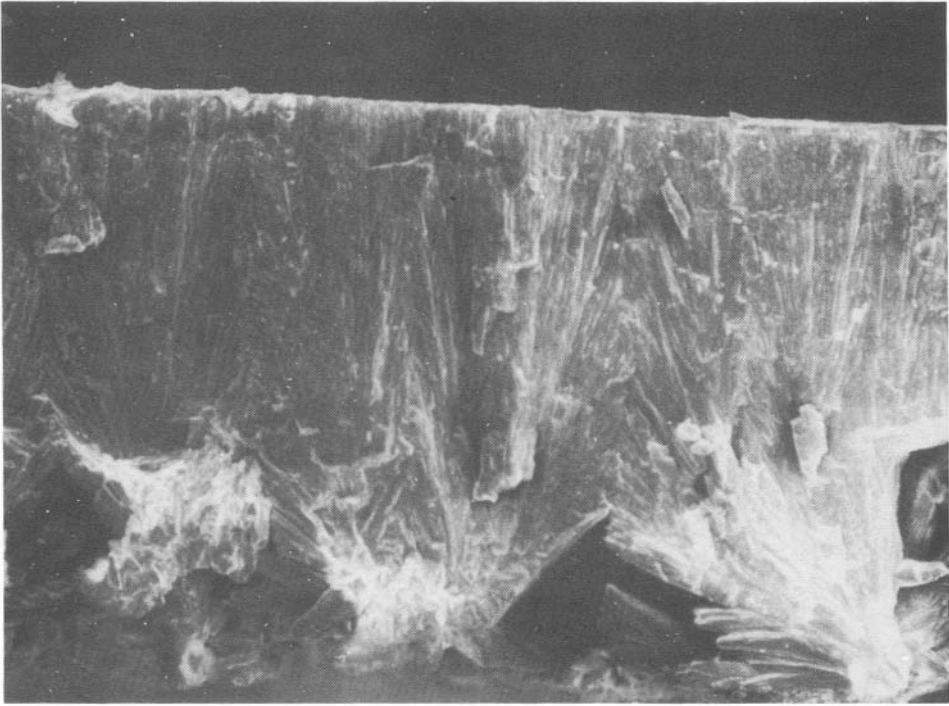


Fig. 3. Sección radial de la cáscara del huevo de *Rhinoclemmys pulcherrima*. Nótese la superficie externa sin ondulaciones (Arriba) y las unidades fundamentales de la capa calcárea constituídas por aragonito (200 x).

por numerosos poros de paredes muy regulares. Por otra parte, los huevos de otras tortugas como *K. flavescens*, *K. baurii*, *K. hirtipes*, *K. alamosae*, *C. serpentina* (Packard *et al.*, 1984), *L. olivacea* (Acuña, 1980) y *C. mydas* (Solomon y Baird, 1979) también carecen de una estructura similar.

Los huevos de *R. pulcherrima* presentan en su cutícula una serie de agujeros de bordes casi circulares, en cuyo fondo se observan cristales de aragonito. Estos agujeros son superficiales (Figura 2). En la cutícula no se observan poros como los de los huevos de quinosternidos ni tampoco como los de las aves de corral. Además, externamente no se muestran espiras o rugosidades como las de los huevos de *K. flavescens*, *S. minor* y *K. baurii* (Packard *et al.* 1984).

Asimismo, en los huevos de estos tres últimos quinostémidos se observan variaciones en el relieve de su superficie causadas por el conjunto de cristales de aragonito que conforman cada una de las unidades calcáreas constitutivas de la cáscara. Esta característica también se presenta en los huevos de *L. olivacea* y *C. mydas*, en las cuales el huevo presenta una su-

perficie que semeja un bosque visto desde el aire, solo que menos compacto que el de las otras tres especies anteriores. Particularmente, el aspecto irregular de la superficie del huevo de *L. olivacea* se debe a las numerosas unidades semiglobosas que la constituyen (Acuña, 1980 y 1984).

Al corte radial, el aspecto de la cutícula del huevo de *R. pulcherrima* se pareció más al de los huevos de la tortuga galápagos *G. elephantopus* que al de las de las tortugas marinas citadas. También se semeja al de los huevos de las tortugas *Cuora amboinensis*, *Siebenrockiella crassicolis* y *Phrynops hilarii* (Silyn-Roberts y Sharp, 1985) y al de los cocodrilos *Melanosuchus niger*, *Crocodylus niloticus*, *C. acutus* y *Alligator mississippiensis* (Hirsch, 1985). El huevo de todos ellos tiene por lo general una cutícula relativamente lisa y sin ondulaciones, excepto cuando se produce sobre ella desgaste, descamación, o está sometida al efecto de los ácidos metabólicos de bacterias, que la disuelvan (Ferguson, 1981).

En *R. pulcherrima* los cristales de aragonito se colocan debajo de la cutícula formando cada una de las unidades fundamentales de la cáscara

(Figura 3). En este emídido, las unidades tienen forma de un cono invertido. Estas semejan abanicos al corte radial. Su parte más ancha limita con la cutícula y la más angosta con la membrana interna del huevo.

En los huevos de los quelonios marinos (*L. olivacea* y *C. mydas*), las unidades semiglobosas se separan cuando el huevo se pone turgente y se acercan cuando se deshidrata. Ello permite regular el intercambio de sustancias tanto hacia adentro como hacia afuera. La estructura dinámica de sus cáscaras es la que da consistencia elástica, apergamínada y flexible a estos huevos. Es un hecho que esto no ocurre con los huevos de *R. pulcherrima*.

Tanto en *L. olivacea* como en *C. mydas* los haces de sales de calcio de cada unidad fundamental, parten de un centro localizado sobre una segunda capa calcárea la cual está ausente en los huevos de los emídidos y quinostérnidos estudiados. Por lo tanto, la situación es diferente en especies como *R. pulcherrima* o *K. flavescens*. En estos organismos, las unidades calcáreas fundamentales parten directamente de la membrana interna del huevo. Esta membrana está localizada debajo de la única capa calcárea que poseen estos huevos. Específicamente, en las cáscaras de los huevos de *R. pulcherrima* se observa también un núcleo o región central del cual arrancan los cristales de aragonito. Este núcleo se localiza en el extremo angosto de cada unidad calcárea. Los cristales se organizan a partir de este núcleo en forma compacta y discreta. Estos salen del núcleo formando diversos ángulos, los cuales son medibles en seis regiones partiendo desde un plano interno paralelo a la superficie externa hasta llegar a ésta (Silyn-Roberts y Sharp, 1985). Por lo general, los cristales se traslapan. Debido a esto los huevos de *R. pulcherrima* no se expanden ni se toman turgentes como si ocurre con los de las tortugas marinas durante el proceso de incubación; tampoco su forma cambia cuando se deshidratan.

Los cristales de los huevos de aves de corral están agrupados formando columnas perpendiculares a la superficie. En los huevos de *R. pulcherrima* estos se distribuyen en forma distinta. Asimismo, su composición química también varía. Los cristales, además de no estar constituidos por calcita como en aquellos organismos sino por aragonito, se ordenan agrupándose en haces de agujas divergentes. Esta característica contrasta también con la de los cristales de cal-

cita de los huevos de cocodrilos observados por Hirsch (1985). En éstos los cristales se acomodan en forma laminar desde el interior hasta el exterior de la cáscara. Asimismo, en cocodrilos los conjuntos de cristales se agrupan formando una especie de cuñas ordenadas unas a la par de las otras dejando de vez en cuando espacios libres o poros. Los huevos de *R. pulcherrima* tienen pocos poros que atraviesen la capa calcárea. Estos se caracterizan por poseer paredes tapizadas por cristales y fibras paralelas y perpendiculares a la superficie (Figura 4). Su distribución por la cáscara es al azar.

En cuanto a la membrana del huevo de *R. pulcherrima* (Figura 7), ésta se encuentra unida a la capa calcárea desde su formación. A pesar de ser lisa, presenta algunos pliegues. Se notan en ella con poca frecuencia algunos agujeros cuyo origen y función no ha sido determinada. La membrana separa las capas extraembrionarias y los líquidos internos del huevo de su cubierta calcárea. Adicionalmente actúa como barrera aislante contra la penetración microbiana. Sin embargo, existe evidencia de que esta función no es del todo efectiva, pues análisis microbiológicos practicados al líquido interno de huevos de *L. olivacea* (colectados en playa Ostional de Costa Rica), determinaron la presencia de bacterias Gram Negativas como *Arizona*, *Citrobacter* y *Klebsiella*. Se desconoce si estas bacterias y otros microorganismos, como el hongo *Monosporium* sp. aislado por Acuña (1980), afectan el desarrollo embrionario.

Al remover mecánicamente la membrana del huevo de *R. pulcherrima* quedan expuestos los extremos internos de las unidades calcáreas como se observa en la figura 5. En los huevos de los quinostérnidos se encuentran adheridos a la membrana desde el principio. Conforme se va formando cada unidad calcárea los cristales de aragonito se van enlazando a las fibras de la membrana. Este proceso de unión ocurre únicamente con los cristales más internos de la capa calcárea. Con mucha probabilidad esto también ocurre en *R. pulcherrima*.

Desprendiendo la membrana, también se evidencia otra característica típica de los huevos de nuestro emídido, que consiste en la presencia de conjuntos de agujas de aragonito alrededor del extremo angosto de los conos de las unidades calcáreas. Los cristales forman una especie de círculo alrededor del centro o núcleo del cual parten otros cristales (Figura 6). Esto significa que además de los cristales que se agrupan

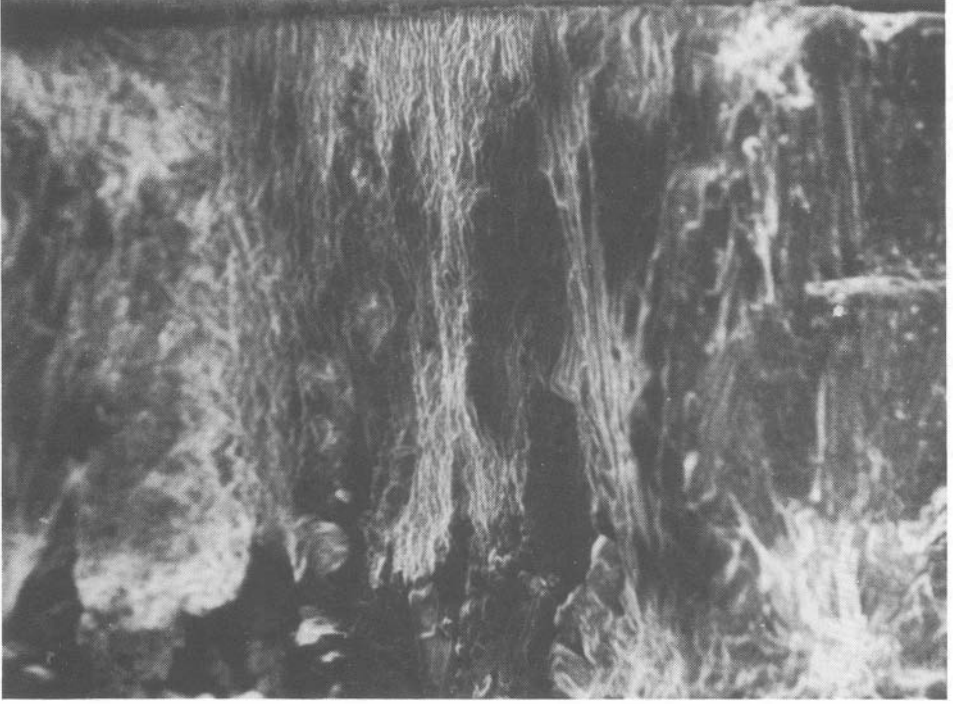


Fig. 4. Cavidad interna de un poro que atraviesa la cáscara desde la membrana del huevo hasta la superficie interior de la cutícula (250 x).

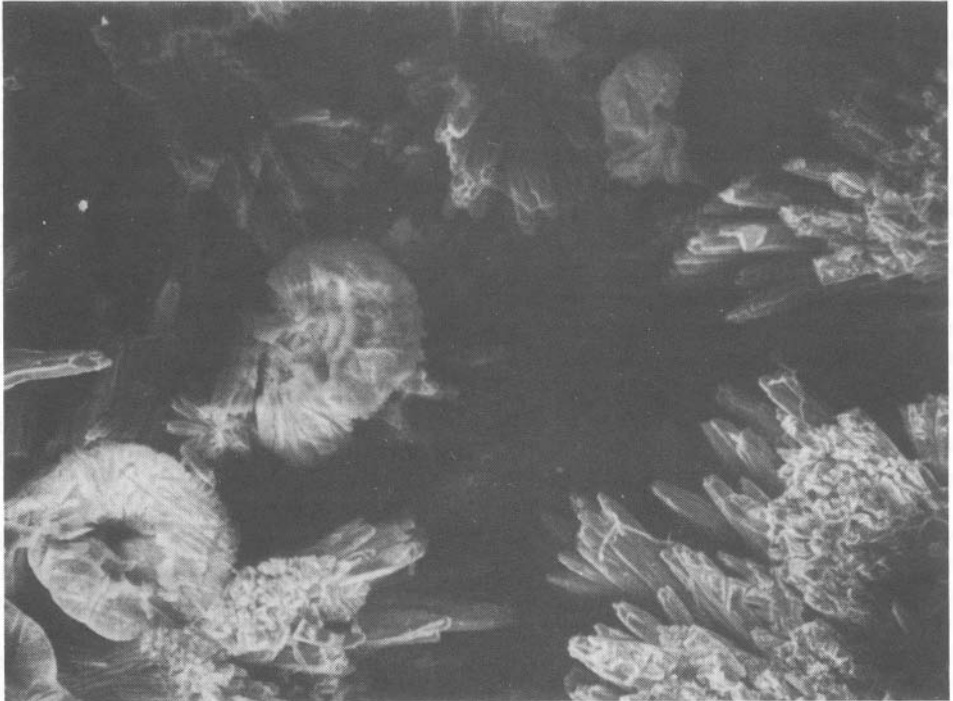


Fig. 5. Superficie interna de la capa calcárea del huevo de *Rhynoclemmys pulcherrima* en la que se observan algunos de los extremos internos de las unidades fundamentales y los grandes espacios entre ellas (300 x).

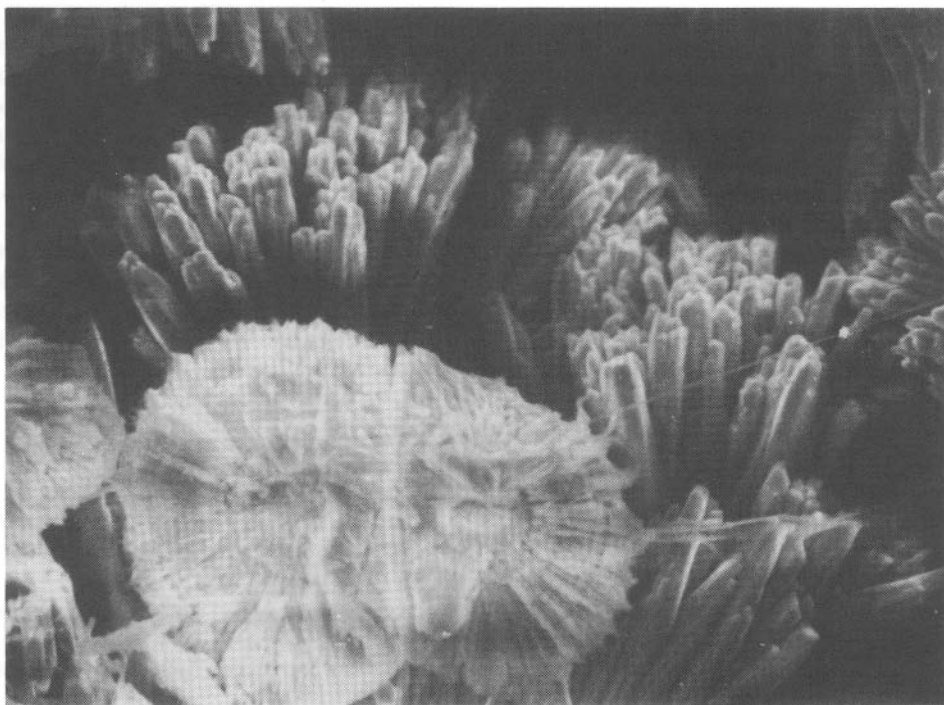


Fig. 6. Sección interna de la capa calcárea mostrando las agujas de aragonito que rodean el extremo interno de las unidades fundamentales de la cáscara del huevo de *Rhinoclemmys pulcherrima* (600 x).

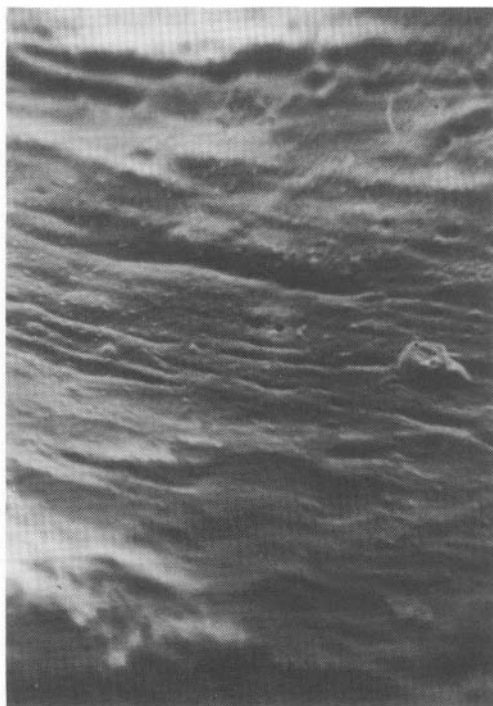


Fig. 7 a y b. Dos vistas de la membrana del huevo de *Rhinoclemmys pulcherrima*. Nótese su aspecto liso además de la presencia de plegamientos esporádicos (a: 700 x; b: 3500 x).

formando radios a partir del núcleo del vértice del cono, existen otros cristales que rodean a dicho vértice a manera de una empalizada. Estos últimos se agrupan perpendicularmente, a los que parten del centro del cono. Esta característica no ha sido observada en los huevos de otras especies de tortugas.

Como se deduce de los resultados discutidos anteriormente, la diferencia estructural entre las cáscaras de las diferentes especies, señala cierta variabilidad que es consecuencia tanto de factores genéticos como de mecanismos adaptativos complejos relacionados con el medio donde estos quelonios se reproducen. La interacción de ambos fenómenos de como resultado determinados patrones fisiológicos y bioquímicos representados en forma especial en los huevos. Por esta razón cualquier estudio comparativo realizado en este campo adquiere, desde esta perspectiva, un alto valor taxonómico ya que representa criterio adicional de gran peso para el esclarecimiento de las relaciones de parentesco entre las especies de quelonios actuales o extintos.

AGRADECIMIENTOS

El más expresivo agradecimiento a Omar Rodríguez Solano por su labor en la dilucidación de algunos aspectos discutidos aquí, y a Rodolfo Bolaños del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular por su ayuda, espíritu de servicio y amabilidad.

RESUMEN

Se describe la ultraestructura de la cáscara del huevo de la tortuga *Rhinoclemmys pulcherrima* y se compara con la de los huevos de otros reptiles.

La cáscara de los huevos de *R. pulcherrima* está constituida por tres regiones: la cutícula (externa), la capa calcárea (media) y la membrana del huevo (interna). La cutícula no presenta ondulaciones al contrario de lo que ocurre con los huevos de los quinostérnidos. Su aspecto al corte radial es semejante al de los huevos de *Geochelone elephantopus*. Asimismo, la cutícula de *R. pulcherrima* muestra fracturas o grietas superficiales cuyos bordes se complementan a manera de un rompecabezas. La capa calcárea está formada por unidades estructurales constituidas por conjuntos de agujas de aragonito que parten, en forma divergente, de un centro o núcleo asociado a la membrana del huevo. En los

huevos de cocodrilo, la cáscara presenta en lugar de aragonito calcita y ésta se deposita en forma laminar a diferencia de lo que ocurre en las cáscaras del huevo de *R. pulcherrima*. Por otra parte, las unidades calcáreas se muestran entrelazadas, situación que no se presenta con las de los huevos de las tortugas marinas *L. olivacea* y *C. mydas*.

Dentro de las características estructurales, se destaca el que los extremos internos de las unidades calcáreas de la cáscara se encuentran rodeados por agujas de aragonito a manera de empalizada. Este tipo de estructura no se ha observado en otros huevos de reptiles.

REFERENCIAS

- Acuña M., R.A. 1980. Aspectos biológicos de la fase terrestre de la tortuga lora *Lepidochelys olivacea*. Tesis para optar al grado de Magister Scientiae en Biología. 115 p.
- Acuña M., R.A. 1984. La ultraestructura superficial de la cáscara del huevo de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* Eschscholtz. *Brenesia* 22: 299-308.
- Castillo C., V. 1986. Aspectos ecológicos y económicos de la reproducción de dos especies de tortugas costarricenses. Tesis para optar al grado de Licenciado en Biología. 150 p.
- Ewert, M.A. 1979. The embryo and its egg: Development and natural history. pp: 333-413. *In* M. Harless and H. Morlock (eds.). *Turtles: Perspectives and Research*. John Wiley, New York.
- Ferguson, M.W.J. 1981. Extrinsic microbial degradation of the alligator eggshell. *Science* 214: 1135-1137.
- Hirsch, K.F. 1983. Contemporary and fossil chelonian eggshells. *Copeia*, 1983: 382-397.
- Hirsch, K.F. 1985. Fossil crocodylian eggs from Eocene of Colorado. *J. Paleont.* 59: 531-542.
- Packard, M.J.; K.F. Hirsch & J.B. Iverson. 1984. Structure of shells from eggs of kinosternid turtles. *J. Morph.* 181: 9-20.
- Packard, M.J.; K.F. Hirsch & V.B. Meyer-Rochow. 1982. Structure of the shell from eggs of the tuatara, *Sphenodon punctatus*. *J. Morph.* 174: 197-205.
- Rahn, H.; A. Ar & G.V. Paganelli. 1979. How bird eggs breathe. *Sci. Amer.* 240: 38-47.
- Silyn-Roberts, H. & R.M. Sharp. 1985. Preferred orientation of calcite and aragonite in the reptilian eggshells. *Proc. R.Soc. Lond. B.* 225: 445-455.
- Solomon, S.E. & T. Baird. 1979. Aspects of the biology of *Chelonia mydas* L. *Oceanogr. Mar-Biol. Ann. Rev.* 17: 347-361.