

Biología reproductiva de *Bothrops alternatus* en un área templada de América del Sur: ciclo reproductivo masculino

Gisela Paola Bellini^{1,2}, Vanesa Arzamendia^{1,2}, Diana Alberto¹, Alejandro Raúl Giraudo^{1,2}

¹ Laboratorio de Herpetología, Instituto Nacional de Limnología - CONICET-UNL - Paraje El Pozo s/n, Ciudad Universitaria, 3000 Santa Fe, Argentina.

² Facultad de Humanidades y Ciencia - Universidad Nacional del Litoral- Santa Fe, Argentina.

Recibido: 11 Noviembre 2019

Revisado: 16 Diciembre 2019

Aceptado: 26 Diciembre 2019

Editor Asociado: J. Goldberg

doi: 10.31017/CdH.2020.(2019-044)

ABSTRACT

Reproductive biology of *Bothrops alternatus* in a South America template area: male reproductive cycle. The pitviper *Bothrops alternatus* is one of the most widely distributed and abundant venomous snake species in the South America template area. However, knowledge about their reproductive biology is mostly known for data from Brazilian populations, finding few data for the Argentine populations. The life history of snakes is influenced by ecological factors such as regional variations in climatic seasons, generating differences in reproductive biology between populations in different regions. We present the male reproductive cycle of *B. alternatus* at its southern distribution limit, based on morpho-anatomical and histological data. The testicular volume varied throughout the seasons, coinciding its increase and decrease with the increase and decrease in temperature. However, the morpho-anatomical measures did not show all the different stages through which the *B. alternatus* testicle passes. In spring the testicles were in recrudescence and in summer began the spermiogenesis that extended until the beginning of autumn (April). Testicular regression began in May (autumn) and in winter the seminiferous epithelium of the testicles retracts completely, being in total regression towards July and until the beginning of September (winter). Males of *B. alternatus* were reproductively active during spring / summer and reproductively inactive during autumn / winter, determining a seasonal reproductive cycle. However, sperm were found in the deferens ducts throughout all the year. With this study, we provide evidence to support the importance of the microscopic approach for studies of reproductive cycles. Finally, we discuss the synchronization of the male reproductive cycle with the female reproductive cycle in the southernmost population of *B. alternatus*.

Key words: Ecological factors; Histology; Sperm cycle; Asynchronic cycles.

RESUMEN

La yarará grande *Bothrops alternatus* es una especie de serpiente venenosa ampliamente distribuida y abundante en el área templada de América del Sur. Sin embargo el conocimiento sobre su biología reproductiva es mayormente conocido por datos de poblaciones brasileñas, existiendo escasos datos de las poblaciones argentinas. La historia de vida de las serpientes está influenciada por factores ecológicos como las variaciones regionales en las estaciones climáticas, generando diferencias en la biología reproductiva entre las poblaciones de diferentes regiones. Presentamos el ciclo reproductivo masculino de *B. alternatus* en su límite de distribución austral, basado en datos morfo-anatómicos e histológicos. El volumen testicular varió a lo largo de las estaciones, coincidiendo su aumento y disminución con el aumento y disminución de la temperatura. Sin embargo, las medidas morfo-anatómicas no mostraron todos los diferentes estadios por los que atraviesa el testículo de *B. alternatus*. En primavera los testículos estuvieron en recrudescencia y en verano comenzó la espermiogénesis que se extendió hasta el inicio del otoño (abril). La regresión testicular comenzó en mayo (otoño) y en invierno el epitelio seminífero de los testículos se retrae totalmente, encontrándose en regresión total hacia julio y hasta comienzos de septiembre (invierno). Los machos de *B. alternatus* estuvieron reproductivamente activos durante la primavera / verano y reproductivamente inactivos durante el otoño / invierno, determinando un ciclo reproductivo estacional. No obstante, se encontraron espermatozoides en los túbulos deferentes a lo largo de todos los meses del año. Con este estudio, aportamos evidencia para apoyar la importancia del enfoque microscópico para los estudios de los ciclos reproductivos. Finalmente, discutimos la sincronización del ciclo reproductivo masculino con el ciclo femenino en la población más austral de *B. alternatus*.

Palabras clave: Factores ecológicos; Histología; Ciclo espermático; Ciclos asincrónico.

Introducción

La reproducción es una función biológica importante, ya que es el medio por el cual los organismos transmiten sus genes a la próxima generación, haciendo su estudio esencial para comprender el ciclo de vida de un organismo (Shine, 2003; Almeida-Santos *et al.*, 2014; Van Dyke *et al.*, 2014). La biología reproductiva de las serpientes abarca diferentes parámetros, como el modo y los ciclos reproductivos, la fecundidad, la edad y el tamaño en la madurez, el dimorfismo sexual, los sistemas de apareamiento y el comportamiento reproductivo (Almeida-Santos *et al.*, 2014). Sin embargo la cantidad de los datos sobre la reproducción de las serpientes neotropicales difieren entre los sexos (Rojas *et al.*, 2013). Hasta hace poco tiempo la mayoría de ellos correspondían a hembras, encontrándose datos confiables para muchos linajes (e.g. Shine, 1977, 1994; Almeida-Santos y Salomão, 2002; Pizzatto *et al.*, 2008; Bellini *et al.*, 2017). Esto se debe en parte a que la reproducción se consideraba energéticamente más costosa para las hembras (Shine, 2003), y en parte a que sus ciclos reproductivos pueden ser inferidos a partir de la observación directa de sus gónadas, mediante el análisis de sus folículos y huevos (Almeida-Santos *et al.*, 2014). Actualmente se sabe que incluso en regiones templadas y cálidas el costo que demanda la reproducción en los machos es significativa, determinando que los ciclos reproductivos masculinos de muchas especies sean estacionales, y no continuos como se consideraba hasta hace poco tiempo (e. g. Barros *et al.*, 2014; Almeida-Santos *et al.*, 2017). Por otro lado, la mayoría de los estudios que incluyen eventos reproductivos masculinos se basan en observaciones morfo-anatómicas sin incluir análisis histológicos que los corroboren (Mathies, 2011; Rojas *et al.*, 2013).

El género *Bothrops* cuenta actualmente con 45 especies, distribuidas desde México a Argentina (Martins *et al.*, 2002; Bisneto y Kaefer, 2019; Uetz y Hošek 2019). Las serpientes pertenecientes a este género tienen un patrón reproductivo complejo, con diferentes estrategias, para posibilitar una reproducción exitosa (Almeida-Santos y Salomão, 2002). En los últimos veinte años, se han publicado varios trabajos sobre la biología reproductiva de diferentes especies *Bothrops*, con una amplia preponderancia de estudios desarrollados en Brasil (e.g. Almeida-Santos y Salomão, 2002; Valdujo *et al.*, 2002; Nogueira *et al.*, 2003; Hartmann *et al.*, 2004; Nunes *et*

al., 2010; Barros *et al.*, 2014; Bisneto y Kaefer, 2019). Estos estudios muestran que varios aspectos de la reproducción, como la viviparidad y la existencia de un ciclo reproductivo estacional se conservan en el grupo, evidenciando la influencia filogenética en la biología reproductiva de este género (Bisneto y Kaefer, 2019). Sin embargo, la estacionalidad reproductiva es común entre las serpientes y los ciclos reproductivos pueden estar correlacionados con variables climáticas (temperatura, precipitaciones, fotoperíodo), factores ecológicos como disponibilidad de recursos, modo reproductivo y su historia filogenética, generando diferencias en la cronología reproductiva entre las poblaciones de diferentes regiones (Pizzatto y Marques, 2007; Rebelato *et al.* 2016; Bellini *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2019; Silva *et al.* 2019)

Según Shine (2003) las serpientes coordinan sus decisiones reproductivas con fluctuaciones temporales en la disponibilidad de energía, ya que los costos reproductivos imponen una fuerte presión de selección que las obliga a ajustar sus estrategias reproductivas a las condiciones locales. Además, los factores ecológicos y geográficos condicionan la madurez, la fecundidad y el dimorfismo sexual, generando divergencia en las tácticas reproductivas entre y dentro de las especies (Vitt y Vangilder, 1983; Shine, 2003; Bellini *et al.*, 2018). Esto implica que suponer similitudes ecológicas o filogenéticas entre diferentes poblaciones de serpientes puede generar sesgos de interpretación sobre la biología reproductiva de las mismas.

Bothrops alternatus Duméril, Bibron & Duméril (1854) es una serpiente robusta de hábitos exclusivamente terrestres que se distribuye en Paraguay, Uruguay, Argentina y Brasil, ocupando un gradiente latitudinal y climático que incluye regiones tropicales y subtropicales hasta templadas (Giraudó, 2001, 2014). Esta especie habita principalmente formaciones abiertas, como pastizales, sabanas, humedales, bosques abiertos y arbustales (no selvas) de las regiones fitogeográficas Pampeana, Espinal, Chaco húmedo, Paranaense y del Cerrado, incluidas también áreas agrícolas, suburbanas y perturbadas (Giraudó y Scrocchi, 2002; Campbell y Lamar, 2004; Giraudó *et al.*, 2008; Nunes *et al.*, 2010). La biología reproductiva de machos y hembras de esta especie de yararará es conocida principalmente por datos de poblaciones subtropicales de Brasil (Almeida-Santos y Salomão, 2002; Nunes *et al.*, 2010). Para las poblaciones subtropicales-templadas argentinas se encuentran publicados solo datos sobre la bio-

logía reproductiva de las hembras (Giraud *et al.*, 2008; Bellini *et al.*, 2018). El objetivo de este estudio es describir el ciclo reproductivo masculino de *Bothrops alternatus* en un área subtropical-templada de América del Sur, considerando tanto aspectos morfo-anatómicos como histológicos. Finalmente discutimos la sincronización del ciclo reproductivo masculino con el ciclo femenino en la población más austral de *B. alternatus*.

Materiales y métodos

Área de estudio. El estudio de campo se llevó a cabo en un área subtropical-templada de América del Sur entre 24°30 S y 35°30 S de latitud, y 65° O y 53° O de longitud, una región en el dominio del Chaco (sensu Morrone, 2014). La geomorfología y el paisaje de esta región están fuertemente influenciados por los grandes ríos de la cuenca del Plata: Paraguay, Paraná y Uruguay que se unen para formar el río de La Plata, y presentan amplias llanuras de inundación que dan origen a diferentes tipos de humedales (Arzamendia y Giraud, 2009). La vegetación es un mosaico formado por sabanas y pastizales húmedos, bosques subtropicales húmedos a subxerófilos, bosques en galería y una amplia variedad de humedales -ríos, arroyos, lagunas, esteros- (Cabrera, 1976; Prado, 1993). El clima es estacional, con 4 estaciones marcadas, las temperaturas medias varían entre 17 y 21° C con mínimas rondando 0° C en otoño e invierno, y máximas de 35 a 40° C en primavera y verano. Las precipitaciones anuales varían entre 1000 y 1800 mm (Prado, 1993).

Recolección de datos. Los ejemplares analizados se obtuvieron mediante 460 muestreos de campo, entre enero de 1990 y julio de 2019. Se utilizaron 2 métodos de muestreo (Campbell y Christman, 1982): 1) búsquedas con un vehículo por rutas y caminos, a velocidades bajas y constantes (40-50 km/h); 2) búsquedas intensivas a pie sin rutas o caminos y encuentros ocasionales en recorridos en embarcaciones por los diferentes hábitats y horas del día, registrando ejemplares activos y ocultos en refugios (Scott, 1994; Valdujo *et al.*, 2002). Los ejemplares atropellados y los muertos por lugareños encontrados en buenas condiciones fueron conservados para su estudio y depositados en la colección del Instituto Nacional de Limnología (INALI-CONICET-UNL).

Los eventos reproductivos se describieron según las estaciones australes. El ciclo reproductivo

de los machos maduros se analizó considerando los cambios morfológicos y anatómicos, tanto a nivel macroscópico como microscópico de los testículos y túbulos deferentes.

Registros morfo-anatómicos. Los ejemplares conservados fueron sexados por medio de una incisión debajo de la cloaca y se les tomaron los siguientes caracteres: 1) longitud hocico cloaca (LHC); 2) masa corporal (MC); y 3) largo, ancho y alto del testículo derecho. Todas las medidas fueron tomadas en milímetros utilizando cinta métrica y calibre de vernier.

Los machos se consideraron adultos cuando tuvieron testículos túrgidos y conductos deferentes enrollados y opacos (Almeida-Santos *et al.*, 2014). Se calculó el volumen testicular (VT) que refleja actividad reproductiva, usando la fórmula del elipsoide ($4/3\pi abc$, donde $a = \text{largo}/2$, $b = \text{ancho}/2$, $c = \text{alto}/2$, Pleguezuelos y Feriche, 1999).

Histología. Para analizar el ciclo espermático a nivel microscópico, se utilizaron fragmentos de testículo y tubo deferente de ejemplares fijados y conservados previamente. Las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (70%, 96% y 100%), se clarificaron en tres baños de xilol e incluyeron en parafina. Se obtuvieron secciones histológicas transversales de 5 μm de espesor a partir de un micrótomos de rotación (Microm HM 325) y se fijaron a portaobjetos albuminizados. Se utilizó el método de tinción histológica hematoxilina y eosina (H&E) (Junqueira *et al.*, 1979). Por último, se montaron con bálsamo de Canadá sintético (Biopack). Las observaciones se realizaron bajo un microscopio óptico Leica DM3000 LED utilizando un aumento de 200X y 400X y se obtuvieron registros fotográficos con una cámara digital (Leica DFC7000 T) conectada al microscopio.

El ciclo espermatogénico se dividió en tres etapas: (1) regresión, presencia de una o dos capas de células (espermatogonias y células de Sertoli) en los túbulos seminíferos que pueden mostrar en la luz del tubo algunos espermatozoides producidos en la estación espermatogénica previa, (2) recrudescencia (fase mitótica y meiótica), caracterizada por la proliferación de células del linaje seminífero, con presencia de espermatogonias, espermatocitos y espermátidas iniciales, y (3) espermiogénesis, cuando los túbulos seminíferos muestran filas de espermátidas metamórficas y esperma abundante en el lumen (Alberto Barros *et al.*, 2014).

Análisis estadísticos. La correlación entre las mediciones testiculares morfo-anatómicas y la longitud corporal (LHC) se probó mediante regresión lineal (Shine, 1977). Se utilizó el análisis de covarianza (ANCOVA) para evaluar la variación estacional en el volumen de los testículos, utilizando LHC como covariable. Realizamos regresiones lineales utilizando solo MC como la variable predictiva, porque LHC y MC estaban fuertemente correlacionadas ($r = 0,66$; $p < 0,0001$). Por lo tanto, analizamos la relación entre las siguientes variables: MC vs. VT. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Infostat, versión 5.1 (Di Rienzo *et al.*, 2005), con un nivel de significancia del 5% para rechazar la hipótesis nula. La asunción de normalidad fue probada con la prueba Shapiro-Wilk.

Resultados

Analizamos un total de 66 machos maduros de *Bothrops alternatus*. Tanto el largo testicular ($n=47$;

$R^2=0,11$; $F=5,45$; $p=0,02$) como el ancho testicular ($n=47$; $R^2= 0,28$; $F =17,19$; $p = <0,0001$) estuvieron significativamente correlacionados con el LHC de los individuos, a diferencia del alto testicular que no mostró diferencias significativas. A pesar de ser correlaciones significativas el R^2 fue bajo debido a la dispersión de los datos, ya que individuos con similar LHC encontrados en diferentes estaciones tuvieron gónadas de muy diferente tamaño. Por ejemplo dos ejemplares con el mismo LHC (715 mm) que se encontraron uno en verano y otro en invierno tuvieron un volumen testicular de 542 mm^3 y 163 mm^3 respectivamente. Esto se debe a que el LHC es una variable intrínseca a los individuos, independiente de la estacionalidad climática, como sí lo es el volumen testicular. El volumen testicular mostró una relación significativa con la masa corporal ($n=46$; $R^2= 0,26$; $F =15,46$; $p=0,0003$). La variación estacional de los parámetros morfométricos de los órganos reproductores masculinos fue estadísticamente identificable. El volumen de los testículos

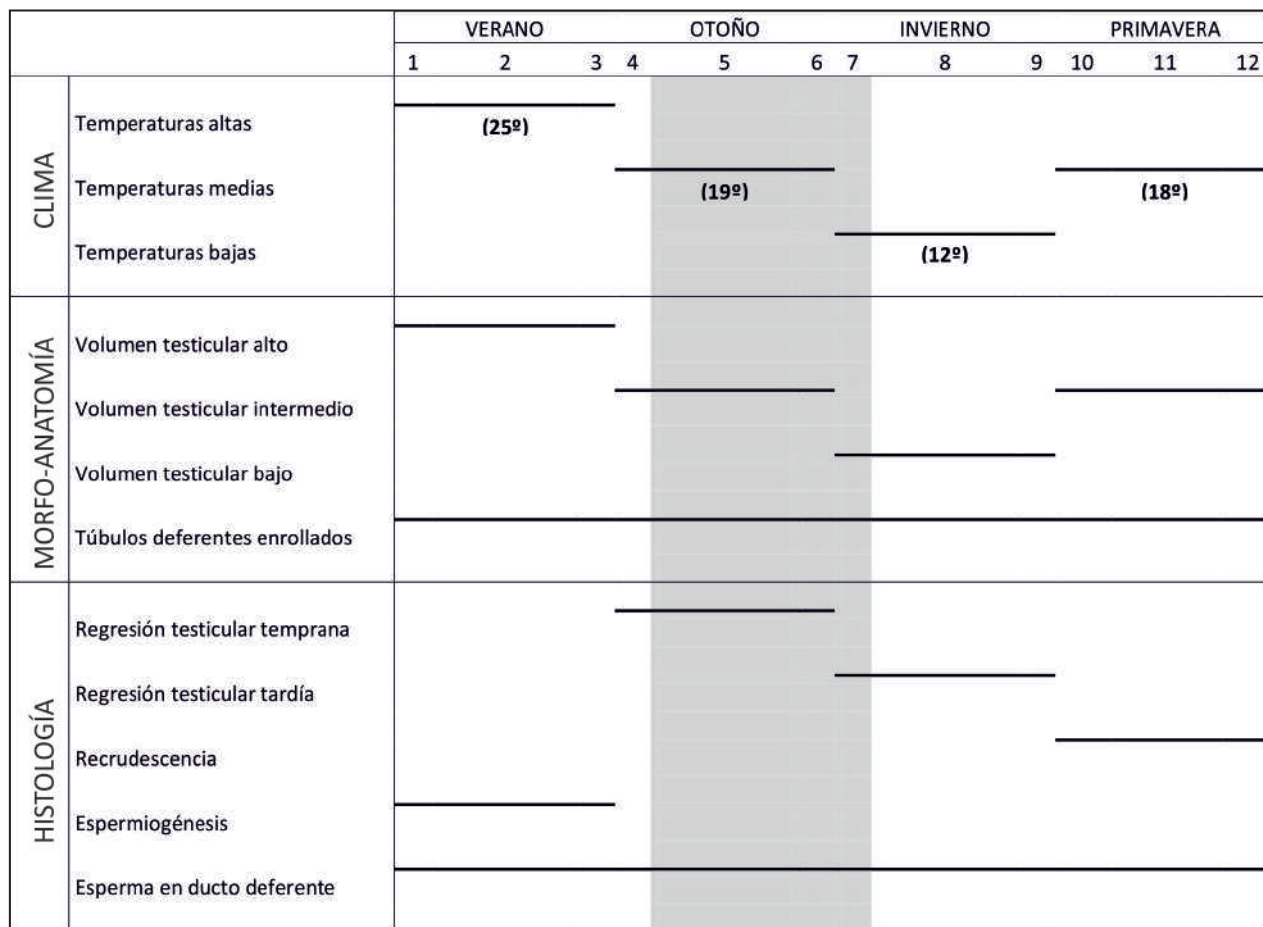


Figura 1. Esquema del ciclo reproductivo masculino de *Bothrops alternatus* en un área subtropical-templada de América del Sur. Entre paréntesis se muestran las temperaturas medias de cada estación. El evento de la cópula (mayo a julio) se muestra en color gris claro.

disminuyó durante el invierno y aumento de tamaño en el verano, mientras que en el otoño y la primavera se encontraron volúmenes intermedios ($F=18,62$, $p<0.0001$) (Figs. 1 y 2). Cuando analizamos los cortes histológicos observamos que los machos estuvieron reproductivamente activos durante la primavera / verano y reproductivamente inactivos durante el otoño / invierno. El estudio del epitelio seminífero evidenció células germinales en diferentes estadios de división celular, sucesivamente distribuidos desde la membrana basal al lumen tubular: espermatogonias, espermatocitos primarios, espermátidas y espermatozoides. En primavera los machos mostraron testículos en recrudescencia, evidenciado por la proliferación de espermatogonias y espermatocitos primarios y secundarios asociados a células de Sertoli (Figs. 1 y 3 A). En verano se observó el estadio de espermiogénesis que se extendió hasta el inicio del otoño (abril), con abundantes espermatozoides en la luz de los túbulos seminíferos (Figs. 1 y 3 B). La regresión testicular (temprana) comenzó en mayo (otoño) mostrando dos capas germinativas y espermatozoides en la luz del túbulo, que fueron

producidos en los meses previos. También se encontraron células de Sertoli rodeando a las células gametogénicas, formando cistos en los cuales las células del linaje gamético que se encuentran en su interior tienen aproximadamente el mismo grado de desarrollo, es decir son todos espermatozoides (Figs. 1 y 3 C). El espacio intersticial situado entre los túbulos seminíferos durante la regresión testicular temprana es poco evidente. En invierno se retrajo totalmente el epitelio seminífero de los testículos, encontrándose en regresión total hacia julio y hasta comienzos de septiembre (invierno). El espacio intersticial entre los túbulos seminíferos durante este estadio se hace más evidente y se puede ver como vacío (Figs. 1 y 3 D). Los espermatozoides estuvieron presentes durante todo el año en el conducto deferente (Figs. 1 y 4).

Discusión

La reproducción en reptiles está influenciada por factores ecológicos y filogenéticos (Cadle y Greene, 1993; Shine, 2003; Bellini *et al.*, 2017, 2018).

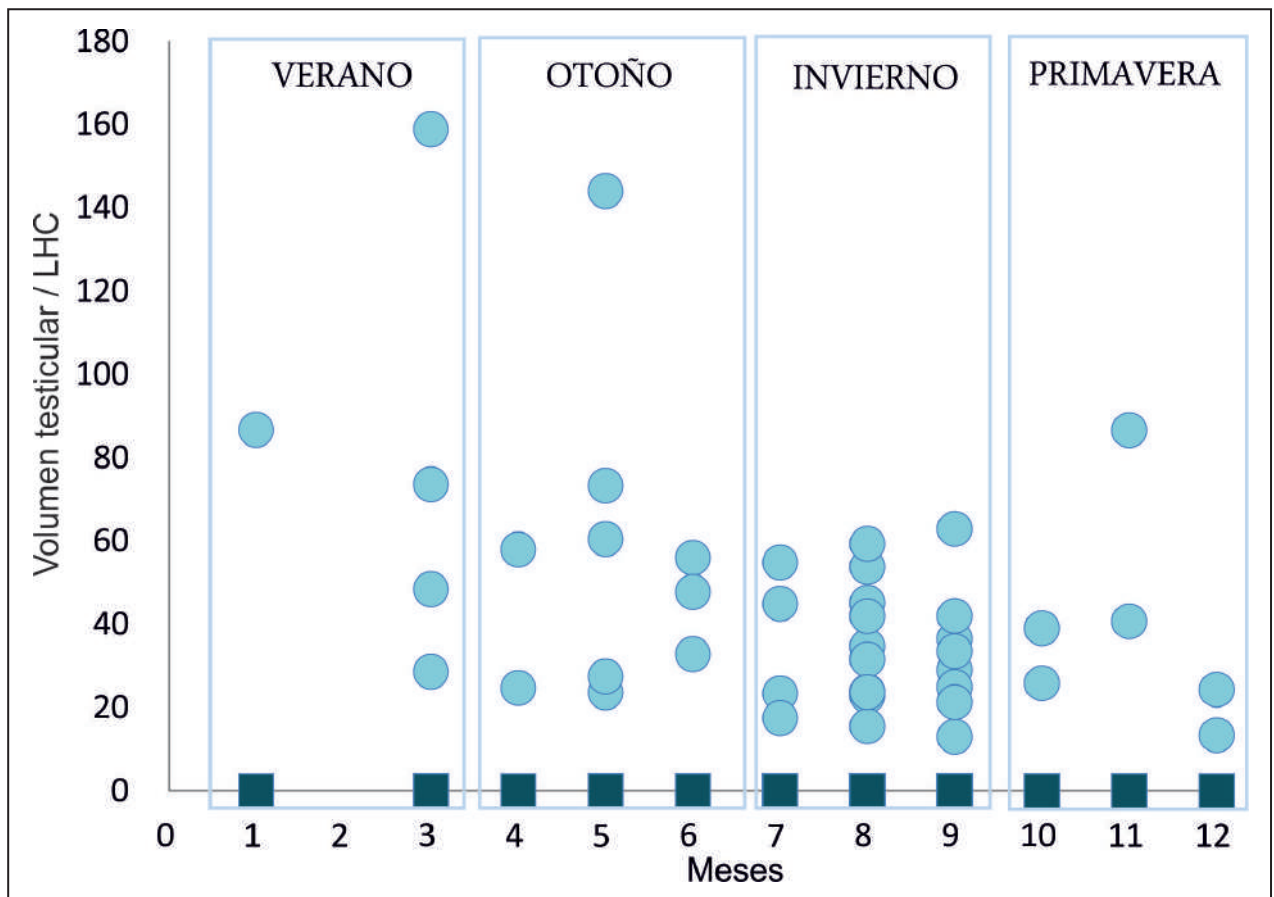


Figura 2. Variación estacional del volumen testicular de *Bothrops alternatus* en un área subtropical-templada de América del Sur. Los túbulos enrollados se muestran como cuadrados en la base de cada mes.

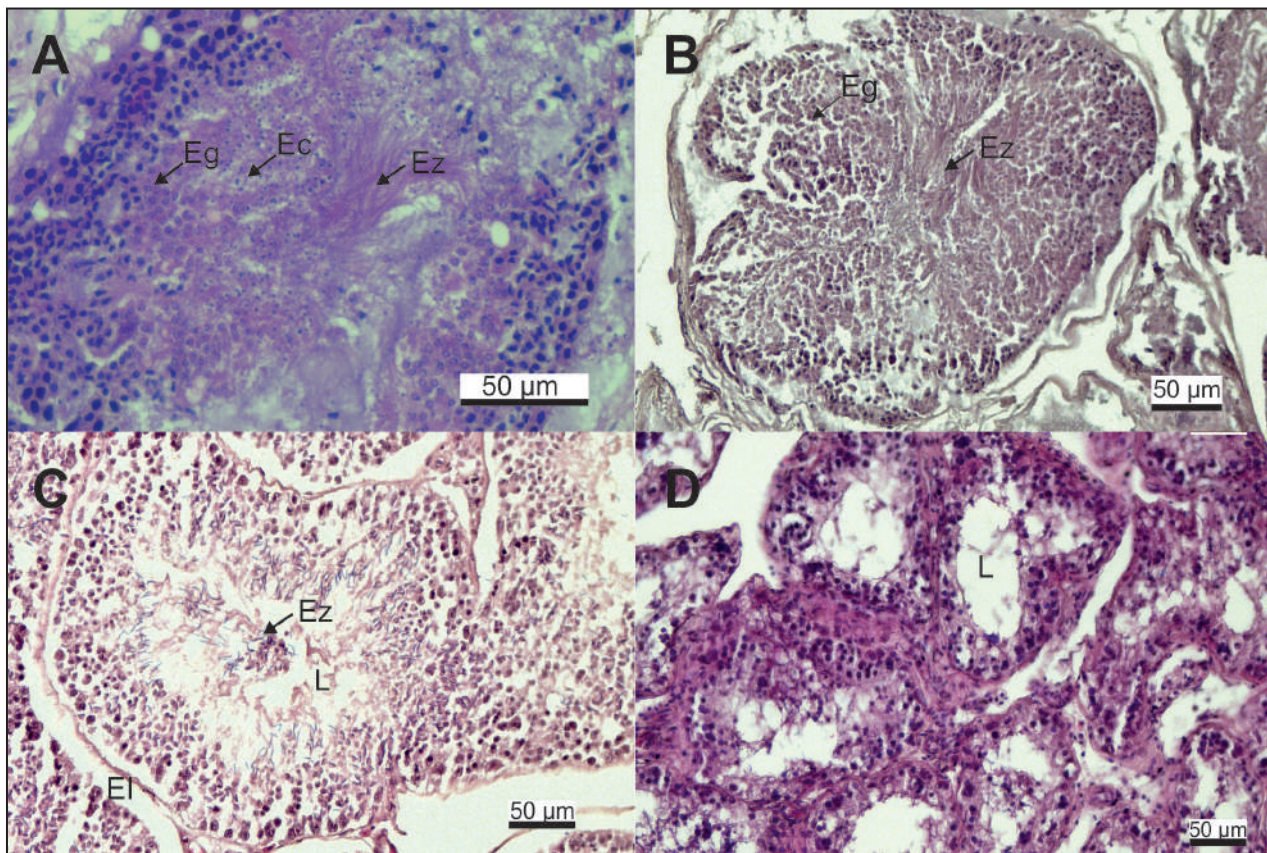


Figura 3. Secciones histológicas del testículo en diferentes estadios del ciclo espermático de *Bothrops alternatus* en un área subtropical-templada de América del Sur. En (A) Primavera, Recrudescencia (B) Verano, proceso de espermiogénesis (C) Otoño, con túbulos seminíferos en regresión temprana (D) Invierno epitelio seminífero en regresión total. Ec=Espermatocito, EI=Espacio Intersticial, Eg=Espermatogonia, Ez=espermatozoide, L=Luz del túbulo seminífero.

La influencia de la estacionalidad climática en la reproducción de los machos de *Bothrops alternatus* fue evidente cuando se analizaron los datos tanto morfo-anatómicos como los histológicos. El volumen testicular varió a lo largo de las estaciones, coincidiendo su aumento y disminución con el aumento y disminución de la temperatura. El volumen testicular alto encontrado en verano se podría correlacionar con el mayor desarrollo celular o actividad reproductiva que implica la espermiogénesis, y el volumen testicular bajo de invierno con el menor desarrollo celular o inactividad reproductiva que se da en la regresión testicular (Volsøe, 1944). Sin embargo Almeida-Santos *et al.* (2014) ponen en tela de juicio la utilización de medidas morfo-anatómicas como únicas indicadoras de la espermatogénesis, sobre todo en animales de colecciones, en parte debido a factores como mala compresión, deshidratación y fijación inadecuada. Por otro lado, también encontramos que las medidas morfo-anatómicas no fueron sensibles a todos los diferentes estadios por los que atraviesa el testículo de *B. alternatus*. En primavera y otoño se desarrollan dos estadios totalmente

distintos (recrudescencia y regresión temprana respectivamente), lo cual fue indistinguible mediante el análisis de los datos morfo-anatómicos. Por tanto, no incluir análisis microscópicos en los estudios de eventos reproductivos masculinos puede conducir a conclusiones engañosas (Mathies, 2011; Rojas *et al.*, 2013; Almeida-Santos *et al.*, 2014). Otra consecuencia de la falta de información detallada de los ciclos reproductivos fue por mucho tiempo la suposición que los machos de las serpientes de áreas tropicales y subtropicales poseían un ciclo reproductivo continuo (Almeida-Santos *et al.*, 2002). Nuestros resultados muestran que el ciclo espermatogénico de *Bothrops alternatus* se extendió pero no fue continuo durante todo el año; considerándose por tanto estacional. Los ciclos espermatogénicos estacionales son comúnmente encontrados en serpientes de áreas templadas (Loebens *et al.*, 2017). La causa principal de la regresión testicular en las especies templadas es la temperatura, mientras que en las especies tropicales es la lluvia (Krohmer y Lutterschmidt, 2011). En concordancia, encontramos que la espermatogénesis de *B. alternatus* comenzó en primavera

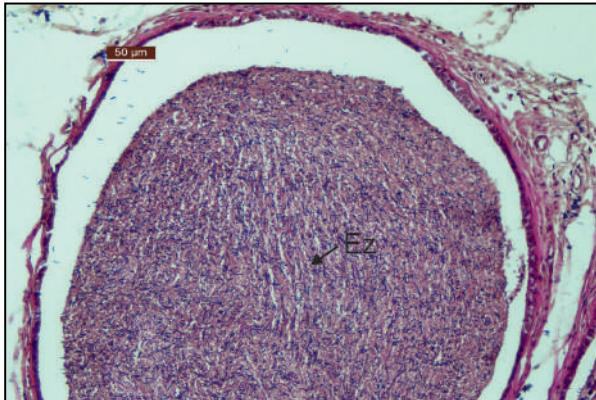


Figura 4. Detalle del túbulo deferente de *Bothrops alternatus* en un área subtropical-templada de América del Sur. Ez=espermatozoide.

y la espermiogénesis se completó en verano hasta inicios del otoño. La regresión del epitelio seminífero se produjo desde mediados del otoño hasta fines del invierno. Las temperaturas frías del invierno se consideran la principal restricción en la duración de la temporada reproductiva, porque solo en verano la temperatura y la insolación son lo suficientemente altas como para permitir el desarrollo embrionario (Gregory, 2009). En un estudio realizado en el sur de Brasil también se postula que la producción de espermatozoides de *B. alternatus* es estacional y por tanto el ciclo reproductivo masculino, pero esto es inferido sólo en base a datos morfo-anatómicos (Nunes *et al.*, 2010).

Los túbulos deferentes presentaron espermatozoides en la luz durante todo el año, probablemente cumpliendo un rol en el almacenamiento de espermatozoides a largo plazo. Esto indicaría que los machos pueden ser capaces de copular en cualquier momento, independientemente de la espermatogénesis, y por ende adaptarse al ciclo reproductivo femenino (Almeida - Santos *et al.*, 1998; Almeida - Santos y Salomão, 2002; Loebens *et al.*, 2017). Sin embargo todos los registros de cópula indican que ésta se da entre los meses de mayo a julio, apenas posterior a la espermiogénesis, aunque cabe destacar que son todos datos de organismos en cautiverio (Araujo y Ely, 1980; Giraudó *et al.*, 2008; Nunes *et al.*, 2010). Las hembras al momento de la cópula se encuentran recién comenzando la fase de vitelogénesis secundaria, lo que indica un desfase entre la cópula y la fecundación (Bellini *et al.*, 2018). Además, si consideramos que la gestación son aproximadamente 170 días, también existe asincronía entre la cópula y el momento de parición, por lo que se postula que las que reservan espermatozoides, en unas estructuras

especiales del útero posterior denominadas “uterine muscular twisting” (UMT), son las hembras de *B. alternatus* (Almeida - Santos y Salomão, 2002; Nunes *et al.*, 2010).

En conclusión, nuestros resultados indican que los machos de *B. alternatus* tienen un patrón reproductivo estacional en su límite más austral de distribución. Si bien los resultados de los análisis morfo-anatómicos y los histológicos guardaron cierta congruencia, es evidente que el solo uso de los primeros no es suficiente para describir acertadamente el ciclo reproductivo masculino de *Bothrops alternatus*. Las conclusiones sobre los patrones reproductivos de las serpientes basados sólo en métodos morfo-anatómicos son poco confiables, y la histología se convierte en una herramienta esencial para revelar el tiempo preciso de algunos eventos reproductivos.

Agradecimientos

Agradecemos especialmente a Gladys Hermida y Javier Goldberg por brindarnos sus valiosos conocimientos y a Exequiel O. Furlán por la colaboración en la edición de las imágenes. Agradecemos al revisor por sus sugerencias y comentarios que mejoraron el trabajo. Este trabajo fue financiado con proyectos otorgados por: Universidad Nacional del Litoral (CAI+D 20016) y Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2016-1415, PICT 2017-3610).

Literatura citada

- Almeida-Santos, S. M.; Salomão, M. G.; Peneti, E.A.; Sena, P. S. & Guimarães, E.S. 1998. Predatory combat and tail wrestling in hierarchical contests of the Neotropical rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes: Viperidae). *Amphibia-Reptilia* 20: 88-96.
- Almeida-Santos, S.M. & Salomão, M.G. 2002. Reproduction in Neotropical pitvipers, with emphasis on species of the genus *Bothrops*: 445-462. En: Schuett, G.W.; Höggren, M.; Douglas, M.E. & Greene, H.W. (eds.), *Biology of the Vipers*. Eagle Mountain Publishing, Eagle Mountain.
- Almeida-Santos, S.M.; Braz, H.B.; Santos, L.C.; Sueiro, L.R.; Barros, V.A.; Rojas, C.A. & Kasperoviczus, K.N. 2014. Biología reproductiva de serpientes: recomendações para a coleta e análise de dados. *Herpetologia Brasileira* 3: 14-24.
- Almeida-Santos, S.M.; Barros, V.A.; Rojas, C.A.; Sueiro, L.R. & Nomura, R.H.C. 2017. Reproductive Biology of the Brazilian Lancehead, *Bothrops moojeni* (Serpentes, Viperidae), from the State of São Paulo, Southeastern Brazil. *South American Journal of Herpetology* 12: 174-182.
- Araujo, M. & Ely L.A.M. 1980. Notas sobre a biologia de tanatofídeos criados em cativeiro-2a. parte (Ophidia-Elapidae e Viperidae). *Iheringia (Zool.)* 55: 9-26.
- Arzամենдіа, V. & Giraudó, A.R. 2009. Influence of large South

G. Bellini *et al.* — Ciclo reproductivo masculino de *Bothrops alternatus*

- American rivers of the Plata Basin on distributional patterns of tropical snakes: a panbiogeographical analysis. *Journal of Biogeography* 36: 1739-1749.
- Barros, V.A.; Rojas, C.A. & Almeida-Santos, S.M. 2014. Reproductive biology of *Bothrops erythromelas* from the Brazilian Caatinga. *Advances in Zoology* 2014: 1-11.
- Bellini, G.P., Arzamendia, V. & Giraudo, A.R. 2017. Is Xenodontine snake reproduction shaped by ancestry, more than by ecology? *Ecology and Evolution* 7: 263-271.
- Bellini, G.P., Arzamendia V. & Giraudo A.R. 2018. Reproductive life history of snakes in temperate regions: what are the differences between oviparous and viviparous species? *Amphibia-Reptilia* 40: 291-303.
- Bisneto, P.F. & Kaefer, I.L. 2019. Reproductive and feeding biology of the common lancehead *Bothrops atrox* (Serpentes, Viperidae) from central and southwestern Brazilian Amazonia. *Acta Amazonica* 49: 105-113.
- Cabrera, A.L. 1976. Regiones fitogeográficas argentinas. Enciclopedia argentina de agricultura y jardinería. Acme, Buenos Aires.
- Cadle, J.E. & Greene, H.W. 1993. Phylogenetic patterns, biogeography, and the ecological structure of Neotropical snake assemblages: 281-293. *En: Ricklefs, R.E. & Schluter, D. (eds.), Species Diversity in Ecological Communities: Historical and Geographical Perspectives.* University of Chicago Press, USA.
- Campbell, H.W. & Christman, S.P. 1982. Field Techniques for Herpetofaunal Community Analysis: 193-200. *En: Scott, N.J. Jr. (ed.), Herpetological communities: a symposium of the Society for the Study of Amphibians and Reptiles and Herpetologists League, August 1977.* U.S. Fish and Wildlife Service research report, 13. Washington, D.C. USA.
- Campbell, J.A. & Lamar, W.W. 2004. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. Ithaca and London: Comstock Publishing Associates.
- Di Rienzo, J.A.; Robledo, C.W.; Balzarini, M.G.; Casanoves, F.; González, L. & Tablada, M. 2005. InfoStat Software Estadístico. Universidad Nacional de Córdoba. <http://www.infostat.com.ar>.
- Giraudo, A.R. 2001. Diversidad de serpientes de la selva Paranaense y del Chaco húmedo. Taxonomía, biogeografía y conservación. Literature of Latin America, Buenos Aires.
- Giraudo, A.R. 2014. Diversidad e historia natural de serpientes de interés sanitario del nordeste argentino: 9-68. *En: Peichotto, M.E. & Salomón, D. (eds.), La problemática del ofidismo en la región nordeste de Argentina. Una mirada científica integradora.* Puerto Iguazú: Instituto Nacional de Medicina Tropical, Misiones.
- Giraudo, A.R. & Scrocchi, G.J. 2002. Argentinian snakes: an annotated checklist. *Smithsonian Herpetological Information Service*.
- Giraudo, A.R.; Arzamendia V.; López M.S.; Quaini R.O.; Prieto Y.; Leiva L.A.; Regner S. & Urban J.M. 2008. Serpientes venenosas de Santa Fe, Argentina: conocimientos sobre su historia natural aplicados para la prevención de ofidismo. *Fabriz* 12: 69-89.
- Gregory, P.T. 2009. Northern Lights and Seasonal Sex: The Reproductive Ecology of Cool-Climature Snakes. *Herpetologica* 65: 1-13.
- Hartmann, M.T.; Marques O.A. & Almeida-Santos S.M. 2004. Reproductive biology of the southern Brazilian pitviper *Bothrops neuwiedi pubescens* (Serpentes, Viperidae). *Amphibia-Reptilia* 25: 77-85.
- Junqueira, L.C.U.; Bignolas, G. & Brentani, R. 1979. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochemical Journal* 11: 447-455.
- Krohmer, R.W. & Lutterschmidt, D.I. 2011. Environmental and Neuroendocrine Control in Snakes: 289-346. *En: Aldridge R.D. & Sever D.M. (eds.), Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes.* Enfield: Science Publishers.
- Loebens, L.; Cechin, S.Z.; Theis, T.F.; Moura, L.B. & Almeida-Santos, S.M. 2017. Reproductive biology of *Philodryas patagoniensis* (Snakes: Dipsadidae) in South Brazil: male reproductive cycle. *Acta Zoologica* 98: 329-339.
- Mathies, T. 2011. Reproductive cycles of tropical snakes: 511-550. *En: Aldridge, R.D. & Sever D.M. (eds.), Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes.* Enfield, Science Publishers.
- Martins, M.; Marques, O.A.V.; Sazima, I. 2002. Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in Neotropical pitvipers (genus *Bothrops*): 307-328. *En: Schuett, G.W.; Höggren, M.; Douglas, M.E.; Greene, H.W. (eds.), Biology of the Vipers.* Eagle Mountain Publishing, Utah.
- Morrone JJ. 2014. Cladistic biogeography of the Neotropical region: indentifying the main events in the diversification of the terrestrial biota. *Cladistics* 30: 202-214.
- Nogueira, C.C.; Sawaya, R.J. & Martins, M. 2003. Ecology of the pitviper, *Bothrops moojeni*, in the Brazilian Cerrado. *Journal of Herpetology* 37: 653-659.
- Nunes, S.F.; Kaefer, I.L.; Leite, P.T. & Cechin, S.Z. 2010. Reproductive and feeding biology of the pitviper *Rhinocerocephis alternatus* from subtropical Brazil. *Herpetological Journal* 20: 31-39.
- Pizzatto, L.; Jordao R.S. & Marques O.A.V. 2008. Overview of reproductive strategies in Xenodontini (Serpentes: Colubridae: Xenodontinae) with new data for *Xenodon neuwiedii* and *Waglerophis merremii*. *Journal of Herpetology* 42: 153-162.
- Pleguezuelos, J.M. & Feriche M. 1999. Reproductive ecology of the horseshoe whip snake, *Coluber hippocrepis*, in the southeast of the Iberian Peninsula. *Journal of Herpetology* 33: 202-207.
- Prado, D.E. 1993. What is the Gran Chaco vegetation in South America? II. A redefinition. Contribution of the study of the flora and vegetation of the Chaco. VII. *Candollea* 48: 615-629.
- Pizzatto, L., & Marques, O.A.V. 2007. Reproductive ecology of boine snakes with emphasis on Brazilian species and a comparison to pythons reproductive ecology of boine snakes with emphasis on Brazilian species and a comparison to pythons. *South American Journal of Herpetology* 2: 107-122.
- Rebelato, M.M., Pontes, G.M.F., & Tozetti, A.M. 2016. Reproductive biology of *Thamnodynastes hypoconia* (Serpentes: Dipsadidae) in Brazilian subtemperate wetlands. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 88: 1699-1709.
- Rojas, C.A.; Barros, V.A. & Almeida-Santos, S.M. 2013. The reproductive cycle of the male sleep snake *Sibynomorphus mikanii* (Schlegel, 1837) from southeastern Brazil. *Journal of Morphology* 274: 215-228.
- Sarquis, J.A.; Cristaldi, M.A.; Arzamendia, V.; Bellini, G.P. & Giraudo, A.R. 2018. Species distribution models and empirical test: Comparing predictions with well-understood geographical distribution of *Bothrops alternatus* in

- Argentina. *Ecology and Evolution* 8: 10497-10509.
- Silva, K.M.P., Silva, K.B., Sueiro, L.R., Oliveira, M.E.E.S. & Almeida-santos, S.M. 2019. Reproductive Biology of *Bothrops atrox* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae) from the Brazilian Amazon. *Herpetologica* 75: 198-207.
- Scott Jr., N.J. 1994. Complete species inventories: 78-79. En: Heyer, R.W.; Donnelly, M.A.; McDiarmid, R.W.; Hayk L.A.C. & Foster, M.S (eds.), *Measuring and monitoring biological diversity standard methods for amphibians*. Smithsonian Institution, Washington, D.C. USA.
- Shine, R. 1977. Reproduction in Australian elapid snakes. II. Testicular cycles and mating seasons. *Australian Journal of Zoology* 25: 647-653.
- Shine, R. 1994. Sexual size dimorphism in snakes revisited. *Copeia* 1994: 326-346.
- Shine, R. 2003. Reproductive strategies in snakes. *Proceedings of the Royal Society of London, Serie B* 270: 995-1004.
- Uetz, P. & Hošek, J. 2019. The Reptile Database. *Disponibile en:* <http://www.reptile-database.org>. Último acceso: 01 de noviembre 2019.
- Valdujo, P.H.; Nogueira, C.C. & Martins, M. 2002. Ecology of *Bothrops neuwiedi pauloensis* (Serpentes: Viperidae: Crotalinae) in the Brazilian Cerrado. *Journal of Herpetology* 36: 169-176.
- Van Dyke, J.U.; Brandley, M.C. & Thompson, M.B. 2014. The evolution of viviparity: Molecular and genomic data from squamate reptiles advance understanding of live birth in amniotes. *Reproduction* 147: 1741-7899.
- Vitt, L.J. & Vangilder, L.D. 1983. Ecology of a snake community in northeastern Brazil. *Amphibia-Reptilia* 4: 273-296.
- Volsoe, H. 1944. Seasonal variation of the male reproductive organs of *Vipera berus* (L.). *Spolia Zoology Musei Hauniensis* 5: 1-157.

© 2020 por los autores, licencia otorgada a la Asociación Herpetológica Argentina. Este artículo es de acceso abierto y distribuido bajo los términos y condiciones de una licencia Atribución-No Comercial 2.5 Argentina de Creative Commons. Para ver una copia de esta licencia, visite <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5/ar/>

