



Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Naturales y Museo

Variabilidad genética, distribución y estado de conservación de las poblaciones de Tortugas terrestres *Chelonoidis chilensis* (Testudines: Testudinidae) que habitan en la República Argentina.

Lic. Julieta Sánchez

Director de Tesis: Dr. Alejandro Daniel Bolzán

Codirector de Tesis: Dr. Leandro Alcalde

Lugar de trabajo:

Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE)

CCT-CONICET La Plata - CICPBA

2012

Agradecimientos

En primer lugar, quisiera agradecer a Alejandro Bolzán, director de esta tesis, por permitirme trabajar en su laboratorio, por dar lugar a mis inquietudes y a mis verdaderas motivaciones. A Leandro Alcalde, codirector de esta tesis, por enseñarme a trabajar en el campo, por su paciencia y por acompañarme a buscar estos hermosos animales tan poco abundantes. A ellos dos, les agradezco sinceramente porque aportaron mucho en mi formación.

A mis papás, Roberto y María, porque siempre me apoyaron en todo de forma incondicional, acompañándome, aconsejándome y demostrándome que puedo lograr todo lo que me proponga. Porque me permitieron crecer en libertad, defendiendo mis convicciones. Les agradezco infinitamente.

A mis hermanos, Vale, Guille y Manu, por todos los momentos que compartimos, porque me divierten mucho, por haber estado cuando los necesité, por seguir de cerca mi trabajo de tesis y estar siempre interesados en él. Y también a Emma Pach.

A mis tíos, Stella y Ruben. A mis primos, Dani, Gus, Juan (gracias por aportar tu creatividad adornando esta tesis) y Vale, y a mis hermosos sobris, Agus, Santi, Gonza y Juan Cruz.

A Lau, Mari, Javi y Bel, por su hermosa amistad, su ayuda durante el desarrollo de mi tesis, dejando muchas veces de lado la de ellos para prestar atención a mis necesidades. A todos ellos, gracias por alegrarme diariamente.

A Sil, Mona, Guille, Marce, Ana y Flor, por acompañarme durante todos estos años, por el apoyo anímico, por estar siempre pendientes y dispuestas a ayudarme en lo que fuere, y por su comprensión, especialmente en esta última etapa de redacción.

A Ele y Vero, por sus infinitas charlas, por estar siempre, aunque sea desde lejos, ayudándome y aconsejándome.

A Mauri y a Ema Diez, por acompañarme desde mi primer día en la Biología.

Quisiera agradecerle a César Horgan por su compañía durante mi estadía en el Laboratorio 10, por sus riquísimos mates y sus alegres charlas.

A Anita, Guille, Lu y Bel, gracias por hacer más agradables los días laborales en Becarios 1. A Rita, por su alegría, por sus consejos y ayuda durante todos estos años. Y a todos los integrantes del IMBICE.

A Natalia Paviolo, Daniel Castrogiovani, Miguel Reigosa y Julieta Parisi por su ayuda con los cultivos celulares.

A Claudio Bravi, Graciela Bailliet, Silvina Richard, Hebe Campaña y Jorge López Camelo, por el apoyo que me brindaron cada vez que los necesité, haciendo más ameno el desarrollo de mi tesis.

A Sebastián Poljak, Andrea Cosacov, Viviana Confalonieri y Claudio Bravi, por las interesantes discusiones en torno a los resultados de mi tesis (las cuales permitieron ordenar mis ideas) y por sus valiosos aportes.

Quisiera agradecer, además, a todas las personas que colaboraron de algún modo con la colecta de los datos: María del Valle Lazcóz, Rocío María Sánchez, Nicolás, José Luis Acosta, Eduardo Sanabria, Raúl Herrera y Diego Balduchi.

A Liliana Beatriz Díaz por enseñarme a realizar las extracciones de sangre en tortugas.

A Ricardo Ruiz por su colaboración en la elaboración de los mapas,

A aquellos que me facilitaron la obtención de muestras de tortugas en cautiverio tanto en Mendoza, a las autoridades del zoológico de Mendoza, y en Tucumán a Juan Pablo Juliá, en la Reserva San Javier. A las Direcciones de Fauna provinciales y Nacional y a La Administración de Parques Nacionales. Especialmente quería agradecerles a Flavio Martínez y a Walter Prado por su colaboración durante el desarrollo del proyecto.

A todos ellos, quiero agradecerles enormemente por hacer posible esta Tesis de doctorado, que me dio la oportunidad de ver a estas hermosísimas tortugas viviendo en su ambiente natural, y que me permitió de algún modo, aportar, aunque sea un granito de arena, para su conservación.

Índice

Índice	4
Resumen en español	7
Resumen en inglés.....	11
Introducción.....	14
La familia Testudinidae y el género <i>Chelonoidis</i>	15
Breve reseña acerca de la sistemática de <i>Chelonoidis chilensis</i>	15
El registro fósil	17
Hipótesis biogeográficas actuales	18
Situación de conservación	19
La genética aplicada al estudio de especies en peligro de extinción.....	20
Hipótesis	24
Objetivos	26
Materiales y Métodos	28
Área de estudio y tortugas muestreadas.....	29
Procedimientos de laboratorio relativo a la obtención y procesamiento del ADN	29
Amplificación y secuenciación del ADN	32
Análisis general de las secuencias obtenidas.....	34
Análisis filogenético	35
Análisis filogeográfico	37
Análisis citogenético	40
Morfortipos de <i>Chelonoidis chilensis</i>	43
Abundancia relativa y otros datos de ecología de la especie.....	45
Anexo Materiales y Métodos	48
Permisos obtenidos para realizar los muestreos:.....	49
Resultados	50
Genética Molecular de <i>Chelonoidis chilensis</i>	51
Área de estudio y tortugas muestreadas.....	52
Análisis general de las secuencias obtenidas.....	53
Análisis filogenético	57
Análisis filogeográfico	61
Análisis citogenético de <i>Chelonoidis chilensis</i>	73
Ecología de <i>Chelonoidis chilensis</i>	81
Abundancia relativa de tortugas en las localidades estudiadas por el método de transectas.....	82
Presencia / Ausencia de tortugas <i>Chelonoidis chilensis</i> en diferentes localidades de su distribución en la Argentina	83

Observaciones generales	83
Anexo Resultados	93
Discusión	100
Análisis general de las secuencias obtenidas	101
Análisis filogenético	102
Análisis filogeográfico	103
Análisis citogenético	106
Consideraciones respecto de otras hipótesis en cuanto al número de especies que se han propuesto históricamente dentro de lo que se ha dado en llamar grupo <i>chilensis</i>	109
Registro fósil y cambios ambientales	112
Análisis ecológico	115
Conclusiones e implicancias para la conservación de <i>Chelonoidis chilensis</i>	119
Bibliografía	122

Resumen en español

Los Testudinidae sudamericanos actuales están representados por cuatro especies agrupadas en el género *Chelonoidis*: *C. carbonaria*, *C. chilensis*, *C. denticulata* y *C. nigra* (Fritz & Havaš 2007). En nuestro país encontramos a *C. carbonaria* en unas pocas localidades de las provincias de Chaco, Formosa y Salta, mientras que *C. chilensis* posee casi el 95% de su distribución en la Argentina.

La sistemática de esta última especie ha sido muy debatida desde la publicación del trabajo de Freiberg en 1973 donde se describen las especies *C. donosobarrosi* y *C. petersi*, además de la clásica *C. chilensis* previamente descrita por Gray en 1870. La primera de ellas caracterizada por alcanzar un mayor tamaño y una distribución más austral (localidad tipo: San Antonio Oeste, Río Negro), mientras que la segunda presenta tamaño pequeño y su distribución ocupa el centro norte de nuestro país (localidad tipo: Paraje Kishka, Santiago del Estero). Para fundamentar su trabajo, Freiberg (1973) reconoce dos nuevas especies de *Chelonoidis* proveyendo una serie de rasgos de forma y coloración del caparazón que resultarían útiles para reconocer ambas especies entre sí y respecto de *Chelonoidis chilensis*. Esta propuesta taxonómica tuvo dispar aceptación, con lo cual se inició un debate que continúa prácticamente hasta el día de hoy.

En cuanto a su situación de conservación, las poblaciones de *C. chilensis* están incluidas en el *Apéndice II* de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora (CITES), y son consideradas *vulnerables* por las Comisiones de Conservación de la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, Red List 2011). Los factores más relevantes que ponen en riesgo la integridad de sus poblaciones son la caza extractiva multipropósito (predominantemente mascotismo) y la reducción, modificación y destrucción del hábitat por la expansión de la frontera agrícola. A nivel local, hasta el año 2010 se la categorizó como *Amenazada* (Richard & Waller 2000) y a partir del año 2012 se la asignó a la categoría *vulnerable* (Prado *et al.* 2012) sin que mediara alguna mejora evidente de la situación. A este panorama, debe agregarse el desconocimiento de la biología y ecología de las poblaciones presentes en Argentina.

En base a estos antecedentes, el objetivo principal de este trabajo de Tesis fue realizar un análisis de la variabilidad genética de *Chelonoidis chilensis* a nivel cromosómico y molecular (ADN mitocondrial), en relación a la distribución geográfica y el estado de conservación de las poblaciones naturales de la especie, tanto protegidas como no protegidas, presentes en Argentina. La metodología empleada consistió en primer término, en extraer, amplificar y secuenciar el ADNmt (gen del citocromo b y región Control) proveniente de diversas muestras recolectadas a lo largo de toda la distribución geográfica de la especie en nuestro país y en la obtención de cromosomas a partir de muestras de sangre periférica para elaborar los cariotipos correspondientes. Posteriormente, a partir de

los datos moleculares se realizó un análisis filogenético y filogeográfico de las muestras y finalmente la información obtenida se relacionó con los datos citogenéticos y datos de distribución y ecología de la especie, estos últimos obtenidos mediante muestreos poblacionales realizados a campo.

A partir del análisis de los datos obtenidos, nuestros resultados permiten concluir que:

1. La variabilidad genética observada corresponde a una única especie: *Chelonoidis chilensis* (Gray 1870), que presenta una gran variabilidad fenotípica. De esta manera, los datos aquí presentados corroboran, con mayor evidencia, lo recientemente postulado por Fritz *et al.* (2012) sobre la base del estudio de un menor número de ejemplares y poblaciones.
2. El análisis del ADNmt permitió establecer 2 haplogrupos de *C. chilensis*, uno correspondiente a las tortugas de la Ecorregión del Monte de Llanuras y Mesetas, y el otro a las tortugas de la Ecorregión Chaco Seco.
3. En cuanto a la constitución cromosómica de la especie, nuestros resultados indicaron que la totalidad de *C. chilensis* presentó un complemento cromosómico constante ($2n=52$). Asimismo, los haplogrupos mencionados anteriormente evidenciaron un cariomorfo específico, determinado por la existencia de 12 pares de macrocromosomas y 14 pares de microcromosomas (cariomorfo A) en el caso de las tortugas de la Ecorregión Chaco Seco, y 11 pares de macrocromosomas y 15 de microcromosomas (cariomorfo B) en el caso de las tortugas de la Ecorregión del Monte de Llanuras y Mesetas. La existencia de una tortuga con características genéticas mixtas (haplogrupo del Monte y cariomorfo del Chaco) en el grupo bajo estudio evidenciaría la ocurrencia de cruzamientos entre individuos de las 2 regiones antes mencionadas y, lo más importante, que su descendencia sería viable.
4. La variabilidad genética observada en las poblaciones naturales de *C. chilensis* podría explicarse por la existencia de un evento vicariante a causa de los cambios climáticos del Plio-Pleistoceno. Se propone que estos cambios generaron dos grupos poblacionales, uno con distribución en la actual Ecorregión del Monte de Llanuras y Mesetas y en parte de la zona más austral de la actual Ecorregión Chaco seco, mientras que el otro grupo es exclusivo de la Ecorregión Chaco Seco.
5. Proponemos que la especie estudiada sea considerada como Amenazada, en vez de Vulnerable, tal cual ha sido recientemente categorizada (Prado *et al.* 2012). Las razones para ello son: (a) valores bajos de abundancia encontrados en la mayoría de las localidades, (b) la aparente ausencia de poblaciones en gran parte de las localidades estudiadas mediante el método de búsqueda al azar, (c) la existencia de una clara regresión, disminución espacial y pérdida de calidad de hábitat sugerida por diversos autores,

fundamentalmente para la Ecorregión Chaco Seco, y (d) la existencia de un mercado ilegal aún prevalente, no cuantificado ni controlado efectivamente.

Resumen en inglés

Living South American tortoises from the Testudinidae family are represented by four different species belonging to the genus *Chelonoidis*: *C. carbonaria*, *C. chilensis*, *C. denticulate*, and *C. nigra* (Fritz & Havaš 2007). Two of these species are present in Argentina: *C. carbonaria*, found in a few locations of Chaco, Formosa, and Salta provinces, and *C. chilensis*, found almost exclusively in Argentina which presents 95% of its geographical distribution in this country.

The systematics of *C. chilensis* has been extensively discussed since 1973, when Freiberg described *C. donosobarrosi* and *C. petersi* species, along with *C. chilensis*, previously described by Gray in 1817. *C. donosobarrosi* is the largest of these species and exhibits the southernmost geographical distribution (Type locality: San Antonio Oeste, Río Negro), whereas *C. petersi* is small and is found along the Northcenter of the country (Type locality: Kishka, Santiago del Estero). Freiberg (1973) reported a series of characteristics related to carapace form and coloring of the tortoise useful to easily recognize *C. donosobarrosi* and *C. petersi* species and differentiate them from *C. chilensis*. This view was not widely accepted and gave rise to a serious discussion on the systematics of the *Chelonoidis* genus that still continues.

Regarding their conservation status, natural populations of *C. chilensis* are included in the Appendix II of the Convention on International Trade of Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES), and are considered as *Vulnerable* by the IUCN Conservation Commission (Red List, 2007). Two main factors put *C. chilensis* populations at risk: multipurpose extraction (mostly commercialized as pets) and habitat loss due to agricultural expansion. In Argentina, *C. chilensis* was classified as *Endangered species* (Richard & Waller 2000) up to 2010 and as *Vulnerable* since 2012 (Prado *et al.* 2012), though there has been no evident improvement regarding its conservation status. Moreover, data on the biology and ecology of terrestrial tortoise populations in Argentina are quite scarce.

Considering the above background, the main goal of this Doctoral Thesis has been to analyze the genetic variability of *Chelonoidis chilensis* at chromosome and molecular levels (mitochondrial DNA / mtDNA) in relation to the geographical distribution and conservation status of natural populations of this species (either protected or unprotected) in Argentina. To this end, we extracted, amplified, and sequenced mtDNA (cytochrome b gene and Control region) from samples collected along the whole range of its geographical distribution. We also extracted peripheral blood samples from the tortoises in order to obtain chromosomes to construct the corresponding karyotypes. Afterwards, we performed phylogenetic and phylogeographic analyses based on the molecular data obtained and correlated these results with the cytogenetic, geographical distribution, and ecological data obtained from field work.

Our results allow concluding that:

1. The genetic variability observed in tortoises analyzed corresponds to one species, *Chelonoidis chilensis* (Gray 1870), which exhibits a large phenotypic variability. Our data confirm previous findings from Fritz *et al.* (2012) based on the analysis of a smaller sample of terrestrial tortoises from Argentina.

2. The analysis of mtDNA allowed us to establish the existence of two haplogroups in *C. chilensis* populations corresponding to Mount of Steps and Plains, and the Dry Chaco Eco-regions.

3. Cytogenetic analyses of all turtles studied showed a constant chromosome complement ($2n=52$), which confirms the chromosome number of *C. chilensis* species. Moreover, we found two different karyomorphs, one with 12 pairs of macrochromosomes and 14 pairs of microchromosomes (karyomorph A), and the other one with 11 pairs of macrochromosomes and 15 pairs of microchromosomes (karyomorph B). Interestingly, each of the haplogroups abovementioned was associated with a specific karyomorph, i.e., tortoises from Dry Chaco Eco-region exhibited karyomorph A whereas those from the Mount of Steps and Plains Eco-region showed karyomorph B. However, the existence of one turtle from the latter Eco-region with karyomorph A in the sample analyzed strongly suggests that populations from both Eco-regions interbreed and that the resulting offspring is viable.

4. The existence of a vicariant event due to climatic changes occurred in the Plio-Pleistocene period could explain the genetic variability observed in natural populations of *C. chilensis*. It is assumed that these climatic changes gave rise to two population groups, one distributed along the present Mount of Steps and Plains Eco-region and part of the southern area of Dry Chaco Eco-region, and another one distributed exclusively in this latter Eco-region.

5. Based on our data, we propose that *C. chilensis* should be considered as *Endangered* species rather than *Vulnerable* (as recently classified; see Prado *et al.* 2012). The reasons for our proposal are: (a) the low values of relative abundance found in most of the sites studied, (b) the apparent absence of populations in most of the sites studied using the method of random search, (c) the clear decline, spatial decrease, and loss of habitat quality, mainly for populations in the Dry Chaco Eco-region, as suggested by several reports, and (d) the persistence of illegal and uncontrolled local commercialization.

Introducción

La familia Testudinidae y el género *Chelonoidis*

La familia Testudinidae es un grupo de tortugas terrestres que comprende 49 especies agrupadas en 12 géneros: *Manouria* (Asia), *Gopherus* (Sur de Estados Unidos y norte de Méjico), *Chelonoidis* (Sudamérica), *Indotestudo* (Asia), *Kinixys* (África), *Malacochersus* (África), *Testudo* (Asia, Europa y norte de África), *Homopus* (sur de África), *Psammobates* (sur de África), *Chersina* (sur de África), *Pyxis* (Madagascar) y *Geochelone* (África y Asia) (Ernst & Barbour 1989; Fritz & Havaš 2007). Este último género es considerado el grupo hermano de *Chelonoidis* (Le *et al.* 2006; Fritz & Bininda-Emonds 2007). Estas tortugas están presentes en todos los continentes excepto Oceanía y Antártida, y se encuentran adaptadas a una gran variedad de ambientes, desde bosques lluviosos a zonas desérticas (Le *et al.* 2006).

Los Testudinidae actuales sudamericanos están representados por cuatro especies agrupadas en el género *Chelonoidis*: *C. carbonaria* (Spix 1824) (Panamá, Guayanas, Brasil, Paraguay, Venezuela, Colombia y norte de Argentina), *C. chilensis* (Gray 1870) (Argentina, sur de Bolivia y sur de Paraguay), *C. denticulata* (Linnaeus) (Colombia, Venezuela, Guayanas, Trinidad y Tobago, Brasil, Ecuador, Perú y Bolivia) y *C. nigra* (Quoy & Gaimard 1824) (Islas Galápagos, Ecuador) (Fritz & Havaš 2007). La monofilia de este género está bien sustentada en datos de secuencias de genes mitocondriales y nucleares (Le *et al.* 2006). En la Argentina encontramos a *C. carbonaria* representada en unas pocas localidades de las provincias de Chaco, Formosa y Salta, mientras que *C. chilensis* posee casi el 95% de su distribución en nuestro país. Esta última especie se encuentra en casi todas las provincias argentinas, a excepción de Tierra del Fuego, Santa Cruz, Entre Ríos, Corrientes y Misiones (Cabrera 1998; Guerreiro *et al.* 2005), siendo discutida su presencia en Chubut, la cual para algunos autores puede deberse a antropocoria (Waller 1986).

Breve reseña acerca de la sistemática de *Chelonoidis chilensis*

Hasta el año 1973, sólo una especie de tortuga terrestre era conocida para las regiones áridas de Argentina: *Chelonoidis chilensis*. Antes de esa fecha, la mayor discusión taxonómica acerca de este taxón concernía a la ubicación de su localidad tipo (Richard 1999). En ese año, Freiberg (1973) describió dos nuevas especies de tortuga terrestre para Argentina: *Chelonoidis donosobarrosi* (Freiberg 1973) y *C. petersi* (Freiberg 1973). La primera de ellas caracterizada por alcanzar un mayor tamaño y una distribución más austral, con localidad tipo en San Antonio Oeste (Río Negro). Contrariamente, la segunda fue descrita como una forma pequeña con

distribución en el centro norte de nuestro país, cuya localidad tipo es Kishka (Santiago del Estero). Adicionalmente, Freiberg (1973) proveyó una serie de rasgos de forma y coloración del caparazón que resultarían útiles para reconocer ambas especies entre sí y respecto de *Chelonoidis chilensis*. El mayor impacto de las descripciones de Freiberg (1973) se verificó en la dispar aceptación que tuvo su propuesta taxonómica, con lo cual se inició un debate que duró prácticamente hasta el presente.

De esta manera, algunos autores (Pritchard 1979; Ernst & Barbour 1989) consideraron *C. chilensis* como especie válida, siendo *C. petersi* y *C. donosobarrosi* sinónimo y subespecie de *C. chilensis* respectivamente. En el otro extremo, Cei (1986) aceptó la validez de las tres especies de Freiberg para luego virar hacia el reconocimiento de sólo dos de ellas (Cei 1993), tal como hizo la mayoría de los autores (Fernández 1988; Buskirk 1993; Cabrera 1998; Richard 1999). Entonces, todas estas cuestiones acerca de cuántas especies de *Chelonoidis* habitan las regiones áridas de Argentina se tradujeron en considerar a *C. chilensis* como un complejo de especies, el complejo “*chilensis*” (Richard 1988a).

Adicionalmente al problema de cuántas especies componen el complejo “*chilensis*”, también se han suscitado controversias entre los autores que reconocen sólo dos especies, los que en general no han acordado sobre cuáles de ellas se trata. De esta manera Cabrera (1998) coincidió con Fernández (1988) y Buskirk (1993) en mantener *C. donosobarrosi* como sinónimo de *C. chilensis*, siendo *C. petersi* una especie válida. Contrariamente, Cei (1993) y Richard (1999) consideraron *C. chilensis* y *C. donosobarrosi* como especies válidas descartando la validez de *C. petersi*. Esta situación se traduce en que las poblaciones más norteñas del complejo “*chilensis*” (Catamarca, Chaco, Córdoba, Formosa, Jujuy, La Rioja, Salta, San Juan, San Luis, Santa Fe, Santiago del Estero, Tucumán y Norte de Mendoza) han sido consideradas como pertenecientes a *C. petersi* o *C. chilensis* según el autor que las considere. De la misma manera, las poblaciones más australes del complejo (Norte, Sur y Este de Río Negro, Sur de Buenos Aires, Norte de Neuquén, Sur de Mendoza y Sur de La Pampa) han sido clasificadas indistintamente como *C. donosobarrosi* o como *C. chilensis*. En resumen, la discusión sistemática dentro del complejo “*chilensis*” siempre ha girado sobre una serie de caracteres propuestos por Freiberg (1973), como el tamaño, que varía geográficamente, o la forma y el color de ciertas placas del caparazón, cuya variación es alta en ciertas poblaciones, desconociéndose aún la razón de ello.

El mejor ejemplo de la inutilidad de los caracteres mencionados anteriormente es el hecho de que para un mismo lugar se hayan realizado diferentes asignaciones específicas según los autores (ver Orrego Aravena 1979; Ormeño 1983; Cabrera 1998; Richard 1999). Tal es el caso de ejemplares procedentes de Puesto Ciénaga Agua de la Mula (Región del Nevado, Las

Malvinas, Departamento de San Rafael, Mendoza) o de La Reforma y Colonia 25 de Mayo (La Pampa) los cuales han sido considerados de una u otra especie según los autores. En este contexto de demanda de nuevos caracteres para resolver el problema, se realizó recientemente una evaluación sistemática de las especies que conforman el complejo “*chilensis*” incluyendo como fuente de caracteres secuencias del gen mitocondrial citocromo b y 9 microsátelites (Fritz *et al.* 2012). La principal conclusión de este trabajo fue que *Chelonoidis chilensis* es la única especie válida dentro del grupo, siendo *C. donosobarrosi* y *C. petersi* sinónimos de ella. El mayor sustento para esa propuesta taxonómica es que esos autores (Fritz *et al.* 2012) no encontraron diferencias genéticas suficientes compatibles con lo que se considera válido para especies dentro de Testudinidae.

Por lo tanto, basándonos en el trabajo de Fritz *et al.* (2012) consideraremos *a priori* que, *Chelonoidis chilensis* es la única especie válida dentro de lo que se denominó el complejo “*chilensis*”.

El registro fósil

Los Testudinidae se registran desde el Eoceno Temprano en América del Norte (Crumly 1984). Se considera que este grupo de tortugas terrestres surgió en América del Norte, ya que allí se encontró el fósil más antiguo de Testudinidae: *Hadrianus majusculus* del Eoceno Temprano (55-50 m.a., Wasatchiano).

El registro más antiguo de Testudinidae en América del sur, corresponde al Oligoceno Tardío- Mioceno Temprano de Costa Rica y corresponde a *Testudo costaricensis* (Segura 1944). Según Auffenberg (1971), *costaricensis* pertenecería al género *Geochelone*, el cual es propuesto como taxón hermano de *Chelonoidis* (Fritz *et al.* 2007), y por lo tanto podría considerarse que sea el ancestro de *Chelonoidis*. Este último género se habría diferenciado en América del Sur ya que no se conocen fósiles fuera de este continente (Auffenberg 1971). El origen biogeográfico de las tortugas terrestres sudamericanas es controvertido. La mayoría de los autores considera que las tortugas terrestres invadieron Sudamérica desde América del Norte o América Central (Auffenberg 1971; Gerlach 2001; Simpson 1943; Williams 1950) mientras que Crumly (1984) sugirió África como un origen alternativo.

En América del Sur se habrían desarrollado dos líneas filéticas de *Chelonoidis* (Auffenberg 1971; De La Fuente 1994; Caccone *et al.* 1999b). Una representada por *C. hesternus* del Mioceno Tardío (10-5 m.a.) de Colombia y las actuales especies *C. carbonaria* y *C.*

denticulada, de ambientes boscosos cálidos y húmedos; y una segunda línea representada por las formas actuales *C. nigra* y *C. chilensis*, las cuales se encuentran adaptadas a ambientes áridos, y la forma fósil *C. gringorum* (Simpson 1942) del Mioceno de Patagonia (De la Fuente 1994). Caccone *et al.* (1999b), en base a datos moleculares y al origen de las Islas Galápagos, consideraron que la separación entre *C. chilensis* y *C. nigra* habría ocurrido hace 12-6 ma., habiendo la última especie colonizado las Islas Galápagos mediante deriva por flotación (Crumly 1984). Este último escenario de dispersión fue avalado por varios autores (Austin & Arnold 2001; Caccone *et al.* 1999; Palkovacs *et al.* 2003).

No obstante, los primeros fósiles de *C. chilensis* datan del Pleistoceno de Villa Bustos, en la provincia de Córdoba (Auffenberg 1969), y del Pleistoceno de San Lorenzo, en la provincia de Santa Fe (De La Fuente 1997).

Hipótesis biogeográficas actuales

Hasta el momento existen dos hipótesis biogeográficas que intentan explicar la actual distribución de la diversidad morfológica y molecular de estas tortugas. Una de ellas, y la primera que se planteó, fue propuesta por Richard (1999) en base a un estudio ecológico, etológico y morfológico realizado en la provincia de Mendoza. Este autor considera que existen dos especies, *C. chilensis* y *C. donosobarrosi*, que ambas surgieron a partir de un ancestro común (posiblemente *C. gringorum*) que ocupó la distribución geográfica actual de las dos especies. Esta especie ancestral habría sufrido los cambios ambientales que ocurrieron en Patagonia durante el Plio-Pleistoceno. Estas nuevas condiciones de frío y aridez redujeron la población más austral, permaneciendo en latitudes inferiores aquellos individuos que continuaron habitando un ambiente comparable al bosque chaqueño actual. Según Richard, una pequeña población pudo permanecer entre las cuencas de los ríos Pre-Negro y pre-colorado, donde las condiciones de temperatura y humedad se mantuvieron más estables. Para este autor, esta población aislada, se adaptó a estas nuevas condiciones climáticas, dando origen a la especie *C. donosobarrosi*, y las poblaciones que permanecieron más al norte, habrían originado a *C. chilensis*.

La segunda hipótesis fue planteada por Fritz *et al.* (2012), a partir de datos moleculares (citocromo b y microsatélites). Ellos observan dos grupos genéticamente distintos, uno en el centro y norte de Argentina, y el otro en Patagonia. Según estos autores, la especie ancestral, de amplia distribución geográfica, no soportó las nuevas condiciones ambientales que se

sucedieron durante el Plio-Pleistoceno en Patagonia, por lo tanto la distribución de la especie se redujo, permaneciendo sólo las poblaciones del centro y norte. Según estos autores, las actuales tortugas de Patagonia habrían alcanzado esta región a partir de una colonización Holocénica, dispersando por flotación por el Río Desaguadero (Mendoza). Este modo de dispersión estaría explicando la baja variabilidad en esta región.

Situación de conservación

Las poblaciones de *C. chilensis* están incluidas en el Apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora (CITES), y se consideran *vulnerables* por las Comisiones de Conservación de la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, Red List 2012). En Paraguay, su estado de conservación es de "Preocupación Menor" (Motte *et al.* 2009), mientras que en Bolivia la especie es considerada como insuficientemente conocida como para asignarle una categoría de conservación (Ergueta & de Morales 1996). La caza extractiva multipropósito (predominantemente mascotismo), la extinción local de muchas poblaciones puntuales y la reducción, modificación y destrucción del hábitat por parte de la expansión de la frontera agrícola, generaron que hasta el año 2010 se haya categorizado a *C. chilensis* como *Amenazada* (Richard & Waller 2000). A partir del año 2011 se la asignó a la categoría *vulnerable* (Prado *et al.* 2011) sin que medie alguna mejora evidente en su situación. Esta preocupación nacional e internacional se expresa en que en los últimos 15 años se han diseñado numerosas herramientas legales tendientes a la protección de la especie. La prohibición de la caza extractiva y la regulación de su tráfico, sumado a la existencia de diversas poblaciones amparadas por el Sistema Nacional de Áreas Protegidas y reservas provinciales (ver legislación y listado de áreas en Chébez *et al.* 2008) son pasos importantes para la conservación de la especie. No obstante ello, la pérdida de ambientes naturales en el Chaco, Monte y Espinal (Bertonatti & Corcuera 2000) que actualmente sigue ocurriendo en importantes áreas de la distribución de la especie son un llamado de atención para la conservación de ésta y su ambiente. A este panorama, debe agregarse el desconocimiento de la biología y ecología de las poblaciones presentes en Argentina. El escaso conocimiento existente hasta el momento se basa mayormente en observaciones realizadas sobre ejemplares en cautividad (Freiberg 1979; Monteverde 1968; Gallardo 1974; Gruss 1986; Belmonte 1991; Fernández & Basso 1992) y a trabajos y observaciones realizados a campo en localidades puntuales de su distribución (Auffenberg 1969; Waller *et al.* 1989;

Richard *et al.* 1988; Richard 1988a, 1988b, 1994, 1999; Richard & De la Fuente 1992; Vinke & Vinke 2000; Varela & Bucher 2002).

La genética aplicada al estudio de especies en peligro de extinción

Si bien la extinción es un fenómeno evolutivo que opera en nuestro planeta desde siempre, la actual tasa de extinción de especies estaría potenciada y acelerada por causas no directamente ligadas con la evolución y dinámica de los ecosistemas (Chébez & Bertonatti 2008). Frente a esta problemática, la conservación podría ser considerada como un intento por preservar la diversidad que se ha generado a lo largo de millones de años de evolución (Eisner *et al.* 1995).

La UICN reconoce tres formas de biodiversidad que merecen ser conservadas: La diversidad genética, la de especies y la de ecosistemas. Una consecuencia de la pérdida de diversidad genética es la reducción de la capacidad de adaptación de las poblaciones naturales a los cambios que surgen en el ambiente, lo que deriva en un aumento de endogamia y la pérdida de aptitud para la mayoría de las especies afectadas por este proceso (Frankham *et al.* 2003).

La variabilidad o diversidad genética puede ser analizada o estudiada a nivel cromosómico (Bueno 2003; In Den Bosch *et al.* 2003) o molecular (Mockford *et al.* 1999; Paetkau *et al.* 2008). En general, la determinación de variantes cromosómicas intraespecíficas permite caracterizar poblaciones silvestres para luego, al complementar con datos moleculares y ecológicos, reconocer posibles unidades de conservación para la especie en cuestión (Moritz 1999). Particularmente, entre las tortugas, el género *Chelonoidis* es uno de los pocos que ha demostrado presentar variabilidad intragenérica (Bickham & Baker 1976a) y por lo tanto hace interesante el estudio de este aspecto en *C. chilensis*. Datos referidos a su constitución cromosómica fueron estudiados sólo en dos tortugas del sur de su distribución (Martínez *et al.* 2009).

En cuanto al análisis de marcadores moleculares en general (ej., microsatélites, secuencias de ADN y SNPs – de sus siglas en inglés *Single Nucleotide Polymorphism*) es posible, mediante la aplicación de éstos, estudiar las relaciones genéticas entre individuos, poblaciones y especies, y así resolver problemas de ecología y evolución (Mace *et al.* 2003; Arif & Khan 2009). La Genética de la Conservación es la disciplina que utiliza estos métodos moleculares para intentar preservar y restablecer la biodiversidad. Además, ésta disciplina

busca lograr una descripción más precisa de los procesos evolutivos y genéticos que operan en la naturaleza y que dieron lugar al estado actual de ciertas especies/poblaciones amenazadas. Para ello, la Genética de la Conservación se focaliza en el manejo genético de poblaciones pequeñas, trata la resolución de situaciones taxonómicas dudosas, define unidades de manejo dentro del nivel de especie y utiliza los marcadores genéticos para el análisis en forense y entender la biología de las especies (Frankham *et al.* 2003). De este modo es como la genética se ha introducido en la elaboración de decisiones de conservación (Frankham 2003; DeSalle & Amato 2004) intentando preservar especies como entidades dinámicas capaces de enfrentarse a los eventuales cambios ambientales. Una característica importante de la Genética de la Conservación, teniendo en cuenta que se focaliza en especies amenazadas, es la implementación de un muestreo no invasivo (saliva, fecas, pelo, etc.) y el no requerimiento de un número elevado de muestras (Desalle & Amato 2004).

Los estudios de genética molecular y poblacional se hacen cada vez más necesarios para complementar, brindando nuevos datos y aproximaciones indirectas, al conocimiento de la historia evolutiva, la estructura poblacional, la filogeografía y la resolución de incertidumbres taxonómicas, entre otros aspectos de la biología de las especies.

Específicamente, para poder comprender como surgió la diversidad genética que observamos hoy en día, debemos determinar cuáles son los procesos naturales evolutivos que moldean y sostienen la diversidad biológica. En este caso la Filogeografía es la disciplina que combina los componentes históricos o filogenéticos de la distribución espacial de linajes de genes con el tiempo y el espacio, en los cuales (idealmente) se mapean las genealogías de estudio (Avice *et al.* 1987; Avice 2000; Vázquez-Domínguez 2009). Por medio de este análisis, se pueden evaluar los patrones (relaciones intra o interespecíficas) y procesos (secuencias de colonización, diversificación y extinciones) que operan y operaron en la evolución de distintos linajes en determinadas áreas (Lanteri & Confalonieri 2003).

En particular, la Filogeografía se sustenta en la teoría de la coalescencia (ver más abajo), la cual presupone que diferentes haplotipos de genes mitocondriales o nucleares coalescen en un ancestro común (Avice 2000; Cruzan & Templeton 2000; Templeton 2004; véase el capítulo 4 de este libro). De esta manera, las relaciones históricas entre linajes de genes son una función de los parámetros demográficos lo cual permite el análisis matemático y estadístico formal de las genealogías de genes (Avice 2000). La utilización de diferentes marcadores complementarios permite descifrar la historia completa de los patrones genealógicos observados en las poblaciones naturales (Carbone & Kohn 2001; Hare 2001). Algunos aspectos fundamentales del estudio filogeográfico son: la unidad de estudio es el individuo, y

más estrictamente, el haplotipo; se evalúan polimorfismos que son únicos –pues no se repiten– y definen claramente la filogenia de los mismos; utiliza árboles de genes, es decir, con base en haplotipos, y no árboles de especies (o taxones o áreas), con los que puede trazarse la filogenia matrilineal en el caso del ADN mitocondrial (haploide), así como las genealogías de genes nucleares (diploides); y se utilizan enfoques basados en los principios de coalescencia para evaluar formal y estadísticamente las predicciones filogeográficas.

Teoría de la Coalescencia

Bajo neutralidad, en una población y a lo largo de las generaciones, surgen de forma permanente nuevos alelos por mutación y se pierden otros por deriva genética. De este modo, todos los alelos de un gen en una generación derivan de –o coalescen hacia– un único alelo ancestral. Los procesos de coalescencia en poblaciones naturales “garantizan” las conexiones filogenéticas entre genotipos dentro de una especie, a través de líneas verticales de descendencia. De esta forma, al mirar hacia atrás en el tiempo, los haplotipos de ADN mitocondrial o de cualquier gen nuclear, eventualmente coalescen en el ancestro común. El tiempo de coalescencia depende de procesos poblacionales, como fluctuación del tamaño poblacional, selección natural o variaciones en el flujo génico (Harding 1996).

Los métodos moleculares actuales permiten no sólo la estimación de las frecuencias alélicas, sino también de las relaciones genealógicas de los alelos, lo cual posibilita considerar el flujo génico histórico y la fragmentación de poblaciones en un marco conceptual más histórico y geográfico (Vázquez-Domínguez *et al.* 2009).

El ADN mitocondrial

El ADN mitocondrial (ADNmt) ha sido ampliamente utilizado para inferir procesos evolutivos y demográficos tanto en poblaciones como en especies (Fritz *et al.* 2006, 2009; Le *et al.* 2006; Osentoski & Lamb 1995). Esta molécula presenta características que la hacen ideal para su análisis:

1. Es de fácil aislamiento y se encuentra en grandes cantidades: cada célula eucariota presenta cientos o miles de mitocondrias y cada una de ellas presenta numerosas copias de este genoma (Ballard & Whitlock 2004).

2. Presenta estructura genética sencilla: es circular y de tamaño pequeño (16-20 kilobases). Asimismo, carece de secuencias altamente repetidas, intrones, elementos transponibles y pseudogenes. Presenta 37 genes (13 ARN mensajeros, 2 ARN ribosomales y 22 ARN de transferencia), además de una región, propia de deuterostomados, conocida con los nombres de región control (de 1 kb aprox.) o *d-loop* (fragmento más pequeño dentro de la misma región control).

3. Su forma de herencia es sencilla: se hereda de la madre y no presenta recombinación génica, lo cual es una característica muy importante al momento de establecer genealogías génicas. La recombinación génica, que ocurre entre cromosomas homólogos durante la meiosis, puede llegar a desvirtuar las verdaderas genealogías de las secuencias (Lanteri & Confalonieri 2003).

4. Exhibe una alta tasa de mutación, lo que hace que evolucione más rápido que el ADN nuclear. La mayoría de las variantes involucran sustituciones nucleotídicas (Brown *et al.* 1979; Avise *et al.* 1987; Lunt *et al.* 1998).

La ausencia de recombinación y su alta tasa de mutación son las características más relevantes en Filogeografía.

Entre los 37 genes que se encuentran en el ADNmt, el gen del citocromo b codifica para una de las proteínas que se encuentran en la cadena de transporte de electrones. Este gen contiene tanto sitios de evolución rápida como sitios de evolución lenta y por eso ha sido utilizado para resolver cuestiones filogenéticas de gran envergadura (Feldman & Parham 2002; Le *et al.* 2006, 2007), y para analizar divergencias más recientes a nivel de poblaciones (Fritz *et al.* 2006, 2010; Farías *et al.* 2007).

Hipótesis

1) *Chelonoidis chilensis* es la única especie de tortuga terrestre presente en las regiones áridas de Argentina. Dado su amplio rango de distribución geográfica y su plasticidad fenotípica es que se observan las variantes morfológicas encontradas. Su variabilidad genética nos permitirá reconstruir su historia filogeográfica.

2) Por lo tanto, y en base a los antecedentes previamente expuestos, consideramos que el estudio de la variabilidad genética de *C. chilensis*, tanto cromosómica como molecular, la aplicación de los métodos de coalescencia, el conocimiento de la distribución geográfica de los linajes y el estado de la población total y sus subdivisiones aportarán el marco de referencia necesario para poder desarrollar estrategias adecuadas de conservación y manejo para la especie en cuestión.

Objetivos

Dada la situación de los ambientes donde habita *Chelonoidis chilensis*, sumado a su situación de conservación, conocer la estructura genética de la especie es un paso importante para elaborar planes de manejo y evaluar el estado de conservación de las mismas. Por lo tanto, el objetivo principal del presente trabajo de Tesis Doctoral fue analizar la variabilidad genética de la especie considerando aspectos de su distribución y de su estado de conservación.

Acorde a ello, los objetivos específicos fueron:

1. Elaborar un mapa georreferenciado de la variabilidad genética (usando citocromo *b* mitocondrial y análisis cromosómico) de las distintas poblaciones de *C. chilensis* y poner a prueba su utilidad en la predicción del lugar de origen de tortugas decomisadas al tráfico ilegal por parte de las autoridades provinciales y nacionales de fauna. Esta información será provista a las autoridades correspondientes para que evalúen su uso en futuros planes de reintroducción o conservación *ex situ* de la especie.
2. Proveer una descripción de la constitución cromosómica de *C. chilensis* y establecer hipótesis de los posibles reordenamientos cromosómicos que puedan haber ocurrido durante la evolución de la especie.
3. Incrementar la predictibilidad y poner a prueba las hipótesis obtenidas en el trabajo de Fritz *et al.* (2012) a partir de la inclusión de un análisis cromosómico y de secuencias de ADN obtenidas de individuos que representen todo el rango de distribución de *C. chilensis* en la República Argentina.
4. Proveer datos básicos de ecología de la especie (abundancia relativa, estado sanitario, proporción de sexos y distribución de tallas) para poblaciones puntuales, tanto dentro como fuera de áreas protegidas y no protegidas en la República Argentina. Estos datos básicos sentarán una base metodológica comparable para el monitoreo futuro de distintas poblaciones a lo largo de todo el rango de distribución de la especie en el país.

Materiales y Métodos

Área de estudio y tortugas muestreadas

Se realizaron seis viajes de campo durante los meses de verano de los años 2009, 2011 y 2012. Los mismos involucraron la Ecorregión del Monte de Llanuras y Mesetas y la Ecorregión Chaco Seco donde se distribuye la especie. Las provincias donde se muestreó fueron: Río Negro, La Pampa, Buenos Aires, Neuquén, San Juan, La Rioja, San Luis, Córdoba, Catamarca, Tucumán, Jujuy, Salta, Santiago del Estero, Chaco, Formosa y Santa Fe. Las Áreas Naturales Protegidas incluidas en el muestreo fueron: Parque Nacional Lihué Calel (La Pampa), Parque Nacional Copo (Santiago del Estero), Parque Nacional Talampaya (La Rioja) y la Reserva Natural Formosa (Formosa). El muestreo fue realizado según las normativas provinciales vigentes (Anexo Materiales y Métodos).

Dado que se trata de una especie protegida a nivel nacional como internacional (ver Introducción de la presente Tesis), se intentó obtener muestras por métodos no invasivos posibles y en ningún caso se realizó el sacrificio del animal en cuestión. La muestra total considerada fue de 98 especímenes (Tabla 2, Anexo Resultados).

Para realizar el análisis de genética molecular, las muestras consistieron en hisopados bucales, en los casos en los que se encontraron tortugas vivas, y restos de tejido o hueso, cuando encontramos tortugas muertas. Debido a que son animales que en general se encuentran en baja densidad o en lugares muchas veces poco accesibles, para incorporar un mayor número de muestras y de localidades al análisis, también se incorporaron muestras pertenecientes a la base de datos GenBank y muestras de tortugas con procedencia geográfica certificada que se encontraban depositadas en las colecciones herpetológicas de los siguientes museos: Museo de La Plata, Buenos Aires (MLP); Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”, Buenos Aires (MACN); Instituto de Herpetología de la Fundación Miguel Lillo, Tucumán (FML) y Museo de Ciencias Naturales de Miramar, Córdoba.

Las tortugas encontradas muertas se depositaron en la Colección Herpetológica del Museo de La Plata (Tabla 2, Anexo Resultados).

Procedimientos de laboratorio relativo a la obtención y procesamiento del ADN

Luego de distintas pruebas, se estableció el método de extracción de ADN más adecuado para cada tipo de tejido obtenido en la presente tesis:

- **Extracción de ADN a partir de saliva.** La extracción de ADN se realizó a partir de hisopos de algodón que se frotaron por las paredes de la cavidad oral, lengua y paladar de las tortugas. En total se obtuvieron 4-5 hisopos por tortuga. Los mismos se almacenaron en tubos de plástico con alcohol 70°. Estos tubos permanecieron a temperatura ambiente mientras duraron los trabajos de campo y, una vez en laboratorio, fueron almacenados en un freezer a -20°C. Allí permanecieron hasta el momento de la extracción de ADN. El procedimiento para la extracción del ADN genómico consistió en:
 1. Colocar el algodón del hisopo en un tubo nuevo con 1 ml de solución TE (denominada así por las iniciales de sus componentes Tris y EDTA). Agitar durante 30 minutos. Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos. Descartar el sobrenadante sin remover el pellet de células.
 2. Resuspender las células en 300 µl de buffer de digestión con agregado de proteinasa K (150 µg/ml conc. Final). Incubar durante 2 horas a 50°C.
 3. Agregar un volumen igual (300 µl) de CILi 5M. Mezclar por inversión durante 1 minuto. Agregar 600 µl de mezcla SEVAG (cloroformo: alcohol isoamílico 24:1) y colocar en agitador rotatorio durante 30 minutos. Centrifugar a 14.000 rpm durante 15 minutos y pasar el sobrenadante con el ADN en solución a otro tubo.
 4. Agregar dos volúmenes de isopropanol (600 µl). Agitar por inversión hasta que el ADN precipite. Centrifugar a 14.000 rpm, tirar el alcohol sobrenadante y lavar el pellet de ADN con etanol 70%. Repetir la centrifugación, descartar el sobrenadante. Tapar con Parafilm perforado y secar el bloque térmico por espacio de 15 minutos a 65°C.
 5. Resuspender el ADN en 50 µl de buffer TE y guardar a 4°C hasta cuantificar. Luego guardar a -20°C.

- **Extracción de ADN a partir de muestras de piel o músculo.** Estos tejidos fueron obtenidos de tortugas halladas muertas en el campo, atropelladas en rutas o bien de ejemplares secos alojados en colecciones y que nunca estuvieron fijados con formol. Estos tejidos fueron cortados con tijera y pinzas y también conservados en tubos plásticos con etanol 70 %. Las muestras así tomadas, al menos por triplicado, fueron llevadas a laboratorio y alojadas en freezer a -20°C hasta el momento de la extracción de ADN. El procedimiento para la extracción del ADN genómico consistió en:
 1. Pesar 300 mg de muestra de tejido fresco o 200 mg de tejido seco. Colocarlo en una cápsula de Petri pequeña.
 2. Lavar la muestra con 2 ml de una solución salina de EDTA (Ácido Etilendiaminotetraacético) 0.15M. Descartar el líquido con pipeta.

3. Agregar 200 µl de SDS (Dodecilsulfato sódico) al 20% y cortar finamente la muestra con tijera o bisturí. Repartir todo en dos tubos plásticos de 1,5 ml.
 4. Agregar 600 µl de EDTA 0.15 M y 200 µl de proteinasa K a cada uno. Incubar en baño térmico a 37°C durante 24 hs.
 5. Agregar 300 µl de CILi 5M. Mezclar por inversión durante 1 minuto. Agregar 600 µl de mezcla SEVAG y colocar en agitador rotatorio durante 30 minutos. Centrifugar a 14.000 rpm durante 15 minutos y pasar a otro tubo el sobrenadante con el ADN en solución.
 6. Agregar dos volúmenes de isopropanol (600 µl) y agitar por inversión hasta que el ADN precipite. Centrifugar a 14.000 rpm, tirar el alcohol sobrenadante y lavar el pellet de ADN con etanol 70°. Repetir la centrifugación, descartar el sobrenadante. Tapar con Parafilm perforado y secar el bloque térmico, 15 minutos a 65°C.
 7. Resuspender el ADN en 100 µl de buffer TE y guardar a 4°C hasta cuantificar. Luego guardar a -20°C.
- **Extracción de ADN a partir de hueso.** Las muestras de hueso fueron obtenidos de huesos de tortugas halladas muertas en el campo o bien se tomaron de ejemplares depositados en instituciones los cuales nunca estuvieron fijados con formol. El hueso se guardo en bolsitas rotuladas, sin ningún tipo de conservante y a temperatura ambiente hasta el momento de la extracción de ADN. El procedimiento para la extracción del ADN genómico consistió en:
 1. Lavar la muestra con hipoclorito al 7% y después con agua ultra pura. Dejar secar a temperatura ambiente.
 2. Exponer el material 5 minutos a luz UV.
 3. Macerar la muestra hasta que quede un polvillo fino (se utiliza un mortero y un mazo por cada muestra).
 4. Pesar la muestra sobre papel aluminio previamente irradiado en UV y transferirla a un tubo estéril de 50 ml.
 5. Adicionar a la muestra de hueso 10 ml de la Solución de Extracción.
 6. Sellar los tubos con papel envolvente. Mezclar suavemente por inversión.
 7. Incubar la muestra 24 horas en oscuridad mezclando constantemente.
 8. Centrifugar 2 minutos a 6000 rpm.
 9. En un tubo cónico de 50 ml adicionar 40 ml de la solución de tampón de unión y transferir el sobrenadante.
 10. Adicionar a la muestra 100 µl de Suspensión de Sílice con una micropipeta de 100-1000 µl.
 11. Ajustar el pH a 4.0 adicionando 200 µl de HCl (30% W/V).

12. Mezclar suavemente. Cerrar los tubos e incubar en agitación durante 3 horas en oscuridad.
13. Centrifugar las muestras por 2 minutos a 6000 rpm en la centrífuga para tubos de 50 ml.
14. Descartar el sobrenadante (eventualmente se puede almacenar en un tubo aparte, por si fallase la extracción de ADN).
15. Adicionar 1 ml de Tampón de Unión al precipitado mediante el empleo de una micropipeta de 100-1000 μ l y una punta con filtro. Resuspender el botón pipeteando.
16. Transferir la suspensión a un tubo de plástico de 1.5 ml.
17. Centrifugar durante 15 segundos a 13000 rpm en la microcentrífuga.
18. Descartar el sobrenadante por inversión.
19. Adicionar 1 ml de Tampón de Lavado al botón de sílice y resuspender pipeteando.
20. Centrifugar por 15 segundos a 13000 rpm.
21. Repetir el paso anterior (Tampón de Lavado).
22. Centrifugar nuevamente por 15 segundos a 13000 rpm.
23. Descartar el sobrenadante por inversión.
24. Dejar secar la sílice a temperatura ambiente durante 15 minutos (tubos destapados).
25. Agregar 50 μ l de solución TE a la sílice ya seca y resuspender agitando.
26. Incubar con tapa cerrada durante 10 minutos a temperatura ambiente. Agitar ocasionalmente.
27. Centrifugar durante 2 minutos a 13000 rpm en microcentrífuga.
28. Transferir el sobrenadante a un tubo de plástico nuevo de 1.5 ml.

Composición y concentración de los componentes para la preparación de las soluciones necesarias para procesar una muestra de 500 mg de hueso:

Solución de Extracción: EDTA 0.45M, 0.25 mg/ml proteinasa K.

Tampón de Unión: Tiocianato de Guanidina (GuSCN) 5M, NaCl 25mM, Tris 50mM.

Tampón de Lavado: Etanol 50% v/v, NaCl 125mM, Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0.

Suspensión de Sílice: 4.8 g SiO₂, 40 ml Agua Ultrapura

Amplificación y secuenciación del ADN

Una vez obtenido el ADN según cualquiera de los protocolos mencionados, las extracciones fueron cuantificadas utilizando un espectrofotómetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific).

Para obtener múltiples copias (amplificación) del gen del citocromo b se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, "Polymerase Chain Reaction"). Una vez amplificado el gen se procedió a su secuenciación empleando cebadores de las siguientes regiones del genoma mitocondrial: (1) el gen completo de la proteína Citocromo b (Cit b), que además incluyó parte del gen del ARNt-Thr (ARN de transferencia del aminoácido Treonina), ambos en total constituyeron un fragmento de aproximadamente 1200 pares de bases (pb); y (2) La Región Control del ADN mitocondrial fue secuenciada en sólo cinco individuos. En este último caso, se amplificó dicha región para realizar una comparación con las secuencias del gen del citocromo b, de las mismas cinco tortugas, y determinar si la Región Control es significativamente más polimórfica que el citocromo b. Esta fue una forma de corroborar si el gen elegido (cit b) es apropiado para los fines de este estudio.

En un principio se utilizaron cebadores para el gen cit b que ya habían sido descritos para especies emparentadas (*Chelonodis nigra*). A partir de estas primeras secuencias se diseñaron cuatro pares de cebadores específicos (asignándoles letras de la A a la H) para *C. chilensis*, los cuales permitieron optimizar la reacción de PCR (Cit b A y Cit b H son los cebadores que permiten amplificar el gen completo). Además, se diseñaron cebadores internos para el caso de muestras de ADN muy degradadas (Cit b B-G). Para el diseño de los mismos se utilizaron los programas Primer3 (Rozen & Skaletsky 2000) y OligoCalc (Kibbe 2007).

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 20 µl con las siguientes proporciones: buffer 1X, 0.2 mM dNTP, MgCl 1.5 mM, 0.2 mM de cada cebador, 1 unidad de *Taq* ADN polimerasa y 50 ng de ADN. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: Desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos seguido de: (1) 34 ciclos a 94°C / minuto, (2) 51-56°C (según cada par de cebadores) / minuto, (3) 72°C / 3 minutos; y (4) una extensión final a 72°C durante 10 minutos. La reacción se realizó en un termociclador Biometra T3000.

Tabla 1. Descripción de los cebadores utilizados en este Trabajo de Tesis.

Cebador	Posición	Secuencia	Referencia
Citocromo b			
GLUDGE	14358	5'-TGATCTTGAARAACCAAYCGTTG-3'	Palumbi et al. 1991.
CytbJSi	15011	5'-GGATCAAACAACCCAACAGG-3'	Spinks et al. 2004.
CytbJSr	15030	5'-CCTGTTGGGTTGTTTGATCC-3'	Spinks et al. 2004.

THR-8	15585	5'-GGTTTACAAGACCAATGCTT-3'	Spinks et al. 2004.
Cit b-A	14411	5'-TTACGAAAAACCCACCCAAT-3'	La Presente Tesis
Cit b-B	14810	5'-GGCCTCATGGTAGGACGTAA-3'	La Presente Tesis
Cit b-C	14737	5'-CCTGAAACACAGGAATTACCC-3'	La Presente Tesis
Cit b-D	15135	5'-CCTAGGAGGTTTGGGGAGAA-3'	La Presente Tesis
Cit b-E	15044	5'-CACCGACAAAATTCCTTTCC-3'	La Presente Tesis
Cit b-F	15328	5'-GGTTGAGCGTTGTTTTGATG-3'	La Presente Tesis
Cit b-G	15244	5'-TACGATCCATCCCAAACAAA-3'	La Presente Tesis
Cit b-H	15564	5'-GGTTTACAAGACCAATGCTT-3'	La Presente Tesis
Región Control			
Ald-DL1FR	16166	5'-GATCTATTCTGGCCTCTGG-3'	Palkovacs <i>et al.</i> 2003.
Phe-H26	50	5'-TACCCATCTTGGCAACTTCAGT-3'	Palkovacs <i>et al.</i> 2003.
RC-F	15451	5'-AAGACCCATTCATCATCATCG-3'	La Presente Tesis
RC-R	16268	5'-TCAAGTTTTGCAAGATCAATCA-3'	La Presente Tesis

Análisis general de las secuencias obtenidas

Durante los seis viajes de campaña se colectaron en total 92 muestras (ver Fig. 1) de las cuales se logró amplificar el gen del citocromo b en sólo 69 de ellas. Los motivos por los

cuales algunas muestras no se incluyeron fueron los siguientes: (1) extracción de ADN fallida, (2) porque fue imposible amplificar el fragmento deseado (presencia de inhibidores, ADN exógenos, etc.) o (3) por obtención de un electroferograma defectuoso para la secuencia en cuestión (cuando la determinación de las bases nitrogenadas es dudosa, por lo menos en más del 25% de la secuencia total).

En contraposición, las restantes 69 secuencias presentaron una calidad entre aceptable y buena. En consecuencia, éstas fueron alineadas utilizando el algoritmo ClustalW, presente en el programa MEGA 4.1 (Tamura *et al.* 2007) y luego editadas manualmente. Tanto para el análisis de relaciones filogenéticas como para el análisis filogeográfico, se incluyeron 29 secuencias del gen *cit b*. Estas 29 secuencias se encontraban depositadas en el GenBank (ver Anexo: Tabla 2). En total se trabajó con una matriz de 98 secuencias.

A partir de la matriz total de secuencias se calculó: (1) la composición nucleotídica, expresada en porcentaje de cada una de las bases nitrogenadas (A, G, C y T); (2) el número de haplotipos (cada variante de la secuencia encontrada: *H*) y (3) el número de sitios segregantes o polimórficos: *S*). Estos cálculos se realizaron mediante el programa DnaSP v.5 (Rozas *et al.* 2003).

La variabilidad genética del gen del citocromo *b* se estimó mediante los índices de diversidad nucleotídica (π) y de diversidad haplotípica (*h*) (Li 1997) utilizando el total de las muestras analizadas. El primero de ellos representa el número de diferencias nucleotídicas por sitio de la secuencia entre dos secuencias elegidas al azar (Nei & Li 1979). El segundo mide la probabilidad de que dos haplotipos elegidos al azar en una población sean diferentes. Este índice considera las frecuencias alélicas. Ambos índices se calcularon con el programa DnaSP v.5 (Rozas *et al.* 2003).

Análisis filogenético

Se realizó un análisis de relaciones filogenéticas con el propósito de poner a prueba la hipótesis de que *Chelonoidis chilensis* es la única especie válida de lo que hasta recientemente se consideró el complejo *Chelonoidis chilensis* (ver Introducción). Para ello se consideró una matriz de 21 haplotipos por 1118 pb. Cada haplotipo representa las variantes identificadas de las secuencias analizadas del gen del citocromo *b*. Esta reducción en el número de especímenes se realizó para facilitar el análisis de los datos a través de los métodos filogenéticos, dado que al considerar el total de individuos (98) y de caracteres (1118 pb) se retardaba considerablemente el análisis y en algunos casos no se pudo culminar.

Las relaciones filogenéticas fueron reconstruidas empleando diferentes métodos. En primer lugar, se realizó un análisis filogenético basado en criterios de parsimonia utilizando el programa PAUP* (Swofford 2002). Por medio de este análisis se infieren filogenias a partir de caracteres discretos bajo el método de *Maximum Parsimony* (MP). Los métodos basados en parsimonia buscan los árboles de mínima longitud, que son aquellos árboles que minimizan la cantidad de cambio evolutivo necesario para explicar los datos disponibles, en base a un conjunto de restricciones en cuanto a los cambios permitidos entre los caracteres. Al tratarse de caracteres discretos multiestado entre los cuales los cambios pueden darse en cualquier orden, estos se consideraron como no aditivos y fueron analizados utilizando el método de Parsimonia de Fitch (Fitch 1971). La regla de colapsamiento que utiliza PAUP se basa en retener aquella rama soportada al menos por una de las reconstrucciones más parsimoniosas del estado ancestral, para al menos un carácter. En segundo lugar, se aplicó el método de Máxima Verosimilitud o *Maximum Likelihood* (ML). Este método requiere la determinación previa del modelo evolutivo de sustitución nucleotídica que mejor se ajuste a los datos. El mismo se calculó utilizando el programa jModelTest 0.1.1 (Posada 2008) con el criterio de información Akaike (AIC), y el modelo de sustitución elegido fue *General Time-Reversible* (GTR+G) (Rodríguez *et al.* 1990). Bajo este método, se evalúa la probabilidad de que el modelo evolutivo elegido haya generado las secuencias observadas. Posteriormente, las relaciones filogenéticas son inferidas por medio de la búsqueda de aquellos árboles que presenten el mayor valor de *Likelihood*; este valor representa la probabilidad que los datos observados tendrán de acuerdo a la topología obtenida.

Bajo los dos métodos anteriores, se calculó un Árbol de Consenso Estricto cuando se obtuvo más de un árbol igualmente parsimonioso (MP) o con igual probabilidad de *Likelihood* (ML). Para determinar el grado de sustento de cada una de las ramas de los árboles obtenidos, tanto por MP como por ML, se realizó un remuestreo estadístico de "*Bootstrap*". El mismo implica un remuestreo aleatorio con reemplazo de los caracteres (posiciones de las secuencias de ADN), creando muchas réplicas del conjunto de datos (pseudoréplicas) del mismo tamaño que la matriz original. En este caso, se realizó 1000 veces. Por cada matriz remuestreada el programa calcula un árbol y el grado de conflicto entre los mismos se resuelve mediante un árbol de consenso de mayoría. El mismo incluye todos los grupos que sean constantes en más del 50% de las pseudoréplicas. Sobre cada rama, el valor de *Bootstrap* representa la frecuencia con que ese grupo apareció en todos los árboles comparados y es una medida estadística de soporte de los mismos. Adicionalmente, se empleó el programa Mr. Bayes 3.1 (Ronquist *et al.* 2003) para obtener una inferencia estadística bayesiana de las relaciones filogenéticas del grupo. En primer lugar, utilizando el

programa Mesquite 2.75 (Maddison & Maddison 2011), se establecieron los parámetros y el modelo de sustitución nucleotídica que mejor se ajustó a los datos y se generó la matriz necesaria para luego utilizar el programa Mr. Bayes. En el caso de inferencia bayesiana, se establecen probabilidades *a posteriori* para un árbol, que representan la probabilidad de un árbol dadas las observaciones, o sea, dadas las secuencias de ADN obtenidas. A partir de este análisis se obtiene un árbol de consenso de mayoría con los valores de las probabilidades *a posteriori* para cada clado.

Las relaciones filogenéticas, bajo los tres métodos anteriormente descritos, fueron inferidas utilizando a *Geochelone sulcata* como grupo externo (ver Introducción).

Utilizando el programa DnaSP v.5 (Rozas *et al.* 2003) se calculó la divergencia (expresada en porcentaje) de las secuencias entre las especies neotropicales de la familia Testudinidae (*Chelonoidis carbonaria*, *C. denticulata*, *C. nigra* y *C. chilensis*). Utilizando los datos de divergencia y considerando la tasa de mutación propuesta por Avise (1992) para el ADNmt de tortugas y vertebrado en general (2%=0,02 sustituciones/sitio/millón de año), y una tasa de mutación más lenta, propuesta por Bowen *et al.* (1993) (0,4%=0,004 sustituciones/sitio/millón de año) para Testudines, se intentó estimar el tiempos de divergencia temporal entre grupos los grupos detectados en el análisis de las relaciones filogenéticas anteriormente descrito. Esta información se complementó con antecedentes del registro fósil de las Testudinidae sudamericanas.

Análisis filogeográfico

El primer paso del análisis filogeográfico fue el establecimiento de las relaciones genealógicas entre los haplotipos. En segunda instancia se determinó cuáles fueron los factores históricos y geográficos que pudieron haber determinado la actual distribución de los mismos. Para ello, se usaron básicamente dos métodos, el método gráfico conocido como “redes de haplotipos” y el método estadístico basado en estadísticos descriptivos y parámetros demográficos, respectivamente.

La red de haplotipos se obtuvo mediante el programa TCS 1.21 (Clement *et al.* 2000) basado en parsimonia estadística. Para ello se organizan las secuencias en haplotipos y se calcula la frecuencia de cada uno de ellos respecto de la muestra total. Este método establece inicialmente el número máximo de diferencias entre los haplotipos, como resultado de sustituciones simples. A este número máximo se le asigna el 95% de confianza estadística y

es llamado Límite de Parsimonia. Luego se empiezan a conectar aquellos haplotipos que difieren sólo en un cambio, después los que difieren en dos, después los que difieren en tres, y así sucesivamente hasta llegar al Límite de Parsimonia, que es cuando todos los haplotipos se encuentran unidos en una única red. Para poder completar la red, el programa incorpora haplotipos hipotéticos los cuales corresponden a variantes de la secuencia del gen en estudio que no fueron encontradas en este estudio. Las mismas podrían considerarse extintas en la naturaleza, o quizá podrían ser halladas si se ampliara el muestreo (Anexo: Fig. 5).

Una vez obtenida, la red de haplotipos fue superpuesta sobre la distribución geográfica de las poblaciones. Esta es una forma fácil y directa de aproximarse a los patrones filogeográficos que presenta determinado grupo de estudio y es una forma de inferir los eventos y procesos filogeográficos que lo modularon. Además, el método permite evidenciar asociación geográfica, es decir, que la distribución observada de haplotipos no es debida al azar.

Las pruebas de expansión poblacional se pueden clasificar de la siguiente manera:

- 1) Pruebas basadas en la distribución de las frecuencias de las mutaciones (sitios segregantes)

Estos estadísticos pueden ser apropiados para distinguir el crecimiento poblacional de poblaciones con tamaño constante ya que en el primer caso se genera un exceso de mutaciones en las ramas externas de la genealogía (mutaciones recientes) y por lo tanto un exceso de *singletons* (sustituciones presentes en solo una de las secuencias muestreadas) (Tajima 1989; Slatkin & Hudson 1991).

Dentro de esta categoría se implementaron las pruebas D_T (Tajima 1989), D^* y F^* (Fu & Li 1993) y R_2 (Ramos Onsins & Rozas 2002).

Estos estadísticos se basan en la diferencia entre estimados alternativos del parámetro poblacional Theta (θ) = $2N\mu$, donde N es el número efectivo de copias del gen en la población (en el caso de analizar regiones del ADNmt se considera que es el número de hembras en la población) y μ es la tasa mutacional.

La Prueba D_T (Tajima 1989) compara distintos estimadores del nivel de polimorfismo como θ y π (diversidad nucleotídica). Si la selección natural no está actuando sobre las secuencias en cuestión, se espera igualdad entre ambos estimadores y un valor de D_T nulo. Una desviación de estos parámetro puede deberse a cambios en π , ya que puede cambiar si existe heterogeneidad en las tasas de mutación entre distintos sitios. Por lo tanto, desviaciones positivas o negativas del estadístico indican desvíos de la neutralidad. El resultado de D_T tiende a ser negativo cuando las poblaciones han atravesado una expansión poblacional o un cuello de botella muy severo (Depaulis *et al.* 2003), y positivo cuando la población presenta

algún tipo de estructuración (apareamiento no aleatorio) o ha estado sujeta a un cuello de botella de efectos moderados.

La Prueba R_2 (Ramos-Onsins & Rozas 2002) es una de las más poderosas para detectar crecimiento poblacional. Como se mencionó anteriormente, tanto esta prueba como la prueba D_T de Tajima, se basan en la distribución de frecuencias de los sitios segregantes de un *locus* y resultan apropiadas para distinguir entre crecimiento poblacional y tamaño poblacional constante a causa de que la expansión poblacional genera un exceso de mutaciones en las ramas externas de la genealogía y por lo tanto un exceso de *singletons* (sustituciones presentes en una sola de las secuencias muestreadas). Entonces, esta prueba compara los valores observados y esperados de *singletons* para cada rama de la genealogía tras un cambio reciente y severo en el tamaño poblacional. En presencia de un evento de expansión poblacional pronunciada se espera que este valor sea significativamente bajo.

Valores bajos de R_2 son consistentes con un escenario de expansión demográfica.

2) Pruebas que se basan en la distribución de haplotipos

Dado que las frecuencias haplotípicas pueden variar según el escenario demográfico (Nei 1975), estas pruebas permiten detectar desviaciones de los supuestos demográficos del modelo neutral estándar.

En este caso se realizó la prueba F_S (Fu 1997). Este estadístico, al igual que la prueba D_T , se basa en un modelo de sitios infinitos sin recombinación y evalúa la probabilidad de que, en una muestra neutral al azar, se observe un número de alelos menor o similar que el valor observado dado un π (diversidad nucleotídica), tomado como un estimador del parámetro poblacional θ . La significancia de los dos estadísticos es testeada por medio de la generación de muestras al azar bajo la hipótesis nula de neutralidad selectiva y equilibrio poblacional.

Valores bajos de F_S se corresponden con un exceso de *singletons* causado por un evento de expansión.

El cálculo de las pruebas D_T , D^* , F^* , F_S y R_2 se realizó utilizando el programa DnaSP v. 5 (Rozas *et al.* 2003).

3) Pruebas basadas en la distribución de las diferencias pareadas (o *mismatch distribution*)

Está demostrado que la expansión poblacional deja marcas particulares en la distribución de las diferencias pareadas entre secuencias (Slatkin & Hudson 1991; Rogers & Harpending

1992). Por lo tanto, los estadísticos que se basan en estas distribuciones permiten poner a prueba los posibles eventos demográficos.

En este caso se analizó el índice rg (Harpending *et al.* 1993; Harpending 1994). Valores bajos son esperados para una población en expansión.

Por último, se calculó la distribución de diferencias pareadas o “*mismatch distribution*”. Esta distribución refleja el número de diferencias observadas entre pares de haplotipos y, a partir de ella, se pueden estimar parámetros de expansión demográfica repentina basándose en una aproximación de cuadrados mínimos (Schneider & Excoffier 1999). Este método calcula la significancia de las diferencias observadas bajo la suposición que los datos se distribuyen según un modelo de expansión demográfica repentina. La prueba rg se basa en el mismo supuesto. La significancia estadística de este último estadístico y de la distribución de las diferencias pareadas se realizó con el programa Arlequín 3.0. Las distribuciones pareadas se graficaron mediante el programa Dnasp v.5 (Rozas *et al.* 2003).

Todos estos métodos consideran que las poblaciones son entidades dinámicas que experimentan cambios de tamaño, densidad y distribución a lo largo de su evolución. Todas ellas requieren como premisa que la selección no está actuando sobre las secuencias que deseamos analizar, esto es, que las mismas sean neutrales. Entonces, como paso previo a esos análisis, es necesario probar la neutralidad de las secuencias que se utilizarán para los mismos. Hay ciertas pruebas de neutralidad que, basándose en las características genéticas actuales, pueden inferir el pasado (ver teoría de la coalescencia). En general las pruebas D_T , D^* y F^* son más sensibles para detectar desvíos de la neutralidad y, las pruebas F_S y R_2 más sensibles para detectar eventos de expansión poblacional.

Análisis citogenético

En primer lugar se realizó un análisis preliminar utilizando muestras de sangre de tortugas en cautiverio, ubicadas en la provincia de Buenos Aires ($n=8$) y en la provincia de Mendoza ($n=8$). El análisis de estas muestras permitió ensayar las distintas condiciones de cultivo, y elegir la más adecuada; así como también se estableció la estructura del cariotipo. Luego, el mismo análisis se realizó sobre muestras de tortugas silvestres ($n=8$).

El total de muestras de sangre obtenidas resultó menor al total de tortugas halladas vivas en el campo ya que no siempre fue posible obtener extracciones satisfactorias. Una vez en laboratorio pocos cultivos de linfocitos resultaron satisfactorios en términos de no estar contaminados y, fundamentalmente contar con metafases. Por todo ello y sumado a que, aún obteniendo metafases, éstas resultaron ser de baja calidad, fue que sólo se logró concretar el análisis cromosómico de ocho del total de las tortugas muestreadas.

El tejido utilizado para obtener cromosomas a fin de realizar el análisis citogenético fue la sangre periférica. Ésta se obtuvo de la manera menos traumática y con nulo riesgo para el animal. Para ello se optó por realizar la extracción a partir de la vena coccígea. Esta vena se encuentra en la zona dorsal de la cola y, de esta manera, se evita forzar las extremidades o la cabeza para que las mantengan rectas durante la extracción (tal como ocurre con la punción en la vena femoral o el seno nuchal). El menor riesgo es a causa que no se involucran zonas vitales como sí ocurre con otros métodos descritos, como las punciones cardíaca o del seno nuchal.

Las condiciones óptimas para el cultivo de linfocitos y la obtención de metafases fueron desarrolladas tomando como punto de partida el protocolo propuesto por Ulsh *et al.* (2001) para cultivo de linfocitos de *Trachemys scripta* (Testudines: Emydidae). Se ensayaron distintos protocolos hasta determinar el más adecuado para realizar el análisis citogenético de los ejemplares de tortugas objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral. El procedimiento fue el siguiente:

1. Obtención de entre 0.5 y 1 ml de sangre total, dependiendo el tamaño del animal, mediante jeringas de 1 ml y agujas de tipo 0,5x15 25G5/8. El anticoagulante utilizado fue heparina sódica como anticoagulante.
2. Colocación de dosis de 0,3 ml de sangre en frascos de cultivo, cada uno con 2,5 ml de medio de cultivo (D-MEM o RPMI) suplementado al 30% con suero bovino fetal, a temperatura ambiente por un máximo de 3-4 días.
3. Incubación en estufa a 28 °C durante 96 horas. Para ello cada frasco fue suplementado con 50 µl de fitohemaglutinina M (agente mitogénico) al inicio del cultivo y 20 µl de colchicina (alcaloide empleado para detener las células en metafase) a concentración 10 µg/ml, a las 90 hs de cultivo.
4. Sacrificio de células a las 96 horas de cultivo mediante tratamiento hipotónico durante 1 h 15 m con 3 ml de agua destilada cada 1 ml de células y medio de cultivo.
5. Finalmente se realizaron 3 lavados con fijador Carnoy (Metanol:Ácido acético en proporción 3:1).

Una vez sacrificadas las células y obtenidas las metafases se procedió a realizar la tinción de los cromosomas y la observación de las mismas para la posterior elaboración de los cariotipos. Se emplearon tres técnicas: Tinción Homogénea, Bando G, y Técnica de FISH (de sus siglas en inglés: Fluorescent *in situ* Hybridization).

Para la primera de ellas se prepararon extendidos de la suspensión de células sobre portaobjetos de vidrio y fueron teñidos con solución de Giemsa al 5% en agua. Las metafases se observaron bajo microscopio óptico (Nikon Eclipse 50i) y las fotos digitales se obtuvieron con un aumento 1000x.

Para realizar la técnica de Bando G, los extendidos cromosómicos fueron envejecidos mediante su colocación en estufa a 65°C durante 2 horas. Luego se realizó una digestión de los mismos sumergiéndolos en solución de tripsina al 5% en solución salina de Hank a temperatura ambiente durante 1 minuto. Finalmente, los extendidos cromosómicos fueron teñidos con solución de Giemsa al 5% en agua y observados utilizando el microscopio mencionado en el párrafo anterior.

Por otra parte, sobre algunas de las muestras se aplicó la técnica de FISH. Para la misma se empleó una sonda pan telomérica (TTAGGG)_n de tipo PNA (Peptide Nucleic Acid) conjugada con Cy3 utilizando el kit "DAKO telomere FISH kit/Cy3" (DAKO Corporation - CA, USA). Las muestras procesadas con esta técnica fueron analizadas utilizando un microscopio de epifluorescencia, NIKON Eclipse 50i, equipado con un lámpara de mercurio HBO 100 y filtros para DAPI y Cy3 (Chroma Technology Corp., Rockingham, VT, EE. UU.). Las fotos digitales también fueron de un aumento 1000x.

Todas las fotos digitales se procesaron utilizando el programa Adobe Photoshop SC2, analizando un mínimo de 5 metafases por ejemplar de tortuga.

En el caso de la tinción homogénea y el bando G, a partir de los extendidos cromosómicos analizados se construyeron siguiendo a Bickham (1975), quien propuso una clasificación de los cromosomas en tres grupos: A (los cromosomas de mayor tamaño: metacéntricos y submetacéntricos), B (los cromosomas de mayor tamaño: submetacéntricos y acrocéntricos) y C (aquellos cromosomas de menor tamaño donde es difícil determinar la posición del centrómero). A partir de este ordenamiento, se realizaron las comparaciones a nivel cromosómico entre las distintas tortugas analizadas.

Morfotipos de *Chelonoidis chilensis*

En el transcurso de esta Tesis Doctoral, se mencionan tres morfotipos para *Chelonoidis chilensis*, los cuales se describen a continuación, y están basados en las descripciones de Freiberg (1973) (Fig. 1).

Morfo Donosobarrosi: Tortugas de gran tamaño, de tono general oscuro, con el centro de las placas dorsales del caparazón amplio, liso y negro. Plastrón amarillo con sus placas fuertemente grabadas por crestas paralelas a las suturas. Patas con tubérculos córneos cónicos prominentes en los miembros anteriores. Pico bicuspidado, denticulado en el borde. Color general gris pizarra dorsalmente y plastrón amarillo uniforme.

Morfotipo Chilensis: Centro de las placas dorsales amarillento, bandas negras en la unión de las placas. Placas con anillos de crecimiento marcados. Tortugas en general de tamaño intermedio a los otros dos morfotipos. Pico tricuspídeo.

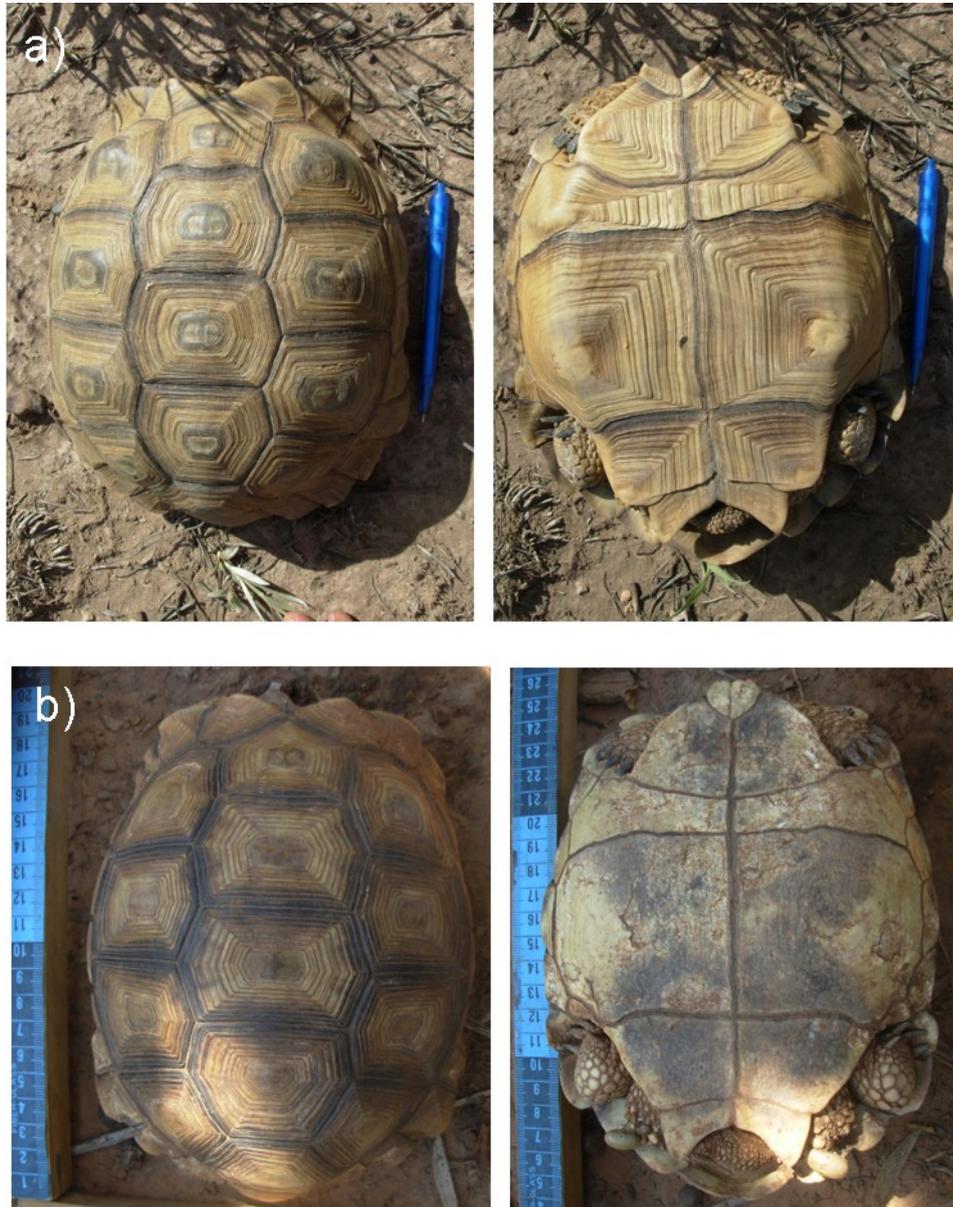
Morfo petersi: Es el morfo de menor tamaño. Las placas del plastrón son lisas y el tono general amarillento. Escamas dorsales del caparazón lisas y, especialmente las del plastrón, carecen totalmente de grabado. Pico bicuspidado, denticulado en el borde.

Morfotipos con características intermedias *donosobarrosi/chilensis* y *chilensis/petersi* se ilustran en la Figura 2.

Figura 1. Los morfotipos mencionados en esta Tesis Doctoral: A) donosobarrosi, B) chilensis y C) petersi.



Figura 2. Los morfotipos intermedios mencionados en esta Tesis Doctoral: A) donosobarrosi/chilensis y B) chilensis/petersi.



Abundancia relativa y otros datos de ecología de la especie

Se realizó una estimación de la abundancia relativa de las tortugas en su ambiente natural basada en una metodología de transectas. En este estudio se incluyeron tres provincias políticas y las dos Ecorregiones (según Burkart *et al.* 1999) donde se distribuye la especie

involucrando tanto Áreas Naturales Protegidas como no protegidas: el Parque Nacional Copo y el Paraje Tío Pozo (provincia de Santiago del Estero, Ecorregión Chaco Seco), el límite norte de la Salina Grande (provincia de Catamarca, Ecorregión Monte de Llanuras y Mesetas), Parque Nacional Lihué Calel y la localidad Laguna La Amarga (provincia de La Pampa, Ecorregión Monte de Llanuras y Mesetas). Además se realizó un análisis de presencia / ausencia (P/A) de tortugas a campo durante los seis viajes de campaña realizados a lo largo de 16 de las 18 provincias argentinas en que habita la especie. El período de estudio comprendió los meses de verano de los años 2009, 2011 y 2012.

Para obtener los datos de abundancia relativa se desarrolló e implementó una metodología estandarizada, basada en transectas de ancho (30 m) y largo (100 m) uniforme y espaciado entre ellas mínimo de 50 m. Cada transecta fue recorrida ida y vuelta por dos personas usando una soga de 100 m de largo enroscada en un carretel. La metodología de búsqueda respecto de la transecta es la siguiente: Una de las personas (P1) desenrolla la soga, siguiendo una línea lo más recta posible de acuerdo al terreno y vegetación. A la ida, P1 avanza desenrollando la soga y buscando tortugas en las inmediaciones de la misma mientras que P2 cubre los 15 m de un lado de la transecta. Una vez que se completan los 100 m, P2 regresa enrollando la soga buscando tortugas en la inmediación de la misma, mientras que P1 las busca en los 15 m del lado de la transecta que no había sido revisado P2. A lo largo del ancho total de las transectas (30 m: 15 m/lado) todos los tipos de refugios (cuevas, bajo troncos, etc.) son cuidadosamente revisados para asegurarnos que todas las tortugas fueran detectadas. Además, las tortugas que se encuentran entre transectas, también son contadas. Para evitar el re-muestreo de las tortugas, cada vez que encontramos una, la marcamos con pintura en un área pequeña del plastrón.

Por cada sitio de muestreo se realizaron 56 transectas de este tipo por un espacio de dos días por sitio abarcando casi toda la franja horaria de luz entre las 8,00 AM y las 19,00 PM. En cada sitio se registró la cobertura vegetal mediante la toma de muestras de vegetación y la temperatura fue tomada cada una hora aproximadamente con termómetro de mercurio a ras del piso a la sombra. El tiempo de recorrido de cada transecta también fue registrado con el fin de tener una idea de la variabilidad del esfuerzo entre los sitios de muestreo.

Para la obtención de datos de presencia/ausencia (P/A) de tortugas se muestrearon al azar 16 de las 18 provincias argentinas en las cuales *C. chilensis* está presente. Este análisis comprendió un total de 53 localidades (tres de ellas Parques Nacionales) y 87 horas de búsqueda al azar. Las búsquedas fueron desarrolladas por un número variable de personas, generalmente dos, aunque en algunos casos se completó un grupo de 3-4 personas. A diferencia del método de transectas, el método de P/A carece totalmente de estandarización.

El fin que se persiguió con el mismo fue corroborar, con cierta confianza, si la especie se encuentra presente en determinadas regiones de nuestro país.

Los siguientes datos fueron registrados en todas las tortugas muestreadas con ambas metodologías: sexo, peso, longitud recta del caparazón (LRC), estado sanitario (presencia de garrapatas, presencia de lesiones en el caparazón, otros signos de enfermedad, etc.) y grado de actividad de las tortugas muestreadas.

Se definieron tres grados de actividad: (1) *Activa*, cuando la tortuga se encontraba caminando; (2) *Semi-activa*, cuando la tortuga se encontraba descansando o comiendo bajo un arbusto, pero siempre con signos de actividad reciente; y (3) *Inactiva*, aquella tortuga que estaba descansando dentro o fuera del refugio y tenía la cabeza y las patas retraídas dentro del caparazón.

Los diferentes valores de abundancia de tortugas a los largo de los cinco sitios muestreados con el método de transectas fueron comparados globalmente usando la prueba estadística no paramétrica Cochran Q (Zar 2010). Una vez que se detectaron diferencias significativas en el análisis general, se compararon las localidades de a pares para poder detectar cuál de todas ellas estaba explicando la variación total. Este último procedimiento se realizó por medio de las pruebas estadísticas Test Exacto de Fisher y el test no paramétrico de McNemar (Zar 2010).

Las comparaciones de las variaciones del tamaño en los dos sexos, los valores de temperaturas (°C) y el esfuerzo medido en tiempo empleado (minutos) entre sitios de muestreo se hicieron utilizando la prueba estadística *t* de Student. Todos los análisis y gráficos se realizaron con el programa Statistica 6.0 (Statsoft Inc 2001).

Anexo Materiales y Métodos

Permisos obtenidos para realizar los muestreos:

Córdoba: Secretaría de Ambiente, Provincia de Córdoba. Nota CI N°053510.

Chaco: Permiso otorgado por Ana Susy Gutiérrez, Jefa del Departamento de Fauna y Pesca, Dirección de Fauna y Áreas Naturales Protegidas, Ministerio de Producción y Ambiente. (31/12/2011).

Guía de Tránsito N°4671.

Formosa (Reserva Natural Formosa): Administración de Parques Nacionales, Delegación NEA, Disposición N°19/10.

Jujuy: Secretaría de Gestión Ambiental, Dirección provincial de políticas ambientales y recursos naturales, San Salvador de Jujuy. Resolución N°424/2010-DPPAyRN. Renovación N°075/2011-DPPAyRN.

La Pampa: Ministerio de la Producción, Secretaría de Asuntos Agrarios, Santa Rosa. Permiso otorgado por la Lic. Marisa M. Urioste Directora de Recursos Naturales (28/10/2011). S/Nro.

Guía de Tránsito N°931.

La Pampa (Lihué Calel): Administración de Parques Nacionales. Delegación Regional Patagonia. Proyecto N°1193.

Guía de Tránsito N°006990.

La Rioja (Talampaya): Dirección de Parques Nacionales, Delegación Regional Centro, Informe N°285/10.

Neuquén: Permiso otorgado por Mario R. García, Director General de Control de los Recursos Faunísticos, Ministerio de Desarrollo Territorial, Neuquén. (07/03/2012).

Río Negro: Dirección General de Recursos Naturales, Ministerio de Producción, Río Negro. Nota N°350-DFS 11-.

Salta: Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sustentable. Provincia de Salta. Resolución N°130.

San Juan: Permiso otorgado por el Biol. Marcelo Manuel Jordán, Director de Conservación y Áreas Protegidas, Subsecretaría de Medio Ambiente. Sin número. (13/10/2010).

San Luis: Programa Biodiversidad, Recursos Naturales y Medio Ambiente, Ministerio de Medio Ambiente. Resolución N°17 PB-2012.

Santa Fe: Ministerio de Aguas, Servicios Públicos y Medio Ambiente, Secretaría de Medio Ambiente, Santa Fe. Notificación N°183/2010. - Renovación, Notificación N°275/2011.

Santiago del Estero: Dirección General de Bosques y Fauna, Santiago del Estero. Resolución N°1853.

Santiago del Estero (Copo): Disposición N° 17/11. Administración de Parques Nacionales.

Resultados

Genética Molecular de *Chelonoidis chilensis*

Área de estudio y tortugas muestreadas

El origen geográfico de cada una de las 98 muestras analizadas se detalla en la Tabla 2.

Figura 3: Localización geográfica de las muestras de *Chelonoidis chilensis* obtenidas para el desarrollo del presente Trabajo de Tesis.



Análisis general de las secuencias obtenidas

El alineamiento del total de las secuencias analizadas (n=98) permitió el reconocimiento de 37 sitios polimórficos, que correspondieron a 36 sustituciones nucleotídicas y un polimorfismo de tipo *Indel* (Inserción-delección). Las sustituciones nucleotídicas resultaron representadas por 25 transiciones y 11 transversiones. La composición de bases nitrogenadas fue la siguiente: C=31,46%; T=26,01%; A= 31,10%; G=11,44%. La Tabla 3 muestra las 21 variantes (haplotipos) que se detectaron en las secuencias analizadas. Las frecuencias absolutas y relativas de cada haplotipo se detallan en la Tabla 4.

Tabla 3: Haplotipos identificados para *C. chilensis* en base al análisis de secuencias de ADNmt (cit b). Las posiciones nucleotídicas muestran las diferencias entre los haplotipos descriptos. Los números (columnas) hacen referencia al sitio del alineamiento en nuestro conjunto de datos de 1118 pb

	49	52	62	116	193	199	247	268	322	364	376	421	439	505	583	677	685	707	749	764
C1	T	A	T	A	T	C	A	C	G	C	A	T	T	C	C	T	A	T	G	G
C2
C3
C4	A
C5	G
C6	T	G	A
C7	T	G
C8	G	C	.	.	T	A	.	T
C9	G	T	A	.	T
C10	C	G	.	C	C	.	.	.	A	.	.	.	C
C11	C	G	C	.	C	.	.	.	A	.	.	C
C12	C	G	C	C	C	.	.	.	A	.	.	C
C13	C	G	.	C	C	.	.	.	A	.	.	C
C14	C	G	.	C	C	.	.	.	A	T
C15	C	G	.	C	C	.	.	.	A	T
C16	C	G	.	C	C	.	.	.	A	C
C17	C	G	.	C	C	.	.	.	A	T
C18	C	G	.	C	C	.	.	.	A	C
C19	C	G	.	C	C	.	.	T	A
C20	C	G	.	C	C	.	.	.	A	C
C21	C	G	.	C	C	.	.	.	A

Tabla 3: Continuación.

	818	859	887	907	947	964	985	1022	1039	1042	1081	1092	1099	1102	1118
C1	G	T	G	C	T	T	C	G	C	C	C	T	A	G	T
C2	.	.	.	A
C3	T
C4
C5	A
C6
C7
C8	C	C	.	.	C
C9	C	C	.	.	C
C10	.	.	A	.	C	C	C	.	A	C
C11	.	.	A	.	C	C	.	A	.	.	.	C	.	A	C
C12	.	.	A	.	C	C	.	A	.	.	.	C	.	A	C
C13	.	.	A	.	C	C	.	A	.	.	.	C	.	A	C
C14	.	A	A	.	C	C	C	.	A	C
C15	.	.	A	.	C	C	C	.	A	C
C16	.	.	A	.	C	C	C	.	A	C
C17	.	.	A	.	C	C	C	.	A	C
C18	.	.	A	.	C	C	C	.	A	C
C19	.	.	A	.	C	C	.	.	T	.	.	C	.	A	C
C20	.	.	A	.	C	C	C	G	A	C
C21	.	.	A	.	C	C	.	.	.	G	.	C	.	A	C

Tabla 4: Frecuencias absolutas y relativas de los 21 haplotipos descritos para *C. chilensis*, ordenados de forma decreciente. En gris oscuro se indican los haplotipos más frecuentes.

	<i>Frec. Absoluta</i>	<i>Frec. Relativa</i>
C 1	27	0,2755
C 13	19	0,1938
C 16	9	0,0918
C 5	7	0,0714
C 7	6	0,0612
C 12	6	0,0612
C 6	3	0,0306
C 19	3	0,0306
C 20	3	0,0306
C 4	2	0,0204
C 9	2	0,0204
C 15	2	0,0204
C 2	1	0,0102
C 3	1	0,0102
C 8	1	0,0102
C 10	1	0,0102
C 11	1	0,0102
C 14	1	0,0102
C 17	1	0,0102
C 18	1	0,0102
C 21	1	0,0102
Total	98	1,000

Análisis filogenético

El análisis de las relaciones filogenéticas demuestra la existencia de dos grupos en general bien sustentado por los tres métodos utilizados: Máxima Parsimonia (Fig. 4), Máxima Verosimilitud (Fig. 5) e Inferencia Bayesiana (Fig. 6). Uno de estos grupos, y el mejor sustentado, (con valores entre el 83 y 99 %) corresponde a las tortugas que se distribuyen en la Ecorregión Chaco Seco. El otro grupo contiene a las tortugas que se encuentran en la Ecorregión del Monte, y presenta valores de soporte más bajos: 65-82 %.

La divergencia genética entre estos dos grupos fue del 1,3%, y las divergencia entre *C. chilensis* (considerando en conjunto los dos haplogrupos) y las demás especies de Testudinidae sudamericanos variaron entre 9% y 13,4% (Tabla 5).

Tabla 5: Divergencia genética entre las especies sudamericanas de la familia Testudinidae expresadas en porcentaje, entre paréntesis se muestran los desvíos estándares (bootstrap=500). Aquí se realizan las comparaciones de *C. chilensis* como especie y también considerando dos grupos dentro de ella: el de las tortugas del Monte y de las tortugas del Chaco Seco.

	<i>C. chilensis</i> Pob. Total	<i>C. denticulata</i>	<i>C. carbonaria</i>	<i>C. chilensis</i> Monte
<i>C. denticulata</i>	13,1 (1,2)			
<i>C. carbonaria</i>	13,4 (1,5)	11,7 (1,2)		
<i>C. nigra</i>	9,1 (1,1)	11,8 (1,2)	12,8 (1,4)	
<i>C. chilensis</i> Chaco Seco				1,3 (0,3)

Figura 4: Relaciones filogenéticas entre las secuencias de ADNmt (cit b) de *C. chilensis* identificadas en este estudio, basadas en 1118pb. Aquí se muestra el Árbol de Consenso Estricto, obtenido aplicando el método de Máxima Parsimonia, a partir de cinco árboles obtenidos utilizando el programa PAUP 4.0 mediante una búsqueda heurística con 1000 réplicas de adición al azar de los taxones. Se indican los valores de soporte de *bootstrap* con 1000 réplicas para ambos grupos.

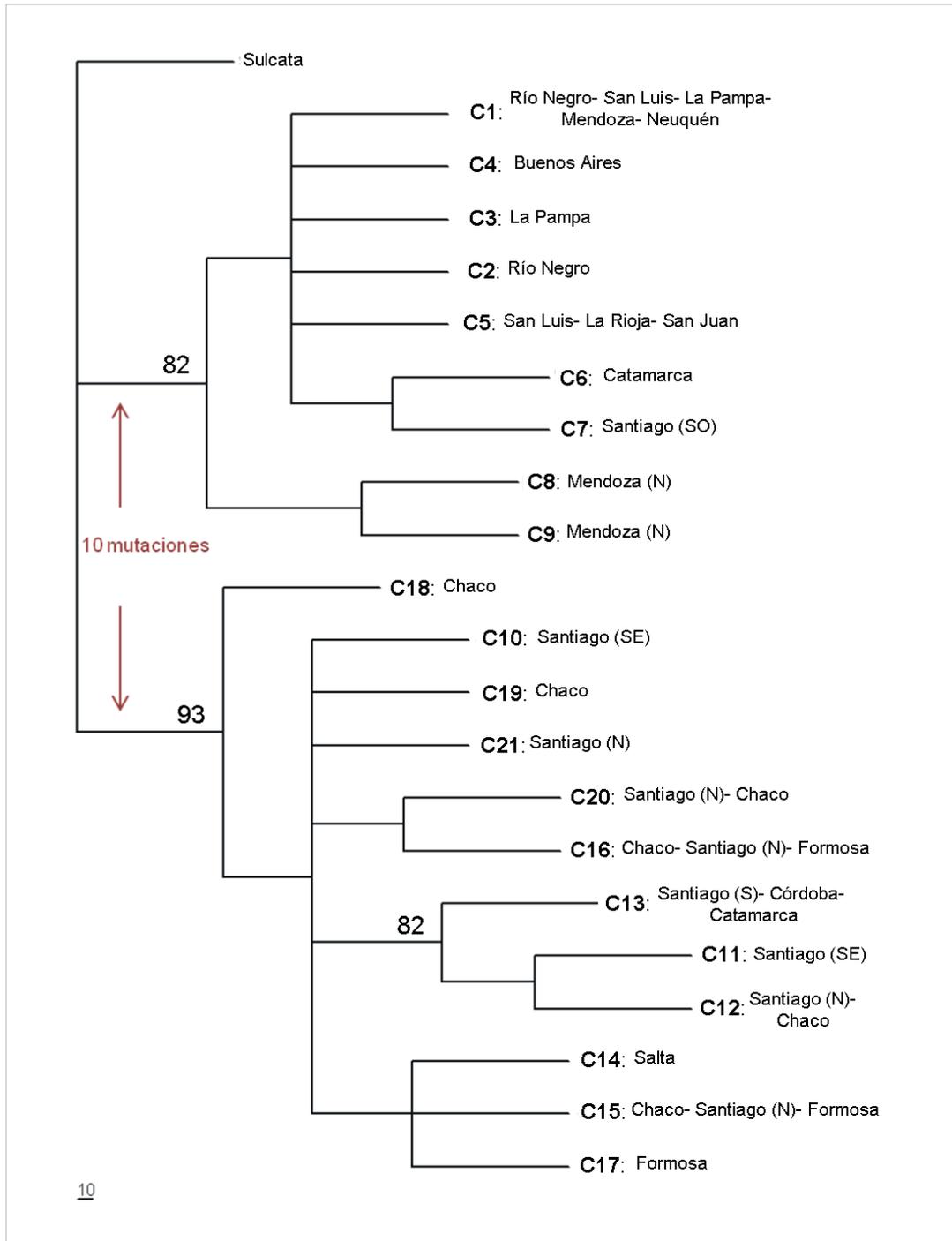


Figura 5: En la figura se observa el único Árbol de Máxima Verosimilitud (*Maximum Likelihood*) obtenidos con el programa PAUP 4.0 mediante una búsqueda heurística empleando los caracteres de secuencias de ADNmt (cit b) de *C. chilensis* identificadas en este estudio, basadas en 1118pb. Se indican los valores de soporte de *bootstrap* con 1000 réplicas para ambos grupos.

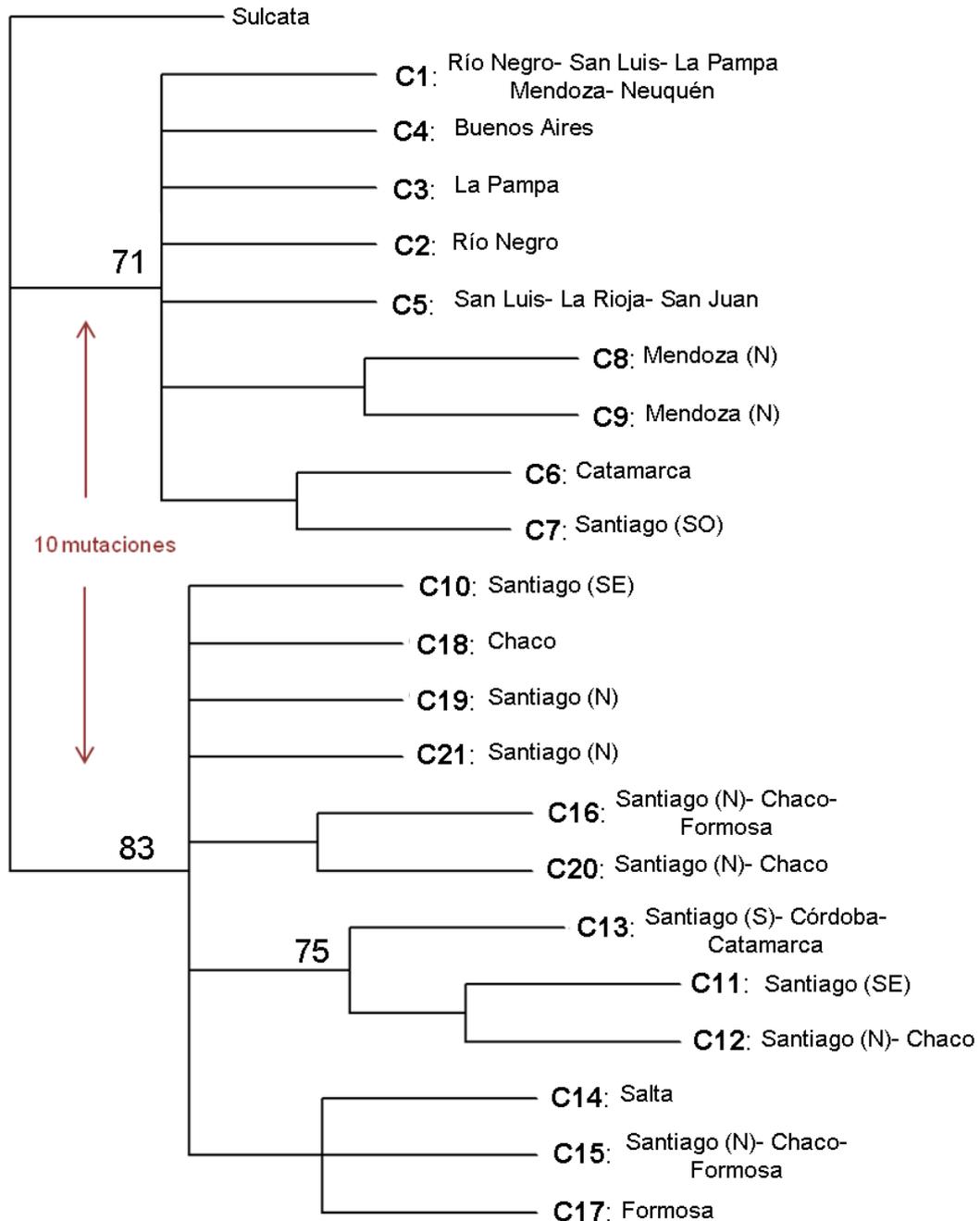
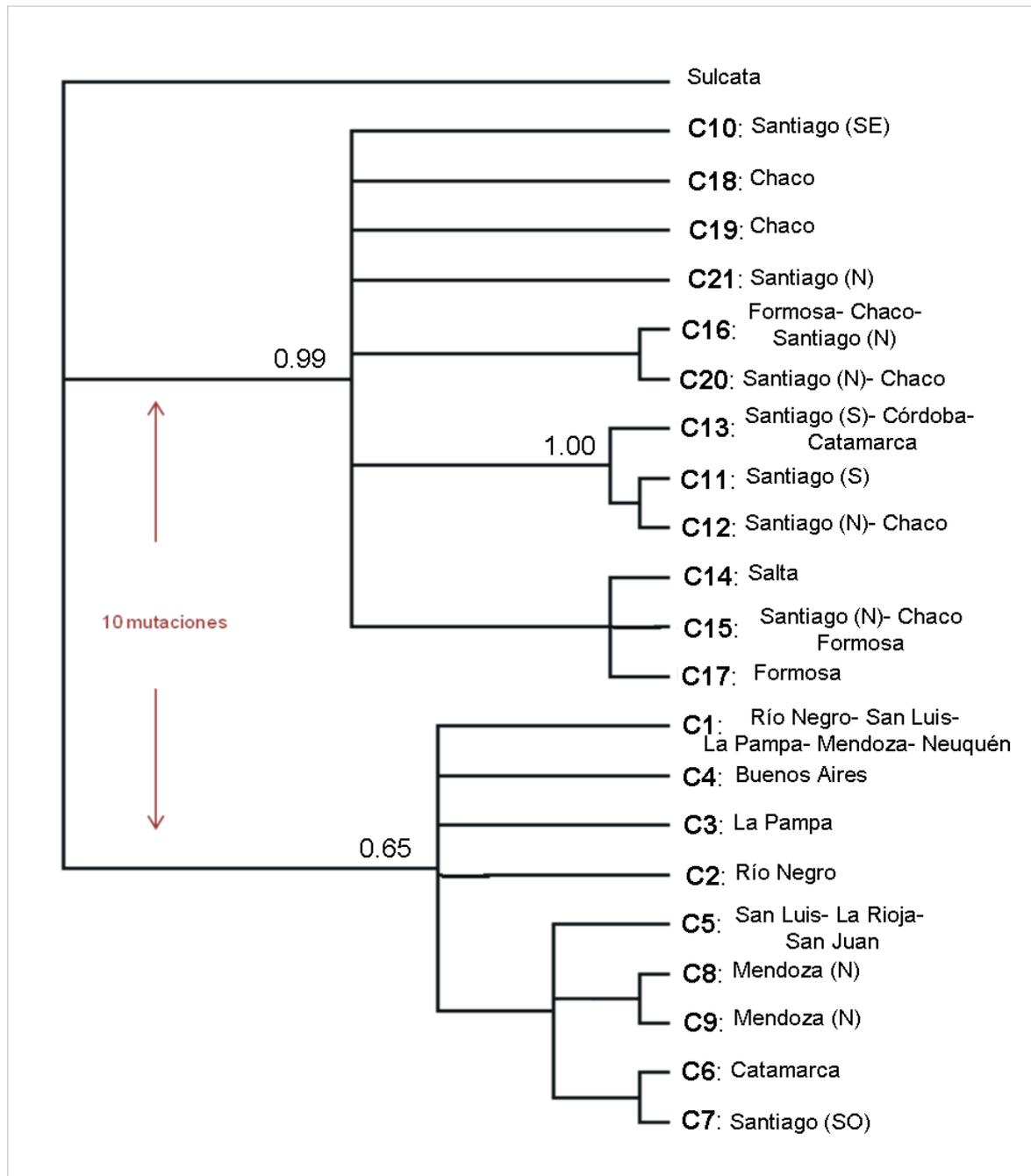


Figura 6: Árbol de Consenso de Mayoría obtenido a partir de los dos árboles que produjo el programa Mr. Bayes 3.1 aplicando inferencia bayesiana a los caracteres de secuencias de ADNmt (cit b) de *C. chilensis* identificadas en este estudio, basado en 1118pb. Se indican los valores de soporte de *bootstrap* con 1000 réplicas para ambos grupos.



Análisis filogeográfico

La red de haplotipos obtenida por medio de parsimonia estadística (Fig. 7) mostró diez pasos mutacionales de separación entre los dos haplogrupos: Haplogrupo Chaco Seco (HCS) y Haplogrupo del Monte (HM). En este contexto se observaron tres haplotipos hipotéticos. El HCS es más diverso ya que presenta 12 haplotipos en 48 muestras en contraposición a los nueve haplotipos en 50 muestras del HM.

En el HM el haplotipo C1 resultó ser el más frecuente y más ampliamente distribuido. Éste se encuentra presente en las provincias de Río Negro, Mendoza (norte y sur), La Pampa, San Luis y Neuquén, registrándose en 14 de las 40 localidades muestreadas (Tabla 6). Dentro de este haplogrupo C8 y C9 conforman un subgrupo que se separa por 5 pasos mutacionales del resto de los haplotipos del HM, y correspondió a 3 tortugas de las estudiadas por Fritz *et al.* (2012) procedentes de la localidad de Alucuyüm, al norte de Mendoza. Los haplotipos C5, C6 y C7 se distribuyen hacia el norte de la región del Monte, desde San Luis y hasta el sur de Santiago del Estero y Catamarca, pero siempre dentro de la Ecorregión del Monte o en lenguas de esta que penetran en el Chaco Seco mediante la Salina Grande y la Salina de Ambargasta. Los haplotipos C2, C3 y C4 se encuentran en el norte de Río Negro, sur de La Pampa y sur de Buenos Aires, respectivamente.

El haplogrupo HCS presentó una estructura distinta del HM dado que no evidenció un haplotipo más frecuente en el centro de la red. En este haplogrupo, C13 fue el haplotipo más frecuente y más ampliamente distribuido, presentándose en 10 de las 40 localidades muestreadas. La mayor diversidad haplotípica se concentró en Chaco, Formosa, norte de Santiago del Estero y este de Salta (Fig. 8). Este haplogrupo se distribuye en la Ecorregión Chaco Seco (Tabla 6).

Figura 7: Red donde se muestran las relaciones filogenéticas a nivel poblacional. En esta red se representan los haplotipos y sus frecuencias (dadas por el tamaño de cada figura). Sobre las líneas que los unen se muestran los pasos mutacionales entre ellos.

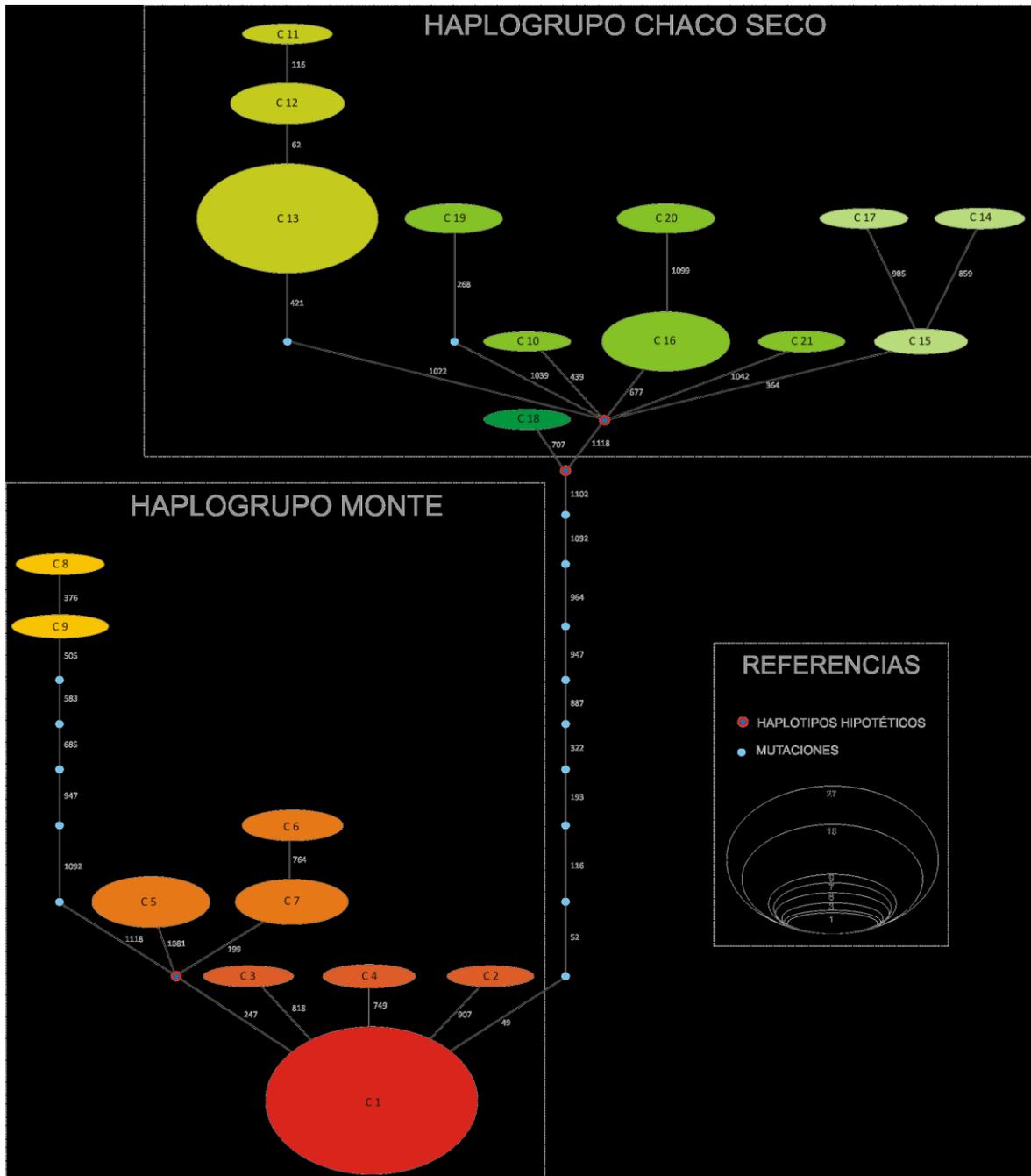


Figura 8: Distribución geográfica de los 21 haplotipos descritos para *Chelonoidis chilensis*. Los números hacen referencia al número del haplotipo. El área circular blanca encierra la región donde coexisten haplotipos de los dos haplogrupos (6 y 7 pertenecen al Haplogrupo Monte y 13 al Haplogrupo Chaco Seco). Los distintos tonos verde y rojo corresponden a los mismos haplotipos representados en la Fig 7.

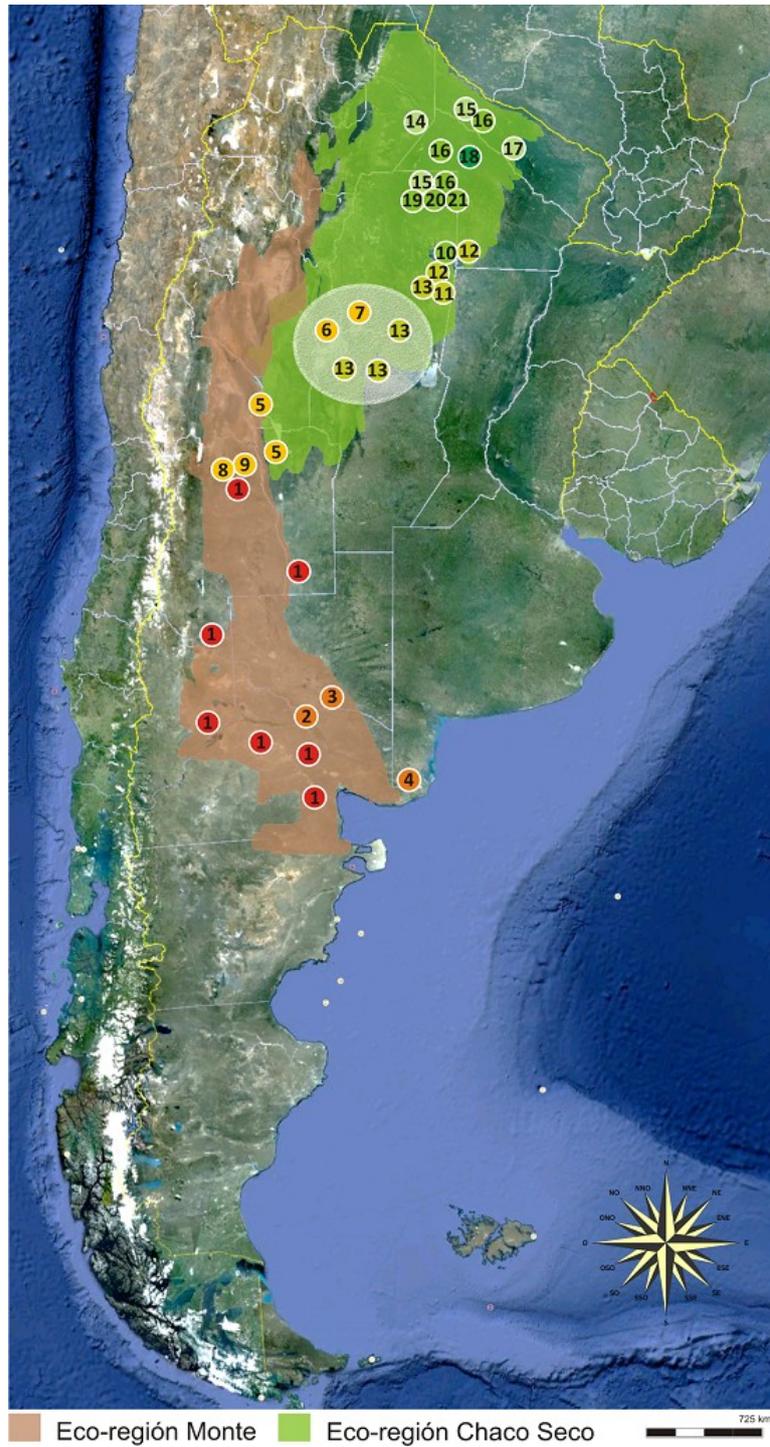


Tabla 6: Localidades muestreadas y haplotipos registrados para *C. chilensis* presentes en cada una.

<i>Provincia</i>	<i>Localidad</i>	<i>N</i>	<i>Haplotipo (N° de individuos)</i>
Formosa	Ibarreta	1	C16
	Res. Nat. Formosa	2	C15 y C17
	Comandante Fontana	1	C15
Salta	La Estrella	1	C14
Chaco	Santa Sylvina	1	C12
	Fuerte Esperanza	5	C16(3), C18 y C20
Santiago del Estero	Loreto	2	C7 y C13
	Guasayán	2	C13(2)
	Tapso	1	C13
	Va. Ojo de Agua	3	C13(3)
	Kishka	1	C13
	Acc. PN Copo	6	C15, C19(2), C20 y C21
	PN Copo	6	C16(4) y C20
	Quimil Paso	13	C7, C10, C11, C12(5) y C13(5)
	Choya	2	C13(2)
	Brea Pozo	1	C13
	Pozo Hondo	2	C13(2)
-	2	C13(2)	
Córdoba	La Para	1	C13
Catamarca	San Martín	1	C13
	Salina Grande	4	C6(3) y C13
La Rioja	PN Talampaya	3	C5(3)
San Juan	Baldecitos	1	C5
	Valle Fértil	1	C5
Mendoza	Alucuyüm	4	C1, C8 y C9(2)
	Jacuel Casa de Piedra	7	C1(7)
Neuquén	Rincón de los Sauces	1	C1
	Octavio Picos	5	C1(5)
Río Negro	Pailemán	1	C1
	Sierra Grande	1	C1
	El Cuy	1	C1
	Isla Choele Choel	2	C1(2)
	Valcheta	1	C1

	San Antonio Oeste	1	C1
	Chelforó	1	C2
	Catriel	1	C1
	Gral. Roca	1	C1
	Salinas de Trapalcó	1	C1
San Luis	PN Sierra de las Quijadas	2	C5(2)
	-	1	C1
La Pampa	Cnia. 25 de Mayo	2	C1 y C3
Buenos Aires	Carmen de Patagones	2	C4(2)

Para cada uno de los haplogrupos y para la población total se calcularon los índices de diversidad genética. Los valores de diversidad nucleotídica variaron entre 0,002, para el Haplogrupo del Monte y para el Haplogrupo Chaco Seco, a 0,007 en la Población Total. El valor de la diversidad haplotípica fue levemente superior en el Haplogrupo Chaco Seco respecto del Haplogrupo del Monte (Tabla 7).

Tabla 7. Valores de diversidad genética de *C. chilensis*. Se consideró la población total y cada haplogrupo por separado (Monte y Chaco Seco).

Grupo	<i>n</i>	<i>S</i>	π	$\pi (DE)$	<i>H</i>	<i>h</i>	<i>h (DE)</i>
Población total	98	36	0,00719	0,0001	21	0,868	0,021
Haplogrupo Monte	51	23	0,0022	0,0005	10	0,693	0,063
Haplogrupo Chaco Seco	47	21	0,0021	0,0002	11	0,778	0,0022

n= tamaño de la muestra; *S*= número de sitios polimórficos; π = diversidad nucleotídica; $\pi (DE)$ = Desviación estándar de la diversidad nucleotídica; *H*= número de haplotipos; *h*= diversidad haplotípica; *h (DE)*= desviación estándar de la diversidad haplotípica.

En la Tabla 8 se muestran los valores obtenidos en las pruebas de expansión poblacional y neutralidad. Los valores de D_T , F^* , D^* y F_S fueron no significativos en todos los grupos, demostrando que la selección natural no está actuando sobre las secuencias analizadas. Valores significativos se observan en la prueba R_2 , donde esta desviación de la neutralidad podría estar explicada por un proceso de expansión poblacional.

Tabla 8. Índices de neutralidad (D_T , F^* y D^*) y expansión poblacional (F_S y R_2) de *C. chilensis*. Se consideró la población total y cada haplogrupo por separado (Monte y Chaco Seco).

<i>Población</i>	D_T	F^*	D^*	F_S	R_2
Población total	-0.066	-0.120	-0.10263	0.30901	0.0924*
Haplogrupo Monte	-0.06201	-0.103	-0.0503	-0.063	0.1041*
Haplogrupo Chaco Seco	-0.068	-0.058	-0.049	-0.0728	0.108*

*Valores significativos ($p < 0.05$)

La distribución de las diferencias pareadas (*mismatch distribution*) también se obtuvo para los tres grupos. En esas distribuciones se observa que el haplogrupo de la Ecorregión del Monte (Fig. 9) es el único que muestra una distribución de las diferencias pareadas observadas que más se ajusta a la distribución esperada de estas diferencias (modelo de expansión demográfica), y por lo tanto es el que exhibe mayor tendencia a ser unimodal. En la Tabla 9 se muestran los valores obtenidos para las pruebas estadísticas basadas en la distribución de las diferencias pareadas (Suma de las Desviaciones Estándar –SDE- e índice *rg*). Bajo las dos pruebas, el Haplogrupo Chaco Seco presentó valores significativos, los cuales demuestran que el grupo se encuentra en equilibrio, en cambio los valores de las probabilidades para el Haplogrupo Monte fueron muy superiores a 0,05 aceptando la hipótesis de expansión poblacional. Los valores de la población total, aunque no significativos fueron muy marginales.

Figura 9: Representación gráfica de la distribución de las diferencias pareadas (*Mismatch Distribution*). a) Población total; b) Haplogrupo Chaco Seco y c) Haplogrupo Monte.

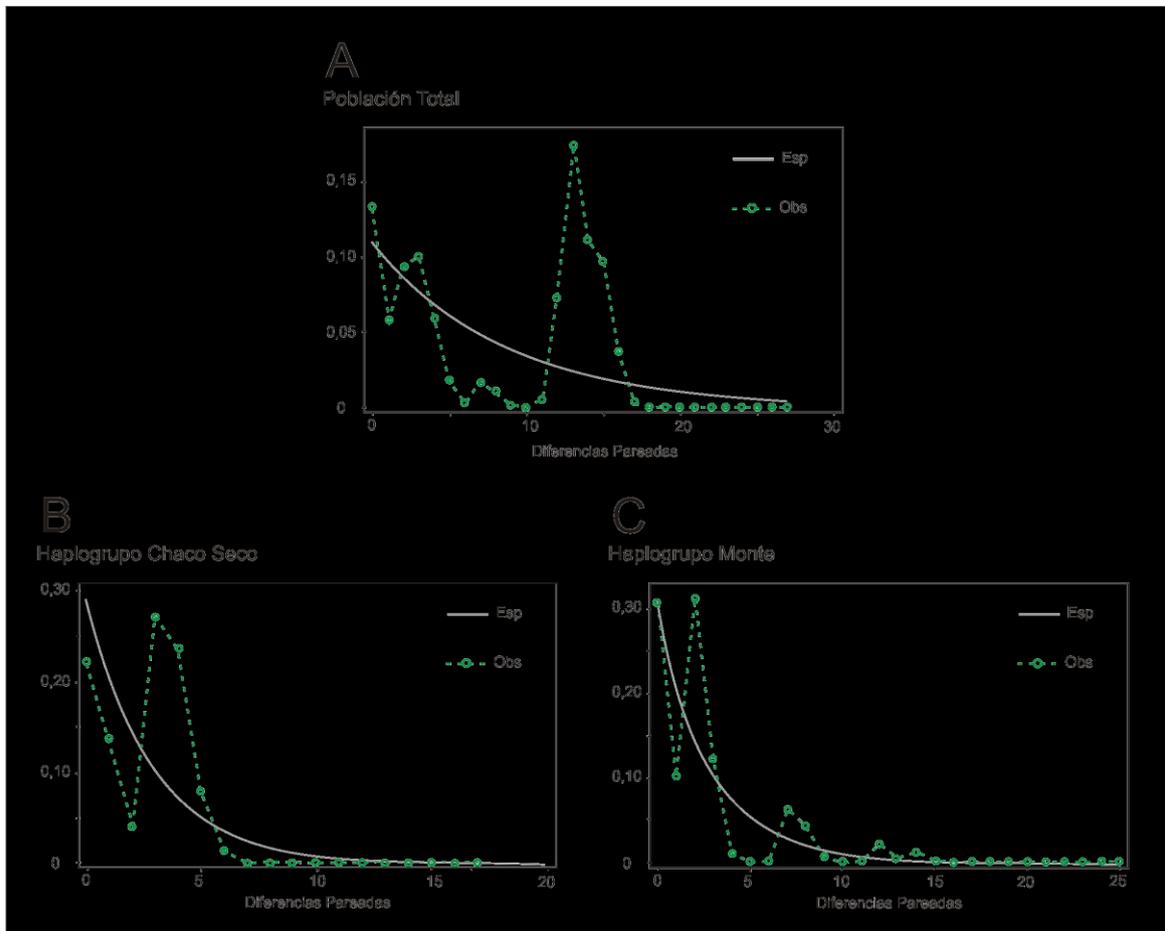


Tabla 9. Validación estadística de la distribución de diferencias pareadas (*mismatch distribution*) de cada uno de los haplogrupos considerados en este trabajo de Tesis y de la población total, en base a un modelo de expansión poblacional. En la tabla se muestra la Suma de las Desviaciones Estándar (*SDE*) y su probabilidad asociada (p (*SDE*)), el valor del índice *rg* y su probabilidad asociada (p (*rg*)).

<i>Población</i>	<i>SDE</i>	p (<i>SDE</i>)	<i>rg</i>	p (<i>rg</i>)
Población total	0,0469	0,0632	0,0632	0,0500
Monte	0,0429	0,3200	0,1212	0,3000
Chaco	0,0678	0,0100*	0,0773	0,0200*

*Valor significativo ($p < 0.05$)

Por lo tanto, en base al análisis de las relaciones filogenéticas por medio de los tres métodos (MP, ML e IB) se observan dos grupos que corresponden a tortugas que se distribuyen en general, por un lado en la Ecorregión del Monte y por el otro en la Ecorregión Chaco Seco (Fig 4-6). Estos dos grupos coexisten en el sur de Santiago del Estero y Catamarca, tal como lo evidencia la distribución de los haplotipos sobre la geografía (Fig 8). El análisis de las pruebas de expansión poblacional demuestra que el Haplogrupo Monte se encuentra en expansión demográfica.

En cuanto a los morfotipos registrados, se observó que la forma *chilensis* predomina en el Chaco Seco y la forma *donosobarrosi* en el Monte. Además, morfotipos con características intermedias se observaron en uno y otro grupo (Figs. 10-13). El morfo *petersi* como tal se registró sólo en las tortugas de la Reserva Natural Formosa. (Fig. 15 al final del capítulo “Análisis Citogenético de *Chelonoidis chilensis*”).

Figura 10. Variantes morfológicas detectadas en tortugas de la Ecorregión Chaco Seco.



Figura 11. Variantes morfológicas detectadas en tortugas de la Ecorregión Chaco Seco.



H
A
P
L
O
G
R
U
P
O

C
H
A
C
O

S
E
C
O

Sección: Resultados

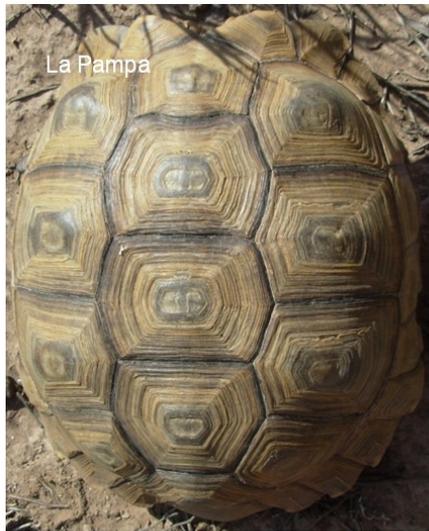
Figura 12. Variantes morfológicas detectadas en tortugas de la Ecorregión Monte.



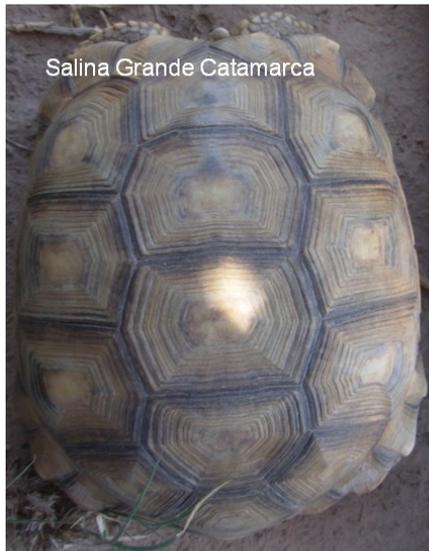
H
A
P
L
O
G
R
U
P
O

M
O
N
T
E

Figura 13. Variantes morfológicas detectadas en tortugas de la Ecorregión Monte.



La Pampa



Salina Grande Catamarca



La Rioja



H
A
P
L
O
G
R
U
P
O

M
O
N
T
E

Análisis citogenético de *Chelonoidis chilensis*

A partir del análisis citogenético realizado sobre extendidos cromosómicos teñidos con Giemsa, se obtuvieron los cariotipos correspondientes, observándose la existencia de dos variantes, las cuales denominaremos Cariomorfo A y Cariomorfo B (Fig. 14). El complemento cromosómico diploide de todas las muestras analizadas fue $2n = 52$ y todos presentaron un total de 78 brazos cromosómicos. La fórmula cariotípica de cada uno de los cariomorfo fue: 7:5:14 y 6:5:15, respectivamente.

Los pares de cromosomas homólogos fueron identificados mediante la técnica de Bando G. De este modo también se pudo corroborar la existencia de los dos cariomorfos (Fig. 15).

Con la técnica de Hibridación *in situ* Fluorescente (“FISH” de sus siglas en inglés) se demostró la presencia de cuatro señales teloméricas (dos en cada extremo) en todos los cromosomas del cariotipo de las tortugas analizadas, no registrándose señales teloméricas intersticiales (Fig. 16). Estos datos demuestran que ninguno de los cromosomas de *C. chilensis* son es telocéntrico. No se observaron diferencias en cuanto a la distribución de las secuencias teloméricas entre ambos cariomorfos.

El Cariomorfo A, fue el único que apareció en las tortugas de cautiverio muestreadas en zoológicos y domicilios particulares de la Provincia de Buenos Aires, todas ellas con el característico morfotipo *chilensis* (Fig. 1B). Por otro lado, las tortugas procedentes del zoológico de Mendoza presentaron ambos cariomorfos en proporciones iguales (ver Tabla 10). Respecto del fenotipo de las tortugas del zoológico de Mendoza, la mayoría de estas presentaron el morfotipo *donosobarrosi* (Fig. 1A) mientras que otras poseían características intermedias *chilensis/donosobarrosi*.

Las tortugas silvestres para las cuales se pudieron obtener cariotipos presentaron: (1) Cariomorfo B - morfotipo *chilensis* (Ecorregión Monte, Parque Nacional Talampaya, La Rioja); (2) Cariomorfo A - morfotipo *petersi* (Ecorregión Chaco Seco, Reserva Natural Formosa y Comandante Fontana, Formosa) (3) cariomorfo B - morfotipo *donosobarrosi* (Ecorregión Monte, Choele Choel, Río Negro); (4) Cariomorfo A - morfotipo *chilensis* (Ecorregión Chaco Seco, Telaritos; Catamarca) (5) Cariomorfo B - morfotipo *donosobarrosi* (Ecorregión Monte, Salina Grande, Catamarca); y, (6) Cariomorfo A - morfotipo *donosobarrosi* (Ecorregión Monte, Salina Grande, Catamarca); (Tabla 10 y Figs. 17, 18 y 19).

Figura 14: Cariotipos teñidos homogéneamente con solución de Giemsa y organizados según los criterios propuestos por Bickham (1975).



Figura 15: Cariotipos de los dos cariomorfos preparados con la técnica de Bandas G a fin de determinar la homología de los cromosomas. No se muestra el total de microcromosomas en cariomorfo B dado que la calidad de los mismos no fue buena.

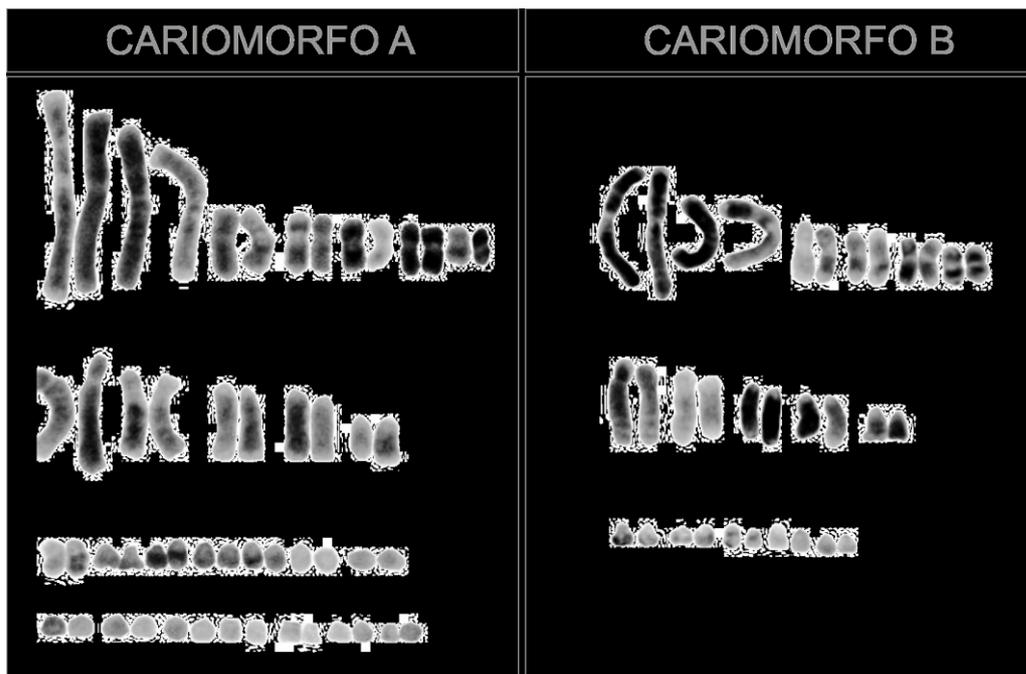
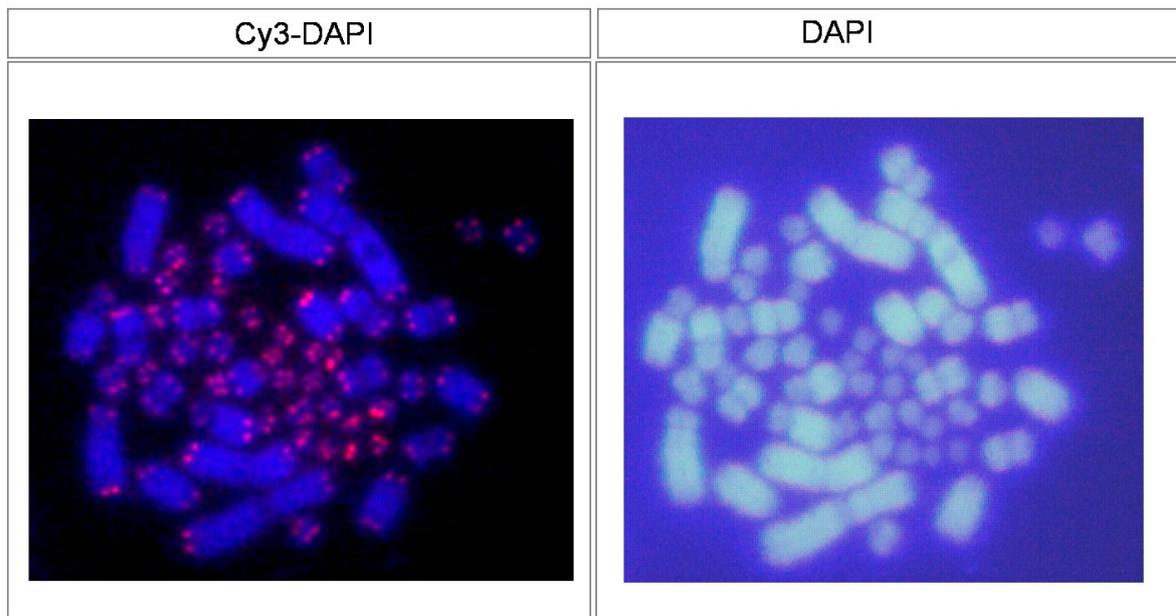


Figura 16: Resultado de la aplicación de la técnica de FISH con sonda pantelomérica sobre un extendido cromosómico de la tortuga *c. chilensis*. Se muestra una metafase con la presencia de señales teloméricas (en rojo) ubicadas en los extremos de todos los cromosomas, incluyendo los microcromosomas. La coloración azul, DAPI, tiñe la cromatina en general y permite realizar el contraste (Cy3-DAPI). La figura de al lado (DAPI) evidencia sólo la tinción con DAPI donde se observan más claramente las regiones centroméricas.



El mismo análisis citogenético fue realizado en las tortugas que se encontraban en cautiverio, de las cuales no se conoce su localidad de origen.

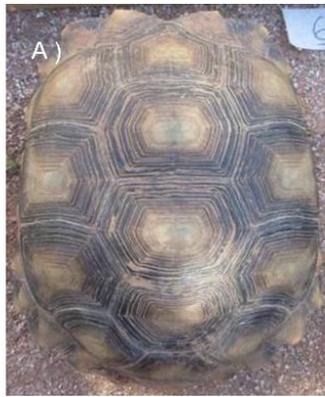
Las frecuencias observadas de los dos cariomorfos, tanto en tortugas silvestres como de cautiverio, se detallan en la Tabla 10.

Tabla 10. Frecuencia de los cariomorfos A y B en tortugas de cautiverio y silvestres.

		<i>Cariomorfo A</i>	<i>Cariomorfo B</i>
Cautiverio	Buenos Aires	8	0
	Zoo de Mendoza	4	4
Silvestres	Formosa	2	0
	La Rioja	0	2
	Río Negro	0	1
	Catamarca	2	1
Total		16	8

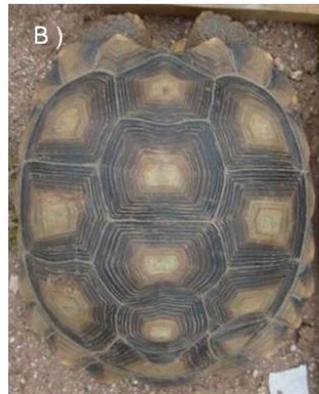
El cariomorfo B se encuentra en La Rioja, Río Negro y Catamarca; y el cariomorfo A en Formosa y Catamarca. Esto evidencia, aunque el número de muestras sea bajo, una posible correlación entre el cariomorfo B y la Ecorregión del Monte, y el cariomorfo A y la Ecorregión Chaco Seco. Patrón ya observado en el análisis del gen del citocromo b. Al igual que en este caso, el sur de Catamarca es una zona en la cual se encuentran las dos formas. En la Figura 19 se resumen los resultados obtenidos a partir del análisis molecular, el análisis citogenético, la distribución geográfica y los morfotipos registrados en las tortugas muestreadas.

Figura 17. Tortugas a partir de las cuales se pudieron obtener los cariotipos. Al lado de cada foto se indica las características genéticas (cariomorfo y haplogrupo) y la provincia donde fue encontrada cada tortuga.



Cariomorfo B
Haplogrupo Monte
La Rioja (1)

Cariomorfo B
Haplogrupo Monte
La Rioja (2)



Cariomorfo A
Haplogrupo Chaco Seco
Formosa (1)

Cariomorfo A
Haplogrupo Chaco Seco
Formosa (2)

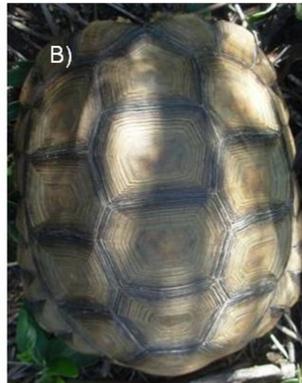


Figura 18. Tortugas a partir de las cuales se pudieron obtener los cariotipos. Al lado de cada foto se indica las características genéticas (cariomorfo y haplogrupo) y la provincia donde fue encontrada cada tortuga.



Cariomorfo B
Haplogrupo Monte
Río Negro

Cariomorfo A
Haplogrupo Chaco Seco
Catamarca (1)



Cariomorfo B
Haplogrupo Monte
Catamarca (2)

Cariomorfo A
Haplogrupo Monte
Catamarca (3)

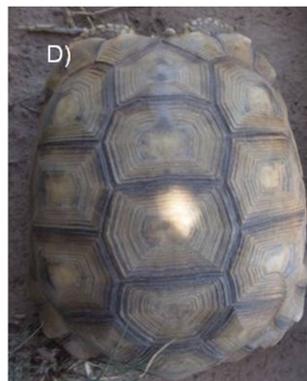
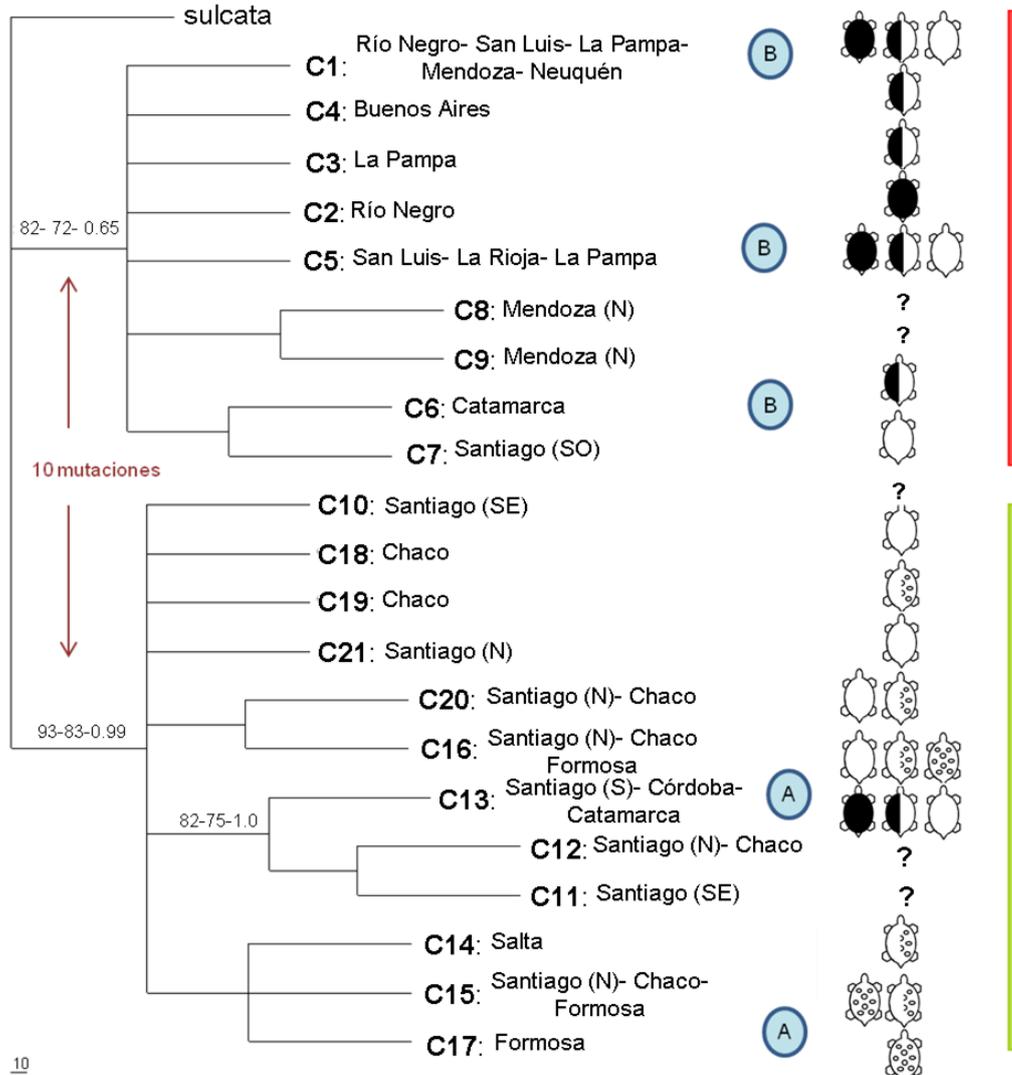
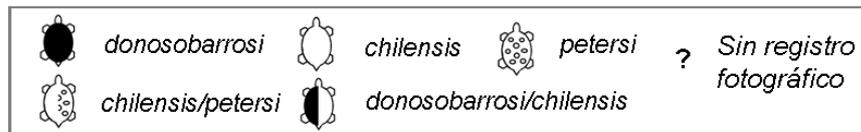


Figura 19. En la siguiente imagen se resumen los datos obtenidos por medio del análisis molecular (los valores en la base de los clados indican los resultados obtenidos en el análisis de las relaciones filogenéticas: MP-ML-IB) y citogenético (A y B, corresponden a cariomorfo A y cariomorfo B, respectivamente). Además se muestran datos de distribución de las muestras, Ecorregión Monte (rojo) y Ecorregión Chaco Seco (verde), y de los morfotipos y morfotipos intermedios encontrados, graficados de la siguiente manera:



10

Ecología de *Chelonoidis chilensis*

Abundancia relativa de tortugas en las localidades estudiadas por el método de transectas.

De todas las localidades estudiadas, hubo tres en las cuales no se encontraron tortugas en las transectas (PN Lihué Calel, Laguna La Amarga y Tío Pozo). Dos tortugas fueron encontradas en las transectas de la Salina Grande y cinco en las del PN Copo, respectivamente. Asimismo, se encontraron tres tortugas entre transectas, una en la laguna La Amarga y dos en el PN Copo. De este modo, los valores globales de abundancia de tortugas encontradas dentro y entre transectas difirieron significativamente entre localidades ($X^2_{\infty 0.05; v4} = 9.48 < Q = 20.36$). Este mismo análisis se realizó excluyendo a las localidades de Tío Pozo y PN Lihué Calel, para evitar el efecto de los grupos que contienen valores cero. El análisis que excluye estas localidades también resultó significativo entre los dos sitios ($X^2_{\infty 0.05; v2} = 5.991 < Q = 7.81$). Las comparaciones pareadas realizadas entre la laguna La Amarga, la Salina Grande y el PN Copo, a través de La Prueba Exacta de Fisher y la Prueba de McNemar, demostraron que la abundancia de tortugas no varió entre las dos últimas localidades (Prueba Exacta de Fischer = $p0.08 > p0.05$ – Prueba de McNemar $_{\infty 0.05; v2} = 1.78 < 1.9$) y entre la laguna La Amarga y la Salina Grande (Prueba Exacta de Fischer $t = p0.5 > p0.05$ – Prueba de McNemar $_{\infty 0.05; v2} = 0.00 < 1.9$). Contrariamente, el PN Copo y la laguna La Amarga difirieron significativamente en sus valores de abundancia (Prueba Exacta de Fisher = $p0.03 < p0.05$ – Prueba de McNemar $_{\infty 0.05; v2} = 3.13 > 1.9$).

El esfuerzo-tiempo invertido por transectas en cada localidad no varió entre el PN Copo y Tío Pozo pero sí lo hizo cuando se compararon todas las localidades (Fig. 20A; Tabla 11). Los valores de temperatura en general fueron constantes a lo largo de los sitios estudiados, mostrando diferencias significativas. Mostraron diferencias significativas cuando la laguna La Amarga fue comparada con la Salina Grande y con el PN Copo (Fig. 20B; Tabla 11).

Todas las tortugas halladas en la Laguna La Amarga, la Salina Grande y el PN Copo, tanto dentro como entre transectas, fueron ejemplares adultos. La mayoría de ellas fueron machos (Fig. 21A) y, en general, se encontraban activas o semi-activas (Fig. 21 B).

Presencia / Ausencia de tortugas *Chelonoidis chilensis* en diferentes localidades de su distribución en la Argentina

El esfuerzo en tiempo (horas) y personas por localidad se presenta en la Tabla 12. Habiéndose relevado 26 localidades en el Chaco Seco (38,5 horas; 1-4 personas, generalmente 2) y 27 localidades en el Monte de Llanuras y Mesetas (50 horas; 1-3 generalmente 1-2). La presencia de más tortugas registradas en el monte (12) que en el Chaco Seco (3) parece estar relacionada con el diferente esfuerzo-tiempo empleado entre las dos ecorregiones. Es decir, aunque el esfuerzo-tiempo invertido en el Monte fue el doble que el empleado en el Chaco, los resultados son diferentes de lo esperado puesto que encontramos cuatro tortugas más realizando el mismo número de transectas en el Monte que en el Chaco. El hecho de que invertimos 4 horas (Monte) ó 13 (Chaco Seco) para encontrar una tortuga podría estar evidenciando algo importante (ver Discusión).

Las tortugas no se registraron en algunas de las provincias relevadas y en algunos de los sitios estudiados sólo encontramos restos de tortugas (Tabla 12). La ausencia de tortugas vivas y una alta proporción de restos de tortugas en relación a otras provincias es particularmente marcada en el norte de Córdoba (ver Discusión)

Observaciones generales

Del total de tortugas encontradas vivas con las dos metodologías (N=29), 14 fueron hembras y 15 fueron machos. La Prueba *t* de Student sobre el análisis de la variación del tamaño entre los sexos (peso/longitud: P/L) indicó que las hembras son más grandes que los machos ($p < 0.05$; Fig. 22B). Asimismo, las hembras de las poblaciones del sur y del oeste son más grandes que las de las poblaciones del norte (Fig. 22A).

La mayoría de las tortugas de las localidades del oeste presentaron el típico morfo *chilensis* (n=3, PN Talampaya, provincia de La Rioja) pero un espécimen de Baldecitos (provincia de San Juan) presentó características intermedias entre los morfos *chilensis* y *donosobarrosi*. Las tortugas de las poblaciones del sur (n=7; provincias de La Pampa, Río Negro y Neuquén) presentaron el morfo *donosobarrosi* a excepción de una tortuga encontrada cerca de La Reforma (provincia de La Pampa) que mostraba características

del morfo *chilensis*. El morfo típico *petersi* fue encontrado sólo en un macho adulto en la Reserva Natural Formosa (provincia de Formosa). El resto de las tortugas del norte correspondieron mayoritariamente al morfo *chilensis* (n=9, provincias de Salta, Catamarca y Santiago del Estero), algunas de ellas presentaron características mezcladas entre los morfos *chilensis-petersi* (n=4; Salina Grande y PN Copo) y *chilensis-donosobarrosi* (n=3; Salina Grande, Catamarca).

Veinte tortugas fueron capturadas durante la mañana (10.00-13.00 hs.), nueve durante las primeras horas de la tarde (15.00-18.00 hs) y las restantes ocho se encontraron en los siguientes horarios: 8.00-10.00 hs. (n=3); 13.00-15.00 hs. (n=3) y 18.00-19.00 hs. (n=2).

Ninguna de las 29 tortugas encontradas vivas estudiadas bajo ambas metodologías mostró daños en el caparazón y, excepto por una hembra de La Pampa, ninguna presentó signos de enfermedades respiratorias. La hembra mencionada (L=244 mm; P=2308 g) fue encontrada inactiva bajo un arbusto al mediodía (12.00 hs-35°C) y presentó abundante secreción mucosa en orificios nasales y ojos.

Sólo las poblaciones del norte presentaron garrapatas (provincias de Salta, Formosa, Santiago del Estero y Catamarca). Estas poblaciones se corresponden mayoritariamente con la Ecorregión del Chaco Seco excepto por las tortugas de la Salina Grande (Catamarca) que fueron encontradas en una zona con vegetación típica del monte rodeada de formaciones de bosques típicos del Chaco Seco. No se encontraron garrapatas en las poblaciones del sur (provincias de La Pampa, Río negro y Neuquén) y del oeste (provincias de San Juan y La Rioja) que habitan la Ecorregión del Monte sin bosque chaqueño alrededor.

Tabla 11. Caracterización y resultados principales de las cinco localidades estudiadas usando transectas. Las localidades marcadas con asterisco (*) corresponden a áreas naturales protegidas (Parques Nacionales).

<i>Localidad</i>	Laguna Amarga	La Amarga	Lihué Calel *	Salina Grande	Tío Pozo	PN Copo *
Provincia	La Pampa			Catamarca	Santiago del estero	
Coordenadas (elevación)	38°13'52.1"S 66°11'35.74"W (253 msnm)	37°50'41.95"S 65°28'52.89"W (230 msnm)		29°30' 37.39"S 64°58'37.05"W (185 msnm)	28°23'35.31"S 63°59'15.37"W (133 msnm)	25°39'40.66"S 61°59'35.95"W (179 msnm)
Ecorregión	Monte de Llanuras y Mesetas			Chaco Seco		
Fecha	10-12 /III/2012	3-4/III/2012		14-15/XI/2011	16-17/XI/2011	19-20/XI/2011
Rango horario	8.40-18.37	9.33 - 20.24		9.06 – 16.20	8.22 - 20.14	6.45 - 20.14
Rango de T° (media)	21 - 38.5° C (28.39)	20 - 45°C (31.5)		26 - 41°C (35.1)	25 - 37°C (31.56)	26 - 41°C (33.68)
N° de transectas	57 /localidad					
Características de la transecta	Longitud: 100m – Ancho: 10m					
Espacio mínimo entre transectas	50 m					
Área cubierta	28.500m ² / localidad					
Tiempo medio/transecta	9.61min	11.47min		12.7min	15.57min	16.49min
Horas totales/localidad	8.48hs	11.06hs		12.03hs	14.4hs	15.58hs
Tortugas por transecta	0	0		2	0	5
Tortugas entre transectas	1	0		0	0	2
Tortugas en el área de estudio	0	0		0	0	7

Tortugas totales	1	0	2	0	14
-------------------------	----------	----------	----------	----------	-----------

Tabla 12. Resultados de presencia / ausencia (P/A) para cada una de las localidades muestreadas al azar empleando un esfuerzo de muestreo variable.

Localidad	Provincia (horas totales)	Ecorregión (horas totales)	Esfuerzo		Tortugas	
			Hs	Personas	Vivas	Muertas
Gato Colorado	Santa Fe	Chaco Seco (38.5)	1	2	0	0
Tostado	(2)		1	2	0	0
Santa sylvina	Chaco		1	2	0	1
Castelli	(3)		2	2	0	1
Reserva Natural Formosa*	Formosa		3	2	1	1
Pozo del Tigre	(4)		1	2	0	0
Brea Pozo	Santiago del Estero (0.5)		0.5	4	0	1
Obispo Trejo	Córdoba (8)		3	2	0	0
Chuña			1	3	0	0
Dean Funes			2	3	0	1
La Paquita			1	2	0	0
Villa Tulumba			1	1	0	0
Capitán Juan Paje			Salta (9)	1	2	0
Dragones	4			2	0	0
Las Lajitas	1			2	1	0
Hickmann	1			2	0	0
Ruta 16 cerca SJ de Metán	2			2	0	0
Arroyo Santa	Jujuy (1)			1	2	0

Rita cerca de Isla Chica							
Trancas	Tucumán			1	2	0	0
Ruta 157 cerca de Lamadrid	(2)			1	2	0	0
Ruta 60 cerca de San Martín				1	2	0	0
Ruta 60 cerca Telaritos				1	2	1	0
Ruta 157 cerca de Tapso				1	2	0	1
Ruta 38 al límite con La Rioja	Catamarca			1	1	0	0
Ruta 64 cerca de Las Cañas	(9.5)			1	2	0	1
Cerca de San Fernando del Valle				4	1	0	0
Ruta 60 en la Salina Grande				0.5	2	2	0
Cerca de Patquia	La Rioja			1	3	0	0
Parque Nacional Talampaya*	(6)			5	3	2	0
Baldecitos		Monte de Llanuras y Mesetas		1	2	1	0
Ruta 510 cerca de San Agustín	San Juan	(50)		1	1	0	0
Ruta 141 cerca Caucete	(6)			4	1	0	0
Estancia Las Tortugas				0.5	2	0	0
Casa de Piedra	La Pampa (18)			1.5	2	0	0
Colonia Chica				1	2	0	0

Algarrobo del Águila			0.5	2	0	0
Santa Isabel			1	2	0	0
25 de Mayo			1.5	2	3	1
Gobernador Ayala			1	2	0	1
Parque Nacional Lihué Calel*			10	1	0	0
Ruta 154 cerca de Cuchillo-Có			1	1	0	0
El Cruce	Neuquén (3)		1	2	1	0
Rincón de los Sauces			0.5	2	0	0
25 Km SE Rincón de los Sauces			1	2	1	0
Añelo			0.5	2	0	0
Norte de Salina del Gualicho	Río Negro (9)		1	1	0	0
Bahía Creek			5	1	0	0
Río Colorado			1	1	0	0
Entre Duval y Chelforó			1.5	2	2	3
Catriel			0.5	2	0	0
Patagones	Buenos Aires (2)		2	1	0	0
Ruta 3 cerca de Río Verde	Chubut (4)		2	1	0	0
Ruta 4 cerca de Puerto Madryn			2	2	0	0

Figura 23: Localidades donde se llevó a cabo el método de búsqueda Presencia/Ausencia. Las localidades se diferencian en el mapa según se hayan encontrado tortugas vivas (círculos blancos) o ambas, vivas y muertas (círculos blancos con punto negro); y localidades donde no se encontró ninguna tortuga (triángulos completamente negros), o sólo restos de ellas (triángulo con círculo blanco). Los números (1-5) corresponden a los puntos donde se realizó la estimación de abundancia relativa por medio del sistema de transectas.

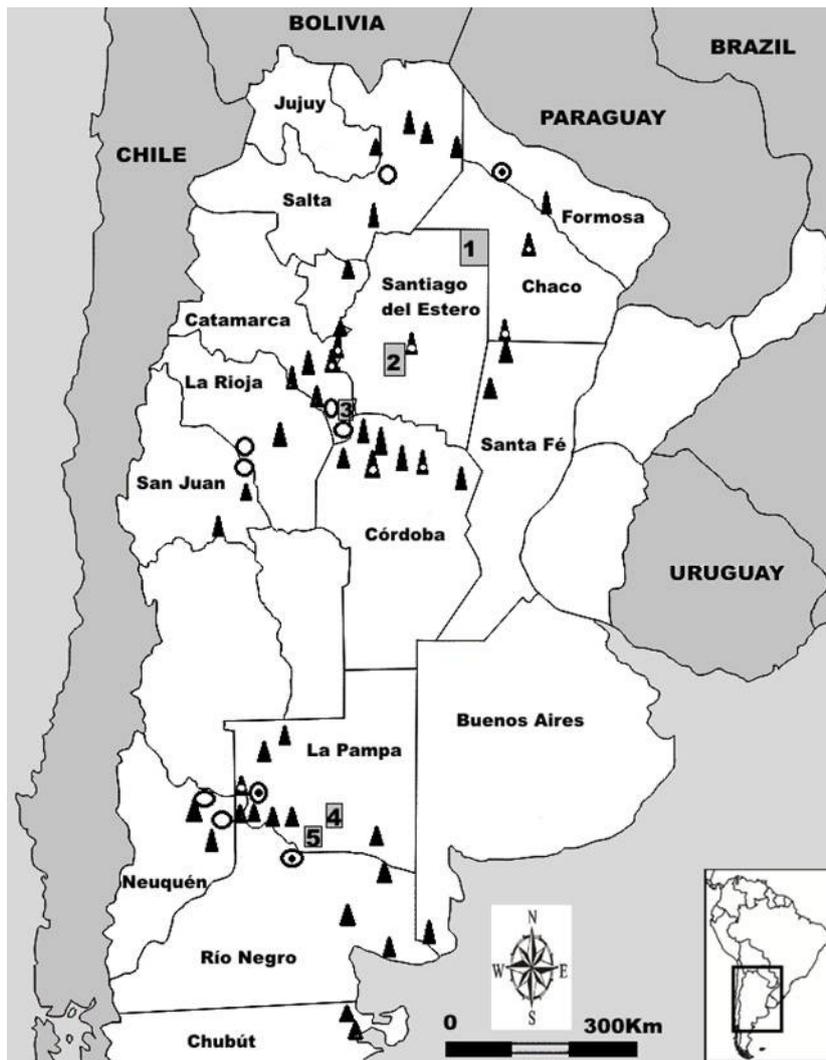


Figura 20: (A) Esfuerzo de muestreo (horas) en cada una de las localidades estudiadas mediante transectas. Los números dentro de las fracciones de los gráficos de tortas indican la cantidad de tortugas vivas halladas en cada localidad. (B) Temperatura promedio y sus desviaciones estándares, para cada localidad, durante los días en que se realizó el muestreo de transectas. LA: Laguna La Amarga; LC: Lihué Calel; SG: Salina Grande; TP: Tío Pozo y Co: PN Copo.

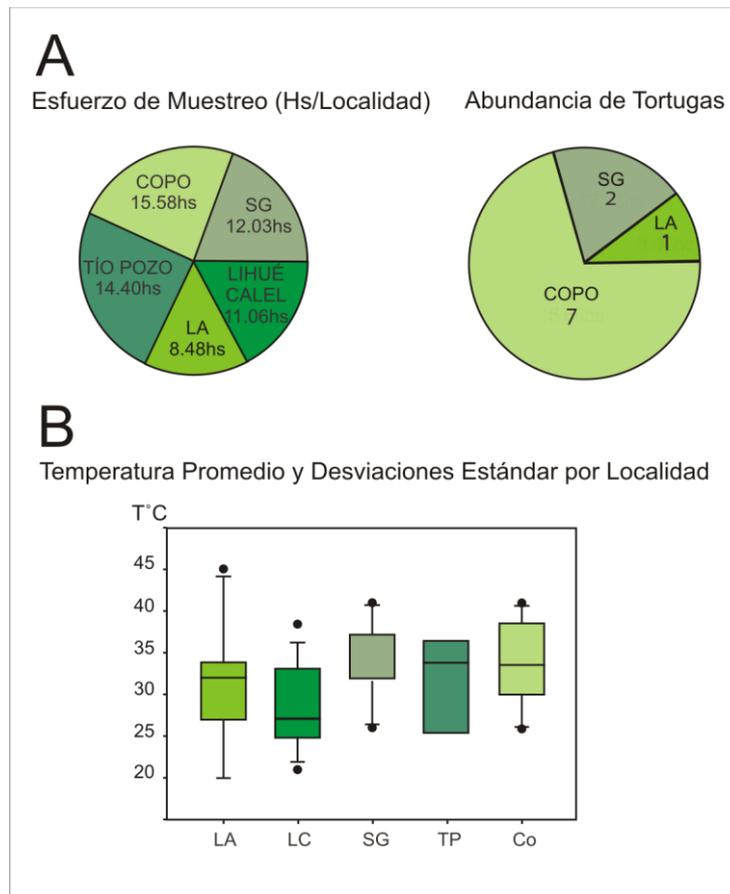


Figura 21: (A) Frecuencias observadas de machos y hembras en las 3 localidades donde se encontraron tortugas durante la realización del muestreo por transectas. (B) Frecuencia observada de tortugas activas, semiactivas e inactivas en cada una de las 3 localidades donde se encontraron tortugas mediante el muestreo por transectas. LA: Laguna La Amarga, SG: Salina Grande y Co: PN Copo.

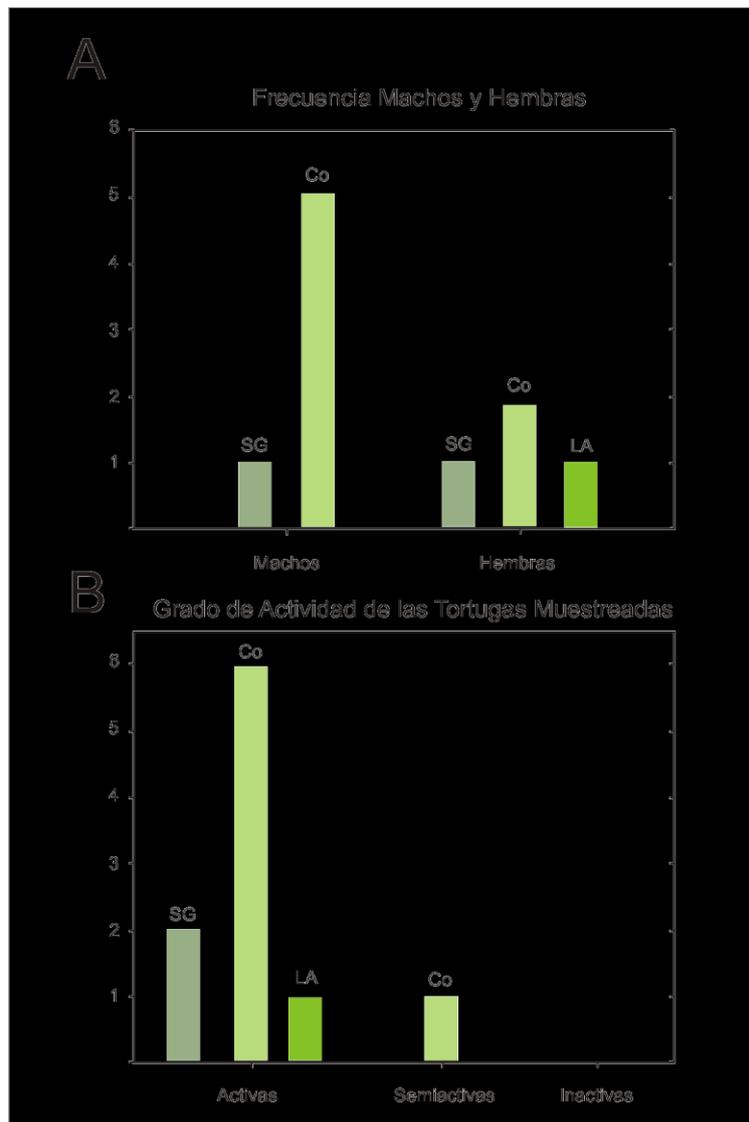
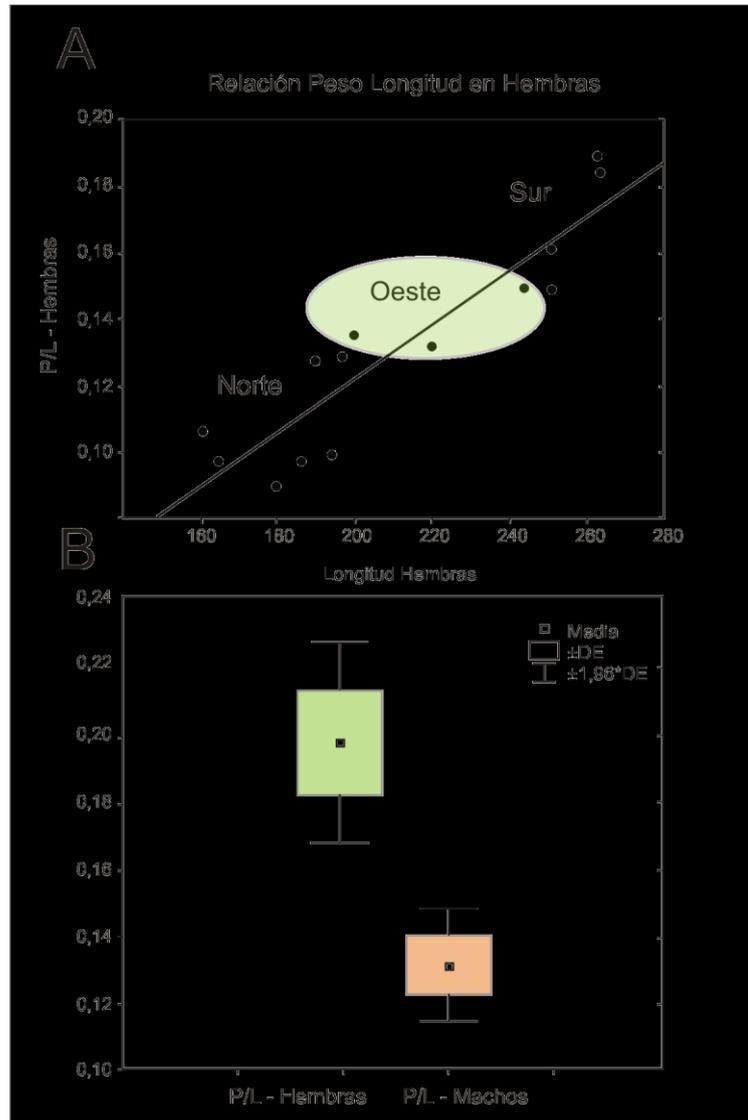


Figura 22: Relación entre el peso y la longitud de machos y hembras muestreadas en los estudios de estimación de abundancia y de P/A. (A) Relación de las variables Peso/Longitud (P/L) y Longitud para las hembras. (B) Comparación de la variable Peso/Longitud entre machos y hembras.



Anexo Resultados

Tabla 2: Muestras de *Chelonoidis chilensis* analizadas en el presente Trabajo de Tesis.

MLPR: Colección de Herpetología del Museo de Ciencias Naturales de La Plata. **MACN:** Colección de Herpetología del Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”, Buenos Aires.

FML: Colección de Herpetología de la Fundación Miguel Lillo, Tucumán.

Núm	Código	Localidad	Coordenadas	Referencia	Colección Museo	Num. Acceso
01	RN 1037	Río Negro	41°7'58.1"S 65°53'36"W	Esta Tesis	-	-
02	RN 1020	Río Negro	41°23'6.1"S 65°21'49"W	Esta Tesis	MLPR 5463	-
03	RN 1021	Río Negro	38°35'43.7"S 67°35'16"W	Esta Tesis	MLPR 5464	-
04	RN 1036	Río Negro	39°32'3"S 67°10'23,4"W	Esta Tesis	MLPR 5513	-
05	RN 1039	Río Negro	40°40'59.9"S 66°9'43"W	Esta Tesis	MLPR 5062	-
06	RN 1023	Río Negro	39°21'60"S 65°43'0"W	Esta Tesis	-	-
07	RN 1022	Río Negro	39°21'60"S 65°43'0"W	Esta Tesis	-	-
08	RN 1030	Río Negro	40°44'34.1"S 64°58'3.6"W	Esta Tesis	MACN 36669	-
09	RN 1040	Río Negro	39°17'16.8"S 65°39'55"W	Esta Tesis	-	-
10	LP 2006	La Pampa	37°58'45,56"S 67°39'47,31"W	Esta Tesis	-	-
11	SL 1038	San Luis	35°36'60"S 66°17'0"W	Esta Tesis	MLPR 0017	-
12	SL 1028	San Luis	32°28'13"S 66°57'53"W	Esta Tesis	-	-
13	SL 1000	San Luis	32°45'36"S 67°65'11"W	Esta Tesis	-	-
14	LR 1012	La Rioja	30°11'29.4"S 67°41'28"W	Esta Tesis	-	-
15	LR 1013	La Rioja	30°11'34.1"S 67°41'31"W	Esta Tesis	-	-
16	LR 1035	La Rioja	30°3'40"S 67°46'12"W	Esta Tesis	-	-
17	SJ 1014	San Juan	30°13'32.8"S 67°41'55"W	Esta Tesis	-	-

18	CA 1016	Catamarca		29°32'21.3"S 65°5'41"W	Esta Tesis	-	-
19	CA 1017	Catamarca		29°32'22.4"S 65°5'43"W	Esta Tesis	-	-
20	CA 1043	Catamarca		29°30'37.4"S 64°58'37"W	Esta Tesis	-	-
21	CA 1015	Catamarca		29°21'42.4"S 65°42'60"W	Esta Tesis	-	-
22	CA 1042	Catamarca		29°30'37.4"S 64°58'37"W	Esta Tesis	-	-
23	SA 2005	Santiago Estero	del	28°31'8"S 64°48'4,1"W	Esta Tesis	-	-
24	SA 2002	Santiago Estero	del	28°31'8"S 64°48'4,1"W	Esta Tesis	-	-
25	SA 1002	Santiago Estero	del	28°36'49"S 64°1'14"W	Esta Tesis	-	-
26	SA 2004	Santiago Estero	del	28°25'24,4"S 64°6'3"W	Esta Tesis	-	-
27	SA 2013	Santiago Estero	del	27°13'20"S 64°30'18"W	Esta Tesis	-	-
28	SA 2007	Santiago Estero	del	25°39'40.7"S 61°59'36"W	Esta Tesis	-	-
29	SA 2009	Santiago Estero	del	28°25'24,4"S 64°6'3"W	Esta Tesis	-	-
30	SA 1007	Santiago Estero	del	27°59'53.1"S 64°48'40"W	Esta Tesis	MACN 40001	-
31	SA 1011	Santiago Estero	del	28°17'57.8"S 65°5'49"W	Esta Tesis	MLPR 5623	-
32	SA 1005	Santiago Estero	del	28°25'24,4"S 64°6'3"W	Esta Tesis	-	-
33	SA 1006	Santiago Estero	del	28°25'24,4"S 64°6'3"W	Esta Tesis	-	-
34	SA 1004	Santiago Estero	del	28°36'49"S 64°1'14"W	Esta Tesis	-	-
35	SA 1003	Santiago Estero	del	27°36'46"S 64°17'5"W	Esta Tesis	-	-
36	SA 2010	Santiago Estero	del	28°20'16"S 63°58'11"W	Esta Tesis	-	-
37	SA 2011	Santiago Estero	del	27°59'53.1"S 64°48'40"W	Esta Tesis	-	-
38	SA 2012	Santiago Estero	del	27°13'20"S 64°30'18"W	Esta Tesis	-	-

39	SA 1059	Santiago Estero	del	26°5'52.5"S 61°42'51"W	Esta Tesis	MLPR5667	-
40	SA 1051	Santiago Estero	del	25°39'19.8"S 62°0'3.6"W	Esta Tesis	-	-
41	SA 1054	Santiago Estero	del	25°39'26.4"S 62°0'36"W	Esta Tesis	-	-
42	SA 1052	Santiago Estero	del	25°39'19.8"S 62°0'3.6"W	Esta Tesis	-	-
43	SA 1053	Santiago Estero	del	25°39'26.4"S 62°0'36"W	Esta Tesis	-	-
44	SA 1048	Santiago Estero	del	25°39'40.7"S 61°59'36"W	Esta Tesis	-	-
45	SA 1058	Santiago Estero	del	26°5'52.5S 61°42'51"W	Esta Tesis	MLPR 5666	-
46	SA 1044	Santiago Estero	del	26°5'52.5"S 61°42'51"W	Esta Tesis	-	-
47	SA 1046	Santiago Estero	del	26°5'52.5"S 61°42'51"W	Esta Tesis	MLPR 5665	-
48	SA 1047	Santiago Estero	del	25°39'40.7"S 61°59'36"W	Esta Tesis	-	-
49	SA 1057	Santiago Estero	del	26°5'52.5"S 61°42'51"W	Esta Tesis	-	-
50	ST 1018	Salta		23°54'30"S 64°3'23"W	Esta Tesis	-	-
51	CO 1001	Córdoba		30°54'37.6"S 62°56'17"W	Esta Tesis	-	-
52	CH 2008	Chaco		27°56'11.8"S 61°10'42"W	Esta Tesis	-	-
53	CH 1069	Chaco		25°9'38.3"S 61°50'20"W	Esta Tesis	-	-
54	CH 1070	Chaco		25°9'38.3"S 61°50'20"W	Esta Tesis	-	-
55	CH 1071	Chaco		25°9'38.3"S 61°50'20"W	Esta Tesis	-	-
56	FO 1019	Formosa		24°18'41.2"S 61°48'44"W	Esta Tesis	MLPR 5622	-
57	FO 1009	Formosa		24°47'52.7"S 60°27'3.4"W	Esta Tesis	FML 031	-
58	FO 1024	Formosa		25°20'5.28"S 59°40'55"W	Esta Tesis	-	-
59	FO 1025	Formosa		24°18'39"S 61°43'41"W	Esta Tesis	-	-

60	NE 1079	Neuquén	37°31'33.19"S 68°41'25.44"W	Esta Tesis	-	-
61	RN 1090	Río Negro	38°52'39.43"S 66°24'40.43"W	Esta Tesis	-	-
62	LP 1084	La Pampa	37°41'57'16"S 67°34'08"W	Esta Tesis	-	-
63	SJ 1074	San Juan	30°13'32.8"S 67°41'55"W	Esta Tesis	-	-
64	CH 1073	Chaco	25°9'38.3"S 61°50'20"W	Esta Tesis	-	-
65	CH 1072	Chaco	25°9'38.3"S 61°50'20"W	Esta Tesis	-	-
66	RN 1077	Río Negro	38°21'45.53"S 68°00'44.26"W	Esta Tesis	-	-
67	RN 1080	Río Negro	38°55'40.37"S 67°34'05.22"W	Esta Tesis	-	-
68	ME 063	Mendoza Norte	32°48'48.61"S 67°51'51.31"W	Fritz <i>et al.</i> 2012.	-	HE648063
69	ME 064	Mendoza Norte	32°48'48.61"S 67°51'51.31"W	Fritz <i>et al.</i> 2012.	-	HE648064
70	ME 065	Mendoza Norte	32°48'48.61"S 67°51'51.31"W	Fritz <i>et al.</i> 2012.	-	HE648065
71	ME 066	Mendoza Norte	32°48'48.61"S 67°51'51.31"W	Fritz <i>et al.</i> 2012.	-	HE648066
72	BA 069	Buenos Aires	40°26'00.74"S 62°47'37.35"W	Fritz <i>et al.</i> 2012.	-	HE648069
73	BA 070	Buenos Aires	40°26'00.74"S 62°47'37.35"W	Fritz <i>et al.</i> 2012.	-	HE648070
74	ME 071	Mendoza Sur	37°26'23.06"S 68°32'21.17"W	Fritz <i>et al.</i> 2012.	-	HE648071
75	ME 072	Mendoza Sur	37°26'23.06"S 68°32'21.17"W	Fritz <i>et al.</i> 2012.	-	HE648072
76	ME 073	Mendoza Sur	37°26'23.06"S 68°32'21.17"W	Fritz <i>et al.</i> 2012.	-	HE648073
77	ME 074	Mendoza Sur	37°26'23.06"S 68°32'21.17"W	Fritz <i>et al.</i> 2012.	-	HE648074
78	ME 075	Mendoza Sur	37°26'23.06"S 68°32'21.17"W	Fritz <i>et al.</i> 2012.	-	HE648075
79	ME 076	Mendoza Sur	37°26'23.06"S 68°32'21.17"W	Fritz <i>et al.</i> 2012.	-	HE648076
80	ME 077	Mendoza Sur	37°26'23.06"S 68°32'21.17"W	Fritz <i>et al.</i> 2012.	-	HE648077

81	NE 078	Neuquén		37°41'22.55"S 68°14'30.46W	Fritz <i>et al.</i> - 2012.	HE648078
82	NE 079	Neuquén		37°41'22.55"S 68°14'30.46W	Fritz <i>et al.</i> - 2012.	HE648079
83	NE 080	Neuquén		37°41'22.55"S 68°14'30.46W	Fritz <i>et al.</i> - 2012.	HE648080
84	NE 081	Neuquén		37°41'22.55"S 68°14'30.46W	Fritz <i>et al.</i> - 2012.	HE648081
85	NE 082	Neuquén		37°41'22.55"S 68°14'30.46W	Fritz <i>et al.</i> - 2012.	HE648082
86	SA 094	Santiago Estero	del	28°48'31.28"S 63°5'18.44"W	Fritz <i>et al.</i> - 2012.	HE648094
87	SA 095	Santiago Estero	del	28°48'31.28"S 63°5'18.44"W	Fritz <i>et al.</i> - 2012.	HE648095
88	SA 096	Santiago Estero	del	28°48'31.28"S 63°5'18.44"W	Fritz <i>et al.</i> - 2012.	HE648096
89	SA 097	Santiago Estero	del	28°48'31.28"S 63°5'18.44"W	Fritz <i>et al.</i> - 2012.	HE648097
90	SA 098	Santiago Estero	del	28°48'31.28"S 63°5'18.44"W	Fritz <i>et al.</i> - 2012.	HE648098
91	SA 099	Santiago Estero	del	28°48'31.28"S 63°5'18.44"W	Fritz <i>et al.</i> - 2012.	HE648099
92	SA 100	Santiago Estero	del	28°48'31.28"S 63°5'18.44"W	Fritz <i>et al.</i> - 2012.	HE648100
93	SA 101	Santiago Estero	del	28°48'31.28"S 63°5'18.44"W	Fritz <i>et al.</i> - 2012.	HE648101
94	SA 102	Santiago Estero	del	28°48'31.28"S 63°5'18.44"W	Fritz <i>et al.</i> - 2012.	HE648102

95	SA 103	Santiago del Estero	del	28°48'31.28"S 63°5'18.44"W	Fritz <i>et al.</i>	-	HE648103
96	SA 104	Santiago del Estero	del	28°48'31.28"S 63°5'18.44"W	Fritz <i>et al.</i>	-	HE648104
97	SA 105	Santiago del Estero	del	28°48'31.28"S 63°5'18.44"W	Fritz <i>et al.</i>	-	HE648105
98	SA 106	Santiago del Estero	del	28°48'31.28"S 63°5'18.44"W	Fritz <i>et al.</i>	-	HE648106

Tabla 13. Comparación entre los sitios polimórficos del gen del citocromo b y la Región Control del ADNmt realizada sobre una muestra de cinco tortugas. Las muestras consideradas correspondieron a especímenes de los extremos de la distribución geográfica total de la especie.

Región analizada	Sitios invariables (SI)	Sitios variables (SV)	SV <i>singletons</i>	Sitios parsimoniosamente informativo
Citocromo b	1101	17	6	12
Región Control	720	14	6	8

Discusión

Análisis general de las secuencias obtenidas

De las 36 sustituciones registradas en las secuencias analizadas del gen del citocromo b, 25 correspondieron a transiciones (Ti) y 11 a transversiones (Tv). Si bien la proporción de estas últimas es elevada (30,6%) respecto de lo esperado en secuencias de mamíferos (3%) (Tchaicka *et al.* 2007; Rodríguez *et al.* 2009), estos valores son similares a los encontrados en otras tortugas, las cuales presentaron entre 21 y 36% de Tv en el mismo gen analizado (Caccone *et al.* 1999a; Ureña-Aranda & Espinosa de los Monteros 2012).

Aunque los niveles de diversidad genética (h : 0,693-0,868; π : 0,0021-0,0072) de la especie estudiada en esta tesis resultaron bajos, éstos fueron levemente superiores a los registrados en especies de tortugas categorizadas como *En peligro* o *En peligro crítico* según UICN (Red List 2012) ($h=0.000-0.651$; $\pi=0.000-0.002$) o de aquellas en que su diversidad genética se ha visto significativamente reducida (ej., *Chelydra serpentina*: Walker *et al.* 1989; *Podocnemis lewyana*: Vargas-Ramírez *et al.* 2007; *Dermatemys mawii*: González-Porter *et al.* 2011; *Gopherus flavomarginatus*: Ureña-Aranda & Espinosa de los Monteros 2012). A su vez, los valores registrados en la especie aquí estudiada fueron similares a los valores registrados ($h= 0.76-0.9$; $\pi=0.003-0.01$) en dos testudinidos categorizados como *Vulnerables* (UICN, Red List 2012): *Chelonoidis nigra* (Beheregaray *et al.* 2003) y *Testudo graeca graeca* (Salinas *et al.* 2009).

Respecto de la diversidad génica o haplotípica, el gen del citocromo b demostró ser un buen marcador ya que presentó valores levemente inferiores a los de la Región Control mitocondrial analizada aquí en algunos especímenes de *Chelonoidis chilensis* (ver Tabla 13, Anexo Resultados) e incluso estos valores fueron superiores a los registrados en otras especies de tortugas (Amato *et al.* 2008; ver comparación en Ureña-Aranda & Espinosa de los Monteros 2012). Lo que corrobora las observaciones realizadas por otros autores (Starkey *et al.* 2003; Spinks & Shaffer 2005; Böhme *et al.* 2007) quienes consideran que el gen del citocromo b es útil para resolver cuestiones filogeográficas en reptiles en general. A diferencia de lo que ocurre en mamíferos donde el gen del citocromo b es más conservado (Fleischer *et al.* 2001; Li *et al.* 2005; Teacher *et al.* 2011).

Respecto de los datos publicados por Fritz *et al.* (2012) en este Trabajo de Tesis se describen 11 haplotipos nuevos: C2, C3, C6, C14, C15, C16, C17, C18, C19, C20 y C21.

Análisis filogenético

A partir del análisis de las relaciones filogenéticas observamos que, bajo los tres métodos aquí utilizados (Máxima Parisomonia, Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana), la especie estudiada presenta dos clados (haplogrupos del análisis filogeográfico) en general bien sustentados (MP=82-93; ML=71-83; IB=0,65-0,99). A su vez, estos clados son constantes en cuanto a las secuencias que agrupan. Uno de esos grupos contiene a las tortugas que se distribuyen prácticamente en la Ecorregión del Monte (con algunas tortugas que alcanzan la parte su de la Ecorregión chaco Seco) y el otro a las tortugas de la Ecorregión Chaco Seco. La divergencia genética entre estos dos grupos es del 1,3%. Respecto de este nivel de divergencia, valores del 2% se han registrado entre distintas especies del género *Graptemys* (Lamb *et al.* 1994) y del 1,5 al 2,4% entre especies de *Chrysemys* (Starkey *et al.* 2003). No obstante ello, Fritz *et al.* (2012) consideran que esos rangos de porcentaje de divergencia no justifican la separación de las entidades estudiadas en más de una especie. Respecto esto último, existe la posibilidad que dos linajes genéticos hayan divergido a causa de la existencia de barreras al flujo génico que, una vez desaparecidas, éstas permitan el contacto secundario mezclando nuevamente ambos grupos vicariantes (González-Porter *et al.* 2011). Si bien los datos de esta tesis indican una clara correspondencia geográfica de cada clado (uno prácticamente distribuido en la Ecorregión del Monte y el otro en la Ecorregión Chaco Seco), su separación geográfica resulta incompleta ya que ambos linajes están presentes en el sur de Santiago del Estero y sur de Catamarca. Este área de contacto entre ambos clados puede explicarse por la desaparición de la barrera genética hipotética que fue arriba mencionada. Para explicar este patrón genético donde hay dos clados bien delimitados, con una clara correspondencia geográfica pero, a la vez, separados por divergencias genéticas bajas y un área de contacto en la zona centro de Argentina, pueden plantearse dos hipótesis: (a) el patrón observado es resultado de un contacto secundario con entrecruzamiento de ambos linajes, que al contactarse nuevamente el entrecruzamiento es viable, por lo tanto resultan incompletamente separados, o (b) que existen dos linajes genéticamente aislados y, aunque con contacto

geográfico, ya no pueden entrecruzarse. La discusión de los resultados citogenéticos permitirá tomar partido por una de estas hipótesis (ver Discusión Análisis citogenético).

Análisis filogeográfico

En base al análisis de la red de haplotipos, se observa la presencia de dos haplogrupos (clados del análisis filogenético) separados por diez pasos mutacionales. El haplogrupo del Monte presenta una estructura en forma de estrella (Fig. 7). Esto es, existe un haplotipo central muy frecuente y haplotipos que, en general, se separan de él por unos pocos pasos mutacionales. Dentro del haplogrupo del Monte el haplotipo C1 es el más ampliamente distribuido. Se encuentra en 14 de las 40 localidades muestreadas y a su vez es el haplotipo más frecuente de todos (Tabla 4). Estas características sumadas a la posición interna del haplotipos C1 en la red, sugieren que éste podría ser el haplotipo más antiguo del haplogrupo (Posadas & Crandall 2001). Los haplotipos C2, C3, C4, C5, C6 y C7 son haplotipos claramente derivados de C1, en cambio los haplotipos C8 y C9, si bien claramente componen el haplogrupo del Monte, están separados por cinco pasos mutacionales de C1. Posiblemente, esto sea el producto de que esa zona no haya sido lo suficiente muestreada como para obtener haplotipos intermedios entre C1 y C8-C9. Característicamente, el patrón estrellado de la red de haplotipos sugiere un evento de expansión poblacional (Templeton *et al.* 1995; Avise 2000; González-Porter *et al.* 2011; Teacher *et al.* 2011).

Asimismo, los resultados de esta Tesis indican una correlación geográfica y genética entre los diferentes haplotipos que componen el haplogrupo del Monte es clara. Los haplotipos C2, C3 y C4, que se encuentran en el norte de Río Negro, sur de La Pampa y sur de Buenos Aires, se separan de C1 sólo por una mutación y se distribuyen cercanamente a éste. De los haplotipos restantes en este Haplogrupo, dos mutaciones separan a C1 de C5 y C7. Estos haplotipos se encuentran en el norte de San Luis, San Juan y La Rioja (C5) y en el sur de sur de Santiago del Estero (C7). El haplotipo C6 se separa de C1 por tres pasos mutacionales y se encuentra en la Ecorregión Chaco Seco, específicamente en la Salina Grande, al sur de Catamarca. Todos los haplotipos que pertenecen al Haplogrupo Monte, corresponden a tortugas que fueron encontradas en ambientes con las características florísticas y edáficas típicas del Monte, aún así cuando fueron encontradas en sectores que pertenecientes a la Ecorregión Chaco Seco. Por

otro lado, C8 y C9 son los haplotipos más distantes de C1, pero su distribución geográfica (una zona muy definida del norte de Mendoza) no explica claramente este patrón. Esta distribución de los haplotipos explica, en parte, su expansión por toda la Ecorregión del Monte, llegando en su distribución más al norte hasta la Salina Grande de Catamarca y la Salina de Ambargasta en Santiago del Estero.

El haplogrupo Chaco Seco resultó ligeramente más diverso que el haplogrupo del Monte, presentando 12 de los 21 haplotipos totales observados. El haplotipo más diverso y frecuente de este grupo es C13, que se encuentra en 14 de las 40 localidades muestreadas (Tablas 4 y 6). Sin embargo, la red de haplotipos de este haplogrupo no presentó un patrón estrellado como en el caso del Monte (Fig. 7). El haplotipo C13 ocupa una posición periférica en la red y sólo dos (C11 y C12) de los restantes 11 haplotipos derivan de éste y presentan frecuencias relativamente altas. El haplotipo de posición central en la red es hipotético y por lo tanto, o bien no fue muestreado o bien podría estar extinto en la población (ver más adelante). En definitiva, este conjunto de características hace que el haplogrupo Chaco Seco sea distinto al del Monte. Dentro del haplogrupo del Chaco Seco los haplotipos C11, C12 y C13 conforman (MP: 85; ML:75 y IB: 1.0), según el análisis de relaciones filogenéticas, un grupo monofilético sustentado por los cuatro métodos de análisis implementados, e incluye a las tortugas que se distribuyen en el sur y centro de Santiago del Estero. El resto de la diversidad haplotípica del haplogrupo Chaco seco se distribuyó principalmente en el norte de Chaco, norte de Santiago del Estero (PN Copo y alrededores), Formosa y Este de Salta. La diversidad genética de esta parte de la Ecorregión Chaco Seco es elevada ya que alberga ocho haplotipos (C14-C21), la misma cantidad de haplotipos que alberga la totalidad de la Ecorregión del Monte. Esta característica podría corresponderse con una mayor antigüedad del haplogrupo Chaco Seco en esta región. Este punto es apoyado además por el registro fósil de *Chelonoidis chilensis*, ya que los registros de mayor antigüedad de la especie se encontraron en las provincias de Córdoba y Santa Fe (De La Fuente 1997) (ver discusión Registro fósil y cambios ambientales).

Entonces, la actual asociación no azarosa de los haplotipos respecto de la distribución geográfica (Fig. 8) puede haber surgido a partir de la restricción al flujo génico a causa de eventos históricos tales como fragmentación, expansión del rango o colonización (Templeton *et al.* 1995).

En cuanto al análisis de la distribución de las diferencias pareadas (*mismatch distribution*) el haplogrupo del Monte es el que mejor ajustó a la distribución esperada (SSD= 0.0429) según el modelo. Por otro lado, tanto el Haplogrupo Chaco Seco y la Población total resultaron en valores mayores al esperado (SSD=0.678 y SSD=0.0469, respectivamente). Las gráficas de estas distribuciones también reflejan claramente esta situación, donde el gráfico del haplogrupo del Monte tiene una mayor tendencia unimodal mientras que los de los otros dos haplogrupos (Chaco seco y Población total) presentan gráficos multimodales. Por lo tanto, y teniendo en cuenta los valores de p correspondientes a cada grupo, sólo el haplogrupo del Monte es explicado por el modelo de Expansión Demográfica y Espacial (p -SSD- > 0.05). El valor del índice de rg también demuestra la existencia de este proceso.

Los índices D_T , F^* , D^* y F_S fueron no significativos en los tres grupos indicando que no se puede rechazar la hipótesis nula de neutralidad. Todo esto significa que la selección natural no estaría actuando sobre el gen del citocromo b de las tortugas estudiadas. El test R_2 fue significativo para los tres grupos ($p < 0.05$). Como demostraron varios autores (Ramos Onsins & Rozas 2002; Ramírez-Soriano *et al.* 2008), las pruebas R_2 y F_S son las más sensibles para poner a prueba tamaño poblacional constante vs. Crecimiento poblacional, y consideran que es más conveniente utilizar R_2 para poblaciones pequeñas y F_S para poblaciones grandes. Quizá el tamaño pequeño de estos grupos sea el motivo por el cual R_2 fue significativo y F_S no lo fue, siendo que las dos pruebas son muy poderosas para detectar expansión poblacional. Como estos autores también demostraron, las pruebas D_T , F^* y D^* fueron más sensibles frente a la selección natural y por lo tanto menos perceptivas para detectar eventos de expansión poblacional. Entonces, dadas las características de la prueba R_2 , que resultó significativa para los tres grupos, estaría detectando una expansión poblacional leve para el caso de la Población total y el Haplogrupo Chaco Seco, que evidentemente no está siendo detectada por los otros métodos, que son menos sensibles frente a este evento. Finalmente, reuniendo las evidencias aportadas por estos índices y por la distribución de las diferencias pareadas podemos considerar que el Haplogrupo del Monte se encuentra en expansión poblacional.

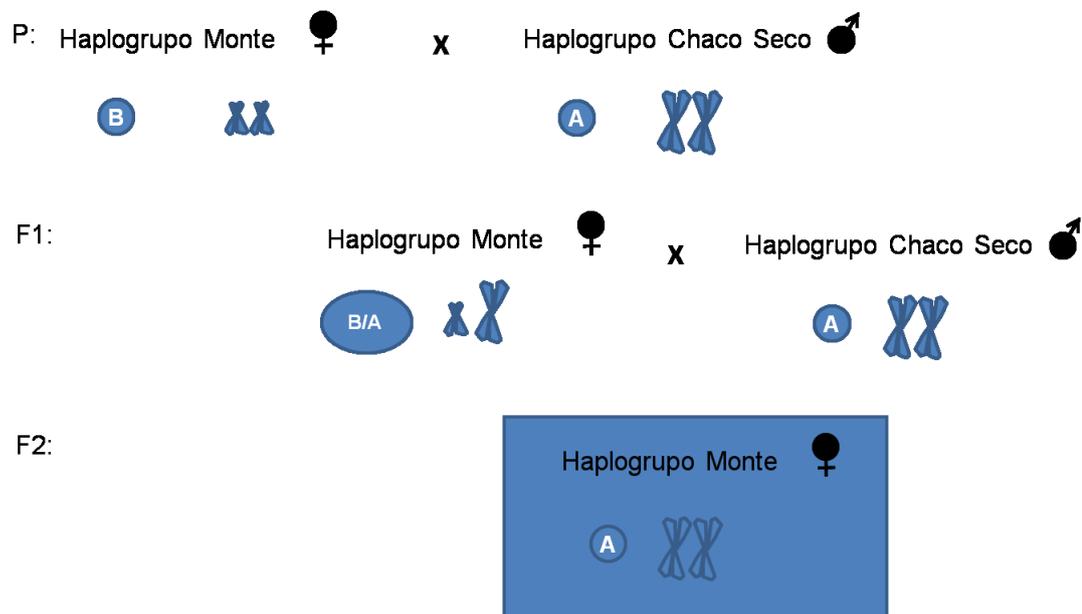
Análisis citogenético

La reconstrucción del tráfico ilegal de tortugas terrestres de nuestro país realizada por Richard (1999) sobre la base de datos propios y de otros autores (Waller & Micucci 1997) indica que las poblaciones del sur de Santiago del Estero y principalmente las del norte de Córdoba, fueron las más explotadas para abastecer al comercio de mascotas, con destino fundamental en la provincia de Buenos Aires. Quizá esta sea la razón por la cual las 8 tortugas de cautiverio analizadas en Buenos Aires presentaron el morfo *chilensis* (Fig. 1B) y presentaron el Cariomorfo A. En cambio, los datos sobre tráfico ilegal arriba mencionados indican que la provincia de Mendoza ha recibido tortugas de distintos orígenes. De hecho, según las autoridades del zoológico de esa provincia, allí han recibido tanto, tortugas donadas por personas que las han comprado y que ya no desean conservarlas, y tortugas que los habitantes locales colectan en los alrededores de sus casas o en ocasión de salidas al campo y que deciden llevarlas a dicho lugar. Por este motivo es lógico que en las tortugas de cautividad que he analizado para la provincia de Mendoza hayan mostrado ambos cariomorfos.

Las tortugas silvestres que presentan Cariomorfo B pertenecen, desde el punto de vista del análisis del ADNmt, al haplogrupo del Monte y presentan localidad de origen dentro de esa Ecorregión, y en general, las tortugas con Cariomorfo A pertenecen mitocondrialmente al haplogrupo del Chaco Seco y procedieron geográficamente de esa Ecorregión (Fig 19). La única excepción a este patrón fue una tortuga muestreada en la Salina Grande de Catamarca que presentó el Cariomorfo A y que corresponde al haplogrupo del Monte (Fig. 18 D). Las características genéticas de esta tortuga podrían estar evidenciando que el entrecruzamiento entre ambos cariomorfos ocurre, y que la descendencia sería viable. Puede suponerse que lo que sucedió fue lo siguiente: una hembra perteneciente al haplogrupo Monte y Cariomorfo B, se cruzó con un macho del Haplogrupo Chaco Seco y cariomorfo A. Esta primera descendencia presentaría el haplogrupo del Monte (la mitocondria se hereda por línea materna) y cromosómicamente constituiría un híbrido entre los dos cariomorfos. En una generación siguiente, el individuo híbrido generaría 50% de gametas con el macrocromosoma y 50% gametas con el microcromosoma. Por lo tanto, al producirse el entrecruzamiento habría un 50% de chances de restablecer el cariomorfo A con un Haplogrupo del Monte. Si bien no conocemos el comportamiento del par cromosómico híbrido en la meiosis, esta hipótesis de entrecruzamiento constituye una explicación plausible para las características genéticas de esta tortuga de la Salina Grande de Catamarca, y para poder corroborarla

es necesario analizar un mayor número de individuos. Esta hipótesis se esquematiza en Figura 24.

Figura 24: Cruzamientos hipotéticos que explicarían las características genéticas de la tortuga encontrada en Catamarca que presentó Haplogrupo Monte y Cariomorfo A. Para simplificar, sólo se esquematiza el primer par de cromosomas del grupo C (microcromosomas) del cariomorfo B y el último par de cromosomas del grupo A (macrocromosomas) del cariomorfo A.



Todas las tortugas analizadas presentaron un complemento cromosómico $2n=52$, siendo este dato consistente con el análisis citogenético llevado a cabo por otros autores en las demás especies analizadas del género *Chelonoidis*: *C. carbonaria* (Forbes 1966; Sampaio *et al.* 1971; Bickham 1976; Bickham & Baker 1976a), *C. denticulata* (Bickham 1976; Bickham & Baker 1976a) y *C. chilensis morfo chilensis* (Bickham & Carr 1983), aunque en este último caso no se describió el cariotipo. Más recientemente, Martínez *et al.* (2009) describieron el cariotipo de *C. chilensis morfo donosobarrosi* procedente de Río Negro (Argentina). El cariotipo de esta tortuga fue 6:5:15, correspondiendo al Cariomorfo B descrito en este trabajo de Tesis.

Los cariotipos de *C. carbonaria* y *C. denticulata* fueron descritos por Bickham (1976), siendo sus fórmulas 9:5:12 y 8:6:12, respectivamente. Asimismo, Dowler & Bickham (1982), el cariotipo de *C. nigra* como 9: 5: 12.

Volviendo a *C. chilensis*, ambos cariomorfos de esta especie mantienen constante el segundo grupo de cromosomas, con 5 pares de cromosomas de tipo sub-acrocéntricos y acrocéntricos. Como se mencionó anteriormente, el Cariomorfo B (6: 5: 15) de los especímenes estudiados para esta tesis coincidió con el de los dos ejemplares de Río Negro estudiados por Martínez *et al.* (2009). Entonces el Cariomorfo A (7: 5: 14) se describe por primera vez en este trabajo de tesis y, de los dos cariomorfos de la especie, es el que presenta un mayor número de cromosomas en el primer grupo y, consecuentemente, menos microcromosomas.

Esta tendencia en la reducción del número de macrocromosomas y el aumento del número de microcromosomas fue observada por Bickham (1976), quien postuló que el cariotipo de *C. carbonaria* podría considerarse una forma ancestral ya que coincide con el cariotipo del Geoemydido *Batagur baska* (Bickham & Baker 1976b). Según Bickham (1976), estos dos linajes evolutivos se separaron en el Viejo Mundo (Eurasia y África), y un testudínido con un cariotipo ancestral (9: 5: 12) fue el que llegó al Nuevo Mundo (América), originando las formas que encontramos actualmente en América del Sur.

Respecto de la posibilidad que los cariomorfos A y B sean expresiones dimórficas del sexo, esto queda descartado ya que ambos ocurren tanto en machos como en hembras.

La técnica de FISH con sonda pantelomérica, no arrojó diferencias entre los dos cariomorfos. Ninguno de ellos presentó cromosomas con secuencias teloméricas a nivel centromérico, indicio que generalmente aparece cuando, en la evolución del cariotipo, ocurren translocaciones Robertsonianas (Bruère & Ellis 1979; Slijepcevic 1998). Esta clase de translocaciones implican la fusión de dos cromosomas acrocéntricos a través de sus brazos cortos, originando un cromosoma metacéntrico con secuencias teloméricas a nivel centromérico. No obstante estas reorganizaciones cromosómicas son comunes en la evolución del cariotipo de algunos roedores (Gauthier *et al.* 2010; Lavrenchenko *et al.* 2011). Por lo tanto, los resultados del presente trabajo de Tesis permiten sugerir que las secuencias teloméricas no han tenido un rol trascendental en la evolución del cariotipo de las tortugas *C. chilensis*.

Por lo tanto, y en base a las evidencias genéticas, podemos decir que la variabilidad de las tortugas *C. chilensis*, tanto molecular como cariotípica, evidencia la existencia de dos grupos o clados que no han alcanzado una separación completa dentro de la

especie *C. chilensis*. Uno de esos clados está distribuido geográficamente en la Ecorregión del Monte de Llanuras y Mesetas y el otro en la Ecorregión Chaco Seco. Asimismo, las zonas del sur de Catamarca (Salina Grande) y sur de Santiago del Estero (Salina de Ambargasta) estarían constituyendo el área de contacto secundario entre los dos grupos donde ocurriría el entrecruzamiento entre ellos.

Consideraciones respecto de otras hipótesis en cuanto al número de especies que se han propuesto históricamente dentro de lo que se ha dado en llamar grupo *chilensis*

Como se reseñó en la introducción, la gran variabilidad morfológica de las tortugas *C. chilensis* llevó a Freiberg (1973) a clasificarlas en tres especies, y fue él quien caracterizó a los tres morfotipos (para el rango específico) que hoy conocemos.

Los caracteres empleados por Freiberg (1973) fueron considerados por varios autores como altamente variables y sin valor taxonómico (Wermuth & Mertens 1977; Auffenberg 1979). Sobre estos antecedentes, Fernández (1988) realizó su tesis doctoral analizando caracteres morfométricos y osteológicos de las tres supuestas especies. En ese trabajo, empleó técnicas fenéticas y cladísticas. En un primer paso construyó un fenograma de correlación entre individuos utilizando caracteres cuantitativos que correspondieron a 25 medidas (del caparazón y de la cabeza) y 23 índices, entre los cuales consideró los caracteres empleados por Freiberg (1973). Como resultado de todos sus análisis, Fernández (1988) encontró dos grupos lejanamente vinculados entre sí, uno que reúne a las tortugas de la Ecorregión del Chaco Seco (muestras de Santiago del Estero, Córdoba y Chaco) y el otro con tortugas de la Ecorregión del Monte de Llanuras y Mesetas (muestras de La Pampa, Río Negro y Mendoza). A modo de conclusión, Fernández (1988) destacó que los caracteres propuestos por Freiberg (1973) no contribuyen en forma significativa a la separación de las tortugas estudiadas. Por lo tanto, el patrón en base a caracteres morfológicos, encontrado por Fernández (1988) sería el mismo obtenido a través de los datos genéticos de la presente Tesis Doctoral, aunque por los motivos expuestos anteriormente no coincidimos con la autora en asignar categoría específica a cada grupo por los siguientes motivos (alguno de ellos anteriormente expuestos): (1) divergencia genética baja entre ambos respecto de lo que se considera como especie válida dentro de Testudinidae (ver Fritz *et al.* 2012); (2) si

bien ambos grupos presentan un cariomorfo propio, ambos cariomorfos no son incompatibles con el entrecruzamiento viable entre ambos grupos, tal cual los datos presentados lo avalan para la zona de Salina Grande (Catamarca) y por último; (3) es sabido que los rasgos externos (forma, textura y coloración del caparazón) y el tamaño son altamente influenciados por las características ambientales, tal cual fue demostrado para diversos casos en años recientes (Fritz *et al.* 2005, 2006, 2007, 2008, 2009; Attum *et al.* 2007; Široký & Fritz 2007). Respecto del punto (3), es clara la existencia de morfos intermedios (*donosobarrosi-chilensis* o *petersi-chilensis*) en zonas donde hay contacto entre las Ecorregiones del Monte y Chaco Seco. Otra evidencia en ese sentido es que los individuos juveniles de, por ejemplo el morfo *donosobarrosi* son muy parecidos al morfo *chilensis* en cuanto a forma y coloración del caparazón, cuestión que sugiere que los rasgos típicos del morfo *donosobarrosi* se adquieren con la edad y por lo tanto, con la mayor exposición a determinadas condiciones climáticas y fisiográficas de la región.

Por lo tanto, una conclusión importante que se desprende de lo expuesto en el punto (3) es que, aquellas clasificaciones taxonómicas que se basan en los caracteres externos que se ha sugerido definen a cada morfotipo (Freiberg 1979, Cei 1986, 1993), no tendrían validez.

Desde un enfoque eco-etológico y morfológico, Richard (1999) consideró la existencia de dos especies válidas dentro del complejo *chilensis*: *C. chilensis* y *C. donosobarrosi*. Los caracteres eco-etológicos que sustentaron su propuesta fueron el tipo de refugio empleado por esas formas (construcción o no de cuevas), presencia / ausencia de ectoparásitos (garrapatas del género *Amblyomma*), y el espectro trófico. Como resultado él consideró que los morfos *chilensis* y *petersi* son parte de la especie *C. chilensis* (no construye cuevas o las hace poco profundas, presenta garrapatas) y que el morfo típico *donosobarrosi* corresponde desde luego a *C. donosobarrosi* (construye cuevas profundas, no presenta garrapatas). Pero los caracteres eco-etológicos por él empleados son cuestionables. De hecho, se ha demostrado para otras especies de tortuga que una misma especie puede presentar cierta plasticidad fenotípica que le permitiría vivir en ambientes con características distintas (Fritz *et al.* 2005, 2007; Fusco & Minelli 2010). En ese sentido, la construcción de cuevas menos profundas en poblaciones del norte de la distribución de *C. chilensis* sería coherente con la existencia de condiciones climáticas que no hacen necesario la construcción de cuevas profundas para pasar la etapa fría del año. A su vez, comparado con la región del Monte, el Chaco seco presenta condiciones edáficas y de cobertura vegetal diferentes (Torrela & Adámoli 2005). La condición climática inversa para las tortugas de poblaciones del sur hace

necesaria, como rasgo etológico adaptativo, la construcción de cuevas para el sopor invernal. De la misma manera, el espectro trófico, no sería válido como rasgo para distinguir especies, ya que se halla claramente influenciado por la oferta alimentaria del ambiente. Por último, respecto de la presencia / ausencia de garrapatas, esto también es explicable en términos de ambiente. De hecho, para la presente Tesis encontramos tortugas en la Ecorregión del Monte, con la morfología carapacial correspondiente al morfo *chilensis* (Figs.12 y 13) y carentes de garrapatas. Inversamente, todas las tortugas observadas en la zona de la Salina Grande (formación vegetal típica del Monte) en Catamarca presentaron garrapatas, indistintamente de si su morfología carapacial correspondía a los morfos *petersi*, *chilensis* o *donosobarrosi*. Respecto de este tema, y para cerrar esta parte de la discusión, la especie de garrapata encontrada en las tortugas de la Ecorregión Chaco Seco (*Amblyoma argentinae*), si bien se encuentra principalmente parasitando a estas tortugas, también se la ha encontrado en otros reptiles (*Bothrops*, *Crotalus terrificus*, *Boa constrictor occidentalis*, etc.) y en anfibios del género *Bufo* (Guglielmone *et al.* 2001). En base a estas evidencias, la propuesta de Richard (1999), quien consideró la presencia de garrapatas en las poblaciones de tortugas de la Ecorregión Chaco Seco y la ausencia de estos ácaros en las tortugas del Monte, como un motivo más para considerarlas especies distintas, no sería válida, ya que, al encontrarse en varias especies de reptiles, no habría motivo para que no parasite las poblaciones más australes, excepto por las condiciones climáticas de esta última región. Esto último se ve reflejado en que la distribución de las especies de Ixodidae (Acari) se centra principalmente en el norte y centro de nuestro país (19 de 22 especies), y sólo tres especies se encontraron en Patagonia, todas ellas en mamíferos como hospedadores (Guglielmone & Navas 2006).

Finalmente, los resultados aquí obtenidos corroboran la hipótesis de que *C. chilensis* es la única especie válida de tortuga terrestre para las regiones áridas de Argentina y complementan los resultados presentados por Fritz *et al.* (2012). La variabilidad genética encontrada en esta tesis fue mayor a la variabilidad conocida hasta el momento. El mayor número y variedad de evidencia obtenida para esta tesis permite diferir de Fritz *et al.* (2012) en lo concerniente a la hipótesis biogeográfica propuesta por estos autores (ver más adelante).

Registro fósil y cambios ambientales

Como se mencionó en la sección Introducción, Auffenberg (1971) consideró a *Chelonoidis hesterna*, de fines del Mioceno de Colombia, como el posible ancestro de *C. carbonaria* y *C. denticulata*, y que en otra línea evolutiva aparte habría originado a *C. nigra* y *C. chilensis*. Según este autor, a partir del descubrimiento de la tortuga fósil *C. hesterna*, la separación entre *C. carbonaria* y *C. denticulata* habría ocurrido hacia fines del Mioceno (12,55 ma). Caccone *et al.* (1999), en base a datos moleculares y al origen geológico de las Islas Galápagos, consideraron que la separación entre *C. nigra* y *C. chilensis* ocurrió hace 6-12 ma. Posteriormente, Vargas-Ramírez *et al.* (2010) realizó una nueva calibración, a partir del análisis de secuencias del gen del citocromo b, y encontró datos prácticamente coincidentes con los ya publicados para la separación *carbonaria / denticulata* (13,32 ma.), pero algo distintos para el caso *nigra / chilensis* (8,98 ma.).

El registro fósil de la parte más austral de Sudamérica presenta formas que corresponderían a ancestros de *C. chilensis* tanto en la quebrada de Saguay (Bolivia) (?*Chelonoidis*) como en Cabeza Blanca (Patagonia Central Argentina) (*C. gringorum*), de fines del Oligoceno-principios del Mioceno (Broin & De La Fuente 1993). Posteriormente, De La Fuente (1994) describió nuevos especímenes fósil asignables a *C. gringorum*, un ancestro directo de *C. chilensis*, el cual procedía del Mioceno temprano de la barranca sur del Valle del río Chubut, provincia de Chubut. Por lo tanto, durante el Mioceno el género *Chelonoidis* habría alcanzado una amplia distribución geográfica en América del Sur y, ocupando casi toda la extensión de lo que hoy es el territorio de la República Argentina y parte de Bolivia y Paraguay. Según Richard (1999), esta especie antecesora a *C. chilensis*, habría ocupado ambientes con características similares al actual bosque chaqueño. Según Báez & Scillato Yané (1979), durante la primera mitad del Mioceno, un clima más templado y equilibrado dio lugar al desarrollo de un bosque subtropical que permitió la presencia de biota típica chaqueña en latitudes hasta los 50°S, esto es al nivel de lo que hoy es centro-sur de la provincia de Santa Cruz.

Sobre este escenario es donde pudo haber ocurrido un evento vicariante que explique la separación de ambos haplogrupos de *C. chilensis* a partir de un stock continuo inicial anterior al Mioceno. Este evento vicariante habría permitido una separación suficiente para que evolucionen dos cariomorfos dentro de la especie en cuestión.

Los cambios ambientales que se sucedieron en Patagonia durante fines del Mioceno-principios del Plioceno (11-3 ma.) dieron lugar a “La Edad de las Planicies del Sur” (Pascual *et al.* 1996; Ortiz-Jaureguizar 1998). Es durante este periodo cuando los movimientos tectónicos producen el levantamiento de la cordillera de los Andes. Como es sabido, el nuevo cordón montañoso alcanzó una elevación suficiente como para bloquear el paso de los vientos cargados de humedad desde el Océano Pacífico. Estos cambios tuvieron un fuerte impacto ecológico ya que los ambientes de la vertiente atlántica trocaron hacia la aridez, situación que se mantiene hasta la actualidad. Además, hacia fines del Mioceno se registró un descenso de la temperatura, reflejado en el avance glacial en el sur de Argentina (Baéz & Scillato Yané 1979; Ortiz-Jaureguizar & Cladera 2006). Ya que la fauna chaqueña estaba adaptada a vivir en sabanas boscosas, los cambios climáticos mencionados provocaron que esta se extinga localmente en sus poblaciones más australes a causa de una retracción faunística hacia el norte. No obstante ello, esta situación no habría operado de la misma manera en todos los vertebrados ya que, para *C. chilensis*, las nuevas condiciones climáticas no habrían sido suficientemente significativas como para provocar la desaparición de la especie del norte de Patagonia (Richard 1999). Al igual que estas tortugas, el género *Tupinambis* tuvo una distribución similar durante fines del Miocenos (Ceï & Scolaro 1982) y se considera que en su historia biogeográfica reflejó el mismo patrón vicariante observado (dos grupos de individuos, uno en el sur y el otro en el norte. El del sur más adaptado a condiciones de aridez). En el caso de este lagarto, algunas de las poblaciones más australes también habrían soportado los cambios climáticos mencionados y, habrían mantenido estable la población que luego originaría a *T. rufescens* (Albino *et al.* 2006; Albino 2011). Según Ávila *et al.* (2006) otro género de reptiles (*Liolaemus*) también sobrevivió en Patagonia durante este período. Por todas estas evidencias y ejemplos similares de otras especies de reptiles, y en coincidencia con Richard (1999), yo también considero que esta hipótesis de una adaptación y aislamiento de las poblaciones más australes es la más apropiada para explicar la historia biogeográfica de *C. chilensis*.

Con el fin de establecer cuales habrían sido las áreas donde esos refugios faunísticos habrían ocurrido, Sérsic *et al.* (2011) realizando un análisis filogeográfico comparado entre especies vegetales y animales de Argentina, proponen numerosas áreas que pudieron haber actuado como refugios durante este período. Richard (1999) consideró como posible refugio un área entre los ríos pre-Colorado y pre-Negro donde habrían sobrevivido y adaptado las poblaciones más australes de *C. chilensis*. En ese

refugio se habrían mantenido condiciones de mayor humedad y calor, según lo infiere a partir del registro fósil de edentados (Baéz & Scillato Yané 1979).

Contrariamente a lo expuesto, Fritz *et al.* (2012) plantearon una hipótesis biogeográfica en la cual *C. chilensis* no habría sobrevivido a los cambios climáticos del Plio-Pleistoceno de Patagonia y, su distribución se retrajo al centro-norte de nuestro país durante ese período. En ese contexto, esos autores propusieron que las poblaciones más australes de la especie en la actualidad se han originado a partir de una recolonización a partir de un rápido evento de expansión en sentido norte – sur desde las poblaciones del norte de la distribución. Esa colonización rápida se habría producido durante el Holoceno mediante tortugas que llegaron derivando (“rafting”) por lo que es actualmente el Río Desaguadero que lleva aguas de deshielo desde La Rioja, San Juan y Mendoza a través de La Pampa (Río Salado) hasta desembocar en el Río Negro. Esos autores justificaron ese modo de dispersión norte-sur a partir de los datos de secuencias de citocromo b, donde las poblaciones australes (según los datos de Fritz *et al.* 2012) son más homogéneas y en consecuencia se habrían originado a partir de una misma población del norte que fue arrastrada y llevada a salvo aguas abajo por el impresionante caudal de agua del Río Desaguadero durante la postglaciación. Esta situación también se ha descrito para la dispersión de Emydidos europeos (Sommer *et al.* 2007).

Pero si se incorporan los datos de citogenética que aquí se presentan, la hipótesis de dispersión norte sur (sin importar si ella ocurrió mediante “rafting” o no) se cae. Esto es a causa que el surgimiento de los dos cariomorfos descritos (A y B) no podría haber sucedido, y menos aun mantenerse en el tiempo, sin una estructura poblacional que consista en un grupo pequeño de individuos, aislado y con un número bajo de migrantes por generación (Wright 1982; Cothran & Smith 1983; Chesser & Baker 1986; King 1995). Complementariamente a la información citogenética, por medio de la hipótesis de recolonización norte - sur tampoco es posible explicar las diferencias moleculares (10 mutaciones) que existen entre ambos haplogrupos (Monte y Chaco Seco). Referido a esto último, según varios autores (Starkey *et al.* 2003; González-Porter *et al.* 2011), una tasa de sustitución nucleotídica similar a la que ocurre en otras tortugas, con un porcentaje de divergencia del 1,3% estaría implicando, como mínimo, 100.000 años de separación entre ambos haplogrupos

Por lo expuesto y en base al conjunto de evidencias reunidas en este trabajo de tesis estoy en condiciones de afirmar que: (1) la distribución amplia de *C. chilensis* durante el Plio-Pleistoceno se vio fragmentada por las condiciones de frío y aridez crecientes en el

sur, (2) un grupo de esas tortugas permaneció en refugios en Patagonia, donde un reordenamiento cromosómico ocurrió y se fijó, originando un nuevo cariomorfo (B), (3) durante la formación de la Ecorregión del Monte este grupo de tortugas se expandió demográficamente hacia el norte.

Respecto del haplogrupo que permaneció en el norte y que corresponde a la Ecorregión Chaco Seco, también podría estar atravesando un proceso de expansión poblacional leve (detectado por la prueba de R_2) que no pudo ser corroborado por las pruebas que se basan en el espectro de las diferencias pareadas (*mismatch* e índice de rg) dada la explotación de tortugas que ocurre desde 1960, con auge en la década del '80, para satisfacer el comercio de mascotas (Waller 1997; Richard 1999). El sur de Santiago del Estero y norte de Córdoba fue una región con una gran abundancia de tortugas, que hoy se ve claramente diezmada y fragmentada ambientalmente, particularmente en la segunda provincia mencionada (ver más adelante). El haplotipo C13 (presente en numerosas localidades y en gran frecuencia) puede haber sido el reflejo de esa expansión poblacional hacia el centro-sur de Argentina. Por lo tanto, ambos haplogrupos parecerían estar expandiendo su distribución en sentidos norte – sur y sur – norte encontrándose en el centro – oeste de nuestro país, lugar que habría sido parte de su distribución ancestral.

La presencia de ambos haplogrupos en el sur de Catamarca y el suroeste de Santiago del Estero se explica por la influencia de la parte norte de la Salina Grande, y en su extensión santiagueña hacia el este, la Salina de Ambargasta. Estas salinas y sus ambientes ecotonaes hacen posible la existencia de mosaicos ambientales con vegetación halófila, propia de este tipo de zonas salitrosas, coexistiendo con ambientes de Bosque Chaqueño e intrusiones de formaciones vegetales características de la Ecorregión del Monte de Llanuras y Mesetas (Reati *et al.* 2002; Rosacher 2004; Ruiz Posse *et al.* 2007). El hallazgo de un espécimen de esta tortuga en esta región, la cual presentó características combinadas de los dos grupos (haplogrupo del Monte y Cariomorfo del Chaco Seco) es un reflejo de este contacto secundario.

Análisis ecológico

Como brevemente se resumió en la sección Introducción, pocos trabajos han sido publicados acerca de la densidad o abundancia relativa de *Chelonoidis chilensis* en

Argentina y nada se sabe del Chaco Seco de Paraguay y Bolivia. En Argentina, estimaciones de abundancia están disponibles para dos localidades de la Ecorregión del Monte (Waller & Micucci 1997; Richard 1999), una del Chaco Seco (Auffenberg 1969) y algunos comentarios hechos por Cei (1986) y Chébez (2008) y (Auffenberg 1969) pero estos autores no proveyeron ninguna información metodológica respecto de los datos presentados. Por el contrario, aunque sin soporte estadístico, las estimaciones de Waller & Micucci (1997) y Richard (1999) fueron obtenidas usando una metodología reproducible que contextualizó sus resultados. Las estimaciones de estos autores variaron desde 1 tortuga / Ha a 11 tortugas / Ha (Richard 1999), pasando por valores intermedios (3/4 tortugas / Ha; Waller & Micucci 1997) para especímenes de la Ecorregión del Monte de las provincias de Río Negro y Neuquén respectivamente. Si el número de tortugas que nosotros encontramos fuera expresado en relación al área total cubierta por el método de transectas en cada lugar (16,8 Ha), nuestros resultados serían: 1 tortuga / 16,8 Ha (Laguna La Amarga); 1 tortuga / 8,4 Ha (Salina Grande) y; 1 tortuga / 2,4 Ha (PN Copo). Nuestros resultados del PN Copo son realmente más bajos que aquellos publicados por Waller & Micucci (1997) y Richard (1999) para el morfo más austral de la especie. No obstante, diferentes lugares se convierten en totalmente comparables sólo bajo las mismas condiciones metodológicas. Así, una característica importante de nuestros datos es la presencia de diferencias significativas entre la abundancia de tortugas de Tío Pozo (0) y el PN Copo (7) usando la misma metodología con dos días de diferencia y sin variaciones de temperatura y lluvias entre las dos localidades (Tablas 11 y 12). Como oportunamente se resumió en la sección Materiales y Métodos, Tío Pozo puede ser caracterizada como un bosque del Chaco Seco degradado (ganado, extracción forestal selectiva) mezclado con un mosaico de áreas producto de la influencia del Río Dulce en el este y por la influencia de la Salina de Ambargasta en el norte y noroeste. Estos factores (ambientes salitrosos, zonas húmedas influenciadas por el río y sobrepastoreo por el ganado) están ausentes en el PN Copo. El PN Copo está formado por bosque árido del Chaco Seco típico y bien conservado, dominado por árboles xerofíticos como el “Quebracho Colorado Santiagueño”, *Schinopsis lorentzii*, “Quebracho Blanco”, *Aspidosperma quebracho blanco* y “Guayacan”, *Caesalpinia paraguariensis*, con sabanas de herbáceas o Aibales de *Elionurus* sp., las últimas dos naturalmente ausentes en Tío Pozo. La densidad poblacional humana, rutas, vías de tren y otros caminos son más pequeños o ausentes en el PN Copo y en áreas aledañas cuando se compara con Tío Pozo. Además, la zona de Tío Pozo es uno de los pocos lugares remanentes en los cuales las tortugas son

ofrecidas y vendidas por los habitantes locales a los costados de la ruta nacional 9 al sur de la ciudad de Loreto. Este área es también parte de la región a partir de la cual las tortugas silvestres fueron extraídas por lo menos desde 1960 (ver Waller 1997) para satisfacer el comercio interno de mascotas. Así, la degradación forestal por parte del ganado (afortunadamente en ausencia de agricultura a gran escala), la presencia de población humana rural, la presencia de animales domésticos y la formación de “peladares” peridomésticos (ver Morello *et al.* 2006) junto con una red importante de caminos y algunos centros urbanos cercanos (Loreto, Villa Atamísqui) potencian el impacto de la extracción histórica de tortugas para satisfacer el comercio de mascotas. Todos estos factores podrían estar explicando la abundancia cero encontrada en Tío Pozo comparada con los valores relativamente altos encontrados en el PN Copo. Finalmente, las diferencias entre ambos sitios aumenta si agregamos siete tortugas encontradas en el camino de acceso al PN Copo, aumentando el número de tortugas a 14 especímenes dentro del área protegida (PN Copo) y áreas aledañas (Río Muerto), para el mismo tiempo de trabajo entre ambos sitios estudiados. Tres (dos hembras y un macho) de las siete tortugas adultas (cuatro machos y tres hembras) las encontramos recientemente muertas en el acceso al PN Copo, presumiblemente por la exposición a las altas temperaturas. Esto fue inferido porque las tortugas se encontraban literalmente “atrapadas en la ruta” ya que ésta a lo largo de largos tramos (50-100mts), se encuentra aproximadamente 40 cm por debajo de los terrenos que la delimitan y las paredes que la contienen son totalmente verticales. La alta abundancia de tortugas y el movimiento de éstas a ambos lados del camino causan que, en algunos puntos, las tortugas entren a la ruta y queden atrapadas allí. Estas tortugas mueren por sobrecalentamiento (45°C al mediodía cerca del suelo) o porque se transforman en presas fáciles para predadores oportunistas (ocasionalmente, para la colecta por humanos) o son atropelladas por los vehículos que circulan por allí.

Se pueden inferir una situación similar a la encontrada en Tío Pozo (abundancia cero) para el valor cero de tortugas vivas registrado con la búsqueda al azar para detectar P/A en las localidades del norte de Córdoba en relación a otras localidades en el Chaco Seco. De hecho, las localidades del norte de Córdoba están bien representadas en colecciones herpetológicas (Cabrera 1998) indicando que *C. chilensis* fue muy común en esta región del Chaco Seco. Una de estas localidades (La Posta) fue señalada por Auffenberg (1969) como una zona de alta densidad de tortugas (20/30 tortugas / Ha). Aunque estos valores no fueron soportados por métodos reproducibles y, por lo tanto, corresponden a una apreciación del autor más que a la realidad, no hay

dudas que esta zona del norte de Córdoba fue muy rica en tortugas. Es sabido que uno de los criaderos más famosos (que en realidad eran acopiadores de tortugas silvestres) del país había operado ahí (en Sebastián Elcano) y que la mayoría de las tortugas destinadas a satisfacer los mercados interno y externo provenía del norte de Córdoba y del centro y sur de Santiago del Estero (Waller 1997). La situación de las tortugas del Chaco Seco de las localidades del norte de Córdoba está muy afectada por la transformación del bosque nativo en agroecosistemas de gran escala (principalmente por la producción de soja), una situación que no ocurre en la zona de Tío Pozo. En Tío Pozo, la influencia de suelos bajos y salinosos permite sólo la agricultura familiar en pequeñas chacras. La deforestación que ha operado con una gran intensidad en el bosque del Chaco Seco del norte de Córdoba no se expresa en la cantidad de áreas deforestadas respecto de otras provincias pero sí en la proporción de bosque perdido durante los últimos años respecto del total original de cobertura boscosa de esa provincia (Montenegro *et al.* 2004). Estos autores señalan a Córdoba como la provincia argentina más deforestada del Chaco Seco con un 10% de bosque perdido entre 1998 y 2002 (seguida de Santiago del Estero: 4,42%; y Chaco: 2,31%). Como consecuencia, el bosque de Chaco Seco del norte de Córdoba está enormemente reducido y fragmentado. Además, los pequeños remanentes de bosque carecen de protección excepto por la Reserva Provincial Chancaní y la Reserva Natural Laguna de Mar Chiquita. Afortunadamente, una población de tortugas fue recientemente reportada para esta última reserva y las áreas no protegidas circundantes (Briguerá *et al.* 2006), pero no hay registros para la Reserva Provincial Chancaní.

Finalmente, proponemos que ambas metodologías usadas en esta tesis deberían emplearse en futuros programas de monitoreo para *Chelonoidis chilensis*. Según cuál sea el objetivo de futuros trabajos, el método de transectas parece apropiado para estimar tanto abundancia relativa como densidad poblacional por métodos de distancia (Buckland *et al.* 2001). Contrariamente, sugerimos que la búsqueda al azar con tiempo-esfuerzo fijo es más sencilla para realizar en el campo y debería ser empleado para obtener datos de P/A en el caso de estudios en los que sólo se busquen poblaciones de tortugas en lugar de una estimación de la densidad o abundancia.

Conclusiones e implicancias para la conservación de *Chelonoidis chilensis*

En base a los análisis molecular del gen del citocromo b y cromosómico de las tortugas terrestres de las regiones áridas de Argentina y, teniendo en cuenta la variabilidad general de la morfología de las mismas, consideramos que:

1. La variabilidad genética observada corresponde a una única especie: *Chelonoidis chilensis* (Gray 1870), con una gran variabilidad fenotípica. De esta manera, los datos aquí presentados corroboran, con mayor evidencia, lo recientemente postulado por Fritz et al. (2012) sobre la base del estudio de un menor número de ejemplares y de poblaciones. Respecto de los datos publicados por estos autores en este Trabajo de Tesis se describen 11 haplotipos nuevos: C2, C3, C6, C14, C15, C16, C17, C18, C19, C20 y C21.
2. La variabilidad genética observada se explica bien por la existencia de un evento vicariante a causa de los cambios climáticos del Plio-Pleistoceno. Estos cambios generaron dos grupos, uno con distribución en la actual Ecorregión del Monte de Llanuras y Mesetas y en parte de la zona más austral de la actual Ecorregión Chaco seco, mientras que el otro grupo resulta exclusivo de la Ecorregión Chaco Seco. El contacto secundario entre ambos grupos ocurre en la actual zona sur de la Ecorregión Chaco Seco a nivel del norte de la Salina Grande (sudeste de Catamarca) y la parte sur de Santiago del Estero.
3. Ante la ausencia de métodos estandarizados para trabajar con las tortugas de zonas áridas de nuestra región, consideramos como útiles a las metodologías aquí propuestas para estimar abundancia (método de transectas) y para corroborar presencia/ausencia (método de búsqueda al azar) de poblaciones de *Chelonoidis chilensis*.
4. Respecto de la abundancia de tortugas estimada en este trabajo para cinco poblaciones mediante el empleo del método de transectas, consideramos que, si bien los resultados obtenidos mediante éste método resultan metodológicamente incomparables con los resultados de otros autores, los valores de abundancia aquí obtenidos parecen bajos. Esta situación resulta preocupante para algunas de las localidades estudiadas (Centro-Sur de Santiago del Estero en Paraje Tío Pozo). De la misma manera, los esfuerzos de búsqueda al azar realizados en localidades

cercanas en la provincia de Córdoba han arrojado resultados negativos para la presencia de tortugas, indicando que su abundancia allí también ha de ser muy baja.

5. Proponemos que *C. chilensis* debiera ser considerada como Amenazada, en vez de Vulnerable, tal cual ha sido recientemente categorizada (Prado *et al.* 2012). Las razones para ello son: (a) valores bajos de abundancia encontrados en la mayoría de las localidades, (b) la aparente ausencia de poblaciones en gran parte de las localidades estudiadas mediante el método de búsqueda al azar, (c) la existencia de una clara regresión, disminución espacial y pérdida de calidad de hábitat sugerida por diversos trabajos, fundamentalmente para la Ecorregión Chaco Seco, y (d) la existencia de un mercado ilegal aún prevalente y no cuantificado ni controlado efectivamente.

6. Respecto de la situación Amenazada para la especie, esto es mucho más nítido para algunas de sus poblaciones que por sus características genéticas y la ausencia de áreas de protección efectiva, demandarían mayor atención y consecuentes efectos de protección. Estas poblaciones son las correspondientes a la zona sureste de Catamarca, centro-sur de Santiago del Estero, y posiblemente norte de Córdoba. Esta área del Chaco Seco y sus ecotonos con el Monte de Llanuras y Mesetas estarían protegidos con cierto grado de efectividad sólo en la Reserva Provincial Chancaní (aún no se conoce que allí habite *Chelonoidis chilensis*) y la Reserva Natural Mar Chiquita (con la especie corroborada para el área protegida), ambas en la provincia de Córdoba.

7. La parte norte del Chaco Seco presenta un mejor panorama para la conservación de la especie. Ésta cuenta con una serie de áreas protegidas efectivas en las provincias de Santiago del Estero (Parque Nacional Copo), Chaco (Reserva Fuerte Esperanza y Refugio Loro Hablador, y futura creación del Parque Nacional La Fidelidad) y Formosa (Reserva Natural Formosa), existiendo una gran deuda ambiental por parte de la provincia de Salta.

Bibliografía

- Albino A. M. 2011.** Evolution of Squamata reptiles in Patagonia base on the fossil record. *Biological Journal of the Linnean Society* **103**: 441-457.
- Albino A. M., Brizuela S. & Montalvo C. I. 2006.** New *Tupinambis* remains from the Late Mioceno of Argentina and a review of the South American miocene Teiids. *Journal of Herpetology* **40**: 206-213.
- Amato M. L., Brooks R. J. & Fu J. 2008.** A phylogeographic analysis of populations of the wood turtle (*Glyptemys insculpta*) throughout its range. *Molecular Ecology* **17**: 570-581.
- Arif I. A. & Khan H. A. 2009.** Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation* **32**: 9-17.
- Attum O., Baha el Din S., Carranza S., Earley R., Arnold E.N. & Kingsbury B. 2007:** An evaluation of the taxonomic validity of *Testudo weneri*. *Amphibia-Reptilia* **28**: 393-401.
- Ávila L. J., Morando m. & Sites J. W. JR. 2006.** Congeneric phylogeography: hypothesizing species limits and evolutionary processes in Patagonian lizards of the *Liolaemus boulengeri* group (Squamata: Liolaemini). *Biological Journal of the Linnean Society* **89**: 241-275.
- Auffenberg W. 1969.** Land of the Chaco tortoise, *Geochelone chilensis*. *International Turtle and Tortoise Society Journal* **3**: 1-6.
- Auffenberg W. 1971.** A new fossil tortoise, with remarks on the origin of South American Testudinines. *Copeia* **1971**: 106:117.
- Austin J.J. & Arnold E.N. 2001.** Ancient mitochondrial DNA and morphology elucidate an extinct island radiation of Indian Ocean giant tortoises (*Cylindraspis*). *Proc. R. Soc. Biol. Sci.* **268**: 2515–2523.
- Avise J. C. 2000.** Phylogeography: the history and formation of species. *Harvard University Press*, Cambridge (MA).
- Avise J.C., Arnold J., Ball R.M. et al. 1987.** Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA Bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**: 489-522.
- Baéz A.M. & G.J. Scillato Llané. 1979.** Late cenozoic environmental changes in temperate Argentina. Pp. 141-156. En. Duellman W. (Ed.). *The South American*

Herpetofauna: Its origin, evolution and dispersal. 485 pp. *Museum of Natural History, University of Kansas, Monograph 7, USA.*

Ballard J. W. & Whitlock M. C. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* **13**: 729-744.

Belmonte F. T. 1991. Comportamiento reproductivo de *Chelonoidis chilensis* (Reptilia, Testudines) en cautiverio. *Acta Zoológica Lilloana* **XL**: 13-20.

Bertonatti C. & Corcuera J. 2000. Situación Ambiental Argentina 2000. *Fundación Vida Silvestre Argentina, Buenos Aires*, 440 pp.

Bickham J. W. 1975. A cytosystematic study of turtles in the genera *Clemmys*, *Mauremys* and *Sacalia*. *Herpetologica* **31**:198–204

Bickham J. W. 1976 A meiotic analysis of four species of turtles. *Genetica* **46**:193–198.

Bickham J. W. & Baker R. J. 1976 a. Karyotypes of some neotropical turtles. *Copeia* **4**: 703-708.

Bickham J. W. & Baker R. J. 1976 b. Chromosome homology and evolution of Emydid turtles. *Chromosoma* **54**: 201-219.

Bickham J. W. & Carr J. L. 1983. Taxonomy and phylogeny of the higher categories of cryptodiran turtles based on a cladístico analysis of chromosomal data. *Copeia* **4**: 918-932.

Böhme M. U., Fritz U., Kotenko T., Džukić G., Ljubisavljević K., Tzankov N. & Berendonk T. U. 2007. Phylogeography and cryptic variation within the *Lacerta viridis* complex (Lacertidae, Reptilia). *Zoologica Scripta* **36**:119-131.

Bowen B. W., Nelson W. S. & Avise J. C. 1993. A molecular phylogeny for marine turtles: Trait mapping, rate assessment, and conservation relevance. *Proc. Natl.Acad. Sci.* **90**: 5574-5577.

Broin F. De & De La Fuente M.S. 1993. Les tortues fossiles d'Argentine: première synthèse. *Actes Table Ronde Européenne, Paléontologie et Stratigraphie d'Amérique Latine*, Lyon 1992. *Doc. Lab. Geol. Lyon* **125**: 73-84.

Brown W. M., George M. Jr. & Wilson A. C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **76**: 1967-1971.

- Bruère A. N. & Ellis P. M. 1979.** Cytogenetics and reproduction of sheep with multiple centric fusions (Robertsonian translocations). *Journal of Reproduction Fertility* **57**: 363-375.
- Buckland S. T., Anderson D. R., Burnham K. P., Laake J. L., Borchers D. L. & Thomas L. 2001.** Introduction to distance sampling estimating abundance of biological populations. *Oxford University Press*
- Bueno M. L. 2003.** Importancia de la caracterización genética de especies silvestres en zoológicos, unidades de rescate de fauna y centros de acopio. *Lyonia* **3**: 45-56.
- Burkart, R., Bárbaro, N. O., Sánchez, R. O. & Gómez, D.A. 1999.** Ecorregiones de la Argentina. Administración de Parques Nacionales y Secretaria de Recursos Naturales y Desarrollo Sustentable, Bs. As., 43 pp.
- Buskirk J.R. 1993.** Distribution, status and biology of the tortoise, *Geochelone chilensis*, in Río Negro Province, Argentina. *Stud. Neotrop. Fauna Environ.* **28**: 233-249.
- Cabrera M.R. 1998.** Las tortugas continentales de Sudamérica austral. Córdoba, edición privada del autor, 108 pp., 6 pls.
- Caccone A., Amato G., Gratry O.C., Behler J. & Powell J.R. 1999a.** A molecular phylogeny of four endangered Madagascar tortoises based on mtDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **12**: 1-9.
- Caccone A., Gibbs J.P., Ketmaier V., Suatoni E. & Powell J.R. 1999b.** Origin and evolutionary relationships of giant Galápagos tortoises. *Proceeding of the Natural Academy of Sciences* **96**: 13223-13228.
- Cei J.M. 1986.** Reptiles del centro, centro-oeste y sur de la Argentina. Herpetofauna de las zonas áridas y semiáridas. *Torino, Mus. Reg. Sci. Natur. Torino, Monogr.* **IV**: 1-527.
- Cei J. M. 1993.** Reptiles del Noroeste, Nordeste y Este de la Argentina. Herpetofauna de las selvas subtropicales, Puna y Pampas. *Torino, Mus. Reg. Sci. Natur. Torino, Monogr.* **XIV**: 1-949.
- Cei J. M. & Scolaro J. A. 1982.** A population of Tupinambis from northern Patagonia, South Río Negro River. *Herpetological Review* **13**:1-26.
- Chebez, J. C. 2008.** Los que se van. Fauna argentina amenazada. **Tomo I**: 320 pp, *Albatros*, Bs. As.

- Chebez J. C. & Bertonatti C. 2008.** “Problemática ambiental de la Argentina” en Chebez J. C. 2008. Los que se van. Fauna argentina amenazada. Tomo I: 54-119, Albatros, Buenos Aires.
- Chesser R. K. & R. J. Baker 1986.** On factors affecting the fixation of chromosomal rearrangements and neutral genes: computer simulations. *Evolution* **40**: 625–632.
- Clement M., Posada D. & Crandall K.A. 2000.** TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*. **9**: 1657-1660.
- Cothran E. G. & M. H. Smith 1983.** Chromosomal and genetic divergence in mammals. *Syst. Zool.* **32**: 360–368.
- Crumly C. R. 1984.** A hypothesis for the relationship of land tortoise genera (family Testudinidae). *Studia Geol. Salamanticensia* **1**: 115–124.
- Cruzan M. B. & Templeton A. R. 2000.** Paleoecology and coalescence: phylogeographic análisis of hypotheses from the fósil record. *TREE* **15**: 491-496.
- De La Fuente M. S. 1994.** Descripción de nuevos especímenes y relaciones filogenéticas de *Chelonoidis gringorum* (Simpson 1942) (CHELONII: TESTUDINIDAE) del Mioceno Temprano de Patagonia Central, Argentina. *Stvdia Geologica Salamanticensia* **XXX**: 107-131.
- De La Fuente M. S. 1997.** Las tortugas pleistocenas del extremo meridional de la provincia de Santa Fe, Argentina. *Stvdia Geologica Salamanticensia* **33**: 67-90.
- Depaulis F., Mousset S. & Veuille M. 2003.** Power of neutrality tests to detect bottlenecks and hitchhiking. *Journal of Molecular Evolution* **57**: S190-S200.
- DeSalle R. & Amato G. 2004.** The expansion of conservation genetics. *Nature* **5**: 702-712.
- Dowler R. C. & Bickham J. W. 1982.** Chromosomal relationships of the tortoises (family Testudinidae). *Genetica* **58**: 189-197.
- Eisner T., Lubchenco J., Wilson E. O., Wilcove D. S. & Bean M. J. 1995.** Building a scientifically sound policy for protecting endangered species. *Science* **268**: 1231-1232.
- Ergueta S. P. & de Morales C. 1996.** El libro rojo de los vertebrados de Bolivia. CDC Bolivia. 347 pp.
- Ernst C. H. & Barbour R. W. 1989.** Turtles of the world. Smithsonian Institution Press, Washington D.C., and London, 313 pp.

- Farías I. P., Jerozolinski A., Melo A., das Neves Viana M., Martins M. & dos Santos Monjeló L. A. 2007.** Population genetics of the Amazonian tortoises, *Chelonoidis denticulata* and *C. carbonaria*, (Cryptodira: Testudinidae) in an area of sympatry. *Amphibia-Reptilia* **28**: 357-365.
- Feldman C. R. & Parham J. F. 2002.** Molecular phylogenetics of Emydine turtles: Taxonomic revision and the evolution of shell kinesis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **22**: 388-398.
- Fernández M. S. 1988.** Las Testudinidae (Reptilia: Chelonii) argentinas: Osteología, sistemática y distribución geográfica. Tesis doctoral N° 505, Universidad Nacional de La Plata.
- Fernández M. S. & Basso N. G. 1992.** Análisis de las vocalizaciones de *Chelonoidis chilensis* (Gray) (Chelonii: Testudinidae). *Acta Zoologica Lilloana* **41**: 341-344.
- Fitch W. M. 1971.** Toward defining the course of evolution : Minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology* **20**: 406-416.
- Fleischer R. C., Perry E. A., Muralidharan K., Stevens E. E. & Wemmer C. M. 2001.** Phylogeography of the Asian elephant (*Elephas maximus*) based on mitochondrial DNA. *Evolution* **55**: 1882-1892.
- Forbes W. C. Jr 1966.** A cytological study of the Chelonia. Unpublished PhD dissertation. University of Connecticut, Storrs.
- Frankham R. 2003.** Genetics and conservation biology. *C. R. Biologies* **326**: 22-29.
- Frankham R., Ballou J. D. & Briscoe D. A. 2003.** Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, Nueva York. 617pp.
- Freiberg M.A. 1973.** Dos nuevas tortugas terrestres de Argentina. *Bol. Soc. Biol. Concepción* **46**: 81-93.
- Freiberg M. A. 1979.** El mundo de las tortugas (2º ed.). Ed. Albatros. 154 pp. Argentina.
- Fritz U., Alcalde L., Vargas-Ramírez M., Goode E., Fabius-Turoblin D. U. & Praschag, P. 2012.** Northern genetic richness and southern purity, but just one species in the *Chelonoidis chilensis* complex. *Zoologica Scripta* **41**: 220-232.
- Fritz U., Auer M., Bertolero A., Cheylan M., Fattizzo T., Hundsdörfer A. K., Sampayo M. M., Pretus J. L., Široký P. & Wink M. 2006.** A rangewide phylogeography of

Hermann's tortoise, *Testudo hermanni* (Reptilia: Testudines: Testudinidae): implications for taxonomy. *Zoologica Scripta* **35**: 531-543.

Fritz U. & Beninda-Emonds O. R. P. 2007. When genes meet nomenclature: Tortoise phylogeny and the shifting generic concepts of *Testudo* and *Geochelone*. *Zoology* **110**: 298-307.

Fritz U., Harris D.J., Fahd S., Rouag R., Gracia Martínez E., Giménez Casalduero A., Široký P., Kalboussi M., Jdeidi T.B. & Hundsdörfer A.K. 2009. Mitochondrial phylogeography of *Testudo graeca* in the Western Mediterranean: Old complex divergence in North Africa and recent arrival in Europe. *Amphibia-Reptilia* **30**: 63- 80.

Fritz U., & Havaš P. 2007. Checklist of chelonians of the world. *Vertebrate Zoology* **57**: 149-368.

Fritz U., Hundsdörfer A.K., Široký P., Auer M., Kami H., Lehmann J., Mazanaeva L.F., Türkozan O. & Wink M. 2007. Phenotypic plasticity leads to incongruence between morphology-based taxonomy and genetic differentiation in western Palaearctic tortoises (*Testudo graeca* complex; Testudines, Testudinidae). *Amphibia- Reptilia* **28**: 97-121.

Fritz U., Široký P., Kami H. & Wink M. 2005. Environmentally caused dwarfism or a valid species – Is *Testudo weissingeri* Bour, 1996 a distinct evolutionary lineage? New evidence from mitochondrial and nuclear genomic markers. *Mol. Phylogenet. Evol.* **37**: 389-401.

Fritz U., Stuckas H., Vargas-Ramírez M., Hundsdörfer A. K., Maran J. & Päckert 2011. Molecular phylogeny of Central and South American slider turtles: implications for biogeography and systematic (Testudines: Emydidae: *Trachemys*). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **50**: 125-136.

Fu Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* **147**: 915-925.

Fu Y. X. & Li W. H. 1993. Statistical tests if neutrality mutations. *Genetics* **133**: 693-709.

Fusco G. & Minelli A. 2010. Phenotypic plasticity in development and evolution: Facuss and concepts. *Phil. Trans. R. Soc. B* **365**: 547-556.

Gallardo, J. M. 1974. Tortugas terrestres argentinas: Observaciones biológicas. *Ciencia e Investigación* **30**: 197-201.

- Gauthier P., Hima K. & Dobigny G. 2010.** Robertsonian fusions, pericentromeric repeat organization and evolution: a case study within a highly polymorphic rodent species, *Gerbillus nigeriae*. *Chromosome Research* **18**: 473-486.
- Gerlach J. 2001.** Tortoise phylogeny and the 'Geochelone' problem. *Phelsuma* **9**: 1-24.
- González-Porter G. P., Hailer F., Flores-Villela O., García-Anleu R. & Maldonado J. E. 2011.** Patterns of genetic diversity in the critically endangered Central American river turtle: human influence since the Mayan age? *Conservation Genetics* **12**: 1229-1242.
- Gray J. E. 1870.** Notes on three species of tortoises living in the Society's Gardens. *Proc. Zool. Soc.*: 706-708.
- Gruss J. X. 1986.** *Geochelone chilensis* en cautividad, descripción. *FVSA - Amphibia & Reptilia (cons.)* **1**: 29-31.
- Guerreiro A., Baldoni J. C. & Brigada A. M. 2005.** Herpetofauna de Sierra de Las Quijadas (San Luis, Argentina). *Gayana* **69**: 6-9.
- Guglielmone A. A., Luciani C. A. & Magnold A. J. 2001.** Aspects of the ecology of *Amblyomma argentinae* Neumann, 1904 [= *Amblyomma testudinis* (Connil 1877)] (Acari: Ixodidae). *Systematic and Applied Acarology Special Publications* **8**: 1-12.
- Guglielmone, A. A. & Nava, S. 2006.** Las garrapatas argentinas del género *Amblyomma* (Acari: Ixodidae), distribución y hospedadores. *RIA (INTA, Argentina)* **35**: 133-153.
- Harding R. M. 1996.** New phylogenies: an introductory look at the coalescent. En: Harey P. H., Leigh Brown A. J., Maynard Smith J. & Nee S. (eds.). *New uses for new phylogenies*. Oxford University Press, Nueva York, EUA. Pp 15-22.
- Harpending H. C. 1994.** Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology* **66**: 591-600.
- Harpending H. C., Sherry S. T., Rogers A. R. & Stoneking M. 1993.** Genetic structure of ancient human populations. *Curr. Anthr.* **34**: 483-496.
- In Den Bosch H. A. J., Odierna G., Aprea G., Barucca M., Canapa A., Capriglione T. & Olmo E. 2003.** Karyological and genetic variation in middle eastern lacertid lizards, *Lacerta laevis* and the *Lacerta kulzeri* complex: a case of chromosomal allopatric speciation. *Chromosome Research* **11**: 165-178.
- Kibbe W. A. 2007.** OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Research* **35**: 43-46.

- Lamb T., Lydeard C., Walker R. B. & Gibbons J. W. 1994.** Molecular systematics of map turtles (*Graptemys*): A comparison of mitochondrial restriction site versus sequence data. *Systematics Biology* **43**:543–559.
- Lanteri A. A. & Confalonieri V. A. 2003.** Filogeografía: objetivos, métodos y ejemplos. Pp. 185-193. *En*: Llorente Bousquets, J. & J.J. Morrone (eds.). *Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía*. Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Lavrenchenko L. A., Nadjafova R. S. & Bulatova N. Sh. 2011.** Three new karyotypes extend a Robertsonian fan in Ethiopian spiny mice of the genus *Acomys* I. Geoffroy, 1838 (Mammalia, Rodentia). *Comparative Cytogenetics* **5**:423-431.
- Le M., Raxworthy C. J., McCord W. P. & Mertz L. 2006.** A molecular phylogeny of tortoises (Testudines: Testudinidae) based on mitochondrial and nuclear genes. *Molecular phylogenetics and evolution* **40**: 517-531.
- Li M., Wei F., Goossens B., Feng Z., Tamate H. B., Bruford M. W. & Funk S. M. 2005.** Mitochondrial phylogeography and subspecific variation in the red panda (*Ailurus fulgens*): implications for conservation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **36**: 78-89.
- Lunt D. H., Whipple L. E. & Hyman B. C. 1998.** Mitochondrial DNA variable number tandem repeats (VNTRs): utility and problems in molecular ecology. *Molecular Ecology* **7**: 1441-1455.
- Martínez P. A., Boeris J. M., Sánchez J., Bolzán A. D. & Ledesma M. A. 2009.** Karyotypic characterization of *Trachemys dorsigni* (Testudines: Emydidae) and *Chelonoidis donosobarrosi* (Testudines: Testudinidae), two species of Cryptodiran turtles from Argentina. *Genetica* **137**: 277-283.
- Maddison W. P. & Maddison D. R. 2011.** Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75. <http://mesquiteproject.org>
- Mockord S. W., Snyder M. & Herman T. B. 1999.** A preliminary examination of genetic variation in a peripheral population of Blanding's turtle, *Emydoidea blandingii*. *Molecular Ecology* **8**: 323-327.
- Monteverde A. 1968.** La reproducción de *Testudo chilensis*. *Neotropica* **14**: 125-126.
- Moritz C. 1999.** Conservation units and translocations: strategies for conserving evolutionary processes. *Hereditas* **130**: 217-228.

- Motte M., Pier Cacciali K. N., Norman Scott F. B. & Aquino A. L. 2009.** Categorización del estado de conservación de los anfibios y reptiles de Paraguay. *Cuadernos de herpetología* **23** (1): 5-18.
- Nei M. 1975.** Molecular population genetics and evolution. *North-Holland, Amsterdam and New York*.
- Ormeño E. A. 1983.** Distribución de la tortuga terrestre *Geochelone chilensis* (Gray) en la Provincia de Mendoza. *Deserta* **7**:179-182.
- Orrego Aravena, R. O. 1979.** Reptiles de la Provincia de La Pampa. *Acta Zoológica Lilloana* **35**: 1-4.
- Ortiz-Jaureguizar E. 1998.** Paleoecología y evolución de la fauna de mamíferos de América del Sur durante la "Edad de las Planicies Australes" (Mioceno Superior-Plioceno-Superior). *Estudios Geológicos* **54**: 161-169.
- Ortiz-Jaureguizar E. & Cladera G. A. 2006.** Paleoenvironmental evolution of southern South America during the Cenozoic. *Journal of Arid Environments* **66**: 498-532.
- Osentoski M. F. & Lamb T. 1995.** Intraspecific phylogeography of the gopher tortoise, *Gopherus polyphemus*: RFLP analysis of amplified mtDNA segments. *Molecular Ecology* **4**: 709-718.
- Paetkau D., Waits L. P., Clarkson P. L., Craighead L., Vyse E., Ward R. & Strobeck C. 2008.** Variation in genetic diversity across the range of North American brown bears. *Conservation Biology* **12**: 418-429.
- Palkovacs E.P., Marschner M., Ciofi C., Gerlach J. & Caccone A. 2003.** Are the native giant tortoises from the Seychelles really extinct? A genetic perspective based on mtDNA and microsatellite data. *Molecular Ecology* **12**: 1403-1413.
- Pascual R., Ortiz-Jaureguizar E. & Prado J. L. 1996.** Land mammals: paradigm of Cenozoic South American geobiotic evolution. In G. Arriata (Ed.), Contribution of Southern South America to Vertebrate Paleontology, *Müncher Geowissenschaftliche Abhandlungen (A)* **30**: 265-319.
- Posada D. & Crandall K.A. 2001.** Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends Ecol. Evol.* **16**: 37-45.
- Posada D. 2008.** jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* **25**: 1253-1256.

Prado W. S., Waller T., Piña C. A., Albareda D. A., Cabrera M. R., Etchepare E., Giraudo A., González Carman V., Prosdocimi L. & Richard E. 2012. Categorización del estado de conservación de las Tortugas y Caimanes de la República Argentina. *Cuadernos de Herpetología*. En prensa.

Pritchard P. C. H. 1979. Encyclopaedia of turtles. TFH Publications, Ney Yersey, USA, 895 pp.

Quay J. R. & Gaimard J. P. 1824. Sous-genre Tortue de Terre- *Testudo* Brongn. Tortue Noire *Testudo nigra*. En : Freycinet M. L. (Ed.). Voyage autour du monde exécuté sur l'Uranie et la Physicienne pendant les années 1817-1820, 174-175. París.

Ramírez-Soriano A., Ramos-Onsins S. E., Rozas J., Calafell F. & Navarro A. 2008. Statistical Power analysis of neutrality tests under demographic expansions, contractions and bottlenecks with recombination. *Genetics* **179**: 555-567.

Ramos –Onsins S. E. & Rozas J. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol. Biol. Evol.* **19**: 2092-2100.

Red List 2012. UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza, red list 2007) (<http://www.iucnredlist.org/search/details.php/9007/summ>).

Richard E. 1988a. Las "Yatache" (*Chelonoidis donosobarrosi*: Chelonii, Testudinidae) de la región del Nevado (Mendoza: Argentina). Apuntes sobre su historia natural. FVSA, *Amphibia y Reptilia* (conservación) **1**: 79-92.

Richard E. 1988b. Notas ecoetológicas sobre las tortugas del complejo *chilensis* (Chelonii: Testudinidae) II. Litofagia y geofagia. *Boletín de la Asociación Herpetológica de Argentina* **4**: 12.

Richard E. 1994. Espectro trófico de *Chelonoidis chilensis* (Chelonii: Testudinidae) en la provincia fitogeográfica del Monte (Mendoza, Argentina). *Cuadernos de Herpetología* **8**: 131-140.

Richard E. 1999. Tortugas de las regiones áridas de Argentina. Buenos Aires, L.O.L.A., Nº10, 200 pp., 8 pls.

Richard E. & De la Fuente M. S. 1992. Notas ecológicas sobre *Chelonoidis donosobarrosi* (Freiberg, 1973) (Chelonii: Testudinidae) en el sur de la provincia de Mendoza (República Argentina). *Acta Zoologica Lilloana* **41**: 349-356.

- Richard E., Gruss J., Micucci P & Waller T. 1988.** Notas ecoetológicas sobre las tortugas del complejo *chilensis* (Chelonii: Testudinidae) I. Comportamiento de ingesta de agua y actividad nocturna. *Boletín de la Asociación Herpetológica de Argentina* **4**: 11.
- Richard E. & Waller T. 2000.** Categorización de las tortugas de Argentina. Capítulo 3, pags 35-44. En: Lavilla, E. O., Richard, E. & Scrochi, G. J. eds. Categorización de los anfibios y reptiles de la República Argentina. Asociación Herpetológica Argentina, 97 pp.
- Rodríguez F., Hammer S., Pérez T., et al. 2009.** Cytochrome b Phylogeography of Chamois (*Rupicapra* spp.). Population contractions, expansions and hybridization governed the diversification of the genus. *Journal of Heredity* **100**: 47-55.
- Rodríguez F., Oliver J. L., Marín A. & Medina J.R. 1990.** The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology*. **142**: 485–501.
- Roger A. R. & Harpending H. 1992.** population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* **9**: 552-569.
- Ronquist F. & Huelsenbeck J.P. 2003.** MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**: 1572-1574.
- Rozen S.& Skaletsky H. 2000.** PRIMER3 on the www for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology* **132**:365–386.
- Ruiz Posse E., Karlin U. O., Buffa E., Karlin M., Gai Levra C. & Castro G. 2007.** Ambientes de las Salinas Grandes de Catamarca, Argentina. *Multequina* **16**: 123-127. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal.
- Salinas M., Altet L., Clavel C., Almela R. M., Bayón A., Burguete I. & Sánchez A. 2009.** Genetic assessment, illegal trafficking and management of the Mediterranean spur-thighed tortoise in southern Spain and northern Africa. *Conservation Genetics* **12**: 1-13.
- Segura A. P. 1944.** Estudio de la primera especie de tortuga fósil de Costa Rica con algunas generalidades sobre el orden testudines. *Escuela Farm. Costa Rica* **7**:9-29.
- Sérsic A. N., Cosacov A., Cocucci A. A., Johnson L. A., Pozner R., Ávila L. J., Sites Jr. J. W. & Morando M. 2011.** Emerging phylogeographical patterns of plants and terrestrial vertebrates from Patagonia. *Biological Journal of the Linnean Society* **103**: 475-494.
- Shaffer H. B., Georges A., FitzSimmons N. & Rhodin A. G. J. 2007.** DEFINING TURTLE DIVERSITY. Proceedings of a workshop on genetics, ethics, and taxonomy of freshwater turtles and tortoises. *Chelonian Research Monographs* 175 pp.

- Simpson G. G. 1942.** A Miocene tortoise from Patagonia. *American Museum Novitates* **1209**: 1–6.
- Simpson G. G., 1943.** Turtles and the origin of the fauna of Latin America. *American Journal of Science* **241**: 413–429.
- Široký, P., & Fritz, U. 2007.** Is *Testudo wernerii* a distinct species? *Biologia* **62**: 228-231.
- Slatkin M. & Hudson R. R. 1991.** Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* **129**: 555-562.
- Slijepcevic P. 1998.** Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. *Chromosoma* **107**: 136-140.
- Sommer R. S., Persson A., Wieseke N. & Fritz U. 2007.** Holocene recolonization and extinction of the pond turtle, *Emys orbicularis* (L. 1758), in Europe. *Quaternary Science Reviews* **26**: 3099–3107.
- Spinks P. Q. & Shaffer H. B. 2005.** Range-wide molecular analysis of the western pond turtle (*Emys marmorata*): cryptic variation, isolation by distance, and their conservation implications. *Molecular Ecology* **14**: 2047-2064.
- Spinks P. Q., Shaffer H. B., Iverson J. B. & McCord W. P. 2004.** Phylogenetic hypotheses for the turtle family Geoemydidae. *Molecular Phylogenetic Evolution* **32**: 164-182.
- Starkey D. E., Shaffer H. B., Burke R. L., Forstner M. R. J. et al. 2003.** Molecular systematic, phylogeography, and the effects of Pleistocene glaciations in the painted turtle (*Chrysemys picta*) complex. *Evolution* **57**:119-128.
- Statsoft Inc. 2001.** Statistica (data analysis software system). Version 6.0.
- Swofford D.L. 2002.** PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), Version 4. Sunderland, MA, Sinauer Associates.
- Tamura K., Dudley J., Nei M. & Kumar S. 2007.** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**:1596-1599.
- Tajima F. 1989.** The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics* **123**: 597-601.
- Teacher A. G. F., Thomas J. A. & Barnes I. 2011.** Modern and ancient red fox (*Vulpes vulpes*) in Europe show an unusual lack of geographical and temporal structuring, and

differing responses within the carnivores to historical climatic change. *BMC Evolutionary Biology* **11**: 214.

Tchaicka L., Eizirik E., De Oliveira T. G., Cándido Jr. J. F. & Freitas T. O. 2007. Phylogeography and population history of the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*). *Molecular Ecology* **16**: 819-838.

Templeton A. R. 2004. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology* **13**: 789-809.

Templeton A. R., Routman E. & Phillips C. A. 1995. Separating population structure from population history: A cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the Tiger Salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics* **140**: 767-782.

Torrella S. A. & Adámoli J. 2006. Situación ambiental de la Ecorregión del Chaco Seco. En: Brown A., Martínez Ortiz U., Acerbi M. & Corcuera J. (eds.). La situación ambiental Argentina 2005, pp 75-82. Buenos Aires, Fundación Vida Silvestre Argentina.

Ulsh B. A., Congdon J. D., Hinton T. G., Whicker F. W. & Bedford J.S. 2001. Culture methods for turtle lymphocytes. *Methods in Cell Science* **22**: 285-297.

Ureña-Aranda C.A. & Espinosa de los Monteros A. 2012. The genetic crisis of the Mexican Bolson Tortoise (*Gopherus flavomarginatus*: Testudinidae). *Amphibia-Reptilia* **33**: 45-53.

Varela R. O. & Bucher E. H. 2002. Seed dispersal by *Chelonoids chilensis* in the Chaco dry woodland of Argentina. *Journal of Herpetology* **36**: 137-140.

Vargas-Ramírez M., Chiari Y., Castaño-Mora O. V. & Menken S. B. J. 2007. Low genetic variability in the endangered Colombian endemic freshwater turtle *Podocnemis lewyana* (Testudines, Podocnemididae). *Contributions to Zoology* **76**: 1-7.

Vargas-Ramírez M., Maran J. & Fritz U. 2010. Red- and yellow-footed tortoises, *Chelonoidis carbonaria* and *C. denticulata* (Reptilia: Testudines: Testudinidae), in South American savannahs and forests: do their phylogeographies reflect distinct habitats? *Org Divers Evol* **10**: 161-172.

Vázquez- Domínguez E. 2009. Capítulo 14. Filogeografía y Vertebrados. 441-466. En: *La Ecología Molecular de Plantas y Animales*.

Vázquez- Domínguez E., Castañeda-Rico S., Garrido-Garduño T. & Gutiérrez-García T. 2009. Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética,

genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Revista Chilena de Historia Natural* **82**: 277-297.

Vinke, T. & Vinke S. 2000. Biotopbeobachtungen an *Geochelone chilensis* (Gray, 1870) im Gran Chaco von Paraguay. *Sauria*, Berlin **22**: 25-29.

Waller T. 1986. Distribución, hábitat y registro de localidades para *Geochelone chilensis* (Gray, 1870) (*syn. donosobarrosi, petersi*) (Testudines, Testudinidae). *FVSA - Amphibia & Reptilia* (cons.) **1**: 36-48.

Waller T. & Micucci P. 1997. Land use and grazing in relation to the genus *Geochelone* in Argentina. Proceedings: Conservation, Restoration, and Management of Tortoises and Turtles - An International Conference, pp 2-9.

Waller T., Micucchi P. & Richard E. 1989. Preliminary results on the research on biology, ecology and conservation of the *Chelonoidis chilensis* (sensu lato) (Gray, 1870) tortoise in Argentina. K.Z.T., WWF-Traffic Sudamerica and CITES Secretariat publ. 43 p. Suiza.

Wermuth H. & Mertens R. 1977. Testudines, Crocodylia, Rhynchocephalia. Das Tierreich. Ed. De Gruyter. Liefer **100**: 1-173.

Williams E. E. 1950. *Testudo cubensis* and the evolution of western hemisphere tortoises. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* **95**: 1-36.

Wright S. 1982. Character change, speciation, and the higher taxa. *Evolution* **36**: 427-443.