

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DESARROLLO EMBRIONARIO EN LA TORTUGA ACUÁTICA

***PHRYNOPS HILARII* (TESTUDINES, CHELIDAE):**

ANÁLISIS DE FACTORES AMBIENTALES Y BIOLÓGICOS

QUE INFLUYEN EN EL PROCESO DE DIAPAUSA

por

Lic. YANINA ANDREA PRIETO

Directora: ADRIANA SILVINA MANZANO

Centro de Investigaciones Científicas y Transferencia de Tecnología
a la Producción



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Córdoba, Argentina

2015

COMISIÓN ASESORA

Nombre y Apellido SILVIA ARRANZ

Lugar de Trabajo PLATAFORMA DE
BIOTECNOLOGÍA ACUÁTICA (UNR)

Nombre y Apellido MA CARLA LÁBAQUE

Lugar de Trabajo FACULTAD DE CIENCIAS
EXACTAS FÍSICAS Y NATURALES (UNC)

Nombre y Apellido ADRIANA S. MANZANO

Lugar de Trabajo CICYTTP – CONICET

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

A Felipe

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis y beca, la Dra. Adriana Manzano, por el apoyo brindado durante el desarrollo de esta tesis y por confiar en mí para llevar a cabo este proyecto.

Al Lic. Marcelino “Quique” Freyre, a la Mg. Cecilia Bernardi, al Mg. Victor Rozicky y a la Téc. Sup. Adriana Bonaldo, miembros del laboratorio del Instituto de Tecnología de Alimentos de la Universidad Nacional del Litoral (ITA-FIQ-UNL), por abrirme generosamente las puertas de su equipo de trabajo durante la realización de esta tesis.

A Felipe, la luz de mis ojos, la razón por la que este final es más valioso. A Mariano por estar presente y brindarme su apoyo.

A mi familia por el apoyo incondicional durante todo este tiempo, aún sin entender completamente de que se trata el trabajo de “biólogo”.

A mis amigos, biólogos y no biólogos, por aguantarme hablando de huevos y tortugas todo este tiempo y por las palabras de apoyo cuando no veía la luz al final del túnel.

A la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba (FCEFN-UNC), por permitirme llevar a cabo la Carrera de Doctorado en Ciencias Biológicas en esa casa de estudios.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por las becas otorgadas para concluir esta tesis.

Al director del Centro de Investigaciones Científicas y Transferencia de Tecnología a la Producción (CICyTTP-CONICET), Dr. Jorge Noriega, por permitirme trabajar en la institución y estar siempre disponible para los diferentes requerimientos concernientes a este trabajo.

A Ma. Soledad López y CPA Raúl D’Ángelo por su colaboración y compañía en los muestreos de campo. A la CPA Silvia Etcheverry por su colaboración en la toma de datos en el laboratorio. Al Dr. Pablo Aceñolaza por sus consejos en la confección del manuscrito y sus recomendaciones en los análisis de datos.

A los becarios del laboratorio 12 del CICYTTP: Zuleica Marchetti, Estela Rodríguez, Laura Sánchez, Lucas Casanave e Ignacio Quignard por las discusiones académicas, mates y charlas que hicieron más amenas las jornadas laborales.

A los miembros de la Comisión Asesora: Dra. Silvia Arranz y Dra. Ma. Carla Lábaque por los consejos brindados durante la redacción de esta tesis.

A los miembros del Jurado: Dra. Silvia Arranz, Dra. Ma. Carla Lábaque y Dr. Gerardo Leynaud por las observaciones y correcciones bienintencionadas del manuscrito final.

Al CEREGEO (Centro Regional de Geomática), por ayudarme con la impresión de la tesis.

Trabajo financiado parcialmente con los proyectos PICT Bic. 0616 dirigido por la Dra. Marissa Fabrezi, PIP UADER 2012-2015 Resol. 1646/11 dirigido por la Dra. Adriana Manzano y PIP 284 dirigido por la Dra. Virginia Abdala.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

López M.S., W. Sione, G.C. Leynaud, **Y.A. Prieto** & A.S. Manzano. 2013. “How far from water? Terrestrial dispersal and nesting sites of the freshwater turtle *Phrynops hilarii* in the floodplain of the Paraná river (Argentina)”. *Zoological Science*: 1063–1069.

PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTIFICAS DERIVADAS DE LA TESIS

- López, M.S., **Y.A. Prieto**, L. Dreher, A. Manzano & G. Leynaud. 2010. Reproducción de *Phrynops hilarii* (Testudines, Chelidae) en el período de inundación 2009-2010: densidad y caracterización de los nidos en un sector del Río Paraná. XI Congreso Argentino de Herpetología. Buenos Aires, Argentina. Expositor.
- **Prieto, Y.A.**, M. Freyre, C. Bernardi & A.S. Manzano. 2011. Componentes de huevo de tortuga acuática *Phrynops hilarii* (Testudinae: Chelidae). XII Congreso Argentino de Herpetología. Bariloche, Argentina. Expositor.
- **Prieto, Y.A.**, M. Freyre & A.S. Manzano. 2012. Composición mineral del huevo de tortuga *Phrynops hilarii* (Testudines: Chelidae) y su valor nutricional. IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Córdoba, Argentina. Expositor.
- **Prieto, Y.A.**, A.S. Manzano & M.S. López. 2013. Tolerancia a la desecación e influencia de la falta de agua en el desarrollo de los embriones de la tortuga acuática *Phrynops hilarii* (Testudines: Chelidae). 1er Workshop Fisiología Ecológica y Cambio Climático: de los patrones a los Mecanismos Causales. Mendoza, Argentina. Expositor.

ÍNDICE

1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	2
3.	HIPÓTESIS Y PREDICCIONES	11
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	13
4.1.	ÁREA DE ESTUDIO	13
4.2.	ENSAYOS DE LABORATORIO Y NIDOS EN LA NATURALEZA	19
4.2.1.	Diseño de experimentos y nidos testigo	19
4.2.2.	Preparación de muestras y datos iniciales	21
4.3.	DESARROLLO EMBRIONARIO	22
4.4.	ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS DE LAS MUESTRAS	25
4.5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	27
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
5.1.	VALORES INICIALES	28
5.2.	CAMBIOS EN EL PESO DE LOS HUEVOS DURANTE LA INCUBACIÓN	32
5.3.	DESARROLLO EMBRIONARIO	36
5.3.1.	Estadios de desarrollo vs. tratamientos	36
5.3.2.	Períodos de incubación	41
5.4.	ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS	48
5.4.1.	Análisis fisicoquímicos iniciales	48
5.4.2.	Análisis fisicoquímicos vs. Estadios de desarrollo	52
6.	CONCLUSIONES GENERALES	60
7.	BIBLIOGRAFIA	62
	ANEXO I	70
	ANEXO II	72
	ANEXO III	76
	ANEXO IV	79
	ANEXO V	86

1. RESUMEN

Diapausa embrionaria es el detenimiento del desarrollo del embrión sano, que ocurre aún cuando el ambiente próximo fomentaría un desarrollo activo. En tortugas, el desarrollo embrionario se detiene en el estadio de gástrula tardía en los oviductos maternos (diapausa primaria), reanudándose luego de la oviposición. Algunas tortugas poseen un segundo período de detenimiento (diapausa secundaria) luego de la oviposición. Este mecanismo es en realidad un enlentecimiento del desarrollo, donde el metabolismo disminuye hasta el punto de parecer un detenimiento y por lo tanto el gasto energético es mínimo. Prolonga la etapa de huevo durante períodos de mal tiempo y permite la sincronización de nacimientos con condiciones óptimas para la supervivencia post eclosión. El principal objetivo de este trabajo fue profundizar en el conocimiento de la diapausa en tortugas y en especial tortugas de agua dulce como *Phrynops hilarii* y determinar cuáles factores tiene relación directa con la diapausa (estrés ambiental, biológicos) y en qué medida influirían en la embriogénesis. Durante 2011 y 2012 se colectaron 38 nidos con 544 huevos de dos poblaciones del valle de inundación del río Paraná, Litoral Fluvial Argentino. Se combinaron tres temperaturas (14°C, 19°C y 24°C) con tres períodos de inundación (Sequía, cinco (5) semanas de inundación y diez (10) semanas de inundación) y se evaluó el efecto de estas variables sobre duración de la diapausa. Los huevos sometidos a temperaturas estivales (24°C) con un período de inundación de hasta cinco semanas tuvieron el mayor “éxito de desarrollo”. Se analizaron los contenidos de huevos en diferentes estadios de desarrollo para evaluar los cambios en los nutrientes: humedad, sólidos totales, cenizas, lípidos, proteínas y minerales. La mayoría de los componentes del huevo de *P. hilarii* disminuyeron durante el desarrollo para constituir los tejidos embrionarios, excepto los lípidos. Los factores ambientales tuvieron una relación directa con la ruptura de la diapausa embrionaria (diapausa secundaria) y con el tiempo de permanencia en este mecanismo, por lo tanto con el tiempo de incubación.

2. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En las especies ovíparas, las condiciones bajo las que los huevos son incubados tienen un impacto profundo en la fisiología y desarrollo del embrión, en los neonatos, en el número de pichones que emergen del nido, y en la supervivencia neonatal (Thompson 1983, Packard & Packard 1988, Deeming 2004). El período de incubación, de hecho, es importante para la supervivencia del embrión determinando un desarrollo exitoso con un embrión a término. Este período es muy vulnerable debido a que las condiciones de temperatura, humedad e intercambio gaseoso actúan sinérgicamente dentro del nido influyendo en el desarrollo del embrión y su metabolismo (Miller & Dinkelacker 2008).

Si nos enfocamos en la hembra que va a ovipositar, los huevos deben ser depositados en el momento en que las condiciones ambientales permitan la adecuada nidificación y cuando esas condiciones comprometan en menor medida la supervivencia de la madre (Spencer 2002). Desde la perspectiva de la descendencia, los huevos deben ser depositados en el nido cuando las condiciones sean las adecuadas para una incubación exitosa y apropiada para el desarrollo, y deben establecerse en un momento que permita la eclosión de los neonatos en las condiciones adecuadas para su supervivencia y crecimiento (Webb *et al.* 1986). La adaptación del lugar y el momento de anidamiento de la madre, en respuesta a la selección natural actuando sobre su supervivencia, puede resultar potencialmente en un cambio en el tiempo de emergencia de su descendencia (Fordham *et al.* 2006). Debido a esto, el período durante el cual se produce el desarrollo embrionario provee suficiente tiempo al embrión para desarrollarse, pero también proporciona coordinación entre el momento de la oviposición y la emergencia de los pichones con el objetivo de maximizar el fitness parental (Fordham *et al.* 2006).

En los reptiles, las estrategias reproductivas suelen ser conservativas (Shine 1985), aunque hay variaciones entre y dentro de los grupos (Miller & Dinkelacker 2008). En las tortugas existen dos categorías de detenimiento del desarrollo: pre y post oviposicional (Booth 2000, 2002; Miller & Dinkelacker 2008). En el oviducto, los huevos permanecen con desarrollo detenido antes de la oviposición, típicamente en el estadio gástrula tardía

(Ewert 1985) y se considera universal para las tortugas, ya que todas las especies estudiadas hasta el momento exhiben este proceso (Miller & Dinkelacker 2008). El beneficio de este primer detenimiento en los oviductos radica en que toda la progenie puede desarrollarse en sincronía en miras de la siguiente oviposición, pero también permite a la hembra posponer la oviposición hasta encontrar el lugar adecuado para nidificar (Ewert 1985). Después de la oviposición, los embriones de algunas especies comienzan el desarrollo luego de algunas horas mientras otras permanecen con el desarrollo detenido (Miller & Dinkelacker 2008). Este detenimiento o enlentecimiento del desarrollo en algunas especies es obligatorio, mientras que en otras es facultativo o presentan un componente estacional (por ejemplo: *Chelodina expansa*, Ewert 1979; *Chelodina rugosa*, Kennet *et al.* 1993, 1998 *Kinosternon baurii*, Ewert & Wilson 1996). Ewert & Wilson (1996) describen cuatro tipos de detenimiento post-oviposicional, el segundo tipo es la diapausa embrionaria. En este mecanismo algunos embriones inician el desarrollo luego de la oviposición y después entran en un período de detenimiento o enlentecimiento en el desarrollo (Miller & Dinkelacker 2008). El valor adaptativo de la diapausa embrionaria es tema de debate actualmente (Spencer *et al.* 2001, Lopes *et al.* 2004, Horne 2007, Miller & Dinkelacker 2008), la idea prevalente en la literatura sugiere que la diapausa permite la prevención de la mortalidad en invierno o posiciona a la progenie en un momento más adecuado para la supervivencia de los neonatos.

El término diapausa en sentido amplio se utiliza para describir el mecanismo de interrupción de los procesos metabólicos en varios estadios de la vida de un organismo debido a condiciones ambientales adversas; en tanto diapausa embrionaria (DE) es el detenimiento temporario o retardo del desarrollo de un organismo en cualquier estadio que ocurre aún cuando el ambiente próximo inmediato fomentaría un desarrollo activo (Ewert 1991, Mead 1993). Existen evidencias que indican que este mecanismo podría haber surgido en forma independiente en diversos grupos de vertebrados entre los que se encuentran algunos peces, reptiles (ej. camaleones, tortugas y cocodrilos), aves (Megapodidae) y algunos mamíferos (ej. marsupiales) (Lombardi 1998).

En los reptiles ovíparos, el período de desarrollo embrionario se divide en dos fases: un período en que los huevos son retenidos dentro del útero y un período posterior de desarrollo después de la oviposición (Shine 1983). En las tortugas, el desarrollo

embrionario llega a detenerse en el estadio de gástrula tardía dentro de los oviductos (extensión de diapausa preoviposicional, Ewert & Wilson 1996; diapausa primaria, Booth 2000, 2002) y se reanuda normalmente después de la oviposición (Ewert 1991). Sin embargo, Booth (2000) sostiene que la diapausa preoviposicional o primaria puede extenderse hasta 6 semanas después de que los huevos son depositados en el nido. Una vez que la diapausa primaria se rompe, una mancha blanca se extiende hasta cubrir la mitad o tres cuartas partes de la cáscara, a partir de este estadio los embriones invariablemente entran en una segunda diapausa (diapausa embrionaria según Ewert & Wilson 1996; diapausa secundaria según Booth 2000, 2002). Durante la etapa de diapausa secundaria el desarrollo embrionario se enlentece de tal forma que parece detenerse, atrasando considerablemente el inicio de la morfogénesis. El ingreso a esta etapa se produce antes del comienzo de las condiciones ambientales adversas (por ejemplo, bajas temperaturas), es decir, aunque la oviposición se produzca en condiciones ambientales óptimas, el embrión entra en diapausa secundaria y no se desarrolla (Ewert 1991). La ruptura de la diapausa embrionaria se puede establecer a partir de la formación de los primordios cardíacos, primeras estructuras visibles en desarrollarse en el embrión que usamos como indicio de la reanudación activa del desarrollo, estos primordios surgen de la fusión de tubos mesodérmicos precardíacos pares situados a ambos lados del intestino anterior en desarrollo (McLaughlin & McCain 1998).

Teniendo en cuenta los antecedentes brindados, donde se destacó la importancia del proceso de diapausa secundaria o embrionaria y su significancia ecológica como estrategia reproductiva y evolutiva en el desarrollo de las tortugas, esta tesis se centra en esta etapa en particular, que se inicia inmediatamente después de la oviposición. Como se mencionó anteriormente, durante el mecanismo de diapausa embrionaria el metabolismo disminuye reduciendo los costos de mantenimiento celular (el catabolismo de la yema; Ewert 1985) minimizando los gastos de energía cuando una incubación prolongada es esencial para la supervivencia de la descendencia. La diapausa embrionaria sería claramente ventajosa para el embrión, ya que prolongaría una etapa de huevo presumiblemente “segura” a través de períodos de mal tiempo (sequía, enfriamiento, inundaciones, etc.) y permitiría la sincronización del nacimiento con las condiciones óptimas para el crecimiento de los neonatos.

Las condiciones físicas ambientales del medio donde vive una especie determinada tienen rangos de normalidad que permite que esta se desarrolle, crezca y se reproduzca, no alterando su biología, cuando las condiciones sobrepasan los rangos de normalidad los individuos producen una respuesta conocida como estrés ambiental (Shelford 1931, Begon *et al.* 1986, Prado *et al.* 2010). Los factores desencadenantes del estrés ambiental en los individuos se denominan estresores e incluyen desde deficiencias o excesos de agua y nutrientes, pasando por altos contenidos salinos de los suelos, altas o bajas temperaturas extremas, excesiva radiación solar (PAR, UVB), excesiva alcalinización o acidificación de los suelos y factores mecánicos (compactación de los suelos, viento, nieve, granizo) hasta la presencia de contaminantes químicos en los suelos (metales pesados, agentes xenobióticos, etc.) o en el aire (Prado *et al.* 2010).

Bates *et al.* (2008), informa que en los tres últimos decenios, América Latina ha estado sometida a distintos impactos en relación con el clima, algunos de ellos vinculados a los episodios de ENOA (El Niño-Oscilación Austral). Los principales cambios se refieren a un aumento de la frecuencia de extremos climáticos tales como crecidas, sequías o deslizamientos de tierra (por ejemplo, las intensas precipitaciones de Venezuela (1999 y 2005); la inundación de la Pampa argentina (2000 y 2002), la sequía del Amazonas (2005), etc.). También ha ido en aumento el estrés respecto a la disponibilidad del agua: diversas sequías relacionadas con La Niña restringieron gravemente el abastecimiento de agua y la demanda de agua de riego en la parte central y occidental de Argentina y en el centro de Chile. Sequías relacionadas con El Niño hicieron disminuir el caudal del río Cauca, en Colombia. Se han observado aumentos de la precipitación en el sur de Brasil, Paraguay, Uruguay, nordeste de Argentina (Pampas), y partes de Bolivia, noroeste de Perú, Ecuador y noroeste de México. El aumento de la precipitación incrementó en un 10% la frecuencia de crecida en el río Amazonas a la altura de Obidos, y en un 50% el caudal de los ríos de Uruguay, del Paraná y del Paraguay. Se ha observado también en la región un aumento en cuanto a episodios de precipitación intensa y días secos. De acuerdo a este documento, son pocos los estudios que evalúan los efectos del cambio climático sobre la diversidad biológica, y en todos ellos es difícil diferenciar los efectos debidos al cambio climático de los inducidos por otros factores. Es de esperar que aquellas especies estrechamente relacionadas con los factores abióticos de los ecosistemas (por ej: anfibios, reptiles) sean más vulnerables a estos cambios climáticos.

La mayoría de los organismos que presentan diapausa embrionaria responden a estímulos externos que provocan este enlentecimiento en el desarrollo, siendo los más comunes la temperatura, el potencial hídrico y la duración del día (Ewert 1991). Casi todas las especies conocidas que presentan diapausa (32 especies de 33), se distribuyen dentro de dos amplias bandas geográficas entre 15°-37° latitud norte y sur (Horne 2007). En general, parecería estar asociada a climas fuertemente estacionales con grandes fluctuaciones en lluvias combinados con modestas fluctuaciones en temperatura que excluyen el congelamiento (Ewert 1991).

Trabajos realizados sobre desarrollo y diapausa en tortugas incluyen especies de la mayoría de las familias de quelonios (Emydidae, Chelidae, Kinosternidae y Testudinidae) (por ejemplo, Ewert 1991, Booth 2002, Fordham *et al.* 2006, Horne 2007); gran parte de estos trabajos destaca la influencia de los factores ambientales (temperatura, humedad, etc) en la entrada y salida del estado de diapausa. Por ejemplo, Booth (2002) incubó huevos de *Chelodina expansa* a tres temperaturas diferentes con variaciones periódicas, todos los huevos experimentaron diapausa embrionaria que se prolongó diferencialmente según las temperaturas fueran más o menos favorables para el desarrollo del embrión. Fordham *et al.* (2006) sometieron huevos de *Chelodina rugosa* a una combinación de cinco temperaturas constantes combinadas con cinco períodos de inundación, comprobó que la diapausa en los embriones de esta especie puede prolongarse hasta 25 semanas bajo el agua, experimentando estos últimos el mismo porcentaje de mortalidad que aquellos mantenidos fuera del agua durante todo el período de incubación. Sin embargo, no solo los factores externos ambientales deben ser los adecuados para permitir el normal desarrollo del plan embrionario, sino que los componentes internos del huevo (principalmente lípidos y proteínas) también son de vital importancia debido a que son la fuente energética del embrión en crecimiento (Booth 2002) y que podrían influir en el mecanismo de diapausa.

En relación a esto, cabe mencionar que los huevos de todas las tortugas son amniotas (Ewert 1985), lo que implica una estructura de doble envoltorio (Lombardi 1998), que incluye las membranas extraembrionarias que envuelven al embrión, rodeadas por una envoltura externa (la cáscara). El contenido de los huevos está aislado del medio circundante, pero puede existir cierto intercambio con el ambiente, principalmente cuando se presentan eventos climáticos extremos. Los huevos con cáscaras más duras (especies

terrestres y algunas acuáticas) permiten fundamentalmente el paso de gases, mientras que otros con cáscaras más flexibles (especies acuáticas) permiten además, el paso de agua tanto en su estado líquido como gaseoso (Miller & Dinkelacker 2008). La cáscara de reptiles está compuesta por unidades de envoltura individuales unidas por una membrana subyacente (Packard 1999). En los Chelidae estas unidades de envoltura son relativamente altas y están en contacto entre sí, confiriendo de este modo mayor rigidez a la cáscara (Hirsch 1983, Packard *et al.* 1982, Packard & Hirsch 1986). A su vez, este tipo de cáscara rígida presenta escasa porosidad (Packard 1999). Los huevos que presentan esta estructura, en general, no son afectados por la humedad del ambiente que rodea al huevo (Packard 1999). Las reservas de agua están bien aisladas, por lo que las variaciones temporales y espaciales en el ambiente circundante al nido no influirían apreciablemente en la disponibilidad de agua para los embriones en desarrollo excepto en condiciones extremas de estrés ambiental (Leshem & Dmi'el 1986, Packard 1999).

Los tejidos presentes en los neonatos de los ovíparos amniotas derivan completamente de los contenidos del huevo en el momento de la oviposición (Lombardi 1998, Thompson *et al.* 2001). El albumen tiene tres funciones fundamentales: proveer protección antimicrobiana al embrión, proporcionar un soporte para la expansión de la membrana vitelina y constituye un reservorio de agua (Thompson & Speake 2004). Mientras que la yema es la fuente primaria de energía proporcionada por la hembra (Miller & Dinkelacker 2008). Los huevos de reptiles presentan la mitad de contenido de lípidos respecto de proteínas y, entre ambos, constituyen más del 90% de la materia seca de la yema del huevo (Thompson & Speake, 2003). Los lípidos son los mayores componentes nutritivos de los huevos de aves y reptiles, y los ácidos grasos derivados de los lípidos de la yema proveen al embrión de la mayor parte de la energía requerida para su desarrollo (Speake & Thompson 2000). La relación entre las concentraciones y tipos de lípidos, proteínas y minerales presentes en un huevo en diapausa y su comparación con las concentraciones en un huevo sin diapausa, nos permitirá determinar si la cantidad de nutrientes presentes en el huevo de *Phrynops hilarii* pueden relacionarse al mecanismo de diapausa.

Esta tesis fue enfocada en la tortuga *Phrynops hilarii*, perteneciente a la familia Chelidae, dentro de las tortugas del grupo Pleurodira. Esta especie es muy abundante en Argentina y no se encuentra amenazada (Prado *et al.* 2012). Aunque su presencia es

extensa en el territorio argentino, existe una falta de conocimiento acerca de su biología y fisiología reproductiva. La capacidad de permanecer y reproducirse en hábitats tan diferentes, con estacionalidad marcada y sujeta a diversas relaciones con los sistemas hídricos, motivó a profundizar en el conocimiento de esta especie. Por otro lado, la diapausa es una estrategia evolutiva producto de un proceso de heterocronía muy poco estudiada en tortugas y sobre todo, en tortugas de agua dulce.

La familia Chelidae cuenta actualmente con 17 géneros y 54 especies, tiene una distribución que abarca gran parte de Sudamérica (Argentina, Brasil, Uruguay, Paraguay, Venezuela, Bolivia, Perú, Ecuador, Colombia, Guyana, Surinam y Guayana Francesa), parte de Australia, Nueva Guinea e Indonesia (Pritchard 1979, Fritz & Havas 2007, Vitt & Caldwell 2009, van Dijk *et al.* 2012). Cuatro de estos géneros se encuentran en Argentina e incluyen siete especies (Prado *et al.* 2012).

Phrynops hilarii es la mayor especie del género, pudiendo alcanzar hasta 450mm de longitud máxima de caparazón (Pritchard 1979). Su distribución en Argentina abarca el centro norte del país, incluyendo las provincias de Buenos Aires, Santa Fe, Entre Ríos, Corrientes, Misiones, Formosa, Chaco, Tucumán, Córdoba, San Juan y Mendoza (Richard 1999). Esta especie es considerada netamente eurioica, siendo posible encontrarla en áreas con condiciones variables (topográficas, físico-químicas, etc.) como cañadas, ríos, arroyos, lagunas, esteros, bañados con juncos y vegetación flotante (Ceí 1993, Cabrera 1998; Carreira *et al.* 2005, Tortato 2007). Además, es una especie con capacidad para habitar sitios antropizados como embalses modificados, arrozales, cunetas al borde de campos cultivados y tajamares (Richard & Waller 2000, Prieto & López, obs. pers.)

En el noreste de Argentina *P. hilarii* muestra dos etapas reproductivas bien marcadas una comienza en Marzo-Abril y la otra en Agosto-Setiembre, en ambas se producen cortejo, copula y ovipostura. El nacimiento de las crías para las dos oviposturas se produciría en Febrero-Marzo (Ceí 1993, López *et al.* 2013). Las posturas de Agosto-Setiembre experimentan temperaturas intermedias al comienzo del desarrollo y aumentan progresivamente en pocas semanas; en cambio, las posturas de Marzo-Abril deben atravesar varias semanas con las temperaturas más bajas para la región, hasta llegar al verano siguiente donde eclosionan los pichones.

La selección de los sitios de anidación es uno de los aspectos reproductivos más importantes en tortugas, debido a que los nidos están expuestos a predadores y a que el desarrollo del embrión está influenciado por la temperatura y la humedad que lo rodea (Fitz & Mullin 2006). En muchas especies de tortugas acuáticas, entre las que se incluye *P. hylarii*, tanto la elevación sobre el nivel de agua (Bager 1997) como la distancia a los cuerpos de agua (Moll & Moll 2004, Ferreira Junior & Castro 2010) son parámetros importantes en la distribución de los nidos, sobre todo en las zonas caracterizadas por cambios en los niveles del río y lluvias (Moll & Moll 2004, Ferreira Junior & Castro 2010, López *et al.* 2013). El área de estudio del presente trabajo está influenciada por cambios estacionales y periódicos de los niveles del río Paraná y los sistemas acuáticos que de él dependen (Neiff 1990, Burkart *et al.* 1999, Casco *et al.* 2005), por lo que esta especie a lo largo de su historia evolutiva ha desarrollado estrategias adaptativas para permanecer en este ambiente y tener éxito reproductivo.

A pesar de la diversidad de las especies de Quelonios que existen en Argentina, el conocimiento sobre la biología de sus especies es escaso, que considero puede atribuirse a la dificultad para obtener datos de éstos ejemplares en la naturaleza o a la poca importancia de este grupo en materia económica.

Las principales contribuciones en la Argentina sobre *P. hylarii*, se refieren a inventarios de fauna nacionales y localidades puntuales (entre otros Richard & Waller 2000, Leynaud *et al.* 2006), información general recopilada en libros (entre otros Cabrera 1998, Richard 1999), trabajos con enfoque veterinario (entre otros Pérez Ganeselli *et al.* 2005) y de filogenia y evolución de las tortugas en general (entre otros Abdala *et al.* 2008, Fabrezi *et al.* 2009). Existen sólo algunos aportes a su biología reproductiva, la mayoría de ellos realizados en el sur de Brasil (Bager 1997, Souza Bujes 1998, Tortato 2007), y las contribuciones acerca de las características de su desarrollo embrionario también son escasas (Serrano 1977, Piña & Argañaráz 2003, Fabrezi *et al.* 2009). Serrano (1977) describe el tamaño de postura y las medidas de los huevos de *P. hylarii*, mencionando brevemente las características internas del huevo. En el trabajo de Piña & Argañaráz (2003) se evalúan los tiempos de incubación de huevos y supervivencia embrionaria de *P. hylarii* exponiéndolos a diferentes temperaturas. Fabrezi *et al.* (2009) sienta las bases de la

homología de los miembros en las tortugas pleurodiras donde se incluye el desarrollo de *P. hylarii*.

Como objetivo general de esta tesis se pretende establecer un punto de partida en el estudio de las estrategias evolutivas en tortugas, tales como la diapausa, y establecer si ésta sería una respuesta de resistencia al estrés ambiental (por ejemplo: temperaturas extremas, largos períodos de inundación, largos períodos de sequías, etc.) o si está dentro del plan de desarrollo de *Phrynops hylarii*, independientemente del ambiente que rodea a los huevos en un momento determinado.

A partir de este objetivo general, destacamos algunos tópicos que serán desarrollados en este trabajo:

- Determinar el grado de relación entre la temperatura y/o el período de inundación que experimentan los huevos en la ruptura de la diapausa embrionaria de *Phrynops hylarii*, o si este mecanismo es independiente de las condiciones ambientales testeadas.
- Describir y comparar las concentraciones de los distintos componentes de la yema de huevos embrionados en diapausa y post diapausa, con el fin de analizar posibles cambios en los contenidos de nutrientes que puedan ser relacionados con el momento de entrada y salida de la diapausa.
- Analizar los porcentajes de desarrollo de embriones en los distintos tratamientos (combinaciones de temperatura y humedad) y relacionarlos con los diferentes niveles de estrés ambiental como por ejemplo: temperaturas bajas, largos períodos de inundación, largos períodos de sequías, etc.; para comprobar los efectos de la diapausa en el éxito de desarrollo (alcanzar estadios de desarrollo pre eclosionales, estadios 24-25).

3. HIPÓTESIS Y PREDICCIONES

H₁: El tratamiento (combinación de temperatura y humedad) al que son sometidos los huevos de *P. hilarii* **determinará el tiempo que durará la diapausa y condicionará la ruptura de este período.**

Predicciones de H₁

- Cuanto más tiempo permanezcan los huevos bajo el agua (período de inundación prolongado), la duración de la diapausa será mayor.
- Los embriones de huevos que experimenten una temperatura baja combinada con un tratamiento de sequía o cualquier período de inundación, no podrán salir de la diapausa.
- Los huevos sometidos a temperaturas intermedias combinadas con un período intermedio de inundación, presentarán una diapausa más larga que aquellos sometidos a temperaturas altas con el mismo período de inundación.
- Los embriones de los huevos que experimenten temperaturas intermedias combinadas con un período largo de inundación, tendrán mayor probabilidad de desarrollarse que aquellos sometidos a altas temperaturas y largos períodos de inundación.

H₂: Los componentes lipídicos y proteicos de los huevos de *Phrynops hiliarii* están relacionados con las distintas etapas de desarrollo del embrión y la ruptura de la diapausa.

Predicciones de H₂

- Todos los huevos en diapausa presentarán un nivel constante de lípidos y proteínas durante el período que permanezcan en esta condición debido a que el embrión no se desarrollará y, por tanto, no consumirá dichos nutrientes.

- Los niveles de lípidos y proteínas disminuirán más rápidamente en las yemas de los huevos embrionados sometidos a una temperatura alta, que aquellos que experimenten una temperatura intermedia, independientemente del período de inundación al que sean sometidos.
- Los niveles de lípidos y proteínas de huevos sometidos a una temperatura baja, no variarán a lo largo del período de incubación, independientemente del período de inundación al que sea sometido, ya que no habrá desarrollo.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. ÁREA DE ESTUDIO

Este trabajo fue realizado con huevos de poblaciones de *Phrynops hilarii* del nordeste de Argentina, en la zona perteneciente al valle de inundación del río Paraná de las provincias de Santa Fe y Entre Ríos, en las inmediaciones de las localidades de Colastiné Sur (Departamento La Capital - Santa Fe) y Las Masitas (Departamento Diamante - Entre Ríos) (Fig. 1).

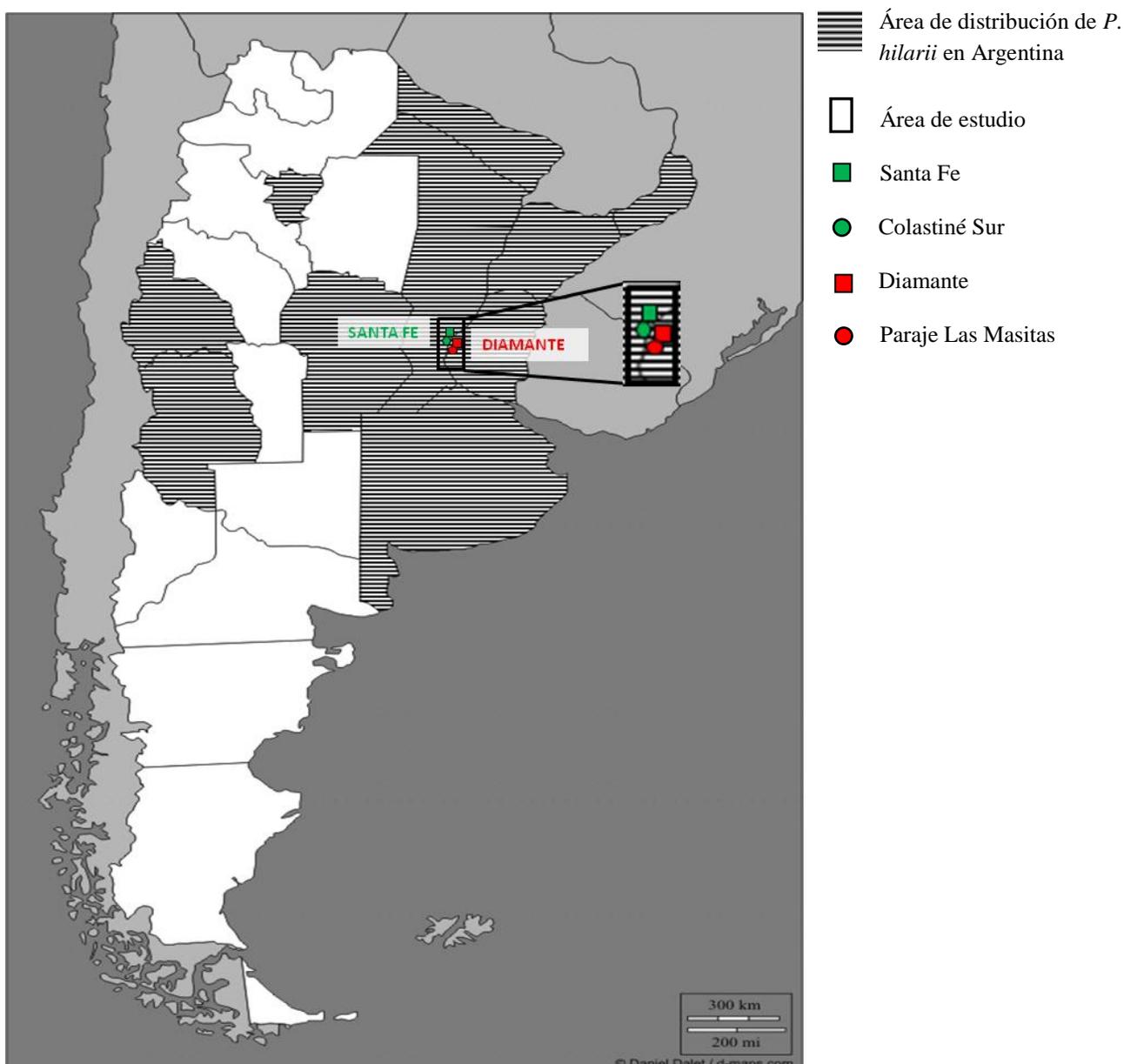


Fig. 1. Provincias en donde *Phrynops hilarii* se encuentra presente en Argentina y área de estudio

El área de estudio se encuentra dentro de la ecorregión Delta e Islas del Paraná (Bó 2005), se trata de macrosistemas complejos en los que los flujos de energía y materiales están fuertemente influenciados por ciclos de crecientes y bajantes de los niveles del río (Neiff 1990, Burkart *et al.* 1999, Casco *et al.* 2005) (Fig. 2a-d), a los que muchos de los organismos presentes se hallan adaptados y pueden sobrevivir en una amplia gama de condiciones ambientales, o bien migran en las épocas desfavorables (Bó y Malvárez, 1999). El régimen hidrológico se caracteriza por un pulso anual aunque, en los últimos años, el mismo ha adquirido un carácter errático. Si bien siguen detectándose períodos de aguas relativamente altas y bajas, pueden observarse varios pulsos pequeños en el ciclo anual, o bien varios años de inundación o de estiaje. Estos eventos se relacionan con fenómenos climáticos naturales como “El Niño” o “La Niña”, aunque también se los asocia al manejo hidráulico que se realiza en las altas cuencas (Bó 2005). El clima es estacional, con meses templados en primavera (octubre-diciembre) y otoño (abril-junio), meses cálidos en verano (enero-marzo) y meses fríos en invierno (julio-setiembre), con una estación lluviosa principal en otoño y una estación lluviosa secundaria en primavera.

El período de estudio abarca desde marzo de 2011 (comienzo de colectas) hasta marzo de 2013 (finalización de incubaciones). Durante el período de estudio, las temperaturas medias fueron: 2011 (16,5°C otoño, 13,9°C invierno, 22,3°C primavera), 2012 (20,2°C verano, 17°C otoño, 14,1°C invierno, 21,1°C primavera) y 2013 (23,9°C enero y febrero). Los niveles máximos de precipitaciones en 2011 se registraron en otoño (340,2mm), mientras que en 2012 se registró un máximo de 564,3 mm en primavera (Fig. 3a-b). Se observan claramente tres picos de precipitaciones que coinciden en ambos años: el primero se da en otoño, el segundo en primavera y el tercero en verano, este último es el más alto de los tres. En el año 2012 se produce un pico intermedio hacia finales de agosto. El primer pico (importante para este estudio) se da en ambos años por igual, el período abril-mayo; a fines de marzo y principios de abril se produce en la región la primera lluvia de otoño y a partir de allí da comienzo a la temporada lluviosa. Es en este momento que *Phrynops hilarii* deposita sus huevos en los nidos, debido a que este pico de lluvia ablandaría la tierra y esto permitiría cavar con facilidad. Esta condición de humedad se prolonga más o menos en el tiempo en esta área seguida de un invierno más seco. En 2011 la estación seca se prolongó desde mediados de mayo a mediados de setiembre donde se

dieron los valores mínimos de precipitaciones para ese año. En 2012 la estación seca fue más corta y se prolongó desde mediados de mayo hasta mediados de agosto.

Los datos climáticos se extrajeron de la Estación Experimental Agropecuaria Paraná del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria <http://anterior.inta.gov.ar/parana/info/documentos/meteorologia/meteorologia.htm>).



Fig. 2. Área de muestreo. a y b- Valle de inundación Rio Paraná en Santa Fe (agua bajas e inundación extraordinaria, respectivamente). c y d- Valle de inundación Rio Paraná en Diamante (agua bajas e inundación extraordinaria, respectivamente).

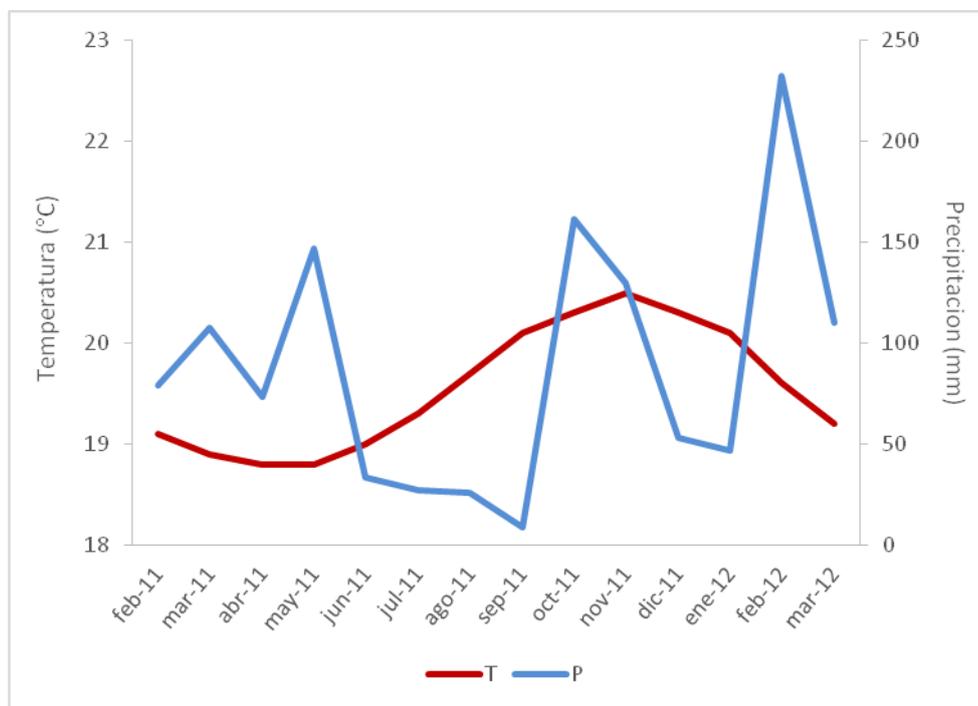


Fig. 3a. Temperaturas promedio y precipitaciones totales mensuales correspondientes a la incubación de huevos en nidos control del año 2011.

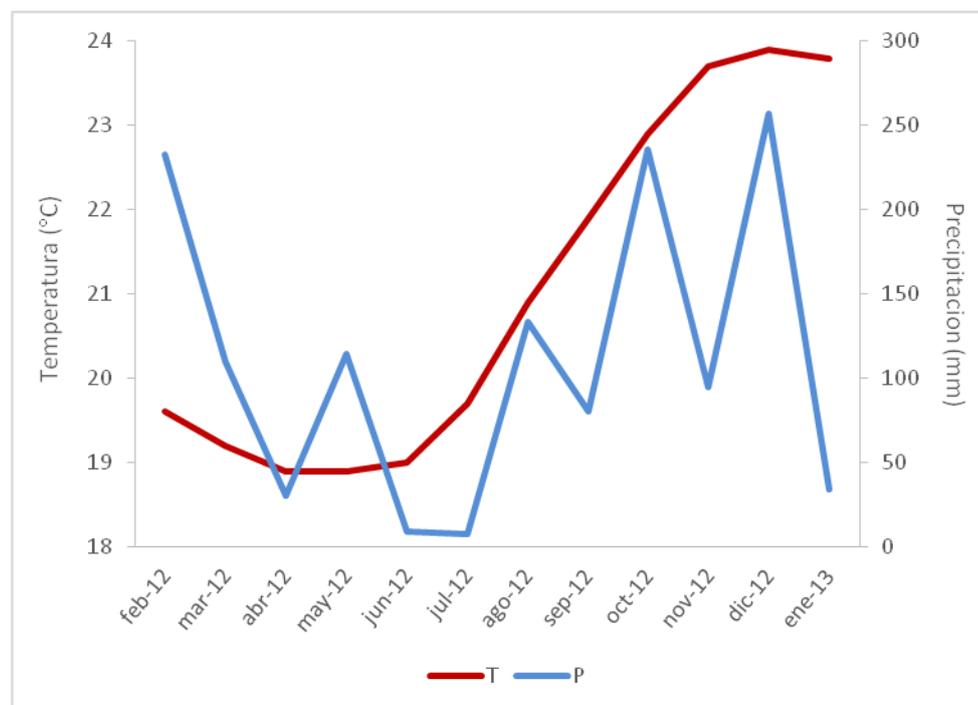


Fig. 3b. Temperaturas promedio y precipitaciones totales mensuales correspondientes a la incubación de huevos en nidos control del año 2012.

Se colectaron 38 nidos con 544 huevos en dos temporadas reproductivas: marzo-junio de 2011 y abril-mayo 2012. Los huevos se recogieron dentro de los tres días de oviposición, cuatro de los nidos, minutos después de ver a la hembra alejarse del lugar de oviposición (Fig. 4a-c). Los huevos recién depositados en los nidos se consideraron en diapausa primaria basándonos en los criterios de Ewert (1985, 1991), Wilson (1996) y Booth (2000; 2002), tomando este estadio como estadio inicial. Al momento de aparecer la mancha blanca en la cáscara, indicativo de la aparición del disco embrionario, se considera que da comienzo a la diapausa secundaria (diapausa embrionaria) (Ewert 1991), y la ruptura de la diapausa embrionaria se estableció a partir de la formación de los primordios cardiacos, primeras estructuras visibles en desarrollarse en el embrión, tomado como criterio para determinar la reanudación activa del desarrollo (McLaughlin 1998).

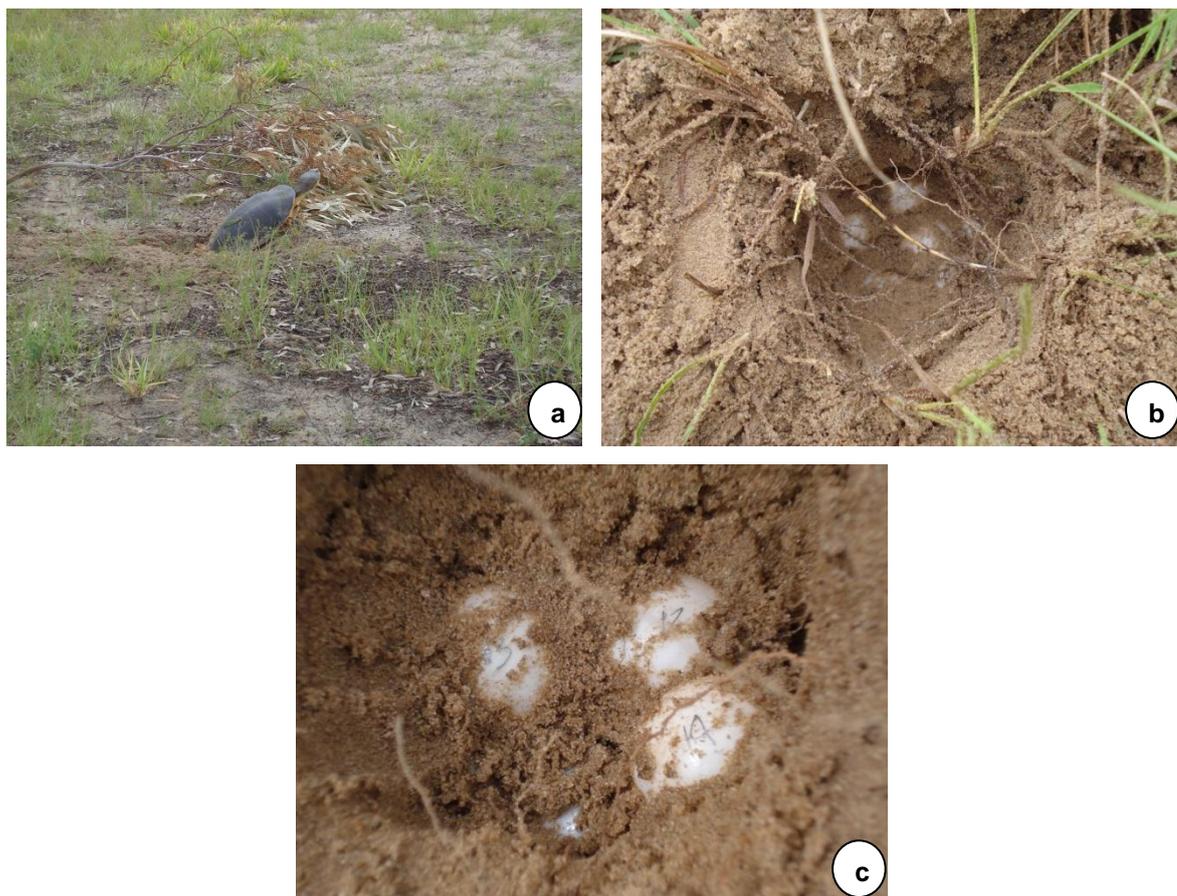


Fig. 4. a- Hembra de *Phrynops hilarii* depositando los huevos en el nido. b- Huevos en la cámara del nido. c- Huevos marcados para conservar orden y posición dentro del nido.

En todos los casos, los huevos se trasladaron al laboratorio en recipientes plásticos con material original del nido con la mayor rapidez posible respetando el orden y posición dentro de la cámara (Fig. 4c) para evitar el desprendimiento del embrión por el movimiento, siguiendo la metodología descrita por Deeming (1991).

4.2. ENSAYOS EN LABORATORIO Y NIDOS EN LA NATURALEZA

4.2.1. DISEÑO DE EXPERIMENTOS Y NIDOS TESTIGO

Los ensayos en laboratorio donde se combinan tres temperaturas con tres períodos de inundación, se diseñaron de la siguiente manera: cada nivel corresponde a una temperatura seleccionada (14°C, 19°C y 24°C); cada columna corresponde a un de período de inundación seleccionado (A- sin saturación de sustrato, B- 5-7 semanas de saturación de sustrato y C- 10-12 semanas de saturación de sustrato) y, por último, cada recipiente corresponde a una réplica de cada ensayo (Fig. 5). Las temperaturas se mantienen constantes a lo largo de todo el tiempo de incubación. Cada nido “nuevo” (réplica) es una mezcla de los nidos recolectados en campo, por lo tanto consta de 2-4 huevos de los nidos originales hasta tener un total de 12 huevos por recipiente.

Las temperaturas utilizadas en los ensayos se registraron a partir del análisis de datos históricos de la zona de estudio (10 años), se realizó un promedio de temperaturas máximas y mínimas estacionales para determinar las temperaturas a las que están expuestos los huevos a través de la incubación, en este caso 14°C pertenece a temperatura media invernal, 19°C a temperaturas medias para otoño y primavera y 24°C es la temperatura estival promedio. Para la selección de los períodos de inundación (intervalos de días) se implementó un sistema similar, donde se tuvieron en cuenta los períodos extremos de inundación para la zona (máximo y mínimo); posteriormente se seleccionó un período intermedio entre los mismos para obtener el tercero. Las variaciones en temperatura y humedad en laboratorio tienen como fin probar distintos períodos de estrés ambiental que pueden acontecer en el área de estudio y a los que deben hacer frente los huevos en desarrollo (altas temperaturas en verano, ciclos de inundación, etc.).

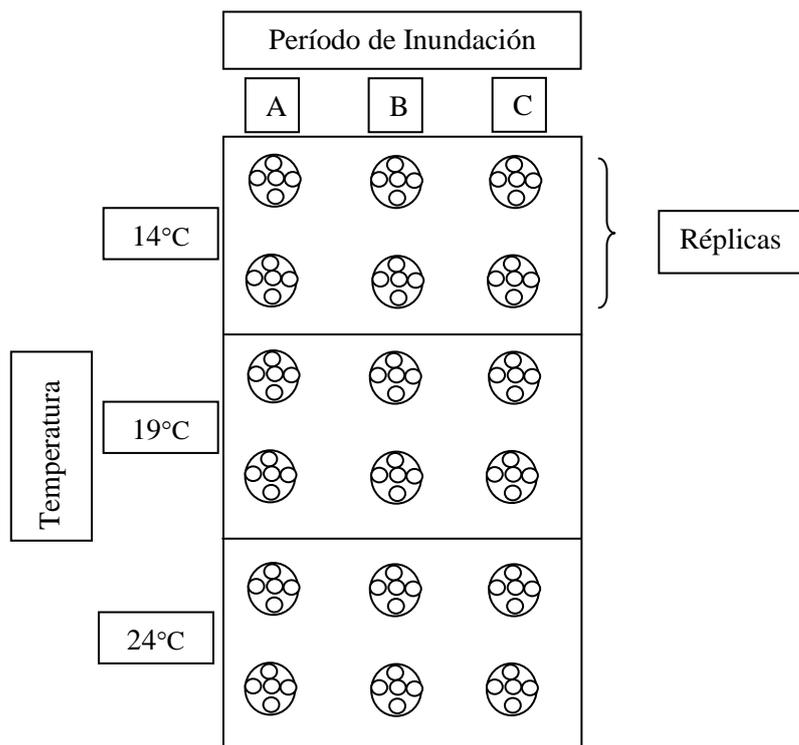


Fig. 5. Distribución de los nidos experimentales en las incubadoras, dos réplicas por cada combinación de Temperatura (14°C, 19°C y 24°C) y Humedad (A: sin saturación de sustrato, B- 5-7 semanas de saturación de sustrato y C- 10-12 semanas de saturación de sustrato).

Las muestras se extrajeron periódicamente para observar el desarrollo de los embriones (ver sección 4.3) y realizar los análisis químicos pertinentes para medir los niveles de nutrientes preestablecidos (ver sección 4.4).

Se incubaron nidos testigo en condiciones naturales en cercanías de los lugares de colecta. A través de la estación meteorológica de INTA Paraná, se tomaron los datos diarios de temperatura y precipitaciones para luego hacer los promedios y totales estacionales, según corresponda. Los huevos de estos nidos se sometieron a los mismos análisis que los huevos incubados en laboratorio, para luego comparar tanto los contenidos como el desarrollo y los tiempos de incubación.

4.2.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y DATOS INICIALES

Los huevos colectados se trasladaron inmediatamente al laboratorio donde se lavaron para extraer sustancias de suelo adheridas, para ésta tarea se humedeció un trozo de tela limpio y se pasó suavemente alrededor de cada huevo. A continuación se midieron (eje 1 y eje 2) y pesaron, para establecer valores de base que luego serán utilizados para registrar y comparar el cambio de los mismos en el tiempo. Las medidas de los ejes se tomaron con un calibre manual (0,05mm de precisión) y los pesos con una balanza de precisión (Precisa 180A, precisión 0,0001g). Además con estas variables se extrajeron datos de grado de esfericidad (eje1/eje2). Luego un huevo por réplica, seleccionado al azar, fue cuidadosamente abierto con bisturí, separándose la yema del resto del contenido, esta fue pesada aparte, para establecer la relación entre el peso de la yema y el del huevo. Los componentes (humedad, sólidos totales, cenizas, lípidos, proteínas y minerales) analizados para estos huevos se denominarán en adelante “componentes iniciales”, ya que se refieren al contenido de las yemas en el estadio inicial (ver Sección 4.4). Además se registró el estado de desarrollo.

El peso de los huevos y las yemas se registraron periódicamente al momento de cada apertura con fines comparativos. Posteriormente, la yema fue homogeneizada con una solución de ClNa 5% (p/v) y resguardada en freezer (-20°C) en tubos cónicos de pvc para los posteriores análisis fisicoquímicos, este procedimiento se repitió en cada apertura, la homogeneización en ClNa permitió aumentar la cantidad de muestra por huevo, ya que al tratarse de análisis fisicoquímicos destructivos se debió aumentar al máximo posible la materia prima disponible (sugerencia metodológica del Licenciado Marcelino Freyre[†]).

4.3. DESARROLLO EMBRIONARIO

La primera apertura se realizó al llegar con los huevos al laboratorio, como ya se describió previamente, en ese momento se estableció el estado de desarrollo inicial del nido (diapausa preoviposicional). La segunda apertura se efectuó una vez concluidas las primeras cinco semanas de desarrollo, momento en el cual eran retirados del agua los huevos del tratamiento B, nuevamente se escoge un huevo al azar para analizar estado de desarrollo y componentes de la yema, pero se observan las características del resto con el ovoscopio y se registra el peso. La tercera apertura fue a las diez semanas de incubación al retirar los huevos del tratamiento C del sustrato saturado, repitiendo el mismo proceso. Luego se realizaron aperturas cada cierto tiempo, evaluando las características de los huevos primeramente a través del ovoscopio, y abriendo al azar huevos en cada una de ellas. Realicé estas aperturas cada dos a cuatro semanas para poder hacer un seguimiento del desarrollo.

Debido a que no todos los nidos pertenecientes al mismo tratamiento se recogieron la misma semana, cuando correspondía el análisis de los datos en el tiempo (por ejemplo: cambio de peso de los huevos por tratamiento por semanas o estadio de desarrollo embrionario por semanas) debí establecer rangos de semanas, esto me permitió ordenar el desfase entre huevos de nidos obtenidos en diferentes semanas. Los rangos de semanas que establecí son los siguientes: **0** (semana inicial, momento en que el huevo es llevado al laboratorio y puesto en tratamiento), **1** (4-7 semanas, corresponde al primer análisis de huevos sometidos a tratamiento, en este rango de semanas se retiran del agua los huevos del tratamiento B), **2** (9-12 semanas, corresponde al segundo análisis de huevos sometidos a tratamiento, en este rango de semanas se retiran del agua los huevos del tratamiento C), **3** (13-16 semanas), **4** (17-19 semanas), **5** (21-23 semanas), **6** (24-26 semanas), **7** (30-32 semanas), **8** (38-42 semanas) y **9** (52-54 semanas). Estos rangos se utilizaron tanto para el análisis de desarrollo embrionario como para el análisis de cambio de peso durante la incubación.

Se establecieron 6 categorías de desarrollo utilizando los estadios propuestos por Yntema (1968) para facilitar la lectura de los datos: **1-Estadio Inicial** (comienzo de las incubaciones, diapausa primaria), **2-Disco Embrionario** (presencia de disco embrionario,

diapausa secundaria), **3-Primordios Cardiacos** (embriones de estadios 5-8, visualización de uno o dos puntos rojos en el saco embrionario, desarrollo activo, ruptura de diapausa), **4-Desarrollo Intermedio** (embriones de estadios 9-23), **5-Desarrollo Avanzado** (embriones en condiciones de eclosionar, estadios 24-25) y **6-Eclosión** (embriones que logran eclosionar, estadio 26). En la figura 6 se colocan a modo ilustrativo seis imágenes como ejemplo de los estadios encontrados, la secuencia completa de estadios embrionarios hallados en este trabajo se encuentra en el Anexo I.

A partir de esta categorización, se evaluó el éxito de desarrollo teniendo en cuenta el número de huevos con desarrollo avanzado (DA, embriones en condiciones de eclosionar) y embriones eclosionados (E) tanto en experimentos como en condiciones naturales (testigo). Este porcentaje proporciona una idea de la capacidad de desarrollo de los embriones de *Phrynops hilarii* bajo distintas condiciones de incubación.

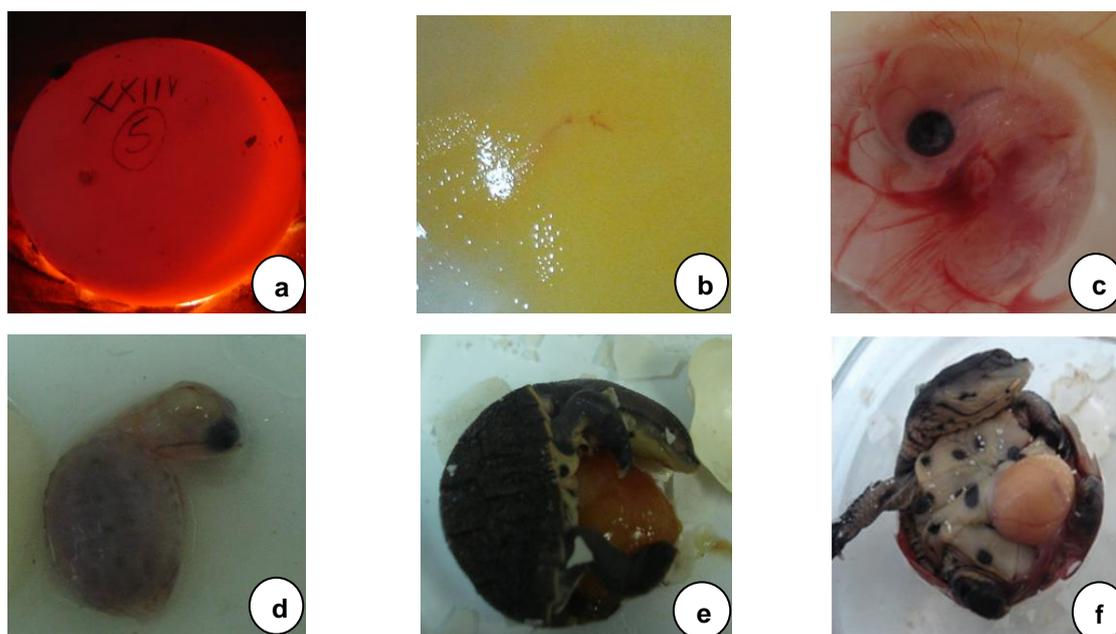


Fig. 6. Categorías de desarrollo de *Phrynops hilarii*. a. Disco embrionario, b. Primordios cardiacos, c y d. Desarrollo Intermedio, e. Desarrollo Avanzado y f. Eclosión

Para realizar las comparaciones entre estado de desarrollo embrionario y el consumo de nutrientes y observar los cambios entre las etapas de diapausa y desarrollo activo, se

tuvieron en cuenta los valores iniciales de cada nido, los valores referentes al estadio donde se presentaba el disco embrionario (diapausa) y los correspondientes a la categoría primordios cardiacos (ruptura de diapausa). Porque consideramos estos momentos claves en la embriogénesis de ésta tortuga y en el estudio de la diapausa, foco central de esta tesis. Este último se determina a partir de la presencia de dos puntos rojos en el saco embrionario (estadios 5-8, Yntema 1968), esto indica el desarrollo de los primordios del corazón que darán origen al sistema circulatorio, a partir del estadio 9 (también llamado **faríngula**), se agrupa a los embriones en la categoría desarrollo intermedio (DI). Como describe Gilbert 2005: “El estadio faríngula es un estadio filotípico que parece ser crítico para todos los vertebrados, antes de llegar a este estadio hay muy pocos acontecimientos inductivos y la mayor parte de ellos está en escalas globales, mientras que una vez alcanzado este estadio los acontecimientos inductivos son más frecuentes, pero la mayor parte se produce en módulos diferenciados”. Los embriones se depositaron en la colección del Centro de Investigaciones Científicas y Transferencia de Tecnología a la Producción (CICyTTP – CONICET) (Anexo II).

4.4. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS

Como bien se explicitó previamente, antes de realizar las técnicas que se van a detallar, las yemas a analizar se homogeneizaron con ClNa 5% (p/v). A continuación se listan los componentes tenidos en cuenta para este proyecto, con sus respectivas metodologías. Los protocolos realizados para cada análisis se detallan en el Anexo III. Todos los valores serán expresados en base seca.

- **Composición Proximal:** la metodología analítica empleada fueron las técnicas oficiales de la AOAC (1995) para los componentes mayoritarios: Humedad, Sólidos Totales y Cenizas. Se utilizaron para el proceso de secado e incineración: estufa de secado – esterilización Bioelec, estufa de vacío termoregulable Científica Central S.A. Jacobo Rapoport (Serie 1615-Modelo V) y Mufla Dalvo (modelo H N°2801)
- **Grasas Totales:** se determinaron por extracción de Cloroformo:Metanol (2:1, v/v), basado en el método original de Folch *et al.* (1957).
- **Colesterol:** método colorimétrico, se determinó usando un reactivo comercial para diagnóstico de colesterol (método enzimático) basado en la técnica desarrollada por Pasin *et al.* 1998. El kit utilizado fue producido por la Sociedad de Bioquímicos de Santa Fe, colesterol enzimático 250ml. Se utilizó el espectrofotómetro UV- Vis Metrolab 330 (330-1000nm).
- **Proteínas:** el contenido total fue estimado a partir del método de Kjeldahl (1883) utilizando el factor de conversión 6.25. El método de Lowry utilizado para el ensayo comparativo se basó en Lowry *et al.* 1951. El equipo utilizado para destilación fue BUCHI K-355 (Suiza) (Fig. 7).
- **Minerales:** preparación de muestras según Joslyn (1970). Los iones de Ca, Mg, Fe y Zn se determinaron por absorción atómica y el K por emisión atómica. Se utilizó el espectrofotómetro de llama Perkin Elmer AAnalyst 300 (Fig. 7)



Fig. 7. Técnicas de análisis para componentes de yema en huevos de *Phrynos hilarii*: a-Kjeldahl (proteínas), b-Absorción atómica (Ca, Mg, Fe y Zn)

4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos analizados en esta tesis fueron testeados en cuanto a su normalidad y homocedasticidad. Los test de normalidad fueron realizados con Shapiro-Wilks. Para testear la homocedasticidad se utilizo el test de Levene.

Los análisis descriptivos presentados son: valores de media (\bar{x}) desvío estándar (DE), valores mínimos y máximos (Min-Max), y número de datos (n). Los datos se analizaron con todos los decimales posibles, pero a fin de dar claridad en la lectura solo se mantuvo un decimal en valores mayores o iguales a 0,1 y dos decimales en valores menores a 0,1.

Para las comparaciones de medias se utilizo el test t para variables normales y Mann-Whitney U para variables no paramétricas. La mayoría de las variables se analizaron mediante el test t, excepto cenizas y grasas totales que resultaron no paramétricas al ser discriminadas por estadios. En general los métodos no paramétricos conllevan análisis menos sensitivos, aun asi, este es el mejor test para comparación de medias de muestras independientes.

Se realizo un test ANAVA de dos vías utilizando el rango de semanas y los tratamientos (combinados) como factores para testear el efecto estadístico sobre el peso de los huevos en el transcurso de la incubación.

Las comparaciones de medias entre los componentes y los estadios se hicieron mediante el test de Kruskal Wallis debido a la falta de normalidad de los datos. Del mismo modo se utilizó este análisis para establecer las diferencias en los niveles de componentes según los estadios combinados con los tratamientos.

Las correlaciones para variables normales se obtuvieron con el coeficiente de Pearson y las correlaciones de variables no paramétricas con el coeficiente de Spearman.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa Infostat versión 2012 (Di Rienzo *et al.* 2012).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 VALORES INICIALES

Se colectaron 38 nidos con 544 huevos (algunos de ellos rotos, por lo que no pudieron tomarse los datos iniciales), el número de huevos por nidada fue variable (min-máx.= 7-23, $\bar{x}=13\pm 4$, n=38). Las medidas anatómicas y los pesos correspondientes se detallan en la Tabla 1. Se encontraron diferencias significativas entre nidos en eje 1 (F=14,39, gl=37, p=<0,0001), eje 2 (F=9,43, gl=37, p=<0,0001) y peso (F=21,64, gl=37, p=<0,0001). Se encontraron correlaciones positivas y significativas entre el eje 1 y eje 2 del huevo (n=538, r= 0,53, p=<0,0001), entre el peso del huevo y el eje 1 (n=537, r= 0,84, p=<0,0001), entre el peso del huevo y el eje 2 (n=537, r= 0,75, p=<0,0001). No se encontró correlación entre el peso del huevo y el peso de yema (n=38, Spearman=0,08, p=0,6121). Según los datos de nidos iniciales la yema representa en promedio el 40% del peso del huevo (n=38, sd=8%),.

Tabla 1.

Eje 1, eje 2 y pesos de huevos y yemas de *Phrynops hilarii* al momento de ser llevados al laboratorio (iniciales).

Variables registradas	n	$\bar{x} \pm DE$	Min-Max
Eje 1 (mm)	538	32,5 \pm 1,2	26,4 - 35,8
Eje 2 (mm)	538	32,8 \pm 1,2	27,2 - 36,6
Peso (g)	538	20,9 \pm 2,0	11,0 - 29,8
Peso yema (g)	38	8,4 \pm 1,1	6,4 - 11,5
Índice relativo yema¹	38	0,4 \pm 0,08	0,3 - 0,7
Grado de esfericidad²	38	1,0 \pm 0,03	0,9 - 1,1

¹ Índice relativo de la yema indica la proporción de yema correspondiente al peso del huevo (peso de yema/peso de huevo)

² Grado de esfericidad: eje1/eje2

Saporiti (1960) encontró nidos de *P. hilarii* con un número de huevos que variaron entre 10 y 14 durante colectas realizadas en áreas próximas a Buenos Aires, Argentina. Serrano (1977) identificó una media de 13,4 huevos por nido, en un intervalo de 1 a 20 huevos por nidada en las proximidades de Porto Alegre, Brasil. Astort (1984), también en los alrededores de Buenos Aires, encontró resultados más amplios observando de 8 a 32 huevos por nido pero no cita la media de estos datos. Bager (1997) condujo su estudio en dos localidades del sureste de Brasil, encontró una media de 12,7 huevos por nido (6 a 20 huevos) en una de ellas y una media de 13,1 huevos por nido (6 a 21 huevos) en la otra. Bujes & Verrasto (2009) en una población de Porto Alegre registró una variación de 1 a 23 huevos por nido. Si bien nuestros resultados en cuanto al número de huevos (mín-máx.= 7-23, $\bar{x}=13\pm 4$) se encuentran dentro de los rangos generales encontrados para esta especie en casi toda su distribución, coinciden particularmente con los datos publicados por Bager (1997), superponiéndose casi de manera exacta tanto los rangos de números de huevos encontrados como la media de huevos por nido.

Respecto al tamaño y forma de los huevos, existe una gran variabilidad entre los reptiles (Iverson & Ewert 1991). Entre las tortugas el rango de variación en tamaño va desde los más pequeños de *Sternotherus adoratus* de 23,6x13,5 mm con 2,6 g de peso (Gross 1982) hasta los más grandes de *Geochelone elephantopus* de 59,7x55,2 mm y 106,9 g de peso (Shaw 1966), y pueden ser esféricos o alargados. Los resultados de los análisis de estadística descriptiva en los huevos de *P. hilarii* evidenciaron poca variación en la medida de los huevos (Tabla 2). Los datos presentados para esta especie se encuentran en la mitad del rango de tamaño para los reptiles y son esferas casi perfectas. A pesar del gran número de huevos registrados (n=538) solo tres (0,56%) presentaron anomalías en cuanto a su forma (ovalados).

Los datos registrados para este trabajo son próximos a los descriptos en otros trabajos realizados con *P. hilarii* tanto en Brasil como en Argentina. Bager (1997) establece dos rangos de medidas y pesos para sus huevos en dos estaciones de muestreo en el sureste de Brasil, Estación Lagoa Verde ($\bar{x}=19,4$, SD=2,06, mín-máx.=13,2-24,4) y estación ecológica do Taim ($\bar{x}=19$, SD=1,4, mín-máx.= 16,1-22,4) y también encuentra un porcentaje mínimo de huevos con anormalidades (0,36%). Cabrera (1998) que analiza huevos de *P. hilarii* para toda su distribución describe los huevos como esféricos, lisos y

de cáscara dura, y los diámetros varían entre 27-37mm. Bujes & Verrastro (2009) también describen los huevos de *P. hilarii* esféricos, lisos y calcáreos y respecto del tamaño presentan valores un poco mayores (eje mayor: 30,9-37mm, eje menor: 30,1-37,4). Los valores registrados en este trabajo (Tabla 2) son mas coincidentes con los valores de Cabrera (1998) y la estación de muestreo Lagoa Verde de Bager (1997), ya que los huevos de las poblaciones brasileras descritas por Bujes y Verrastro (2009) y los medidos por Bager en la estación ecológica do Taim son de mayor tamaño. Esto puede ser atribuible al tamaño y edad cronológica de la hembra (CITA), sin embargo estas variables no se tuvieron en cuenta para este trabajo.

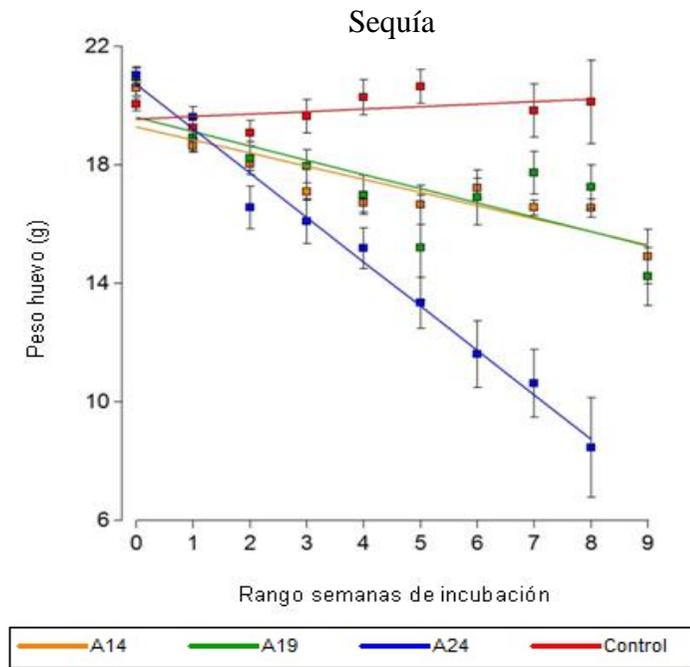
La proporción en peso representada por la yema en el peso total del huevo fue del 40%. A pesar de la fracción de peso representada por la yema, no existió correlación significativa entre el peso del huevo y el peso de la yema ($n= 38$, $P= 0,20$, $p= 0,2883$). No hay otros trabajos donde se describa esta relación para huevos de *P. hilarii*, pero Thompson *et al.* (1999) encontraron en *Emydura macquarii* (Chelidae) una proporción menor (27%), aunque no queda claro de donde proviene este dato. En otras especies no pertenecientes a Chelidae la proporción de yema, en general, es más alta y varía entre 46,8% (*Dermochelys coriacea*, Dermochelyidae) y 58,4% (*Lepidochelys olivacea*, Cheloniidae) (Hewavisenthi & Parmenter 2001), aunque Wallace *et al.* (2006) registra un valor de 33% en *Dermochelys coriacea*, dando cuenta de la variabilidad que puede presentarse en este componente del huevo. Las proporciones relativas de yema y albumen en los huevos difieren de acuerdo a varios factores que reflejan diferencias en sus historias evolutivas y tienen impactos importantes en el desarrollo embrionario a través de los taxones (Deeming 1991, Wallace *et al.* 2006). Las características de los huevos no solo reflejan patrones de recursos maternos asignados sino que además están influenciados por las condiciones del ambiente circundante al nido en que se desarrollan los embriones y del cual emergen los pichones (Wallace *et al.* 2006). Según Wallace *et al.* (2006) las tortugas acuáticas marinas tienen aproximadamente la misma proporción de yema que de albumen, mientras que las otras tortugas tendrían mayor proporción de yema que de albumen, pero esta generalización está basada en comparación a una especie terrestre *Terrapene ornata*, una especie terrestre, con los datos del trabajo de Finkler & Claussen (1997). Si bien, en este trabajo no se tuvo en cuenta el contenido de albumen, de acuerdo a la cantidad de

yema encontrada podemos sugerir que *P. hilarii*, especie de agua dulce, se relacionaría con las especies marinas.

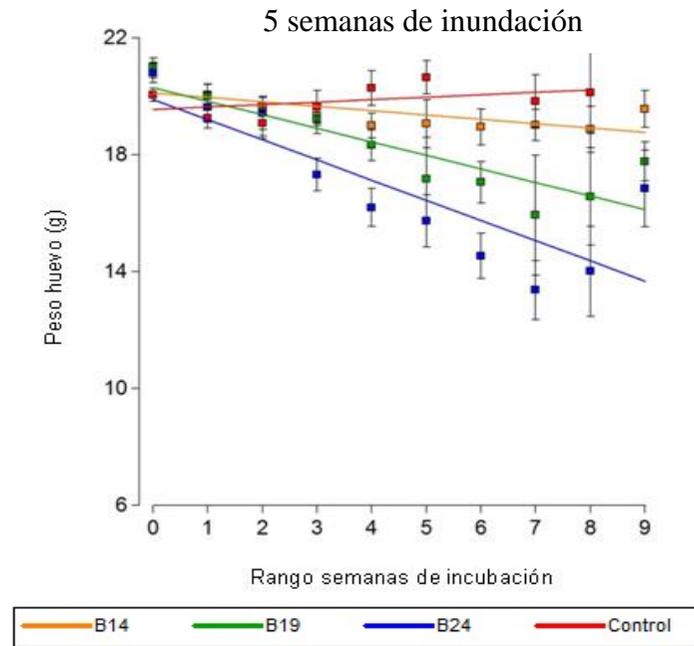
5.2. CAMBIOS EN EL PESO DE LOS HUEVOS DURANTE LA INCUBACIÓN

Los huevos presentaron cambios en su peso durante el transcurso de la incubación (Fig. 8 a-c). Los cambios en el peso de los huevos variaron significativamente en todos los rangos de semanas: rango 1 ($p=0,0259$), rango 2 ($p=<0,0001$), rango 3 ($p=0,0259$), rango 4 ($p=<0,0001$), rango 5 ($p=0,0001$), rango 6 ($p=<0,0001$), rango 7 ($p=<0,0001$), rango 8 ($p=0,0033$) y rango 9 ($p=0,0347$), excepto en los datos tomados inicialmente en el rango 0 ($p=0,1369$). En el Anexo IV, tablas a-j, se detallan específicamente las diferencias de peso entre tratamientos de acuerdo a los rangos de semanas analizados.

a-



b-



c-

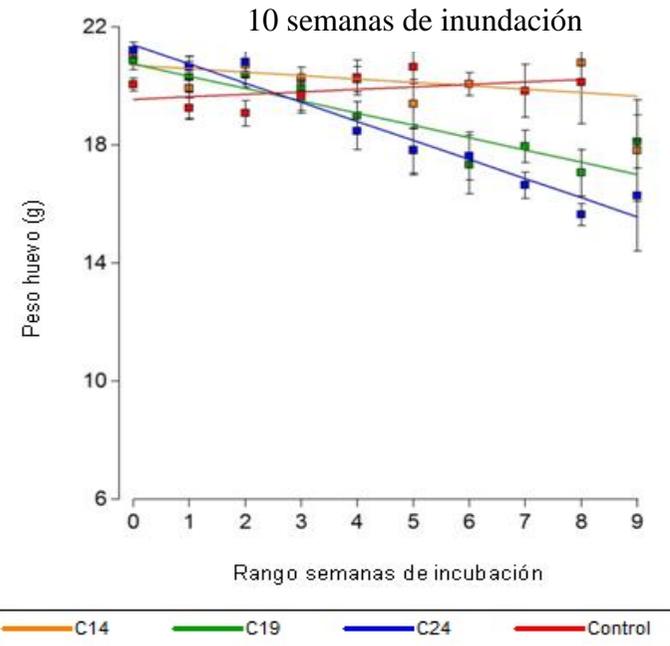


Fig. 8. Cambio de peso en los nidos de tratamientos y nidos testigo. a- Peso tratamientos A (sequía) y testigo, b- Peso tratamientos B (5 semanas de inundación) y testigo, y c- Peso tratamientos C (10 semanas de inundación) y control. **0** (semana inicial), **1** (4-7 semanas, se retiran del agua huevos del tratamiento B), **2** (9-12 semanas, se retiran del agua huevos del tratamiento C), **3** (13-16 semanas), **4** (17-19 semanas), **5** (21-23 semanas), **6** (24-26 semanas), **7** (30-32 semanas), **8** (38-42 semanas) y **9** (52-54 semanas).

Dentro de los huevos sometidos a los distintos experimentos, aquellos que expuestos a la temperatura más alta (24°C), tuvieron una mayor tasa de pérdida de peso, mientras que los de temperaturas intermedia (19°C) y mínima (14°C) se mantuvieron dentro de los valores iniciales desde el principio al final de la incubación (ver Fig. 8 a-c). En los nidos testigo, donde las temperaturas y humedad experimentadas variaron durante el transcurso de la incubación, la variación en peso fue la mínima registrada para este estudio. Asumiendo que los cambios en el peso son consecuencia de una pérdida de humedad (Vleck 1991, Finkler *et al.* 2002), hay una tendencia clara en los huevos de *Phrynops hilarii* a perder agua durante la incubación independientemente de las condiciones a las que son sometidos (ver Fig. 8 a-c). Existe una relación directa entre la temperatura de incubación y la tasa de pérdida de agua, es decir, cambios en el ambiente inmediato de los huevos, en este caso la temperatura, pueden desencadenar patrones de intercambio de agua (Vleck 1991).

Si bien los huevos de *P. hilarii* se caracterizan por una cáscara rígida y escasa porosidad (Cabrera 1998), el ambiente de aquellos sometidos a altas temperaturas los afectó notablemente, principalmente a aquellos expuestos a condiciones de sequia. La mayor influencia observada fue en relación a la temperatura y la pérdida de peso por evaporación de agua. A mayor temperatura, mayor pérdida de peso en menor tiempo. No se evidenció una marcada absorción de agua en aquellos huevos sometidos a condiciones de inundación.

Nuestros resultados coinciden con algunos autores que evaluaron la influencia del ambiente circundante a los nidos, con el peso de los huevos. Packard *et al.* (1982) en sus ensayos de laboratorio con nidos de *Emydoidea blandingii* (Emydidae), sometidos a distintos patrones de humedad, concluyeron que los huevos incubados en sustratos secos disminuyeron considerablemente su peso durante la incubación, mientras que aquellos en sustratos húmedos o intermedios solo disminuyeron levemente su peso. Cagle *et al.* (1993) midieron la temperatura y el potencial hídrico en nidos naturales de *Chrysemys picta* (Emydidae) y encontraron que el intercambio neto de peso en agua en los huevos estaba altamente correlacionado con el potencial hídrico de los nidos. Packard (1999) describe los efectos de el exceso o la falta de humedad ambiental en huevos de varias especies de quelonios, tanto con cáscara blanda como rígida y concluye que, en efecto, el intercambio de agua entre el ambiente subterráneo y el huevo de la tortuga están influenciados por tres

factores principales: 1-la estructura calcárea de la cáscara, 2-el potencial de agua y temperatura del nido, y 3-la fracción de la cáscara que está en contacto con el sustrato. Si bien, establece que los aquellos huevos de cáscaras rígidas permanecen sin ser afectados por los ambientes húmedos o secos, como así también el peso de los pichones al momento de la eclosión, esta condición puede verse afectada en condiciones extremas (Leshem & Dmi'el, 1986, Packard 1999). Mullins & Janzen (2006), incubaron huevos de *Apalone mutica* (Tryonichidae) con seis temperaturas distintas pero con humedad constante, a pesar de la diferencia de temperaturas entre los ensayos los huevos de esta especie no experimentaron cambios notables, probablemente debido a la falta de un potencial hídrico a uno y otro lado de la cáscara. Zhao *et al.* (2013) tuvieron como objetivo determinar la influencia de ambientes secos y húmedos en la incubación de huevos de cáscara rígida de *Pelodiscus sinensis* (Tryonichidae), aquellos huevos incubados en condiciones consideradas de sequia perdieron peso significativamente a diferencia de aquellos en condiciones de humedad, concluyendo que la pérdida de agua de los huevos se incrementa a medida que desciende la humedad del sustrato. Las variaciones en el contenido de humedad dentro del huevo no solo puede influir en el peso del huevo, sino que repercutiría en el desarrollo embrionario.

La influencia de la disponibilidad de agua en el crecimiento de los embriones en especies ovíparas es determinante para entender aspectos primordiales del desarrollo como patrones de crecimiento, duración de la incubación, etc. El incremento en la disponibilidad de agua dentro del huevo durante la incubación parecería aumentar la tasa de movilización de nutrientes desde la yema y su consecuente asimilación en los tejidos (Packard 1991), también incrementaría el contenido de agua contenida dentro del cuerpo del embrión (Finkler 1997) y prolongaría el período de incubación de tal manera que una mayor cantidad de los contenidos del huevo sean utilizados por el embrión (Miller & Packard 1992). En la siguiente sección se realiza un análisis más detallado acerca de la influencia de los factores ambientales en el desarrollo embrionario de *P. hiliarii*.

5.3 DESARROLLO EMBRIONARIO

5.3.1 ESTADIOS DE DESARROLLO VS TRATAMIENTOS

Los embriones alcanzaron diferentes estadios de desarrollo de acuerdo a los tratamientos a los que fueron sometidos (Tabla 2). Los tratamientos correspondientes a la temperatura más baja (14°C) inhibieron el desarrollo independientemente del grado de humedad y el embrión no superó el estadio de disco embrionario. Una temperatura promedio más alta y constante favoreció el desarrollo de embriones hasta estadios avanzados, independientemente de las condiciones de humedad. Los huevos en condiciones naturales (testigo), fueron los únicos que presentaron embriones eclosionados. Las eclosiones de los huevos de nidos testigo en ambos años sucedieron 7-10 días después del pico máximo de las precipitaciones estivales (fig. 3a-b).

Tabla 2.

Tabla de porcentajes acumulativos de estadios alcanzados por los embriones de huevos incubados en el laboratorio (tratamientos) y en la naturaleza (nidos testigo)

Estadios ²	TRATAMIENTOS ¹									TESTIGO n=48
	14°C			19°C			24°C			
	A n ³ =48	B n=45	C n=47	A n=48	B n=48	C n=48	A n=49	B n=48	C n=46	
1	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
2	18,8% (9) ⁴	26,7% (12)	21,3% (10)	43,8% (21)	33,3% (16)	14,6% (7)	28,6% (14)	52,1% (25)	43,5% (20)	83,6% (40)
3	-	-	-	33,3% (16)	16,7% (8)	6,3% (3)	22,4% (11)	47,9% (23)	37,0% (17)	59,2% (28)
4	-	-	-	2,1% (1)	2,1% (1)	2,1% (1)	10,2% (5)	43,8% (21)	34,8% (16)	55,1% (26)
5	-	-	-	-	-	-	2,0% (1)	18,8% (9)	10,9% (5)	49,0% (23)
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	49,0% (23)

¹ Tratamientos: **A** huevos sometidos a sequía durante toda la incubación, **B** huevos sometidos a 5 semanas de inundación al comienzo de la incubación y **C** huevos sometidos a 10 semanas de inundación al comienzo de la incubación

² Estadios: **1- Inicial** (inicio de incubaciones), **2-Disco Embrionario** (diapausa secundaria), **3-Primordios Cardiacos** (embriones de estadios 5-8, ruptura de diapausa), **4-Desarrollo Intermedio** (embriones de estadios 9-23), **5-Desarrollo Avanzado** (embriones de estadios 24-25) y **6-Eclosión** (embriones que lograron eclosionar, estadio 26).

³ n en la parte superior de la tabla se refiere al número de huevos iniciales por tratamiento.

⁴ Entre paréntesis, n correspondiente a cada porcentaje.

En condiciones de laboratorio, fue evidente que la temperatura condicionó la ruptura de diapausa en embriones de *P. hilarii*. Si una temperatura baja (14°C) se prolongara excesivamente en el tiempo, independientemente del grado de humedad de sustrato, los embriones de *P. hilarii* no podrían continuar su desarrollo (Tabla 4, columnas A14-B14-C14). En los tratamientos con temperaturas intermedia (19°C) y alta (24°C), la saturación del sustrato durante las primeras semanas de desarrollo no parece afectar la capacidad de los embriones para romper la diapausa, ya que tanto en condiciones de sequía (A) como de saturación de sustrato (B-C) se pudo observar el paso de disco embrionario (diapausa) a primordios cardíacos (ruptura de diapausa).

Por otro lado, estos resultados evidencian que la humedad no afectaría la ruptura de la diapausa a 19°C, pero sí influiría en el progreso del desarrollo a esta temperatura. Los embriones que mayor éxito presentaron en su desarrollo fueron aquellos que no tuvieron aporte de humedad durante el período inicial (A), seguido de aquellos que permanecieron las primeras cinco semanas bajo el agua (B) y, por último, los que fueron sometidos a 10 semanas de inundación (C). En condiciones naturales, las hembras realizan las posturas durante el otoño, estación húmeda con temperatura promedio 19°C, pero al llegar el invierno las precipitaciones y temperatura disminuyen dando lugar a una estación más seca y fría. Hacia fines del invierno la temperatura comienza a aumentar y las precipitaciones también, y es en este momento (temperatura en ascenso y bajas precipitaciones) donde en la naturaleza los embriones recomenzarían el desarrollo normal dejando atrás la etapa de diapausa. Sin embargo, una temperatura promedio (19°C) prolongada en el tiempo parece afectar la llegada a estadios intermedios y superiores de los embriones, independientemente de la saturación inicial del sustrato (A19-B19-C19). El número de embriones en desarrollo de estos tratamientos disminuyeron notablemente con el paso de las semanas, hasta llegar todos al mismo porcentaje de embriones en estadios intermedios sin lograr pasar a estadios pre eclosionales.

Los huevos incubados a 24°C (temperatura estival) presentaron un comportamiento diferente: los embriones que mayor éxito tuvieron en su desarrollo fueron aquellos sometidos a una inundación de cinco semanas promedio (B) al comienzo de su desarrollo, seguidos por aquellos que permanecieron promedio 10 semanas bajo el agua (C) y, por último, los que menor éxito presentaron en su desarrollo fueron aquellos que

permanecieron en condiciones de sequía (A). Esto coincide parcialmente con lo encontrado por Fordham *et al.* (2006) en *Ch. rugosa*, cuyo trabajo establece una duración de inundación óptima de 6 semanas y los embriones cuyos huevos permanecieron 7 semanas bajo el agua completaron el desarrollo en menor tiempo que aquellos depositados en la tierra seca.

Los huevos de tortugas que quedan sumergidos presentan dos “inconvenientes”: 1- sobrevivir a condiciones de hipoxia y 2- evitar el exceso de agua interna que puede ingresar por la diferencia de gradiente osmótico (Kennet *et al.* 1993). Los embriones de tortugas pueden estar pre adaptados a condiciones de hipoxia después de ser depositados en el nido (diapausa secundaria) debido a que el desarrollo embrionario es detenido dentro de los oviductos en el estadio de gástrula tardía (Yntema 1968), esta condición pre oviposicional de hipoxia estaría relacionada con el origen de la diapausa primaria (Ewert 1985). El exceso de absorción de agua en huevos de tortuga incubados en condiciones de humedad o inundación pueden causar ahogamiento de los embriones, ruptura de la cáscara o de las membranas internas con la consecuente muerte del embrión (Ewert 1985, Kennet *et al.* 1993).

Kennet *et al.* (1993) y Fordham *et al.* (2006), trabajaron con *Chelodina rugosa* que presenta un proceso de desarrollo similar a *P. hiliarii*. Esta especie deposita sus huevos en un ambiente con pantanos y humedales efímeros del norte de Australia, esta área presenta marcadas diferencias entre las estaciones seca y húmeda. Las hembras depositan sus huevos en suelos saturados y permanecen sumergidos durante un tiempo hasta la llegada de la estación seca, similar a *P. hiliarii* en nuestra área de estudio. Ambos trabajos resaltan la evolución en los huevos de *C. rugosa* que soportan la sumersión inmediatamente después de la oviposición para permitir el anidamiento en suelos saturados o totalmente inundados. De este modo, pareciera que dentro del plan de desarrollo embrionario de *C. rugosa* está permitido un período de anidación más prolongado ante la incapacidad de predecir el momento exacto de la transición entre las temporada húmeda (hipoxia de los huevos) y seca (huevos no sumergidos, no hipóxicos). Cuando el suelo eventualmente se seca y el oxígeno alcanza los huevos, las condiciones se vuelven adecuadas para la incubación y el desarrollo procede normalmente. Kennet *et al.* (1993) inicialmente comprueban que los huevos de *C. rugosa* pueden soportar hasta 12 semanas de inundación.

Fordham *et al.* (2006), aumentan las semanas de inundación de los nidos y comprueban que *C. rugosa* puede extender las condiciones de hipoxia de sus huevos hasta 25 semanas, aunque con un incremento de la mortalidad a medida que transcurren las semanas (de 38% con 6 semanas de inundación a 65% luego de 25 semanas de inundación). Por último, concluye que un período de inundación es esencial para una supervivencia óptima de los embriones de esta especie. Este mecanismo es muy similar al que observamos en *P. hilarii* en nuestra zona de estudio.

Debido a que los huevos de *P. hilarii* son depositados en zonas cercanas a sistemas hídricos regulados por pulsos de inundación, es factible que en años de crecientes extraordinarias muchos de los nidos queden sumergidos durante un período prolongado, como también pueden sufrir largos períodos de sequía debido a fenómenos climáticos tales como el Niño y la Niña. Por lo tanto, es factible que esta especie haya desarrollado la suficiente plasticidad para hacer frente a estos extremos ambientales y, a pesar de no cumplirse las condiciones óptimas para su desarrollo embrionario, la progenie puede sobrevivir dentro de ciertos límites temporales a esas condiciones extremas. Tal como se informa en Bates *et al.* (2008), en los tres últimos decenios, América Latina ha estado sometida a distintos impactos en relación con el clima, algunos de ellos vinculados a los episodios de ENOA (El Niño-Oscilación Austral). Los principales cambios se refieren a un aumento de la frecuencia de extremos climáticos tales como crecidas, sequías o deslizamientos de tierra (por ejemplo, las intensas precipitaciones de Venezuela (1999 y 2005); la inundación de la Pampa argentina (2000 y 2002), la sequía del Amazonas (2005), etc.). También ha ido en aumento el estrés respecto a la disponibilidad del agua: diversas sequías relacionadas con La Niña restringieron gravemente el abastecimiento de agua y la demanda de agua de riego en la parte central y occidental de Argentina y en el centro de Chile. Sequías relacionadas con El Niño hicieron disminuir el caudal del río Cauca, en Colombia. Se han observado aumentos de la precipitación en el sur de Brasil, Paraguay, Uruguay, nordeste de Argentina (Pampas), y partes de Bolivia, noroeste de Perú, Ecuador y noroeste de México. El aumento de la precipitación incrementó en un 10% la frecuencia de crecida en el río Amazonas a la altura de Obidos, y en un 50% el caudal de los ríos de Uruguay, del Paraná y del Paraguay. Se ha observado también en la región un aumento en cuanto a episodios de precipitación intensa y días secos. De acuerdo a este documento, son pocos los estudios que evalúan los efectos del cambio climático sobre la diversidad

biológica, y en todos ellos es difícil diferenciar los efectos debidos al cambio climático de los inducidos por otros factores. Es de esperar que aquellas especies estrechamente relacionadas con los factores abióticos de los ecosistemas (por ej: anfibios, reptiles) sean más vulnerables a estos cambios climáticos.

Los resultados obtenidos hasta aquí coinciden con lo observado en la naturaleza en cuanto a la estrecha relación entre esta especie dulceacuícola y los pulsos de crecientes y bajantes del río. Los huevos son ovipositados en una estación húmeda y con temperatura promedio, a principios de otoño (marzo-abril) con temperaturas que oscilan alrededor de los 19°C, luego en invierno (junio-julio) descendieron en algunos períodos a 14-15°C y las precipitaciones registradas en general son las mínimas para el área de estudio. En agosto las temperaturas comienzan a ascender dando lugar a temperaturas primaverales y estivales que influyen positivamente en el desarrollo de estos embriones, finalmente los picos máximos de temperatura y humedad para la zona se producen en el momento de la eclosión de los pichones. Con base en estos ensayos se puede predecir que si durante el otoño, en las primeras semanas de desarrollo, una creciente extraordinaria se prolongara demasiado y los huevos quedaran sumergidos por un largo período sometiendo a los embriones a una hipoxia fuera del rango permitido para su especie, la capacidad de desarrollo de los embriones se vería disminuida significativamente y la probabilidad de alcanzar estadios pre eclosionales sería mínima.

Si bien la saturación de sustrato no sería condicionante para la ruptura de diapausa, ya que como se observó en la tabla 2, tanto los huevos sometidos a sequía como los incubados con saturación de sustrato durante cinco o 10 semanas a 19°C y 24°C rompieron la diapausa. Cabe destacar que esta variable si parece ser esencial para la eclosión de los neonatos. En el caso de los tratamientos, ninguno de los embriones eclosionó, ya que no recibieron un aporte suplementario de agua en las etapas finales de desarrollo. En cambio, los embriones de los nidos testigo experimentaron abundantes precipitaciones 7-10 días previos al momento de la eclosión, presentaron un gran porcentaje de nacimientos (Tabla 2).

5.3.2 PERÍODOS DE INCUBACIÓN

A continuación (Tabla 3) se describen los períodos, en rangos de semanas, que les tomo a los embriones llegar a un estadio de desarrollo determinado tanto en condiciones artificiales (tratamientos) como naturales (nidos testigo). Los huevos de los tratamientos con menor temperatura (14°C) no rompieron la diapausa durante toda la incubación permaneciendo en el estadio disco embrionario. Los huevos que permanecieron 10 semanas sumergidos durante las primeras semanas de desarrollo (C14), se mantuvieron viables hasta un máximo de 25 semanas. La baja temperatura y la prolongada inundación prolongo la diapausa, pero al no ascender la temperatura los huevos indefectiblemente perdieron la viabilidad. Únicamente los huevos de tratamientos con mayor temperatura (24°C) y los de nidos testigo presentaron estadios de pre eclosión (estadios 24-25). Los únicos embriones que eclosionaron fueron aquellos de huevos incubados en condiciones naturales (nidos testigo). A 24°C el desarrollo se produjo más rápido, rompiendo la diapausa y llegando a estadios superiores en menos tiempo que el resto de los tratamientos y los nidos testigo.

La máxima duración de diapausa embrionaria se produjo en los tratamientos que presentaron alguna condición extrema en los factores impuestos. Los huevos sometidos a una inundación de 10 semanas con una temperatura de 14°C prolongaron la diapausa hasta 25 semanas (rango 6); si bien la mayoría de los huevos en los experimentos a temperaturas mayores (19°C y 24°C) y en condición de sequia se desarrollaron más o menos tempranamente, algunos permanecieron en diapausa hasta 23 semanas (rango 5). En condiciones naturales, la duración máxima de la diapausa se extiende hasta 15 semanas (rango 3), coincidiendo con el final del mes de agosto.

Tabla 3.

Estadios de desarrollo alcanzado por los embriones de *Phrynops hilarii* por tratamiento y en nidos control de acuerdo a las semanas de incubación.

Rango Semanas de incubación ³	TRATAMIENTOS ¹									TESTIGO ²
	14°C			19°C			24°C			
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	
1	DE ⁴	DE	DE	DE	DE	ne ⁵	DE PC	PC	DE	DE
2	DE	DE	DE	DE PC	DE	DE	PC DI	DE DI	DE	DE
3	DE	DE	DE	DE	DE	DE	DI	DI	DI	DE
4	DE	DE	DE	PC	DE	ne	DE DI	DI	DI	ne
5	ne	DE	ne	DE	ne	PC	DE PC DA	PC DI	PC DI	PC
6	ne	ne	DE	PC	PC	PC	DI	DI	DI	sd ⁶
7	ne	ne	ne	PC	PC	DI	DA	DI DA	DI DA	DI E
8	ne	ne	ne	PC	ne	ne	ne	DI	DI DA	DI
9	ne	ne	ne	PC DI	PC DI	ne	ne	DI DA	DI DA	E

¹Tratamientos: **A** huevos sometidos a sequía durante toda la incubación, **B** huevos sometidos a 5 semanas de inundación al comienzo de la incubación y **C** huevos sometidos a 10 semanas de inundación al comienzo de la incubación.

²Testigo: huevos incubados a temperatura y humedad ambiente, en condiciones naturales, no expuestos a tratamiento.

³Rango de semanas de incubación: **1** (4-7 semanas, se retiran del agua los huevos del tratamiento B), **2** (9-12 semanas, se retiran del agua los huevos del tratamiento C), **3** (13-16 semanas), **4** (17-19 semanas), **5** (21-23 semanas), **6** (24-26 semanas), **7** (30-32 semanas), **8** (38-42 semanas) y **9** (52-54 semanas).

⁴ Estadios: **DE**: Disco Embrionario, **PC**: Primordios Cardiacos, **DI**: Desarrollo Embrionario, **DA**: Desarrollo Avanzado, **E**: Eclosión,

⁵ne: No Embrionado,

⁶sd: Sin Datos (en este periodo no se sacaron muestras debido a la escasa cantidad de huevos que quedaban en los nidos testigo, se priorizó la continuidad del desarrollo de los embriones remanentes).

La muestra en cada caso fue de dos a cuatro (2-4) huevos extraídos por cada rango de semanas por tratamiento.

Es interesante remarcar la capacidad de los huevos de *Phrynos hylarii* de sobrevivir hasta 12 semanas de inundación (alrededor de 3 meses) y luego de que el agua se retira, continuar el desarrollo hasta estadios pre-eclosionales (C24) (observado y comprobado en los experimentos de esta tesis). Kennet *et al.* (1993, 1998) demostraron que huevos de *Chelodina rugosa* que podían permanecer 10-12 semanas sumergidos sin perder viabilidad; más tarde, Fordham *et al.* (2006) incrementaron el período de inundación en sus ensayos con huevos de *C. rugosa* hasta 25 semanas y comprobaron que los embriones podían sobrevivir ese tiempo, aunque hubo un aumento de la mortalidad.

La duración de la incubación en los huevos de *P. hylarii* estuvo influenciada por la temperatura, alcanzando estadios avanzados en menor tiempo cuanto más alta y constante fue la temperatura. En condiciones variables (nidos testigo en condiciones naturales) el desarrollo fue más lento pero fueron los únicos que lograron eclosionar. Tomando los tratamientos en sequia (A) se puede observar claramente que cuando la temperatura es alta y constante (24°C) la tasa de desarrollo es mayor, apareciendo estadios avanzados en menor tiempo. Esto se debería a que la pérdida de agua por evaporación en estos tratamientos aceleraría el desarrollo embrionario por un aumento en el metabolismo y para aprovechar al máximo los nutrientes disponibles que en el caso del agua van en disminución. En el caso de los tratamientos que experimentaron inundación, también se ve una clara diferencia entre los huevos incubados a temperaturas altas con aquellos incubados a temperaturas intermedias (19°C), desarrollándose en menor tiempo los que experimentaron temperaturas más altas y con un corto período de saturación del sustrato (B24).

Las condiciones ambientales que experimenta el nido las primeras semanas de incubación son esenciales para el futuro desarrollo del embrión (Packard & Packard 1988). Por ejemplo, cuando la temperatura fue alta y constante (experimentos 24°C), la humedad no fue un condicionante para la ruptura de la diapausa, como se puede observar en las columnas A24, B24 y C24. A la misma temperatura con dos condiciones de humedad diferentes (sequia e inundación) encontré tanto disco embrionario (diapausa) como primordios cardíacos (ruptura de diapausa). Esto podría relacionarse con la estructura de la cáscara del huevo de esta especie y su relativa permeabilidad, que en las primeras semanas de desarrollo actúa como una barrera ante las condiciones ambientales externas. Los

efectos de las condiciones extremas a que son sometidos se observan en semanas posteriores al prolongarse las condiciones de sequía particularmente.

La cáscara de reptiles está compuesta por unidades de envoltura individuales unidas por una membrana subyacente (Packard 1999). En los Chelidae estas unidades de envoltura son relativamente altas y están en contacto entre sí, confiriendo de este modo mayor rigidez a la cáscara (Hirsch 1983, Packard *et al.* 1982, Packard & Hirsch 1986). A su vez, este tipo de cáscara rígida está penetrada por escasos poros (Packard 1999). Los huevos que presentan esta estructura, en general, no son afectados por la humedad del ambiente que rodea al huevo (Packard 1999). Las reservas de agua están bien aisladas, por lo que las variaciones temporales y espaciales en el ambiente circundante al nido no influirían apreciablemente en la disponibilidad de agua para los embriones en desarrollo excepto en condiciones extremas (Leshem & Dmi'el 1986, Packard 1999). En este estudio, los huevos comienzan en todos los experimentos con un peso similar y, según el tratamiento al que están sometidos, van perdiendo más o menos humedad en el tiempo y a una tasa diferente (Fig. 8 a-c). La pérdida de agua es más evidente hacia el final de la incubación, esta característica también fue observada para huevos de *Chelonia mydas*, *Caretta caretta* y *Natator depressus* tanto en laboratorio como en la naturaleza (Bustard & Greenham 1968, Kraemer & Richardson 1979, Hewavisenthi & Parmenter 2001). La disponibilidad de agua en los huevos durante las primeras semanas de desarrollo (rangos 1 y 2) es similar en los tres tratamientos, por lo que la falta o exceso de humedad no influiría notablemente en el desarrollo, pero una temperatura alta y constante sí favorecería el desarrollo en tiempos más cortos que aquellos en las mismas condiciones pero a temperatura más bajas (19°C). Sin embargo, cuando la temperatura fue constante pero intermedia (19°C), la ruptura de la diapausa en las primeras semanas de incubación solo se produjo con ausencia de humedad. Para esta temperatura, la ruptura de la diapausa en aquellos huevos sometidos a condiciones de saturación de sustrato fue observada luego de 23 semanas en los que permanecieron sumergidos durante 10 semanas inicialmente (C19).

Como se detalló previamente, el contenido de agua inicial dentro del huevo fue similar para todos los nidos (pesos iniciales similares), al tratarse de un huevo de cáscara rígida las primeras semanas de desarrollo no se vieron afectadas por los tratamientos y por esta razón los huevos en condiciones de sequía (A19) pudieron romper la diapausa. El suelo de la

zona de estudio donde las hembras depositan sus huevos en el inicio del otoño posee una elevada humedad relativa tanto por las elevadas precipitaciones de esa época del año como por los pulsos de los ríos que eventualmente sufre crecientes ordinarias o verdaderas inundaciones durante esta temporada y esto inevitablemente repercute en los ciclos de vida de las especies que habitan en este ambiente, por lo que no solo debe tenerse en cuenta la humedad debido a las altas precipitaciones, sino que puede producirse en algunos casos el anegamiento total de los sitios de anidamiento por tiempo prolongado. Por esta razón los embriones de *P. hilarii* tendrían la capacidad de soportar alrededor de 10 semanas de inundación y luego reanudar el desarrollo. Lo interesante de este resultado es la capacidad de esta especie para proseguir su desarrollo a pesar de experimentar una temperatura tan “baja” para una tortuga, cuando en general los experimentos para este grupo se diseñan a partir de los 22°C (por ejemplo: *P. hilarii*, Bujes & Verrastro 2009, *P. hilarii*, Piña & Argañaraz 2003, *P. geoffroanus*, Lisboa *et al.* 2004). Sin embargo, Piña & Argañaraz (2003) a través de una extrapolación de sus datos establecen que esta especie podría conservar viabilidad hasta los 4°C, pero no ofrecen datos de un experimento que confirme esta afirmación. Deeming & Ferguson (1991) aseguran que la temperatura de incubación de reptiles ovíparos es relativamente lábil, por lo tanto, patrones normales de desarrollo en embriones individuales pueden derivar en una amplia gama de temperaturas en las que el desarrollo puede proceder con normalidad.

En los nidos en condiciones naturales (testigo), durante el período 2011 la temperatura se mantuvo relativamente constante a lo largo de todo el período de incubación y no se produjo el anegamiento de los nidos, es decir, estos nidos no sufrieron una inundación pero si experimentaron las altas precipitaciones correspondientes a esta estación del año. En la figura 3a podemos observar que la temperatura en las estaciones de otoño e invierno osciló alrededor de los 19°C, con el mínimo (18,8°C) en abril-mayo; luego comienza a elevarse en agosto para alcanzar su pico máximo en noviembre (20,5°C). A diferencia de esto, las precipitaciones variaron ampliamente a lo largo de los meses, siendo extremadamente bajas en setiembre (8,4mm) y presentando el valor máximo en febrero de 2012 con 232,7 mm. A principios de marzo de 2012 se registraron todas las eclosiones para este período.

En 2012, a diferencia de 2011, la temperatura fue marcadamente estacional y tampoco se produjo el anegamiento de los nidos. En la figura 3b se observa que los valores mínimos

de temperatura se registraron en abril y mayo (otoño) con 18,9°C, esto coincide con el período anterior, y el pico máximo fue en diciembre (verano) con 23,9°C. Al igual que en 2011, las precipitaciones oscilaron ampliamente con un mínimo de 7,6mm en julio y alcanzando su nivel máximo en diciembre (256,9mm). Al igual que en el período anterior las eclosiones se registraron coincidentemente con el momento de mayor precipitación, pero en este caso fueron en el mes de diciembre.

En este estudio se observó que el período de incubación de los huevos que lograron eclosionar en la naturaleza fue de 294 a 357 días, los valores menores se registraron para 2012 y los mayores para 2011. El período de incubación en la naturaleza descrito por Bager (1997) para *P. hylarii* va desde 156 a 170 días, coincidiendo en su mayor parte con Bujes & Verrastro (2009) registraron un período de incubación de 157-271 días en condiciones naturales y de 130-191 días en condiciones artificiales, aunque no especifican las temperaturas de incubación de estos últimos. Ambos estudios se realizaron en Rio Grande do Sul, Brasil, donde la variación termal es acotada a temperaturas relativamente altas: 21,7-25,9°C en el primero y 23,4-25,3°C en el segundo, mientras que el rango de temperaturas para la zona de estudio de este trabajo fue de 13,8-22,8°C. En el presente trabajo, se observa en los huevos de los nidos testigo (Tabla 3) que hasta el rango 3 de semanas tenidas en cuenta para este trabajo (13 a 16 semanas, fines de agosto, invierno), cuando la temperatura empieza a elevarse con la inminente llegada de la primavera, los embriones permanecen en disco embrionario. Este período de detenimiento o enlentecimiento del desarrollo son la prueba de la existencia de diapausa en *P. hylarii* durante los meses fríos de esta zona de estudio. La relación inversa entre la temperatura y el período de incubación puede estar asociada a que, al tratarse de individuos ectotermos, un aumento de temperatura se traduciría en un incremento de la tasa metabólica, lo que daría como resultado un crecimiento acelerado de los embriones y un tiempo menor para su desarrollo (Zug *et al.* 2001, Piña & Argañaraz 2003)

Si observamos las gráficas en las figuras 3a y 3b, vemos claramente que en ambos años las primeras semanas de incubación transcurren con temperaturas similares, pero hacia la primavera (agosto-setiembre) en el año 2012 la temperatura comienza a elevarse hasta un máximo de 23,9°C. Tal como se observó en los experimentos de laboratorio, una temperatura más alta acorta los tiempos de desarrollo, por esta razón en los nidos del año

2012 las eclosiones se produjeron antes. Es destacable que a pesar de las diferencias en el comportamiento de la temperatura, ambos períodos de eclosión coinciden con la temporada de mayores precipitaciones para el verano del año que les corresponde, 7-10 días luego de producirse la mayor parte de las precipitaciones para ese período, los neonatos salen de los huevos. Esto fue observado en los nidos testigo (en condiciones naturales) y estos resultados podrían extrapolarse a lo que normalmente sucedería con los embriones de *Phrynops hilarii* en la naturaleza, según las características de cada año.

Si bien la humedad no parece ser condicionante para la ruptura de la diapausa, si lo es para la eclosión de los neonatos, ya que según pude comprobar en este trabajo, ninguno de los pichones que llegaron a término (DA) pudieron eclosionar en los experimentos y solo lo hicieron en condiciones naturales en el momento de mayores precipitaciones para ambos años. A diferencia de este trabajo, Bujes & Verrastro (2001) no encontraron relación entre la cantidad de precipitaciones y la emergencia de los pichones en huevos de *P.hilarii* en Brasil, pero Booth (1998) comprobó que la emergencia de los pichones de *E. macquarii* y *Chelonia expansa*, ambas de la familia Chelidae, coincidió significativamente con la cantidad de precipitaciones y la temperatura asociada.

5.4. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS

5.4.1. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS INICIALES

A continuación se describen los valores de los componentes iniciales en huevos de *Phrynosops hilarii* (Tabla 4). Se encontraron correlaciones significativas entre compuestos iniciales y entre características físicas del huevo y contenido de nutrientes de la yema (Tabla 5).

Tabla 4.

Componentes de huevos (iniciales) de *Phrynosops hilarii*. Todos los valores están expresados en yema en base seca.

COMPONENTES	n	$\bar{x} \pm D.E.$	Mín-Máx
% Sólidos Totales	30	42,8 \pm 4,6	33,6 - 56,2
% Humedad	30	57,2 \pm 4,6	43,8 - 66,4
% Cenizas	30	2,7 \pm 0,9	1,1 - 4,4
% Proteínas	13	56,1 \pm 4,4	47,3 - 62,0
% Grasas Totales	30	25,3 \pm 7,7	16,1 - 41,5
mg de col/100g grasa	17	426,3 \pm 147,8	276,2 - 850,1
mg K/100g yema	12	617,8 \pm 188,7	348,7 - 966,5
mg Ca/100g yema	12	529,2 \pm 74,4	415,8 - 649,4
mg Mg/100g yema	12	126,4 \pm 23,4	95,1 - 157,1
mg Fe/100g yema	12	6,6 \pm 1,8	4,2 - 9,9
mg Zn/100g yema	12	8,3 \pm 1,7	5,5 - 11,2

Tabla 5.

Correlaciones significativas entre componentes iniciales de huevos de *Phrynos hilarii*. Se utilizó el índice de Pearson para variables paramétricas y el índice de Spearman para variables no paramétricas.

Variable 1	Variable 2	n	Pearson	Spearman	p
Peso yema	% Humedad	30	0,42		0,0217
Peso yema	% Sólidos Totales	30	-0,42		0,0217
Peso yema	% Cenizas	30	-0,49		0,0057
% Humedad	% Sólidos Totales	30	-1,00		<0,0001
% Humedad	mg Mg/100g yema	12	0,60		0,0392
% Sólidos Totales	mg Mg/100g yema	12	-0,60		0,0392
% Cenizas	mg Fe/100g yema	12	-0,63		0,0293
Proteínas	% Sólidos Totales	13	-0,65		0,0171
Proteínas	% Humedad	13	0,65		0,0171
Proteínas	% Grasa	13		-0,76	0,0072
Proteínas	mg K/100g yema	10	0,83		0,0029
Proteínas	mg Ca/100g yema	10	0,82		0,0036
Proteínas	mg Mg/100g yema	10	0,78		0,0076
Proteínas	mg Zn/100g yema	10	0,69		0,0278
% Grasa	mg Ca/100g yema	11		-0,76	0,0072
% Grasa	mg Zn/100g yema	11		-0,77	0,0060
mg Ca/100g yema	mg K/100g yema	12	0,70		0,0115
mg Ca/100g yema	mg Zn/100g yema	12	0,81		0,0014
mg Ca/100g yema	mg Mg/100g yema	12	0,81		0,0013
mg Mg/100g yema	mg K/100g yema	12	0,88		0,0002
mg Zn/100g yema	mg Mg/100g yema	12	0,67		0,0179

En especies lecitotróficas la mayoría de los nutrientes para el desarrollo del embrión y los nuevos tejidos están presentes en el huevo en el momento de la oviposición, la mayor parte de estos están contenidos en la yema (Thompson & Speake 2003). Los principales constituyentes de la yema de huevos de reptiles son proteínas y lípidos (Noble 1991). En

términos de cantidad las proteínas representan aproximadamente el doble de la cantidad de lípidos y entre ambos superan el 90% de la materia seca de la yema (Noble 1991, Thompson *et al.* 2000). Entre los iones inorgánicos más importantes se encuentran calcio, sodio y fósforo, pero también se incluyen magnesio, hierro y otros elementos traza que comprenden aproximadamente el 5% de la materia seca de un huevo fresco; la cáscara, además, puede actuar como un reservorio adicional de calcio (Thompson *et al.* 2000).

Los estudios de componentes de huevos en especies de la familia Chelidae son escasos. Respecto a los dos nutrientes más importantes y representativos (proteínas y lípidos), el trabajo de Thompson *et al.* (1999), describe el contenido de huevo de *Emydura macquarii* (Chelidae) encontrando 62% de proteína y 31,4% de lípidos totales. Booth (2003) analiza el contenido de huevos de dos especies de familias diferentes: *Emydura signata* (Emydidae) y *Chelodina expansa* (Chelidae), la primera presenta 60,4% de proteínas y 25% de lípidos, mientras que la segunda contiene 54% de proteínas y 31,1% de lípidos. La mayoría de los trabajos han sido realizados en otras familias, en su mayoría del orden Cryptodira. Wilhoft (1986) describió el contenido de huevos de *Chelydra serpentina* (Chelydridae), encontrando 54,9% de contenido proteico y 33,8% de lípidos. Rowe *et al.* (1995) evaluaron el contenido lipídico en huevos de *Chrysemys picta* (Emydidae) encontrando en 29,8% de lípidos totales. Nagle *et al.* (1998) analizan el contenido lipídico de huevos de cuatro especies de la familia Kinosternidae de poblaciones del sureste de Estados Unidos, los valores encontrados van de 28,2% (*Sternotherus odoratus*) hasta 34,1% (*Kinosternon bauri*). Bouchard & Bjorndal (2000) en *Caretta caretta* (Cheloniidae) encontraron 65,5% de proteínas y 21,9% de lípidos. Nagle *et al.* (2003) analiza la inversión parental en las yemas de huevos de *Apalone mutica* (Trionichyidae) encontrando 28,8% de lípidos. Castro-González & Pérez-Gil Romo (2011) describieron los componentes del huevo de *Lepidochelys olivacea* (Cheloniidae), que presentó 53,7% de proteínas y 47% de grasas, ofreciendo una excepción a la tendencia general en la proporción de estos compuestos, donde los valores de lípidos casi duplican a los valores habituales en el resto de las especies. Cabe destacar que la mayoría de los trabajos mencionados analizan el contenido del huevo completo (yema y albumen), por lo que los valores de proteínas pueden estar afectados por el aporte proteico del albumen, excepto en aquellos en los que se aclara que tratan específicamente del contenido de yema. En *P. hiliarii* el contenido promedio de proteínas en yema fue de 56,1% y el de lípidos totales 25,3%, entre ambos

componentes alcanzan el 81,4% del contenido de la yema. Según los antecedentes revisados, existe una amplia variabilidad respecto a la relación entre el contenido de proteínas y lípidos en quelonios, pero en todos los casos se imponen ambos nutrientes como la principal fuente de energía del embrión en desarrollo, cumpliendo la tendencia general en reptiles analizada en Noble (1991).

Los minerales son fundamentales en roles funcionales como importantes coenzimas en el cuerpo, promueven la salud y el crecimiento (Tunsaringkarn *et al.* 2012). Usualmente se los clasifica en dos grupos: minerales esenciales (sodio, potasio, fósforo, magnesio y calcio) y minerales traza (iodo, flúor, zinc, hierro, selenio, etc.) (Tunsaringkarn *et al.* 2012). Los minerales esenciales analizados en este trabajo fueron tres: potasio (K), calcio (Ca) y magnesio (Mg) y dos minerales traza: hierro y zinc. Dentro del suborden Pleurodira existen escasos antecedentes que analicen el contenido mineral de los huevos. Thompson *et al.* (1999) describe el contenido de cuatro minerales esenciales: Ca, Na, K y Mg, pero los resultados son confusos y debido a la falta de claridad con que describe a los resultados, no pudieron ser comparados con este trabajo. La mayoría de los antecedentes existentes en contenido mineral de huevos se generaron dentro del suborden Cryptodira. Sahoo *et al.* (1998) estudiaron el metabolismo de varios minerales en la tortuga marina *Lepidochelys olivacea* (Chelonioidae) de la costa este de India, los valores encontrados para K y Mg fueron muy similares a los de *P. hylarii*, mientras que los valores de Ca fueron levemente superiores. Tunsaringkarn *et al.* (2012, 2013) describieron los componentes minerales de la tortuga dulceacuícola *Malayemys macrocephala* (Geoemydidae) en el centro de Malasia, los valores de los minerales de yema coincidentes con este trabajo (Ca, K y Mg) fueron menores que los hallados en *P. hylarii* para este tesis.

Las correlaciones significativas encontradas en este trabajo para componentes de huevo y características del huevo fueron para % de Sólidos totales y Peso de yema (n= 30, P= -0,42, p=0,0217) y de % Cenizas con Peso de yema (n= 30, P= -0,49, p= 0,0057), indicando que a mayor peso de yema menor proporción de sólidos totales y cenizas, respectivamente. Para % de Humedad y Peso de yema también se encontró una correlación significativa, en este caso positiva (n= 30, P= 0,42, p= 0,0217), por lo que yemas mas grandes contienen mayor cantidad de humedad.

Respecto a las correlaciones presentadas entre componentes nutritivos de la yema, cabe destacar la estrecha relación entre el contenido de proteínas y la mayoría de los nutrientes (Tabla 5). En el caso de su relación con los lípidos puede inferirse que se debe a que inicialmente la hembra otorga la mayor cantidad de nutrientes para el desarrollo embrionario exitoso y las proteínas son la fuente estructural del embrión en desarrollo, mientras que las grasas son fundamentalmente reservas energéticas. Estas últimas, como bien observamos en la tabla 8, comienzan a incrementarse al romperse la diapausa, para acumularse en la membrana del saco embrionario y estar disponibles al momento de la eclosión (Noble *et al.* 1986).

5.4.2 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS VS ESTADIOS DE DESARROLLO

Para esta sección se tienen en cuenta las primeras tres categorías de desarrollo (estadio inicial, disco embrionario y primordios cardíacos) para describir y analizar los cambios en niveles de nutrientes antes, durante y luego de romperse la diapausa secundaria. A continuación se describen los componentes en yema de huevo de *Phrynops hilarii* según el estadio correspondiente (Tabla 6). Se encontraron diferencias significativas entre algunos de los nutrientes de cada estadio: Sólidos Totales y Humedad ($H=19,84$, $p=0,0001$), mg de Colesterol/100 gr de yema ($H= 19,22$, $p=0,0001$) y mg de Mg/100g de yema ($H=7,35$, $p=0,0254$). Las variables Sólidos Totales y Humedad son complementarias, por lo tanto los datos de ambas están fuertemente relacionados. Tanto los sólidos totales como los lípidos totales disminuyen en el estadio disco embrionario y luego aumentan en el momento que se reactiva el desarrollo (primordios cardíacos). En este sentido y de acuerdo a estos datos, podemos inferir una influencia de la cantidad de lípidos en los valores de sólidos totales.

La mayoría de los trabajos que estudian la utilización de nutrientes en el desarrollo embrionario de tortugas centran su atención en dos momentos puntuales: el inicio del desarrollo y la eclosión, sin reparar en los cambios progresivos en los niveles de nutrientes para las distintas etapas (por ejemplo: Wilhoft 1986, Rowe *et al.* 1995, Thompson *et al.* 1999). Además en general, las discusiones y conclusiones se centran en la adquisición o pérdida de nutrientes en el cuerpo o soma embrionario y no en los cambios que

experimenta la yema en el proceso de desarrollo, aunque en la mayoría de las tablas el valor final de contenidos en yema está presente, no se le da mayor importancia.

Tabla 6.

Componentes en yema de huevo de *P.hilarii* en tres etapas de desarrollo. El asterisco indica diferencias significativas en los contenidos de los estadios. Las comparaciones de medias entre los componentes y los estadios se hicieron mediante el test de Kruskal Wallis debido a la falta de normalidad de los datos.

COMPONENTES	INICIAL			DISCO EMBRIONARIO			PRIMORDIOS CARDIACOS		
	n	$\bar{x} \pm DE$	Mín-Máx	n	$\bar{x} \pm DE$	Mín-Máx	n	$\bar{x} \pm DE$	Mín-Máx
% Sólidos Totales*	30	42,8 ^a ± 4,6	33,6 - 56,2	44	39,3 ^b ± 5,4	28,9 - 50,4	19	45,9 ^c ± 5,2	34,7 - 53,4
% Humedad*	30	57,2 ^a ± 4,6	43,8 - 66,4	44	60,7 ^b ± 5,4	49,6 - 71,1	20	54,1 ^c ± 5,2	46,6 - 65,3
% Cenizas	30	2,7 ± 0,9	1,1 - 4,4	42	2,6 ± 1,1	0,8 - 7,0	19	2,6 ± 0,7	0,9 - 3,5
% Proteínas	13	56,1 ± 4,4	47,3 - 62,0	17	56,0 ± 3,8	48,6 - 61,6	8	51,5 ± 7,1	40,5 - 58,8
% Grasas Totales	30	25,3 ± 7,1	16,1 - 41,5	41	24,2 ± 8,7	9,3 - 47,2	23	27,1 ± 9,7	4,9 - 43,9
mg de col/100g grasa*	20	426,0 ^a ± 147,8	276,2 - 850,1	29	280,9 ^b ± 104,2	116,7 - 495,1	9	479,3 ^c ± 108,3	369,0 - 653,4
mg K/100g yema	12	617,8 ± 188,7	348,7 - 966,5	14	484,8 ± 189,4	213,7 - 974,9	9	448,8 ± 82,6	308,6 - 528,5
mg Ca/100g yema	12	529,2 ± 74,4	415,8 - 649,4	14	493,5 ± 130,7	230,6 - 864,2	9	481,9 ± 101,6	359,5 - 699,6
mg Fe/100g yema	12	6,6 ± 1,8	4,2 - 9,9	13	6,8 ± 3,2	3,1 - 16,1	9	6,4 ± 2,2	4,3 - 11,4
mg Mg/100g yema*	12	126,4 ^a ± 23,4	95,1 - 157,1	14	112,9 ± 26,9	52,7 - 173,3	9	100,2 ^b ± 12,9	76,9 - 116,8
mg Zn/100g yema	12	8,3 ± 1,7	5,5 - 11,2	14	8,4 ± 2,2	3,7 - 13,4	9	6,9 ± 1,6	5,0 - 9,1

La inversión parental en nutrientes de la yema post embrionaria puede tener consecuencias potenciales en la supervivencia del pichón eclosionado (Congdon & Gibbons 1990) y, en el caso de lípidos, constituyen la fuente primaria de energía para las primeras actividades post embrionarias como ser emerger del nido y locomoción (natación) (Kraemer & Bennet 1981). Esta inversión parental en nutrientes varía entre especies, tanto en términos de cantidad como de composición bioquímica (Rowe *et al.* 1995), así como difieren interespecíficamente las tasas de utilización de nutrientes de los componentes durante el desarrollo embrionario (Noble 1991). Por lo tanto, esta energía adjudicada a la descendencia en reptiles ovíparos puede ser dividida en aquella asignada a la embriogénesis y en la invertida en la yema post embrionaria que puede contribuir a la supervivencia y el crecimiento del individuo luego de la eclosión (Congdon *et al.* 1983, Congdon & Gibbons 1990). En este caso, según podemos observar en la tabla 6, existe un aporte inicial materno de colesterol que disminuye en las primeras etapas de desarrollo (disco embrionario) para mantener con vida al embrión durante esta etapa de bajo metabolismo, una vez reiniciado el desarrollo activo los niveles de colesterol comienzan a elevarse señalando una síntesis de este nutriente probablemente a partir de ácidos grasos libres en la yema. De acuerdo a la bibliografía ya citada, inferimos que este colesterol es utilizado en parte para la constitución de los nuevos tejidos embrionarios y, por otra parte, acumulados como sustancia de reserva para el momento de la eclosión.

En el momento de la oviposición, la yema está compuesta primordialmente por lípidos y proteínas, fuentes de energía y componentes esenciales para el desarrollo de los tejidos embrionarios; además, la yema y el embrión en desarrollo contienen otros nutrientes incluyendo iones inorgánicos, vitaminas, carotenoides, agua y hormonas (Thompson & Speake 2003). En las especies ovíparas los nutrientes se transfieren desde la yema a la circulación del embrión mediante la membrana del saco vitelino, este mecanismo ha sido estudiado principalmente en especies de aves y muy escasamente en reptiles (Thompson & Speake 2003). Por ejemplo, durante la embriogénesis en pollos, los lípidos de la yema junto con las proteínas son absorbidas en las células del endodermo de la membrana del saco vitelino por endocitosis, allí los lípidos son hidrolizados por actividad lisosomal liberando ácidos grasos libres, glicerol y glicéridos parciales en el citoplasma, y las proteínas son presumiblemente hidrolizadas para liberar aminoácidos (Speake *et al.* 1998). La re esterificación y re ensamblaje de triacilglicerol (lípidos de reserva), fosfolípidos

(lípidos de membrana) y colesterol ester (lípidos reguladores de funciones), llevado a cabo por la acción de una serie de aciltransferasas se ve reflejado por una alta actividad en las células endodérmicas (Murray *et al.* 1999), paralelamente ocurre síntesis de apoproteínas que resulta en la formación de partículas lipoproteicas (Thompson & Speake 2003). Los productos resultantes de estas reacciones metabólicas son secretados desde la superficie basal de las células endodérmicas dentro de los capilares de la membrana del saco vitelino y subsecuentemente ingresan en la circulación del embrión (Speake *et al.* 1998).

En general, a medida que el embrión se desarrolla, los nutrientes de la yema se consumen para dar lugar a las estructuras embrionarias, pero en el caso de los lípidos se puede observar el consumo de algunas clases (por ejemplo: fosfolípidos, formación tejidos embrionarios) y la síntesis de otras (triacilgliceroles, lípidos de reserva para funciones post embrionarias) (Congdon & Gibbons 1990, Rowe *et al.* 1995). Durante los primeros días de desarrollo embrionario se observa una caída en las cantidades de lípidos en yema, acentuándose a medida que avanzan las etapas de desarrollo (Noble 1991), esto también se observa en este trabajo para *P. hilarii* (Tabla 6). Según Noble *et al.* (1986) esta pérdida en la yema va acompañada de una acumulación de lípidos en la membrana del saco embrionario, dando como resultado un mayor contenido de lípidos en la membrana que en el saco embrionario, alrededor del día 17 del desarrollo. Detalles similares se observaron en huevos de alligator (Noble *et al.* 1990). En términos generales, la proporción de lípidos en la yema se incrementa sostenidamente mientras la incubación avanza, hacia el final de la incubación la cantidad de lípidos en la yema remanente es de alrededor del 31% del peso en comparación al 21% de los lípidos en la yema inicial (Noble 1991). En el pollo las proporciones de triacilglicerol y fosfoglicéridos en la yema permanecen en gran parte sin cambios durante las últimas etapas de incubación (Noble & Moore 1964, 1965, Noble 1991), sin embargo, mientras que la proporción de colesterol total no cambia, la relación de colesterol libre y esterificado se incrementa considerablemente (Noble & Moore 1964, Noble 1991); la acumulación de ésteres de colesterol está asociada particularmente a la membrana del saco vitelino (Noble & Moore 1967, Noble 1991).

Según los datos obtenidos en los análisis de yemas de *P. hilarii*, éstas presentan una disminución en el contenido de sólidos totales, lípidos totales y colesterol en el estadio de disco embrionario y luego se produce el aumento de estos componentes en el estadio de

primordios cardiacos, indicando una reactivación del desarrollo. El resto de los componentes disminuye progresivamente desde el inicio de la incubación hacia el estadio de primordios cardiacos indicando el comienzo de la formación de estructuras embrionarias y la continua alimentación del embrión en desarrollo (Tabla 7). En esta tesis no se diferencia entre el contenido de la membrana del saco embrionario y el contenido del mismo, por lo que el término yema abarca ambas estructuras. En consecuencia, en base a la bibliografía consultada, podemos inferir que el incremento en los valores de lípidos totales se debe a la acumulación de lípidos de reserva en la membrana del saco vitelino ((Noble & Moore 1967, Noble 1991). A partir de estos resultados queda abierta la interrogante para futuros trabajos sobre el comportamiento de las distintas clases de lípidos (triacilglicéridos, fosfolípidos, ácidos grasos, etc.) durante el desarrollo en la membrana del saco vitelino y dentro de esta estructura.

En base a estos resultados podemos inferir que los lípidos totales tendrían una importancia esencial como indicador de desarrollo embrionario activo, ya que comenzarían a acumularse como sustancia de reserva una vez concluida la etapa de diapausa embrionaria, y, en el caso del colesterol, comenzaría a sintetizarse dada su importancia en el desarrollo y crecimiento celular (Martinez *et al.* 2001). Es decir, mientras el resto de grupos de nutrientes (proteínas y minerales) van consumiéndose en mayor o menor medida para generar las diferentes estructuras embrionarias al avanzar el desarrollo, los lípidos totales muestran una disminución inicial al entrar en el estadio de enlentecimiento de desarrollo (diapausa), para luego comenzar a elevarse a modo de reserva energética para que el embrión llegue al momento de la eclosión con la suficiente energía acumulado y asegurar su supervivencia post embrionaria. Al no hacer en esta tesis diferenciación entre lípidos de reserva (triacilglicéridos) y lípidos de consumo activo (fosfolípidos), podemos inferir que la cantidad de lípidos de reserva sintetizados y acumulados en la membrana del saco vitelino es alta, ya que se produce un aumento notable de lípidos totales a medida que avanza el desarrollo, coincidiendo con trabajos realizados en otras especies de quelonios donde evalúan el contenido final de la yema post embrionaria (por ejemplo: Whilhoft 1986, Rowe *et al.* 1995).

Whilhoft (1986) analiza el contenido de huevos de *Chelydra serpentina* (Chelydridae) y tanto las proteínas como los lípidos aumentaron hacia el final del desarrollo. Rowe *et al.*

(1995) describen el contenido y variabilidad de lípidos en tres especies de tortugas pertenecientes a dos familias: *C. serpentina* (Chelydridae), y *Chrysemys picta* y *Emydoidea blandingii* (Emydidae); en este caso tanto en *C. serpentina* como en *C. picta* la cantidad de lípidos en la yema post embrionaria fue superior a la que contenían las yemas al inicio del desarrollo, mientras que en *E. blandingii* la cantidad de lípidos disminuyó en las yemas residuales al final del desarrollo, este trabajo si destaca la importancia de la composición de la yema post embrionaria y los cambios en su composición durante el desarrollo en el huevo. Thompson *et al.* (1999) analizan la yema residual de los neonatos de *Emydura macquarii* (Chelidae) presentando una disminución en el contenido de proteínas y un aumento en los niveles de lípidos en las yemas residuales. Como ya quedó establecido, no es parte de esta tesis la comparación con estadios finales, pero en *P. hilarii* se observó una disminución de proteínas y un aumento de lípidos desde el estadio inicial al momento de la formación de los primordios del corazón.

Al analizar estos datos teniendo en cuenta la combinación de tratamientos con los estadios embrionarios (Anexo V) se presentaron diferencias significativas en tres de las variables: % Sólidos Totales y % Humedad ($H=40,4$, $p=0,0007$) y mg de colesterol/100g yema ($H=25,6$, $p=0,0124$). Este análisis está limitado por la cantidad de huevos disponibles para cada combinación por lo que los resultados obtenidos solo pueden ser tenidos en cuenta como tendencia. Debido a que se trabajó con huevos de la naturaleza y a lo largo de la incubación se retirándose retiraron muestras de manera destructiva para realizar cada análisis y por una limitación logística de laboratorio, los n son bajos y si bien el análisis de Kruskal-Wallis permite cierta flexibilidad, no podemos tomar estos datos como un comportamiento real. Para certificar estos análisis correspondería aumentar el número de datos de cada estadio para cada tratamiento.

El estadio disco embrionario se diferenció significativamente del estadio inicial en los niveles de sólidos totales y humedad para los tratamientos que presentaron algún período de saturación de sustrato con temperaturas bajas o intermedias. En el caso de sólidos totales disminuyeron los niveles para estos tratamientos y en el caso de la humedad los niveles aumentaron, evidenciando una leve absorción de agua del medio. También se presentó una diferencia significativa en estas variables entre el estadio inicial y los huevos sometidos a condiciones de sequía con la temperatura más alta (24°C), pero en este caso se

evidenció una pérdida de humedad en los huevos producto de la evaporación de agua. Respecto a los estadios disco embrionario (diapausa) y primordios cardíacos (post diapausa), las diferencias principales en estas variables se evidenciaron entre los estadios disco embrionario de tratamientos sometidos a un periodo de humedad (B o C) y testigo (con humedad variable) y aquellos huevos con desarrollo activo (primordios cardíacos) que estuvieron en tratamientos de sequía (A). Posiblemente este comportamiento de los nutrientes se encuentre relacionado a dos cuestiones: la diferencia de gradiente propiciada por la sequía y la temperatura que genera una mayor tasa de pérdida de agua y el desarrollo activo del embrión que genera el consumo más acelerado de nutrientes.

En el caso del colesterol se encontró una disminución significativa entre huevos del estadio inicial y huevos con disco embrionario de los tratamientos con temperaturas bajas e intermedias (14°C y 19°C) con saturación de sustrato (B y C). Como bien se explicó previamente si bien en el periodo de diapausa los procesos metabólicos se ven reducidos, esto no implica que no haya consumo alguno de nutrientes. Por otro lado, entre los estadios primordios cardíacos y disco embrionario la principal diferencia se encontró entre huevos sometidos a tratamiento de sequia con temperatura media (19°C) con desarrollo activo y aquellos que experimentaron saturación de sustrato con desarrollo detenido (diapausa). Esto probablemente pueda deberse a un aumento de en la síntesis de colesterol para conformar los tejidos embrionarios (Martínez *et al.* 2001).

6. CONCLUSIONES GENERALES

- ✚ Las temperatura que experimenta el nido las primeras semanas de incubación son esenciales para el desarrollo embrionario y la ruptura de diapausa. Los huevos sometidos a alta temperatura (24°C, temperatura estival promedio) rompieron la diapausa en las primeras semanas con sustrato saturado o seco; las bajas temperaturas prolongadas en el tiempo (14°C, temperatura invernal promedio) evitan que se rompa la diapausa embrionaria y producen la muerte del embrión, independientemente del grado de saturación del sustrato.

- ✚ El mayor éxito en el desarrollo en los experimentos se encontró en huevos sometidos a temperaturas estivales (24°C) con una saturación de sustrato promedio (B), evidenciando la necesidad de esta especie de pasar una etapa con altos niveles de humedad en el sustrato para una mayor probabilidad de desarrollo.

- ✚ La humedad no parece ser condicionante para la ruptura de la diapausa, pero si para la eclosión de los neonatos, ya que según pude comprobar en este trabajo, ninguno de los pichones que llegaron a término (DA) pudieron eclosionar en los experimentos y solo lo hicieron en condiciones naturales en el momento de mayores precipitaciones para ambos años estudiados.

- ✚ La mayoría de los componentes del huevo de *Phrynops hilarii* disminuyen durante el desarrollo embrionario para dar lugar a los tejidos del embrión en formación. Con excepción de los lípidos, que descienden durante el estadio de disco embrionario (diapausa) y luego comienzan a elevarse al romperse la diapausa y comenzar el desarrollo activo (primordios cardiacos). Esto se debería a un cambio en la composición y posición de los lípidos en el saco vitelino. Luego de las primeras semanas de desarrollo, lípidos de reserva (triacilgliceroles) comienzan a acumularse en la membrana del saco embrionario para estar disponibles para el

pichón al eclosionar. Esto ocasionaría una disminución de los lípidos estructurales (fosfolípidos) que se encuentran dentro del saco embrionario y son utilizados junto a proteínas y minerales para la formación de tejidos del embrión en desarrollo.

➤ Finalmente, de acuerdo a los resultados encontrados y los antecedentes bibliográficos acerca de la diapausa embrionaria, puedo concluir que este mecanismo se presenta en el plan de desarrollo embrionario (bauplan) de *P. hilarii* mas allá de las condiciones ambientales iniciales a la que los huevos se encuentran sometidos. La duración de la diapausa es en definitiva la que se ve afectada por el ambiente circundante al huevo provocando un mayor o menor tiempo de incubación según sean más o menos favorables las variables ambientales del período.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdala V, AS Manzano & A Herrel.** 2008. Forelimb musculature in aquatic and terrestrial turtles: phylogeny or environmental constraints? *Journal of Anatomy*, 213(2): 159-172.
- AOAC.** 1995. *Official Methods of Analysis*. 6th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA.
- Bager A.** 1997. Aspectos da dinâmica reprodutiva de *Phrynops hilarii* (Duméril & Bibron, 1835) (Testudines - Chelidae) no sul do Rio Grande do Sul. Tesis de Maestría, Universidad de Rio Grande do Sul, Brasil.
- Bates BC, ZW Kundzewicz, S Wu & JP Palutikof (Eds).** 2008. El cambio climático y el agua. Documento técnico del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático, Secretaría del IPCC, Ginebra, 224 pp.
- Begon M, JL Harper & CR Townsend.** 1986. *Ecology: Individuals, Populations and Communities*. Blackwell Scientific, Oxford.
- Bó RF.** 2005. Ecorregión Delta e Islas del Paraná: Situación ambiental en la ecorregión Delta e Islas del Paraná. Pp. 131-174. En: A Brown, U Martínez Ortiz, M Acerbi & J Corcuera (Eds). *La Situación Ambiental Argentina 2005*. Fundación Vida Silvestre Argentina. Buenos Aires, Argentina.
- Bó RF & AI Malvárez.** 1999. El pulso de inundación y la biodiversidad en humedales, un análisis preliminar sobre el efecto de eventos extremos sobre la fauna silvestre, en: Malvárez, A. I. (ed.), *Tópicos sobre humedales subtropicales y templados de Sudamérica*, Montevideo, Oficina Regional de Ciencia y Técnica para América Latina y el Caribe (ORCyT) MAB/Unesco.
- Bonino MF, JN Lescano, JG Haro & GC Leynaud.** 2009. Diet of *Hydromedusa tectifera* (Testudines Chelidae) in a mountain stream of Córdoba province, Argentina. *Amphibia-Reptilia*, 30: 545-554.
- Booth DT.** 2000. Incubation of eggs of the Australian broad-shelled turtle, *Chelodina expansa* (Testudinata: Chelidae), at different temperatures: effects on pattern of oxygen consumption and hatchling morphology. *Australian Journal of Zoology*, 48: 369-378.
- Booth DT.** 2002. The breaking of diapause in embryonic broad-shell river turtles (*Chelodina expansa*). *Journal of Herpetology*, 36(2): 304-307.
- Booth DT.** 2003. Composition and energy density of eggs from two species of freshwater turtle with twofold ranges in egg size. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 134: 129-137.
- Bouchard SS & KA Bjorndal.** 2000. Sea turtles as biological transporters of nutrients and energy from marine to terrestrial ecosystems. *Ecology*, 81: 2305-2313.

- Brown GP & R Shine.** 2006. Effects of nest temperature and moisture on phenotypic traits of hatchling snakes (*Tropidonophis mairii*, Colubridae) from tropical Australia. *Biological Journal of the Linnean Society*, 89: 159–168
- Bujes, CS & L Verrastro.** 2009. Nest temperature, incubation time, hatching and emergence in the hilaire's side-necked turtle (*Phrynops hilarii*). *Herpetological Conservation and Biology*, 4(3): 306-312.
- Burkart R, NO Bárbaro, RO Sánchez & DO Gómez.** 1999. Eco-Regiones de la Argentina. Programa de desarrollo Institucional, Componente de Política Ambiental. Administración de Parques Nacionales, Buenos Aires, Argentina. 42pp.
- Bustard HR & P Greenham.** 1968. Physical and chemical factors affecting hatching in the green sea turtle *Chelonia mydas* (L.). *Ecology*, 49: 269-276.
- Cabrera RM.** 1998. Las tortugas continentales de Sudamérica austral. Talleres gráficos BR Copias, Córdoba, Argentina.
- Cagle KD, GC Packard, K Miller & MJ Packard.** 1993. Effects of the microclimate in natural nests on development of embryonic painted turtles, *Chrysemys picta*. *Functional Ecology*, 7: 653-660.
- Carreira Vidal S, M Meneghel & F achaval.** 2005. Reptiles de Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay. 639pp.
- Casco SL, M Neiff & JJ Neiff.** 2005. Biodiversidad en ríos del litoral fluvial. Utilidad del software PULSO. Temas de la Biodiversidad del Litoral fluvial argentino II. INSUGEO, Miscelánea 14: 419–434.
- Castro-Gonzalez MI & F Perez-Gil Romo.** 2011. Composición química del huevo de tortuga golfina *Lepidochelys olivacea* (Testudines-Cheloniidae) y su potencial como recurso alimenticio. *Revista Biología Tropical*, 59(4): 1729-1742).
- Cei JM.** 1993. Reptiles del noroeste, nordeste y este de Argentina. *Herpetofauna de las selvas subtropicales, puna y pampas*. Museo Regionale di Scienze Naturali di Torino, Monografia XIV: 1–929.
- Christie WW.** 1990. Gas chromatography and lipids, a practical guide. PJ Barnes & Associates, Bridgwater, Somerset, UK. 184pp.
- Congdon JD & JW Gibbons.** 1990. Turtle eggs: their ecology and evolution. Pp. 109-123. En: JW Gibbons (Ed.). *Life History and Ecology of the Slider Turtle*. Smithsonian Press, Washington, D.C.
- Congdon JD, DW Tinkle & PC Rosen.** 1983. Egg components and utilization during development in aquatic turtles. *Copeia*, 1983: 264–268.

- Deeming DC.** 1991. Egg turning in birds and reptiles. Pp: 307-323. En: Deeming, DC & MWJ Ferguson (Eds.). *Egg Incubation: Its Effects on Embryonic Development in Birds and Reptiles*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Deeming DC.** 2004. Post hatching phenotypic effects of incubation in reptiles. Pp: 229-252. En: Deeming DC (Ed.). *Reptilian Incubation: environment, Evolution and Behaviour*. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Deeming DC & MW Ferguson.** 1991. Physiological effects of incubation temperature on embryonic development in reptiles and birds. Pp: 147-171. En: Deeming DC & MWJ Ferguson (Eds.). *Egg Incubation: Its Effects on Embryonic Development in Birds and Reptiles*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Di Rienzo JA, F Casanoves, MG Balzarini, L Gonzalez, M Tablada, CW Robledo.** 2012. InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Ewert MA.** 1979. The embryo and its egg: Development and natural history. Pp: 75-267. En: Harless M & H Morlock (Eds.). *Turtles: Perspectives and Research*. Wiley and Sons, NY, USA.
- Ewert MA.** 1985. Embryology of turtles. Pp: 76-276. En: Gans C, F Billet & PFA Maderson (Eds.). *Biology of the Reptilia*, Vol. 14. John Wiley & Sons, New York.
- Ewert MA.** 1991. Cold torpor, diapause, delayed hatching and aestivation in reptiles and birds. Pp: 173-191. En: Deeming DC & MWJ Ferguson (Eds.). *Egg Incubation: Its Effects on Embryonic Development in Birds and Reptiles*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Fabrezi M, AS Manzano, V Abdala & H Zaher.** 2009. Developmental basis of limb homology in Pleurodiran turtles and the identity of the hooked element in the chelonian tarsus. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 155: 845-866.
- Ferreira Júnior PD & PTA Castro.** 2010. Nesting ecology of *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) and *Podocnemis uniflis* (Troschel, 1848) (Testudines, Podocnemididae) in the Javaés River, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 70: 85–94.
- Finkler MS.** 1997. Impact of eggcontent on post-hatching size, body composition, and performance in the common snapping turtle (*Chelydra serpentina*). *Chelonian Conservation and Biology*, 2: 452-455.
- Finkler MS.** 2006. Influence of water availability during incubation on hatchling size, body composition, desiccation tolerance, and terrestrial locomotor performance in the snapping turtle *Chelydra serpentina*. *Physiological and Biochemical Zoology*, 72(6): 714-722.
- Finkler MS, JT Bowen, TM Christman & AD Renshaw.** 2002. Effects of hydric conditions during incubation on body size and triglyceride reserves of overwintering hatchling snapping turtles (*Chelydra serpentina*). *Copeia*, 2002(2): 504–510.

- Flitz BA & SJ Mullin.** 2006. Nest-site selection in the eastern box turtle, *Terrapene carolina carolina*, in Illinois. *Chelonian Conservation and Biology* 5: 309–312.
- Folch J, M Lees & GH Sloane-Stanley.** 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226: 497-509.
- Fordham D, A Georges & B Corey.** 2006. Compensation for inundation-induced embryonic diapauses in a freshwater turtle: achieving predictability in the face of environmental stochasticity. *Functional Ecology*, 20: 670–677.
- Freyre M, E Astrada, C Blasco, C Baigorria, V Rozicky & C Bernardi.** 2003. Valores nutricionales de frutos de vinal (*Prosopis ruscifolia*): consumo humano y animal. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 4(1): 41-46.
- Fritz U & P Havas.** 2007. Checklist of Chelonians of the World. *Vertebrate Zoology* 57(2): 149-368.
- Gilbert SF.** 2005. *Biología del desarrollo*. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina.
- Gross, DT.** 1982. Reproductive biology of the stinkpot, *Sternotherus odoratus*, in a central Florida lake system. MS Thesis. Tampa: University of South Florida, USA. 91pp.
- Hewavisenthi S & CJ Parmenter.** 2001. Influence of incubation environment on the development of the flatback turtle (*Natator depressus*). *Copeia*, 2001(3): 668-682.
- Hirsch KF.** 1983. Contemporary and fossil chelonian eggshells. *Copeia*, 1983(2): 382-397.
- Horne BD.** 2007. The ecology of developmental timing in a Neotropical turtle, *Kinosternon leucostomum*. Tesis Doctoral, College of Arts and Sciences of Ohio University. 136pp.
- Iverson JB & MA Ewert.** 1991. Physical characteristics of reptilian eggs and comparison with avian eggs. Pp: 87-100. En: Deeming DC & MWJ Ferguson (Eds.). *Egg Incubation: Its Effects on Embryonic Development in Birds and Reptiles*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Joslyn, MA.** 1970 *Methods in food analysis*. Physical, chemical and instrumental methods of analysis. New York; USA: Academic Press Inc., 845pp.
- Kennett R, A Georges & M Palmer-Allen.** 1993. Early developmental arrest during immersion of eggs of tropical freshwater turtle, *Chelodina rugosa* (Testudinata: Chelidae), from northern Australia. *Australian Journal of Zoology*, 41: 37-45.
- Kjeldahl J.** 1883. A new method for the determination of nitrogen in organic matter. *Zeitschrift fur Analytische Chemie*, 22(366): 10-1007.
- Kraemer JE & JI Richardson.** 1979. Volumetric reduction in nest contents of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) (Reptilia, Testudines, Cheloniidae) on the Georgia coast. *Journal Herpetology*, 13: 255-260.

- Kraemer JE & SH Bennet.** 1981. Utilization of posthatching yolk in loggerhead sea turtles, *Caretta caretta*. *Copeia*, 1981(2): 406-411.
- Lescano JN, MF Bonino & GC Leynaud.** 2007. *Hydromedusa tectifera*. Copulation. *Herpetological Review* 38: 332.
- Lescano JN, MF Bonino & GC Leynaud.** 2008. Density, population structure and activity pattern of *Hydromedusa tectifera* (Testudines-Chelidae) in a mountain stream of Córdoba province, Argentina. *Amphibia-Reptilia*, 29: 505-512.
- Leshem A & R Dmi'el.** 1986. Water loss from *Trionyx triunguis* eggs incubating in natural nests. *Herpetological Journal*, 1: 115-117.
- Leynaud GC, N Pelegrin & JN Lescano.** 2006. Anfibios y Reptiles. Pp. 219-235. En: Bucher EH (Ed.). Bañados del río Dulce y Laguna Mar Chiquita (Córdoba, Argentina). Academia Nacional de Ciencias, Córdoba, Argentina.
- Lisboa CS, S Chinen & FB Molina.** 2004. Influência da temperatura no período de incubação dos ovos de *Phrynops geoffroanus* (Testudines, Chelidae). *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, 71: 205-393.
- Lombardi J.** 1998. Embryogenesis. Pp. 225-251. En: Lombardi J (Ed.). Comparative vertebrate reproduction. Kluwer Academic Publishers, Massachusetts, USA.
- Lopes, FL, JA Desmarais & BD Murphy.** 2004. Embryonic diapause and its regulation. *Reproduction*, 128(6): 669-678.
- López MS, W Sione, GC Leynaud, Y Prieto & AS Manzano.** 2013. How far from water? Terrestrial dispersal and nesting sites of the freshwater turtle *Phrynops hilarii* in the floodplain of the Paraná river (Argentina). *Zoological Science*, 30: 1063–1069.
- Lowry OH, NJ Rosebrough, AL Farr & RJ Randall.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1): 265-275.
- Martínez F, MT Espinosa-García, G Maldonado, A Uribe, Ó Flores, R Milán & C García.** 2001. El colesterol es esencial en el desarrollo embrionario y en el crecimiento celular. *Revista Facultad de Medicina UNAM*, 44(4): 168-176.
- McLaughlin SJ & E. R. McCain.** 1998. In vivo and in vitro development of the chicken heart. Pp. 331-332, En: Karcher SJ (Ed.). Tested studies for laboratory teaching, Volume 19, Proceedings of the 19th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE).
- Mead RA.** 1993. Embryonic diapause in vertebrates. *The Journal of Experimental Zoology*, 266: 629-641.
- Miller KG & GC Packard.** 1992. The influence of substrate water potencial during incubation on the metabolism of embryonic snapping turtles (*Chelydra serpentina*). *Physiological Zoology*, 65(1): 172-187.

- Miller JD & SA Dinkelacker.** 2008. Reproductive structures and strategies of turtles. Pp. 225-278. En: Wyneken J, MH Godfrey & V Bels (Eds.). Biology of turtles. Taylor and Francis Group, Florida, USA.
- Moll D & EO Moll.** 2004. River turtle diversity, adaptations, and roles in the river ecosystem. The ecology, exploitation, and conservation of river turtles. Oxford University Press, Oxford, USA. 420pp.
- Mullins MA & FJ Janzen.** 2006. Phenotypic effects of thermal means and variances on smooth softshell turtle (*Apalone mutica*) embryos and hatchlings. *Herpetologica*, 62(1): 27-36.
- Murray AMB, R Denis & BK Speake.** 1999. Acyltransferase activities in the yolk sac membrane of the chick embryo. *Lipids*, 34: 1207-1210.
- Nagle RD, JV Burke & JD Congdon.** 1998. Egg components and hatchling lipid reserves: parental investment in kinosternid turtles from the southeastern United States. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 120: 145–152.
- Nagle RD, MV Plummer, JD Congdon & RU Fischer.** 2003. Parental investment, embryo growth, and hatchling lipid reserves in softshell turtles (*Apalone mutica*) from Arkansas. *Herpetologica*, 59(2): 145–154.
- Neiff JJ.** 1990. Ideas para la interpretación ecológica del Paraná. *Interciencia* 15: 424–441.
- Packard GC.** 1999. Water relations of chelonian eggs and embryos: Is wetter better? *American Zoologist*, 39: 289-303.
- Noble, RC.** 1991. Comparative composition and utilization of yolk lipid by embryonic birds and reptiles. Pp. 17-28. En: Deeming DC & MWJ Ferguson (Eds.). *Egg Incubation: Its Effects on Embryonic Development in Birds and Reptiles*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Noble RC, F Lonsdale, K Connor & D Brown.** 1986. Changes in the lipid metabolism of the chick embryo with parental age. *Poultry Science*, 65: 409-416.
- Packard GC & KF Hirsch.** 1986. Scanning electron microscopy of eggshells of contemporary reptiles. *Scanning Electron Microscopy*, 4: 1581-1590.
- Packard GC & MJ Packard.** 1988 The physiological ecology of reptilian eggs and embryos. Pp. 524-605. En: Gans C & RB Huey (Eds.). *Biology of the reptilia*. Liss, New York.
- Packard GC, MJ Packard & TJ Boardman.** 1982. An experimental analysis of the water relations of eggs of Blanding's turtle (*Emydoidea blandingii*). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 75: 23-34.
- Pearson JT, K Moriya, K Yanone & M Tazawa.** 2000. Development and regulation of heart rate in embryos and hatchlings of gulls (*Larus schistisagus* and *Larus crassirostris*) in relation to growth. *Journal of Comparative Physiology Part B*, 170: 429-438.

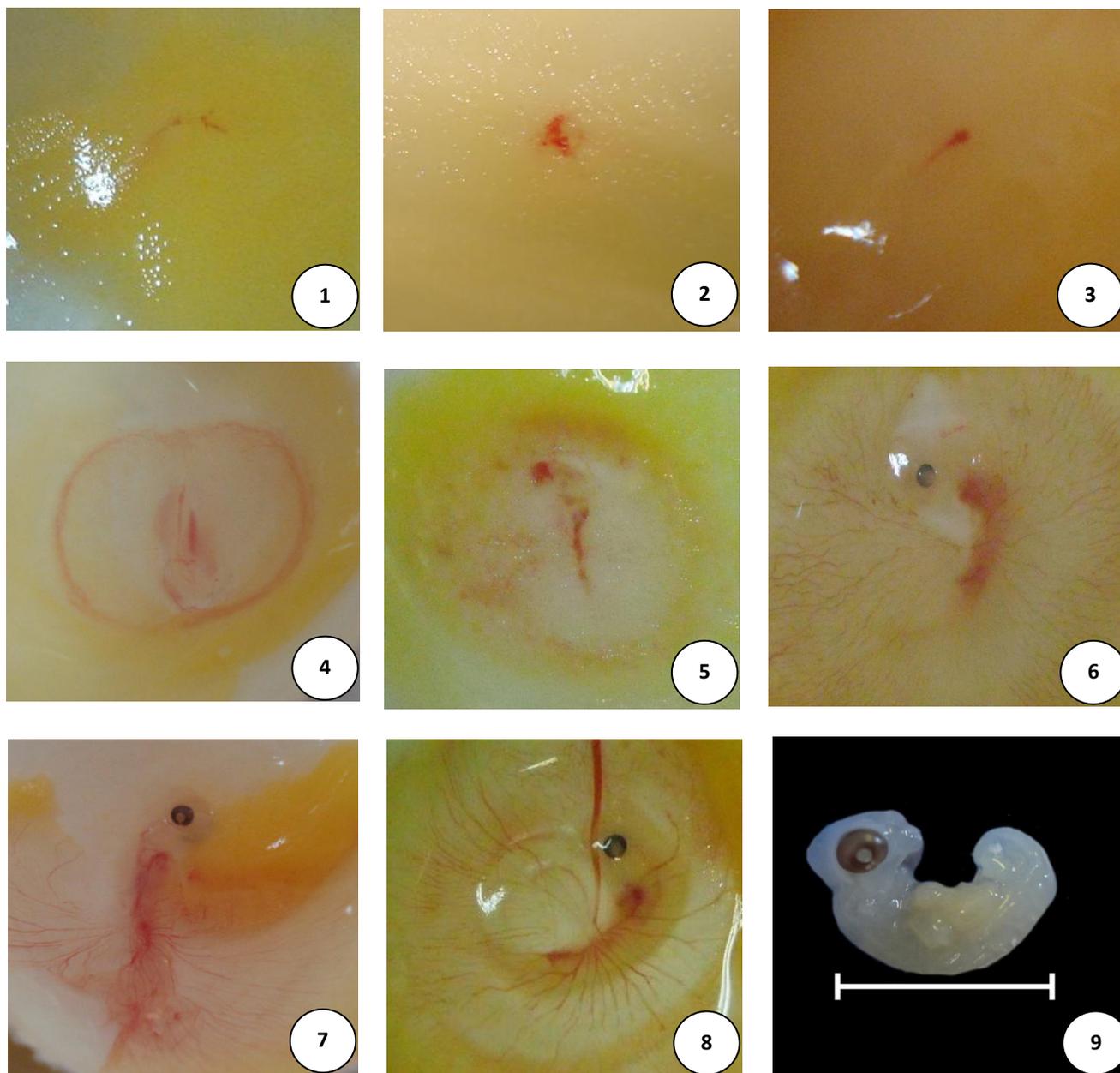
- Pérez Gianceselli MR, V Barbona, W Vercellese & B Araki Nishikori.** 2005. Actualización Bibliográfica de tratamientos en Tortugas. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad Nacional del Nordeste.
- Piña CI & B Argañaráz.** 2003. Efecto de la temperatura de incubación sobre aspectos de la ontogenia de *Phrynops hilarii* (Testudines, Chelidae). Cuadernos de Herpetología, 17(1-2): 130-137.
- Prado WS, T Waller, DA Albareda, MR Cabrera, E Etchepare, AR Giraud, V González Carman, L Prodocimi & E Richard.** 2012. Categorización del estado de conservación de las tortugas de la República Argentina. Cuadernos de Herpetología, 26(1): 375-388.
- Prado F, M Rosa y M Hilal.** 2010. Las especies C4 y el estrés ambiental. Pp. 31.34. En: Gonzalez Rebollar JL & A Chueca Sancho (Eds.). C4 y CAM. Características generales y uso en programas de desarrollo de tierras áridas y semiáridas. Homenaje al Dr. Julio López Gorgé. Servicio de Publicaciones del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid – España.
- Pritchard, PCH.** 1979. Encyclopedia of turtles. TFH Publications. New Jersey, USA.
- Richard E.** 1999. Tortugas de las regiones áridas de argentina. Contribución al conocimiento de las tortugas de regiones áridas de Argentina (Chelidae y Testudinae) con especial referencia a los aspectos ecoetológicos, comerciales y antropológicos de las especies del complejo chilensis (*Chelonoidis chilensis* y *C. donosobarrosi*) en la provincia de Mendoza. Literature of Latin America, Buenos Aires. 200 pp.
- Richard E & T Waller.** 2000. Categorización de las tortugas de Argentina. Pp. 35-44. En: Lavilla EO, E Richard y G Scrocchi (Eds.). Categorización de los Anfibios y Reptiles de Argentina. Asociación Herpetológica Argentina, Buenos Aires, Argentina.
- Rowe JW, L Holy, RE Ballinger & D Stanley-Samuelson.** 1995. Lipid provisioning of turtle eggs and hatchlings: total lipid, phospholipid, triacylglycerol and triacylglycerol fatty acids. Comparative Biochemistry and Physiology, 112B(2): 323-330.
- Sahoo G, RK Sahoo & P Mohanty-Hejmadi.** 1998. Calcium metabolism in olive ridley turtle eggs during embryonic development. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 121: 91-97.
- Serrano LL.** 1977. Nota sobre uma membrana extra-embrionária precoce, no embrião de *Phrynops hilarii* (Duméril e Bibron, 1835) (Nota Prévia). Pesquisas Zoologia, 29: 7-13.
- Shaw, CE.** 1966. Breeding the Galapagos tortoise-success story. Oryx, 9: 119-126.
- Shine R.** 1983. Reptilian reproductive modes: The oviparity-viviparity continuum. Herpetológica, 39(1): 1-8.

- Shine R & M Olsson.** 2003. When to be born? Prolonged pregnancy or incubation enhances locomotor performance in neonatal lizards (Scincidae). *Journal of Evolutionary Biology*, 16: 823-832.
- Souza Bujes C.** 1998. Atividade de nidificação de *Phrynops hilarii* Duméril & Bibron (Testudines, Cheloniidae) na reserva Biológica do Lami, Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 15(4): 921– 928.
- Speake BK & MB Thompson.** 2000. Lipids of the eggs and neonates of oviparous and viviparous lizards. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 127: 453-467.
- Thompson MB.** 1983. The physiology and ecology of the eggs of the pleurodiran tortoise *Emydura macquarii* (Gray, 1831). *Australian Wildlife Research*, 10: 363-371
- Shelford V. E. 1931. Some Concepts of Bioecology. *Ecology*, 12(3): 455-467.
- Spencer RJ.** 2002. Growth patterns of two widely distributed freshwater turtles and a comparison of common methods to estimate age. *Australian Journal of Zoology*, 50: 477-490.
- Spencer RJ, MB Thompson & PB Banks.** 2001. Hatch or wait? A dilemma in reptilian incubation. *Oikos*, 93(3): 401-406.
- Thompson MB & BK Speake.** 2003. Energy and nutrient utilization by embryonic reptiles. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 133: 529-538.
- Thompson MB & BK Speake.** 2004. Egg morphology and composition. Pp. 45-74. En: Deeming, DC (Ed.). *Reptilian Incubation: Environment, Evolution and Behavior*. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Thompson MB, BK Speake, KJ Rusell & RJ McCartney.** 2001. Utilisation of lipids, protein, ions and energy during embryonic development of Australian oviparous skinks in the genus *Lampropholis*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A*, 129: 313-326.
- Thompson MB, BK Speake, KJ Rusell, RJ McCartney & PF Surai.** 1999. Changes in fatty acid profiles and in protein, ion and energy contents of eggs of the Murray short-necked turtle, *Emydura macquarii* (Chelonia, Pleurodira) during development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 122: 75-84.
- Tortato MA.** 2007. Contribuição ao conhecimento de *Phrynops hilarii* (Duméril & Bibron, 1835) (Testudines, Cheloniidae) em área de restinga no Estado de Santa Catarina, Sul do Brasil. *Biotemas*, 20(1): 119-122.
- Tunsaringkarn T, W Tungjaroenchai & W Siriwong.** 2012. Mineral composition of chicken', quail' and snail' eating turtle's eggs. *Journal of Health Research*, 26(2): 59-63.
- Tunsaringkarn T, W Tungjaroenchai & W Siriwong.** 2013. Determination of chemical compositions of snail-eating turtle (*Malayenys macrocephala*) eggs. *Agricultural Science Developments*, 2(4): 31-39.

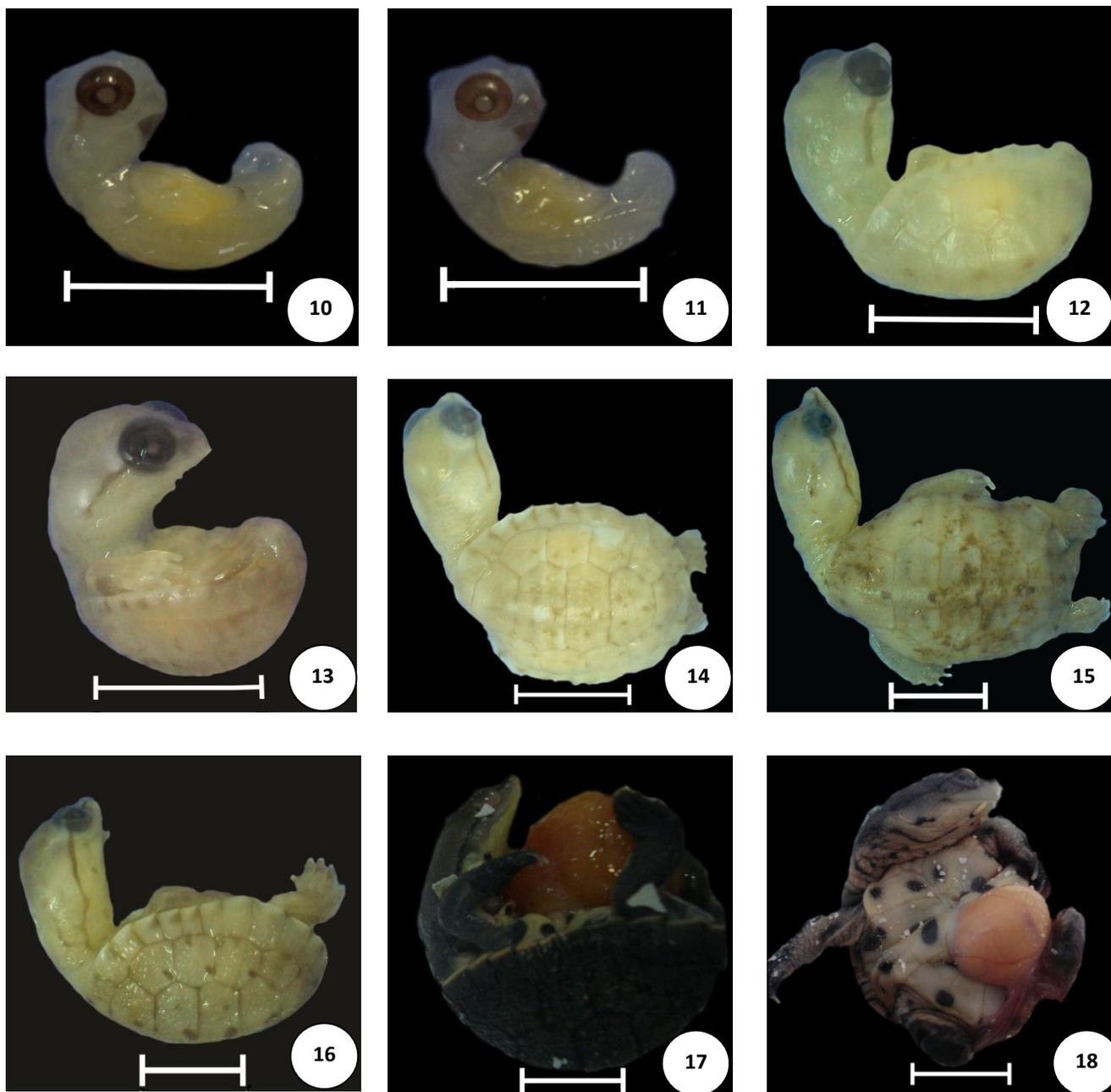
- Van Dijk PP, JB Iverson, HB Shaffer, R Bour & GJ Rhodin.** 2012. Turtles of the World, 2012 Update: Annotated checklist of taxonomy, synonymy, distribution, and conservation status. Pp. 243-328. En: Rhodin AGJ, PCH Pritchard, PP Van Dijk, RA Saumure, KA Buhlmann, JB Iverson & RA Mittermeier (Eds.). Conservation biology of freshwater turtles and tortoises: A compilation project of the IUCN/ SSC Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group. Chelonian Research Monographs 5.
- Vitt LJ & J Caldwell.** 2009. Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles. San Diego: Academic Press, San Diego, USA. 697pp.
- Vleck D.** 1991. Water economy and solute regulation of reptilian and avian embryos. Pp. 245-259. En: Deeming DC & MWJ Ferguson (Eds.). Egg Incubation: Its Effects on Embryonic Development in Birds and Reptiles. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Wallace BP, PR Sotherland, PS Tomillo, SS Bouchard, RD Reina, JR Spotila & FV Paladino.** 2006. Egg components, egg size, and hatchling size in leatherback turtles. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 145(4): 524-532.
- Webb GJW, D Choquenot, & PJ Whitehead.** 1986. Nests, eggs, and embryonic development of *Carettochelys insculpta* (Chelonia: Carettochelidae) from northern Australia. Journal of Zoology, 1(3): 521-550.
- Wilhoft DC.** 1986. Eggs and hatchling components of the snapping turtle (*Chelydra serpentina*). Comparative Biochemistry and Physiology, 84A(3): 483-486.
- Yntema CL.** 1968. A series of stages in the embryonic development of *Chelydra serpentina*. Journal of Morphology, 125: 219-251.
- Zhao B, Y Chen, Y Wang, P Ding & WG Du.** 2013. Does the hydric environment affect the incubation small rigid-shelled turtle eggs? Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, 164: 66-70.
- Zug GR, LJ Vitt & JP Caldwell.** 2001. Herpetology: An introductory biology of amphibians and reptiles. 2nd edition. Academic Press, San Diego, California, USA. 630pp.

ANEXO I

Estadios de desarrollo embrionario encontrados en los huevos de *Phrynops hilarii* durante el desarrollo de esta tesis



Estadios embrionarios en huevos de *Phrynops hilarii*. 1. Estadio 5-6, 2. Estadio 7, 3. Estadio 8, 4. Estadio 9, 5. Estadio 10, 6. Estadio 11, 7. Estadio 12, 8. Estadio 13, 9. Estadio 14-15. Escala= 1cm



Estadios embrionarios en huevos de *Phrynops hilarii* (cont.). 10. Estadio 15-16, 11. Estadio 17, 12. Estadio 18, 13. Estadio 19, 14. Estadio 21, 15. Estadio 22, 16. Estadio 23, 17. Estadio 24-25, 18. Estadio 26 (eclosión). Escala= 1cm

ANEXO II

Listado individuos depositados en la colección del Centro de Investigaciones Científicas y Transferencia de Tecnología a la Producción (CICyTTP-CONICET).

AÑO	FECHA	Nº HUEVO	TRATAMIENTO	ESTADIO	Nº COLECCION
2011	11/05/2011	V 2	A14	DISCO EMBRIONARIO	DIAM-E 95
2012	04/07/2012	XLVII 7	A14	DISCO EMBRIONARIO	DIAM-E 159
2012	26/12/2012	XLII 8	A14	DISCO EMBRIONARIO	DIAM-E 197
2011	11/05/2011	VII 3	A19	DISCO EMBRIONARIO	DIAM-E 97
2011	08/06/2011	V 4	A19	DISCO EMBRIONARIO	DIAM-E 102
2011	30/08/2011	VIII 3	A19	DISCO EMBRIONARIO	DIAM-E 114
2011	30/08/2011	III 3	A24	DISCO EMBRIONARIO	DIAM-E 113
2012	04/07/2012	XLIII 15	B14	DISCO EMBRIONARIO	DIAM-E 156
2011	11/05/2011	V 7	B14	DISCO EMBRIONARIO	DIAM-E 96
2011	08/06/2011	IX 11	B19	DISCO EMBRIONARIO	DIAM-E 104
2012	04/07/2012	XLI 12	B19	DISCO EMBRIONARIO	DIAM-E 154
2011	08/06/2011	III 9	B24	DISCO EMBRIONARIO	DIAM-E 100
2011	08/06/2011	IV 11	B24	DISCO EMBRIONARIO	DIAM-E 101
2011	09/06/2011	XXVII 10	B24	DISCO EMBRIONARIO	DIAM-E 110
2012	04/07/2012	XLI 20	C14	DISCO EMBRIONARIO	DIAM-E 155
2012	25/09/2012	XL 8	C14	DISCO EMBRIONARIO	DIAM-E 172
2012	25/09/2012	XLVII 10	C14	DISCO EMBRIONARIO	DIAM-E 178
2012	19/11/2012	XLVII 11	C14	DISCO EMBRIONARIO	DIAM-E 191
2011	08/06/2011	XIX 4	C24	DISCO EMBRIONARIO	DIAM-E 105
2011	08/06/2011	XX 8	C24	DISCO EMBRIONARIO	DIAM-E 106
2012	04/07/2012	XLV 5	C24	DISCO EMBRIONARIO	DIAM-E 158
2011	11/05/2011	XVI 2	Testigo	DISCO EMBRIONARIO	DIAM-E 98
2011	09/06/2011	XVII 1	Testigo	DISCO EMBRIONARIO	DIAM-E 107
2012	04/07/2012	XLIV 1	Testigo	DISCO EMBRIONARIO	DIAM-E 157
2012	04/07/2012	XLVIII 4	Testigo	DISCO EMBRIONARIO	DIAM-E 160
2011	06/09/2011	VII 4	A19	PRIMORDIOS CARDIACOS	DIAM-E 118

AÑO	FECHA	Nº HUEVO	TRATAMIENTO	ESTADIO	Nº COLECCION
2011	09/11/2011	XII 8	A19	PRIMORDIOS CARDIACOS	DIAM-E 127
2011	14/11/2011	VII 2	A19	PRIMORDIOS CARDIACOS	DIAM-E 129
2011	29/02/2012	XII 7	A19	PRIMORDIOS CARDIACOS	DIAM-E 137
2012	13/06/2012	XXXI 4	A19	PRIMORDIOS CARDIACOS	DIAM-E 151
2012	31/07/2012	XXXII 10	A19	PRIMORDIOS CARDIACOS	DIAM-E 161
2012	25/09/2012	XXXIII 7	A19	PRIMORDIOS CARDIACOS	DIAM-E 169
2012	25/09/2012	XLV 7	A19	PRIMORDIOS CARDIACOS	DIAM-E 176
2012	19/11/2012	XLIII 8	A19	PRIMORDIOS CARDIACOS	DIAM-E 187
2012	19/12/2012	XXXIV 5	A19	PRIMORDIOS CARDIACOS	DIAM-E 192
2012	26/02/2013	XLIII 7	A19	PRIMORDIOS CARDIACOS	DIAM-E 206
2012	19/03/2013	XLI 9	A19	PRIMORDIOS CARDIACOS	DIAM-E 209
2012	19/03/2013	XLI 10	A19	PRIMORDIOS CARDIACOS	DIAM-E 210
2012	19/03/2013	XLII 14	A19	PRIMORDIOS CARDIACOS	DIAM-E 211
2011	08/06/2011	III 5	A24	PRIMORDIOS CARDIACOS	DIAM-E 99
2011	08/06/2011	VIII 5	A24	PRIMORDIOS CARDIACOS	DIAM-E 103
2011	09/06/2011	XXVI 3	A24	PRIMORDIOS CARDIACOS	DIAM-E 108
2011	09/06/2011	XXVII 2	A24	PRIMORDIOS CARDIACOS	DIAM-E 109
2011	30/08/2011	X 6	A24	PRIMORDIOS CARDIACOS	DIAM-E 115
2012	13/06/2012	XXXVI 2	A24	PRIMORDIOS CARDIACOS	DIAM-E 152
2012	28/08/2012	XXXII 1	A24	PRIMORDIOS CARDIACOS	DIAM-E 164
2011	30/06/2011	XXIII 7	A24	PRIMORDIOS CARDIACOS	DIAM-E 111
2011	06/09/2011	VII 6	B19	PRIMORDIOS CARDIACOS	DIAM-E 119
2011	09/11/2011	VIII 9	B19	PRIMORDIOS CARDIACOS	DIAM-E 125
2011	29/02/2012	V 10	B19	PRIMORDIOS CARDIACOS	DIAM-E 135
2012	25/09/2012	XXXI 8	B19	PRIMORDIOS CARDIACOS	DIAM-E 168
2012	19/11/2012	XLV 9	B19	PRIMORDIOS CARDIACOS	DIAM-E 189
2012	23/10/2012	XXXI 7	B19	PRIMORDIOS CARDIACOS	DIAM-E 179
2012	13/06/2012	XXXVI 4	B24	PRIMORDIOS CARDIACOS	DIAM-E 153
2011	06/09/2011	XIX 9	C19	PRIMORDIOS CARDIACOS	DIAM-E 120
2012	19/11/2012	XLIII 12	C19	PRIMORDIOS CARDIACOS	DIAM-E 188
2011	30/08/2011	XII 2	C24	PRIMORDIOS CARDIACOS	DIAM-E 116
2012	23/10/2012	XXXVII 2	Testigo	PRIMORDIOS CARDIACOS	DIAM-E 182

AÑO	FECHA	Nº HUEVO	TRATAMIENTO	ESTADIO	Nº COLECCION
2012	23/10/2012	XLVIII 2	Testigo	PRIMORDIOS CARDIACOS	DIAM-E 184
2011	09/11/2011	IX 12	C19	ESTADIO 10	DIAM-E 126
2011	09/11/2011	III 8	B24	ESTADIO 10-11	DIAM-E 124
2011	12/06/2012	III 11	C24	ESTADIO 10-11	DIAM-E 145
2011	30/08/2011	XX 6	B24	ESTADIO 11	DIAM-E 117
2012	08/08/2012	XLVI 8	A24	ESTADIO 11-12	DIAM-E 163
2012	25/09/2012	XLIII 5	C24	ESTADIO 11-12	DIAM-E 175
2011	16/08/2011	XXIX 4	A24	ESTADIO 12	DIAM-E 112
2011	29/02/2012	IX 9	B19	ESTADIO 12	DIAM-E 136
2011	09/11/2011	II 7	B24	ESTADIO 12	DIAM-E 122
2011	14/11/2011	XII 4	B24	ESTADIO 12	DIAM-E 130
2012	08/08/2012	XLIII 3	B24	ESTADIO 12-13	DIAM-E 162
2012	25/09/2012	XLVI 10	B24	ESTADIO 12-13	DIAM-E 177
2011	24/11/2011	XIV 12	Testigo	ESTADIO 12-13	DIAM-E 131
2011	14/11/2011	IV 17	C24	ESTADIO 13	DIAM-E 128
2012	25/09/2012	XXXIV 8	B24	ESTADIO 13-14	DIAM-E 170
2012	28/08/2012	XXXVIII 6	C24	ESTADIO 13-14	DIAM-E 165
2011	09/11/2011	II 11	C24	ESTADIO 14	DIAM-E 123
2011	24/11/2011	XVIII 1	Testigo	ESTADIO 14-15	DIAM-E 132
2012	19/11/2012	XLVI 13	C24	ESTADIO 15	DIAM-E 190
2012	25/09/2012	XLIII 2	A24	ESTADIO 15-16	DIAM-E 174
2012	25/09/2012	XLII 18	B24	ESTADIO 15-16	DIAM-E 173
2011	01/12/2011	XXX 4	B24	ESTADIO 16-17	DIAM-E 134
2012	23/10/2012	XXXVIII 5	C24	ESTADIO 16-17	DIAM-E 183
2012	19/12/2012	XXXV 3	B24	ESTADIO 17-18	DIAM-E 193
2012	23/10/2012	XXXIII 5	C24	ESTADIO 17-18	DIAM-E 180
2012	28/08/2012	XLIII 14	B24	ESTADIO 18	DIAM-E 166
2012	25/09/2012	XXXVII 6	C24	ESTADIO 18	DIAM-E 171
2011	05/10/2011	XXIX 2	A24	ESTADIO 18-19	DIAM-E 121
2012	28/08/2012	XLV 1	A24	ESTADIO 18-19	DIAM-E 167
2012	26/12/2012	XLII 1	Testigo	ESTADIO 18-19	DIAM-E 199
2012	19/11/2012	XLII 19	A24	ESTADIO 19	DIAM-E 186

AÑO	FECHA	Nº HUEVO	TRATAMIENTO	ESTADIO	Nº COLECCION
2012	19/12/2012	XXXVII 4	B24	ESTADIO 18-19	DIAM-E 195
2012	26/12/2012	XLVI 12	C24	ESTADIO 21	DIAM-E 204
2011	12/06/2012	XXIX 1	A24	ESTADIO 21-23	DIAM-E 150
2012	26/12/2012	XXXVIII 8	Testigo	ESTADIO 22	DIAM-E 196
2012	23/10/2012	XXXIII 3	B24	ESTADIO 23	DIAM-E 181
2012	19/11/2012	XLI 5	B24	ESTADIO 23	DIAM-E 185
2012	26/12/2012	XLVI 9	B24	ESTADIO 24	DIAM-E 198
2012	26/12/2012	XLV 3	B24	ESTADIO 24	DIAM-E 202
2011	01/12/2011	XXX 1	A24	ESTADIO 24-25	DIAM-E 133
2011	29/02/2012	XXIII 1	A24	ESTADIO 24-25	DIAM-E 138
2011	29/02/2012	XXVIII 3	A24	ESTADIO 24-25	DIAM-E 139
2011	29/02/2012	XXVIII 6	B24	ESTADIO 24-25	DIAM-E 140
2011	03/06/2012	III 7	B24	ESTADIO 24-25	DIAM-E 143
2012	26/12/2012	XLII 17	B24	ESTADIO 24-25	DIAM-E 200
2012	26/12/2012	XLV 4	B24	ESTADIO 24-25	DIAM-E 203
2012	26/12/2012	XLII 17	B24	ESTADIO 24-25	DIAM-E 205
2011	29/02/2012	XXVIII 7	C24	ESTADIO 24-25	DIAM-E 141
2011	03/06/2012	III 14	C24	ESTADIO 24-25	DIAM-E 144
2012	19/12/2012	XXXVI 5	C24	ESTADIO 24-25	DIAM-E 194
2011	14/03/2012	XVII 2	Testigo	ESTADIO 24-25	DIAM-E 142
2012	26/12/2012	XLIII 1	A24	ESTADIO 25	DIAM-E 201
2011	12/06/2012	V 11	B24	ESTADIO 25	DIAM-E 146
2011	12/06/2012	XIX 2	B24	ESTADIO 25	DIAM-E 147
2011	12/06/2012	XX 7	C24	ESTADIO 25	DIAM-E 148
2011	12/06/2012	XX 9	C24	ESTADIO 25	DIAM-E 149
2012	19/03/2013	XXXV 5	C24	ESTADIO 25	DIAM-E 207
2012	19/03/2013	XXXV 6	C24	ESTADIO 25	DIAM-E 208

ANEXO III

Protocolos detallados utilizados para la realización de los análisis químicos del contenido de los huevos.

HOMOGENEIZACION (Emulsión Inicial):

- Pesar el vaso de precipitado en que se va a realizar la mezcla
- Incorporar la yema al vaso
- Pesar Vaso + Yema
- Calcular Peso de Yema
- Incorporar un Volumen de la solución de NaCl 5% en igual cantidad que el Peso de Yema. (ej: si la yema pesa 5 g, agregar 5 ml de NaCl)

1. HUMEDAD, SOLIDOS TOTALES Y CENIZAS (por duplicado)

Día 1

- a. Pesar cápsulas
- b. Incorporar 2 g de la emulsión inicial (yema+NaCl) en cada cápsula, pesar (Peso Muestra Húmeda: **Pe m.h.**)
- c. Poner en estufa 50-60 °C por 24hs

Día 2

- a. Secar en estufa 90-100°C durante 30 min
- b. Enfriar en desecador
- c. Pesar (Peso Muestra Seca: **Pe m.s.**)
- d. Colocar en mufla 500-550°C por 24 hs

Día 3

- a. Retirar de la mufla y enfriar en desecador
- b. Pesar (Peso de Cenizas: **Pe cen**)
- c. Incorporar 1 ml de HNO₃ (Ácido Nítrico) y evaporar en baño. Una vez que el ácido desaparece totalmente, poner en mufla 15-20 min hasta blanquear completamente.

- d. Levantar los minerales con 5 ml de HCl 3.5N.
- e. Enrasar a 25 ml en matraz con H₂O(d)
- f. Reservar para análisis de minerales

2. LIPIDOS TOTALES (por duplicado)

- a. Pesar vaso
- b. 3g de dilución yema/CINa
- c. 15 ml Metanol (minipimmer)
- d. 30 ml Cloroformo (agitador 15')
- e. Coloco en ampolla, agrego 15ml H₂O destilada, agito
- f. Decantación en ampolla (24hs) 1ra extracción
- g. 10 ml de Cloroformo (1hr) 2da extracción
- h. Extracción total (ml)
- i. Muestra para lípidos totales: 15 ml de la extracción
- j. Evaporación en baño 70-80°C
- k. Estufa baja (50-60°C) durante 1h
- l. Estufa de vacio (70-80°C) durante 2hs
- m. Enfriar
- n. Pesar (Lípidos totales)
- o. Agregar 5 ml de Cloroformo en 2-3 veces
- p. Reservar para análisis de Colesterol

3. COLESTEROL

- a. 1 ml de muestra en Cloroformo
- b. Evaporación en baño 70-80°C
- c. Agregar 6 ml etanol absoluto
- d. Agregar 1,5 ml KOH 50%
- e. Baño 70-80°C x 45 min
- f. Enfriar
- g. Agregar 7 ml agua destilada

- h. Agregar 4 ml Hexano normal
- i. Decantación
- j. Extraer 3 ml de la porción con hexano
- k. Evaporación de Hexano en baño a 80 °C
- l. Agregar 100ul de alcohol isopropílico
- m. Agregar 400ul de agua destilada
- n. Extraer 50ul de la dispersión (por duplicado)
- o. Agregar 1 ml de reactivo (kit producido por la Sociedad de Bioquímicos de Santa Fe, colesterol enzimático 250ml) en cada duplicado (agregar blanco de muestra)
- p. Calentar 15' en baño 37 °C
- q. Lectura en espectrofotómetro UV- Vis Metrolab 330 (330-1000nm) a 505nm.

4. **PROTEINAS** (por duplicado)

- a. Pesar 0,40 g de la emulsión yema/CINa
- b. Agregar una pastilla catalizadora ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y 5ml de SO_4H_2 concentrado en matraz
- c. Agitar y reservar 24hs
- d. Preparar erlenmeyers con 250 ml de ácido bórico 3%
- e. Conectar el matraz a la trampa de absorción que contiene 250 mL de hidróxido de sodio al 15 %.
- f. Realizar la digestión en el equipo BUCHI K-355 durante 5 minutos cada réplica
- g. Situar un erlenmeyer de 250ml a la salida del refrigerante con 50ml de ácido Bórico y unas gotas de indicador.
- h. Introducir el tubo con la muestra en el destilador.
- i. Destilar y recoger en erlenmeyer
- j. El resultado es un líquido transparente nítido con coloración verde azulado dependiendo del catalizador utilizado
- k. Titular con SO_4H_2 0,1N

ANEXO IV

Prueba de Kruskal Wallis para la variable Peso(g) entre tratamientos por rango de semanas. Los rangos de semanas establecidos son los siguientes: **0** (semana inicial, momento en que el huevo es llevado al laboratorio y puesto en tratamiento), **1** (4-7 semanas, corresponde al primer análisis de huevos sometidos a tratamiento, en este rango de semanas se retiran del agua los huevos del tratamiento B), **2** (9-12 semanas, corresponde al segundo análisis de huevos sometidos a tratamiento, en este rango de semanas se retiran del agua los huevos del tratamiento C), **3** (13-16 semanas), **4** (17-19 semanas), **5** (21-23 semanas), **6** (24-26 semanas), **7** (30-32 semanas), **8** (38-42 semanas) y **9** (52-54 semanas).

Semana inicial	Trat	n	Media	DE	Mediana	H	p
0	A14	48	20,6	1,7	20,3	14,9	0,1369
0	A19	48	20,9	2,2	21,3		
0	A24	49	21,0	2,0	21,4		
0	B14	45	20,9	1,8	20,7		
0	B19	48	21,0	2,1	21,1		
0	B24	48	20,8	2,3	20,9		
0	C14	47	21,0	1,9	20,9		
0	C19	47	20,9	2,2	21,0		
0	C24	46	21,2	1,9	21,2		
0	Testigo	48	20,0	1,5	19,9		

Rango Semanas	Trat	n	Media	DE	Mediana	H	p
1	A14	23	18,7	1,1	18,6	25,2	0,0027
1	A19	18	18,9	1,9	19,3		
1	A24	19	19,6	1,6	19,1		
1	B14	21	20,1	1,6	19,7		
1	B19	18	20,0	1,8	19,7		
1	B24	25	19,6	2,6	20,2		
1	C14	12	19,9	3,7	21,1		
1	C19	12	20,3	1,8	20,5		
1	C24	24	20,6	1,9	20,9		
1	Testigo	26	19,3	1,8	18,9		

Rango Semanas	Trat	n	Media	DE	Mediana	H	p
3	A14	20	17,1	1,3	17,2	53,6	<0,0001
3	A19	14	17,9	2,1	18,2		
3	A24	17	16,1	3,1	17,2		
3	B14	18	19,3	1,5	18,9		
3	B19	14	19,2	1,9	19,5		
3	B24	21	17,3	2,5	17,6		
3	C14	19	20,2	1,8	20,5		
3	C19	14	19,9	1,8	20,2		
3	C24	19	19,7	2,1	20,3		
3	Testigo	12	19,7	1,9	20,2		

Matriz de valores de p entre tratamientos

	A14	A19	A24	B14	B19	B24	C14	C19	C24	Testigo
A14		0,18	0,81	0,0007	0,003	0,40	<0,0001	0,0002	0,0002	0,001
A19			0,13	0,08	0,12	0,55	0,004	0,02	0,04	0,07
A24				0,0005	0,002	0,30	<0,0001	0,0001	0,0002	0,0008
B14					0,90	0,01	0,23	0,54	0,77	0,82
B19						0,02	0,21	0,48	0,69	0,74
B24							<0,0001	0,002	0,003	0,01
C14								0,62	0,35	0,40
C19									0,72	0,73
C24										0,98
Testigo										

Rango Semanas	Trat	n	Medias	DE	Mediana	H	p
4	A14	20	16,7	1,4	16,9	55,0	<0,0001
4	A19	16	17,0	2,7	17,4		
4	A24	14	15,2	2,6	15,4		
4	B14	14	19,0	1,6	18,8		
4	B19	13	18,3	1,9	19,1		
4	B24	19	16,2	2,8	16,5		
4	C14	15	20,2	1,7	20,5		
4	C19	14	19,0	1,8	19,3		
4	C24	17	18,5	2,6	19,4		
4	Testigo	9	20,3	1,8	20,3		

Rango Semanas	Trat	n	Media	DE	Mediana	H	p
6	A14	8	17,2	1,0	17,6	35,7	<0,0001
6	A19	11	16,9	3,1	18,0		
6	A24	10	11,6	3,6	10,4		
6	B14	7	19,0	1,6	18,9		
6	B19	8	17,1	2,0	16,7		
6	B24	6	14,5	1,9	14,5		
6	C14	9	20,1	1,2	20,2		
6	C19	9	17,3	3,0	17,7		
6	C24	4	17,6	1,6	18,3		

Matriz de valores de p entre tratamientos

	A14	A19	A24	B14	B19	B24	C14	C19	C24
A14		0,71	0,02	0,11	0,95	0,17	0,01	0,54	0,56
A19			0,0041	0,18	0,76	0,07	0,01	0,78	0,75
A24				0,00012	0,02	0,50	<0,0001	0,0027	0,02
B14					0,13	0,01	0,33	0,30	0,46
B19						0,16	0,01	0,58	0,59
B24							0,0001	0,05	0,09
C14								0,03	0,11
C19									0,92
C24									

Rango Semanas	Trat	n	Media	DE	Mediana	H	p
7	A14	14	16,6	1,0	16,7	40,1	<0,0001
7	A19	10	17,7	2,3	18,4		
7	A24	8	10,6	3,2	10,3		
7	B14	10	19,0	1,7	19,2		
7	B19	3	15,9	3,6	14,5		
7	B24	13	13,4	3,6	13,2		
7	C14	1	21,7	0,0	21,7		
7	C19	5	18,0	1,2	18,7		
7	C24	10	16,6	1,4	17,1		
7	Testigo	2	19,8	1,3	19,8		

% Cenizas

Estadio	Tratam	Código	n	Medias	DE	Medianas	H	p
1	inicial	1	30	2,7	1,0	2,8	11,3	0,7929
2	A14	2	5	2,9	1,2	2,6		
2	A19	3	3	3,5	3,0	2,0		
2	A24	4	2	2,4	1,4	2,4		
2	B14	5	6	2,9	0,4	2,9		
2	B19	6	6	2,2	0,7	2,3		
2	B24	7	1	2,1	0,0	2,1		
2	C14	8	5	2,9	0,2	2,8		
2	C19	9	2	2,7	0,4	2,7		
2	C24	10	1	2,7	0,0	2,7		
2	Testigo	11	11	2,4	1,3	2,1		
3	A19	12	9	3,0	0,5	2,8		
3	A24	13	3	1,9	0,9	1,9		
3	B19	14	2	1,9	0,1	1,9		
3	B24	15	2	2,2	0,8	2,2		
3	C24	16	2	2,7	0,1	2,7		

% Proteínas

Estadio	Tratam	Código	n	Medias	DE	Medianas	H	p
1	inicial	1	13	56,1	4,4	57,4	8,6	0,5741
2	A14	2	2	58,3	0,2	58,3		
2	A19	3	1	51,9	0,0	51,9		
2	A24	4	1	56,9	0,0	56,9		
2	B14	5	2	55,6	7,0	55,6		
2	B19	6	5	54,0	4,7	54,2		
2	C19	7	1	56,0	0,0	56,0		
2	C24	8	1	55,3	0,0	55,3		
2	Testigo	9	4	58,7	2,4	58,6		
3	A19	10	6	52,1	5,9	53,6		
3	B24	11	2	49,7	12,9	49,7		

% Grasas

Estadio	Tratam	Código	n	Medias	DE	Medianas	H	p
1	inicial	1	29	25,3	7,1	23,9	21,8	0,1506
2	A14	2	5	22,2	6,4	25,3		
2	A19	3	4	31,3	9,9	30,9		
2	A24	4	2	22,1	7,9	22,1		
2	B14	5	5	21,6	5,9	20,6		
2	B19	6	5	18,9	5,6	15,7		
2	B24	7	1	19,5	0,0	19,5		
2	C14	8	6	22,4	10,3	21,3		
2	C19	9	2	21,0	2,9	21,0		
2	C24	10	1	18,1	0,0	18,1		
2	Testigo	11	11	28,7	9,8	28,6		
3	A19	12	11	28,4	8,7	25,6		
3	A24	13	3	33,8	5,3	31,3		
3	B19	14	3	25,0	4,2	23,3		
3	B24	15	2	27,3	7,4	27,3		
3	C24	16	2	16,6	3,4	16,6		

mg de colesterol/100g grasa

Estadio	Tratam	Código	n	Medias	DE	Medianas	H	p
1	inicial	1	17	426,0	147,8	400,9	25,6	0,0124
2	A14	2	4	324,4	108,4	325,4		
2	A19	3	3	265,2	150,7	220,2		
2	A24	4	2	295,1	85,5	295,1		
2	B14	5	3	218,0	40,2	222,1		
2	B19	6	5	232,0	104,1	209,8		
2	C14	7	6	268,9	90,7	288,2		
2	C19	8	1	212,6	0,0	212,6		
2	C24	9	1	248,2	0,0	248,2		
2	Testigo	10	5	360,8	122,6	402,3		
3	A19	11	7	456,5	99,7	415,3		
3	A24	12	1	464,7	0,0	464,7		

Matriz de valores de p entre tratamientos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1		0,29	0,09	0,23	0,01	0,01	0,02	0,10	0,21	0,60	0,49	0,55
2			0,53	0,72	0,20	0,24	0,44	0,31	0,53	0,64	0,16	0,28
3				0,85	0,55	0,67	0,98	0,57	0,85	0,28	0,05	0,15
4					0,47	0,56	0,81	0,50	0,74	0,46	0,14	0,22
5						0,81	0,51	0,89	0,82	0,08	0,01	0,06
6							0,63	0,75	0,94	0,08	0,004	0,07
7								0,56	0,85	0,18	0,01	0,12
8									0,76	0,19	0,06	0,10
9										0,35	0,14	0,18
10											0,32	0,42
11												0,77
12												

mg K/100g yema

Estadio	Tratam	Código	n	Medias	DE	Medianas	H	p
1	inicial	1	12	617,8	188,7	547,4	14,1	0,1206
2	A14	2	2	412,8	95,1	412,8		
2	A19	3	1	425,	0,0	425,2		
2	A24	4	1	339,7	0,0	339,7		
2	B14	5	1	602,6	0,0	602,6		
2	B19	6	4	432,0	28,9	442,5		
2	C19	7	1	974,9	0,0	974,9		
2	Testigo	8	4	472,8	226,7	476,7		
3	A19	9	8	461,2	78,8	500,0		
3	B24	10	1	349,9	0,0	349,9		

mg Ca/100g yema

Estadio	Tratam	Código	n	Medias	DE	Medianas	H	p
1	inicial	1	12	529,2	74,4	538,1	7,5	0,5864
2	A14	2	2	518,4	20,2	518,4		
2	A19	3	1	471,5	0,0	471,5		
2	A24	4	1	470,5	0,0	470,5		
2	B14	5	1	465,7	0,0	465,7		
2	B19	6	4	466,8	41,1	454,3		
2	C19	7	1	550,5	0,0	550,5		
2	Testigo	8	4	511,7	262,1	476,0		
3	A19	9	8	491,6	104,1	466,9		
3	B24	10	1	404,4	0,0	404,4		

mg Fe/100g yema

Estadio	Tratam	Código	n	Medias	DE	Medianas	H	p
1	inicial	1	12	6,6	1,8	6,5	7,3	0,6055
2	A14	2	2	7,9	1,8	7,9		
2	A19	3	1	4,9	0,0	4,9		
2	A24	4	1	5,5	0,0	5,5		
2	B14	5	1	5,4	0,0	5,4		
2	B19	6	3	5,3	0,4	5,5		
2	C19	7	1	7,0	0,0	7,0		
2	Testigo	8	4	8,3	5,5	7,0		
3	A19	9	8	6,6	2,2	6,4		
3	B24	10	1	4,3	0,0	4,3		

mg Mg/100g yema

Estadio	Tratam	Código	n	Medias	DE	Medianas	H	p
1	inicial	1	12	126,4	23,4	128,5	10,5	0,3135
2	A14	2	2	118,7	27,1	118,7		
2	A19	3	1	127,6	0,0	127,6		
2	A24	4	1	95,1	0,0	95,1		
2	B14	5	1	117,0	0,0	117,0		
2	B19	6	4	106,1	13,0	102,5		
2	C19	7	1	122,8	0,0	122,8		
2	Testigo	8	4	114,1	49,3	115,2		
3	A19	9	8	99,6	13,6	98,1		
3	B24	10	1	104,9	0,0	104,9		

mg Zn/100g yema

Estadio	Tratam	Código	n	Medias	DE	Medianas	H	p
1	inicial	1	12	8,3	1,7	8,1	5,9	0,7477
2	A14	2	2	8,8	1,7	8,8		
2	A19	3	1	7,7	0,0	7,7		
2	A24	4	1	7,8	0,0	7,8		
2	B14	5	1	6,9	0,0	6,9		
2	B19	6	4	8,2	1,7	8,4		
2	C19	7	1	9,6	0,0	9,6		
2	Testigo	8	4	8,7	4,0	8,7		
3	A19	9	8	7,0	1,6	7,1		
3	B24	10	1	6,1	0,0	6,1		