



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

ESTIMACIÓN DE LA INERCIA FILOGENÉTICA
SOBRE EL TAMAÑO DE PUESTA EN TORTUGAS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)**

P R E S E N T A

REYNA LETICIA MOYERS ARÉVALO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. José Jaime Zúñiga Vega

**COMITÉ TUTOR: Dr. Adrián Nieto Montes de Oca
Dr. Mark Earl Olson Zunica**

MÉXICO, D.F.

Junio, 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

ESTIMACIÓN DE LA INERCIA FILOGENÉTICA
SOBRE EL TAMAÑO DE PUESTA EN TORTUGAS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)**

P R E S E N T A

REYNA LETICIA MOYERS ARÉVALO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. José Jaime Zúñiga Vega

**COMITÉ TUTOR: Dr. Adrián Nieto Montes de Oca
Dr. Mark Earl Olson Zunica**

MÉXICO, D.F.

Junio, 2012



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/246/12

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **27 de febrero de 2012** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA AMBIENTAL)** del (la) alumno (a) **MOYERS AREVALO REYNA LETICIA** con número de cuenta **401051485** con la tesis titulada **"Estimación de la inercia filogenética sobre el tamaño de puesta en tortugas"**, realizada bajo la dirección del (la) **DR. JOSÉ JAIME ZÚÑIGA VEGA:**

Presidente: DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU
Vocal: DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO
Secretario: DR. ADRIÁN NIETO MONTES DE OCA
Suplente: DR. OSCAR ALBERTO FLORES VILLELA
Suplente: DR. FAUSTO ROBERTO MÉNDEZ DE LA CRUZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.



Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 21 de mayo de 2012

M. del Coro Arizmendi
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

MCAA/MJFM/ASR/grf*

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al apoyo PAEP otorgado por el Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, para realizar la estancia de investigación en la Facultad de Ciencias e Instituto Miguel Lillo de la Universidad Nacional de Tucumán en Argentina.

A los miembros de mi comité tutor. A mi tutor principal, el Dr. Jaime Zúñiga Vega, por su talento para contagiar la pasión por el quehacer científico y por su infinito entusiasmo al realizar este proyecto. También por la tolerancia y el respeto que siempre mostró hacia mis decisiones y sobre todo por estar a mi lado, enseñándome y aprendiendo junto conmigo a descifrar la naturaleza de los métodos comparativos y la evolución de las tortugas. Al Dr. Adrián Nieto Montes de Oca por su gran generosidad, por todos sus comentarios y consejos, por su disponibilidad y tiempo, pues siempre tuvo un momento y un lugar para colaborar conmigo. Especialmente por el interés y admiración que siempre mostró hacia este trabajo. Por último, al Dr. Mark Olson, quien ayudó mucho a dar forma a este proyecto. Gracias por todas las conversaciones que se convirtieron en clases magistrales, por enseñarme a tomarme más tiempo para pensar que para trabajar, por ayudarme a desentrañar los métodos comparativos y ver más allá de los números, por ser tan crítico y por exigirme la autocrítica. Sobre todo gracias por su sencillez, su buen humor y su genuino interés en hacer siempre de este trabajo, algo mejor. A los tres, gracias por ser docentes tan comprometidos e íntegros y por hacer de ésta una investigación estimulante intelectualmente de inicio a fin.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A los miembros del jurado por sus valiosos comentarios. Al Dr. Daniel Piñero por ser una persona siempre dispuesta a ayudar a destacar lo mejor de todo estudiante, enriqueciendo su trabajo. Al Dr. Arturo Becerra por su interés y compromiso por mejorar esta investigación. Al Dr. Fausto Méndez por la retroalimentación que brindó a este proyecto y por las perspectivas que aportó para futuras investigaciones dentro de este campo de estudio. Especialmente, al Dr. Oscar Flores Villela por su dedicación en esta revisión, por las mejoras que propició en este trabajo y sobre todo, por el apoyo y la confianza que me ha brindado durante toda mi carrera académica.

Al Dr. Norberto Giannini por su invaluable ayuda. Gracias por hacerme valorar cada segundo invertido en un trabajo y por demostrarme que toda investigación puede ser la mejor cuando existe un compromiso genuino. Ante todo, gracias por la sabiduría e iluminación compartidas en charlas cotidianas, que permitieron acrecentar mi amor por la biología y mi interés por el estudio de la evolución.

Al Programa de Investigaciones de Biodiversidad Argentina, Facultad de Ciencias e Instituto Miguel Lillo de la Universidad Nacional de Tucumán, Argentina. Por el espacio y las facilidades para realizar la estancia de investigación que permitió completar este proyecto. Gracias en especial al grupo de trabajo de la Colección de Mamíferos del Instituto Miguel Lillo por su hospitalidad y fraternidad.

A la M. en C. Rubi Meza por el tiempo y trabajo invertidos en este estudio. Gracias por las horas de colaboración amenizadas siempre por pláticas y risas.

A la Dra. Emilia Martins por su ayuda y disponibilidad. Gracias por compartir su invaluable conocimiento sobre el estudio de la evolución y los métodos comparativos.

A la Dra. Julieta Rosell por la generosidad para compartir su experiencia e información con respecto a las entrañas estadísticas de los métodos comparativos.

A los integrantes del Laboratorio Especializado de Ecología por su apoyo permanente para el desarrollo de mi trabajo. A la Dra. Teresa Valverde, a la Dra. Consuelo Bonfil, a la Dra. Mariana Hernández Apolinar, al M. en C. Pedro Eloy Mendoza Hernández y sobre todo, a la M. en C. Irene Pisanty quien es un excelente ejemplo y guía.

A mis compañeros del grupo de trabajo de Demografía y Ecología Evolutiva del Laboratorio Especializado de Ecología: Hibraim Pérez Mendoza, Jonathan Maceda Cruz, Fernanda René Rodríguez, Yazmin Zurita, Claudia Olivera, Mariana Romero, Alejandro Molina, Patricia Frías, Regina Vega y Ana Hernández. Gracias por todos los momentos compartidos.

A la biblioteca del Museo de Zoología Alfonso L. Herrera de la Facultad de Ciencias por las facilidades otorgadas para acceder a las fuentes bibliográficas necesarias para completar la información utilizada en este estudio.

A toda la comunidad de la Escuela Alexander Bain por su calidez y solidaridad. A mis jefas, Miss Martine y Miss Malú por su comprensión, su apoyo y por procurar siempre mi crecimiento personal y académico. A mis compañeros de trabajo, por la confianza y la admiración que siempre han mostrado hacia mi trabajo pero sobre todo por propiciar, día con día, el mejor ambiente de trabajo. Por último y de forma especial a mis muy queridos alumnos, quienes son una fuente de amor e inspiración diaria.

Sobre todo a la Universidad Nacional Autónoma de México y al cuerpo académico del Posgrado, por brindarme la oportunidad de gozar de la riqueza de ser universitaria.

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico principalmente a mi familia. Sobre todo a mi papá que donde esté, se que está feliz y orgulloso. A mi mamá porque sigue y seguirá aguantando esta carrera academica que parece interminable, siempre dispuesta a ayudar con amor y dedicación. A mi hermano por estar ahí y ayudarme, sobre todo cuando la tecnología me superaba. A mi tía Sara por inspirarme a buscar nuevos retos continuamente y por sus lecciones de vida. Al resto de mi familia por su apoyo constante.

A mis amigos, por ayudarme a concluir este trabajo pero sobre todo por permitirme interrumpirlo por momentos invaluable de felicidad. De forma especial a Lau, Vale, Fikita, Cirene, Ale, Saúl, Armando, Hugo, Octavio, Agus y Daniel, quienes han estado conmigo en los momentos más importantes. A mis amigas repros y los demás amigos del Universum, con quienes definitivamente he pasado los momentos más divertidos. A mis amigos de la Fac, por que hacen de ese espacio mi casa. A mis queridos roomies, Caro, It y Nes, por hacer de la cotidianidad algo extraordinario. A mis amigos argentinos, porque hicieron de esa tierra una segunda casa con su hospitalidad y cariño.

Finalmente, dedico este esfuerzo a la Universidad Nacional Autónoma de México porque me ha brindado todas las oportunidades de crecimiento que puedan existir y por el orgullo de ser parte de la comunidad universitaria.

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Antecedentes	
Efectos de linaje	5
La inercia filogenética como patrón o proceso evolutivo	8
Historias de vida	8
Historias de vida de tortugas	10
Hipótesis y objetivos	12
Métodos	
Recopilación de información	13
Reconstrucción filogenética	
Parsimonia	17
Inferencia bayesiana.....	17
Métodos filogenéticos comparativos	
Autocorrelación filogenética	20
Mínimos cuadrados generalizados filogenéticos	21
Señal filogenética	23
Exploración de los métodos con simulaciones	25
Ordenación canónica filogenética	30
Relación entre los factores ambientales y la variación no explicada por la filogenia	
Correlación entre residuos y latitud	34
Método de Hansen con ambiente, dieta y latitud.....	34
Resultados	
Reconstrucción filogenética	
Parsimonia	40
Inferencia bayesiana.....	42
Métodos filogenéticos comparativos	
Autocorrelación filogenética	45
Mínimos cuadrados generalizados filogenéticos	45
Señal filogenética	46
Exploración de los métodos con simulaciones	48
Ordenación canónica filogenética	49
Relación entre los factores ambientales y la variación no explicada por la filogenia	
Correlación entre residuos y latitud	58
Método de Hansen con ambiente, dieta y latitud.....	60

Discusión	
Reconstrucción filogenética	64
Efecto filogenético en el tamaño de puesta y en el tamaño adulto	
las hembras	66
Efecto filogenético sobre otros atributos en las tortugas	67
Adaptación local a las condiciones ambientales	69
Patrones latitudinales	71
Efecto de la dieta	73
La utilidad de los métodos filogenéticos comparativos	74
Conclusión	77
Literatura citada	78
Apéndices	
Apéndice 1.	
Referencias de tamaño de puesta y tamaño de las hembras adultas en las	
tortugas	90
Apéndice 2.	
Claves de acceso de GenBank para los genes de la reconstrucción	91
Apéndice 3.	
Script de R para el análisis final de ordenación canónica filogenética	92
Apéndice 4.	
Valores residuales de talla y puesta para el análisis de correlación con distribución	
latitudinal	93

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Filogenia de la familia de ranas venenosas tropicales Dendrobatidae (Santos et al., 2003)	7
Figura 2: Esquema de aleatorizaciones para el método de señal filogenética de Blomberg	24
Figura 3: Escenario de evolución independiente que simula la carencia de efecto filogenético	27
Figura 4: Escenario de evolución por movimiento browniano que simula un efecto considerable de la filogenia	28
Figura 5: Escenario de evolución restringida que simula un efecto filogenético absoluto	29
Figura 6: Estructura de matrices para el análisis de Ordenación Canónica Filogenética (COP por sus siglas en inglés)	30
Figura 7: Ejemplo de codificación de grupos y construcción de matriz filogenética (X) para el método de CPO	31
Figura 8: Estimaciones de regresión del método de CPO.....	32
Figura 9: Mapeo del cambio de hábitat sobre la reconstrucción filogenética	37
Figura 10: Mapeo del cambio de dieta sobre la reconstrucción filogenética	38
Figura 11: Mapeo del cambio de distribución sobre la reconstrucción filogenética	39
Figura 12: Árbol consenso de los 7 árboles más parsimoniosos, según el método de reconstrucción filogenética de Parsimonia	41
Figura 13: Árbol consenso de Inferencia Bayesiana.....	42
Figura 14: Reconstrucción filogenética y valores atributos reproductivos.....	44
Figura 15: Distribución de frecuencias de las varianzas obtenidas a partir de los contrastes independientes de filogenia en la prueba de aleatorización de Blomberg ..	47

Figura 16: Ejemplo de matrices para el análisis de ordenación canónica filogenética ..	50
Figura 17: Reconstrucción filogenética con detalle en los grupos codificados en la matriz filogenética del método de ordenación canónica filogenética.....	51
Figura 18: Clados significativos ($\alpha \leq 0.05$) según el método de ordenación canónica filogenética	54
Figura 19: Matriz filogenética reducida para el atributo de talla.....	56
Figura 20: Matriz filogenética reducida para el atributo de tamaño de puesta.....	57
Figura 21: Correlación entre los valores residuales del método de autocorrelación con la latitud promedio en que habitan las especies	59
Figura 22: Correlación entre los valores observados de los atributos con la latitud promedio en que habitan las especies.....	59
Figura 23: Reconstrucción filogenética con detalle en especies marinas.....	61
Tabla 1: Detalle de familias existentes de tortugas	15
Tabla 2: Relación de las especies incluidas en este trabajo y datos moleculares y ecológicos utilizados en este trabajo	16
Tabla 3: Modelos de sustitución más parsimoniosos y verosímiles (según el criterio de BIC) de acuerdo con el programa jMODELTEST	18
Tabla 4: Estrategias de partición utilizadas en este estudio, diseñadas de acuerdo con los modelos que mejor se ajustaron a los datos moleculares	19
Tabla 5: Resultados de la comparación entre el factor de Bayes para todas las estrategias de partición	43
Tabla 6: Valores de inercia filogenética ($\rho \pm e.e.$) en talla y tamaño de puesta en tortugas	45
Tabla 7: Valores de restricción filogenética ($\alpha \pm e.e.$) en talla y tamaño de puesta en tortugas	46

Tabla 8: Valores de señal filogenética dados por el índice K y la P asociada a las aleatorizaciones de los contrastes.....	47
Tabla 9: Valores obtenidos para inercia filogenética (ρ), restricción (α) y señal filogenética (K y P) para tres escenarios hipotéticos.....	49
Tabla 10: Valores de significancia para los 33 grupos codificados en la matriz filogenética del análisis de ordenación canónica filogenética	52
Tabla 11: Matrices filogenéticas reducidas por los atributos analizados	55
Tabla 12: Correlación entre los valores observados de talla y tamaño de puesta contra latitud, y entre los residuos del análisis de autocorrelación filogenética y la latitud ...	58
Tabla 13: Valor de la diferencia entre fenotipos generada por el paso del ambiente dulceacuícola al marino	60
Tabla 14: Valor de diferencia entre fenotipos generada por el paso del ambiente dulceacuícola al terrestre	62
Tabla 15: Valor de diferencia entre fenotipos generada por el paso de dieta omnívora a carnívora.....	62
Tabla 16: Valor de diferencia entre fenotipos generada por el paso de dieta omnívora a herbívora	62
Tabla 17: Valor de diferencia entre fenotipos generada por el paso de la distribución subtropical a la templada cálida	63
Tabla 18: Valor de diferencia entre fenotipos generada por el paso de la distribución subtropical a la tropical	63
Tabla 19: Valor de la diferencia entre fenotipos generada por el paso de la distribución subtropical hacia templada fría	63

RESUMEN

La inercia filogenética es un patrón macroevolutivo que ocurre cuando las especies cercanamente emparentadas muestran valores parecidos en sus atributos fenotípicos. En este trabajo se evaluó el nivel de inercia filogenética sobre el tamaño de puesta y la talla de las hembras adultas de diversos miembros del grupo de las tortugas. Se utilizaron cuatro métodos filogenéticos comparativos para evaluar el efecto de la filogenia sobre ambos caracteres: (1) autocorrelación filogenética, mínimos cuadrados generalizados filogenéticos, señal filogenética y ordenación canónica filogenética. Posteriormente se buscaron asociaciones con factores ecológicos. Por un lado, se buscaron correlaciones entre los valores libres de inercia filogenética de ambos atributos y la latitud. Por otro lado se usó el método de Hansen para mapear en la filogenia aquellos cambios fenotípicos significativos que pudieran estar asociados a algún cambio ambiental. Los factores considerados como promotores ambientales de cambios en los fenotipos fueron la distribución latitudinal, el hábitat y la dieta.

Los resultados de los cuatro métodos muestran que existe inercia filogenética considerable sobre ambos atributos reproductivos. Este efecto se concentra dentro de dos grupos: el de las tortugas marinas (familias Chelidae y Dermochelyidae) y el de las tortugas de la superfamilia Testudinoidea. Por otro lado, la ecología ha jugado un papel importante moldeando la evolución de ambos atributos, pues la variación en éstos está explicada por dos factores: la latitud y el tipo de ambiente donde habitan. Tanto el tamaño de puesta como la talla de las hembras adultas se correlacionan negativamente con la latitud. Por otro lado, el paso del ambiente dulceacuícola al ambiente marino explica la varianza interespecífica en estos atributos en un 60% y 40%, respectivamente y afectó de forma positiva el fenotipo de ambos atributos, pues las tortugas marinas muestran valores significativamente mayores tanto de tamaño de puesta como de talla de las hembras adultas.

ABSTRACT

Phylogenetic inertia is a macroevolutionary pattern that occurs when closely related species have similar trait values because they inherited those traits from a common ancestor. In this study I evaluated the degree of phylogenetic inertia in two reproductive traits of turtles: female size and clutch size. For this purpose I used four phylogenetic comparative methods: phylogenetic autocorrelation, phylogenetic generalized least squares, phylogenetic signal, and canonical phylogenetic ordination. In addition, I attempted to associate the studied traits with putative causal ecological factors. First, I used the trait values free of phylogenetic inertia derived from the autocorrelation method and correlated them with latitude. Second, I used the Hansen adaptation model to find where in the phylogeny significant phenotypical changes have occurred that could be associated with ecological conditions such as latitudinal distribution, habitat or diet.

All the comparative methods indicated that there is a significant degree of phylogenetic inertia in both reproductive traits. This phylogenetic effect occurred mainly in two clades: the marine turtles (Chelidae and Dermochelyidae) and the superfamily Testudinoidea. Additionally, environmental factors have been important in shaping the evolution of both traits because most of the interspecific variation in these traits can be explained by latitude and habitat. Both traits have a negative correlation with latitude. Furthermore, the shift from the aquatic habitat to the marine habitat explains 60% and 40% of the trait variance, respectively. This shift affected positively female size and clutch size and resulted in marine turtles exhibiting significant higher values of both traits.

INTRODUCCIÓN

Desde una perspectiva neodarwinista, los caracteres fenotípicos se consideran como resultado de la acción de la selección natural (Harvey y Pagel, 1991). Si esta interpretación es correcta, entonces las características de los seres vivos representan adaptaciones al medio en el que viven. Sin embargo, los caracteres fenotípicos (morfológicos, conductuales, fisiológicos, de historias de vida, etc.) son también el resultado de la historia evolutiva. Es decir, un atributo particular, como por ejemplo el tamaño del fémur de dos especies hermanas, es similar entre ellas simplemente porque descendieron de un ancestro común. Entonces, tal similitud no se debe necesariamente a que las presiones de selección que experimentan en los ambientes que habitan sean iguales. Actualmente la biología evolutiva reconoce que los caracteres fenotípicos son el resultado tanto de cambios adaptativos provocados por presiones selectivas locales, como de la historia evolutiva que comparten con sus especies filogenéticamente relacionadas (Harvey y Pagel, 1991).

Uno de los intereses actuales de los evolucionistas es tratar de comprender y cuantificar, por un lado el componente adaptativo de los caracteres y por el otro su componente filogenético (también llamado componente histórico). Este último, llamado inercia filogenética, se ha definido como la tendencia de los caracteres a resistir los cambios a pesar de las perturbaciones ambientales y es evidente cuando hay caracteres compartidos entre especies cercanamente relacionadas (Edwards y Naeem, 1993).

Se han llevado a cabo varios esfuerzos por comprender la intensidad de la inercia filogenética en oposición a la selección natural en distintos caracteres y tipos de organismos. Sin embargo, este campo de trabajo es aún fértil. Por eso, esta investigación intenta conocer el grado en el que la historia evolutiva compartida en el grupo de las tortugas ha determinado uno de sus atributos reproductivos más importantes, que es el tamaño de puesta. En este carácter las tortugas muestran una diversidad fenotípica interespecífica muy alta, misma que ha sido interpretada como resultado de adaptaciones a los ambientes locales. No obstante, se desconoce en qué grado la inercia filogenética podría estar determinando los fenotipos que observamos en estos organismos. Es por ello que el objetivo general de esta investigación es

determinar en qué proporción el tamaño de puesta en las tortugas se debe a la inercia filogenética y en qué proporción se puede atribuir a presiones de selección locales que puedan sugerir adaptaciones. Para comprender la acción complementaria de dichas fuerzas evolutivas, utilizo las herramientas de análisis más novedosas que se han desarrollado hasta el momento, que son los métodos filogenéticos comparativos. Estas herramientas analizan la evolución y diversificación de los caracteres considerando el grado de parentesco entre las especies. Asimismo, permiten cuantificar el grado de variación que puede ser atribuido a efectos independientes de la filogenia, y por lo tanto, a fenómenos microevolutivos, como lo son las adaptaciones locales al ambiente.

ANTECEDENTES

EFFECTOS DE LINAJE

Uno de los paradigmas actuales de la biología es el que dicta que todos los organismos descienden de al menos una forma parental semejante. Si extendemos esta idea espacial y temporalmente, obtenemos una red de ancestros y descendientes interconectados, conocido como linaje (Avice, 2006). Debido a esta relación de tipo genealógica, los atributos presentes en las especies exhiben semejanzas que resultan de la historia evolutiva que comparten (Stearns, 1992). Estos atributos pueden permanecer constantes entre especies debido a que siguen cumpliendo una función particular en el ambiente que habitan o debido a efectos de linaje. Ambos patrones filogenéticos son reconocidos como los extremos de un continuo en la explicación de la variación fenotípica interespecífica (Alberch, 1989; Stearns, 1992).

Por lo tanto, al hacer un análisis evolutivo de los atributos presentes en un grupo de especies, no debe descuidarse el aspecto filogenético, ya que todos los atributos presentes en un organismo responden tanto a las relaciones ancestro-descendientes, como a las presiones de selección ejercidas por los distintos ambientes que habitan (Harvey y Pagel, 1991; Stearns, 1992). Las herramientas analíticas que permiten considerar la importancia relativa de ambos factores en la evolución de un atributo son los métodos filogenéticos comparativos, que logran distinguir entre los componentes heredados y los que tienen un origen evolutivo independiente (Harvey y Pagel, 1991; Martins y Hansen 1997).

Según Stearns (1992), al implementar un método filogenético comparado es necesario considerar: (a) un primer análisis exploratorio de el o los atributos en cuestión, verificando que se trate de un carácter que presente cierta variación entre especies emparentadas. (b) Obtener la información filogenética del grupo, idealmente basada en caracteres moleculares como secuencias de DNA (Cheverud et al., 1985; Avice, 2006). (c) Aplicar varios tipos de métodos comparativos que brinden información complementaria. Como resultado de estos análisis, se obtienen diferentes tipos de información. (1) Es posible calcular la cantidad de variación de un carácter debida a las relaciones ancestro-descendiente (inercia filogenética). (2) También se pueden estimar los estados ancestrales de uno o más caracteres de interés. (3) Se

puede conocer si dos caracteres han evolucionado de forma correlacionada. (4) Permiten estimar y comparar tasas de evolución fenotípica entre distintos caracteres. (5) Finalmente, se pueden calcular valores de los atributos libres del componente filogenético, que pueden ser considerados como evidencia de procesos microevolutivos como la adaptación y la deriva génica (Harvey y Pagel, 1991; Björklund, 1997).

En la literatura existe una gran cantidad de ejemplos en los que se puede observar tanto la correlación entre un par de atributos, como el efecto filogenético en diversos caracteres fenotípicos (Avice, 2006; Stearns, 1992). Un caso interesante es el estudio de Darst y colaboradores (2005), quienes analizaron la evolución de la especialización de la dieta en las ranas venenosas del Nuevo Mundo (familia Dendrobatidae). La presencia de veneno es uno de los mecanismos de defensa que presentan los organismos que puede deberse a factores endógenos o a la adquisición exógena de sustancias tóxicas, vía su alimentación. Según la evidencia, los alcaloides presentes en la piel de los dendrobátidos son producto de una dieta de hormigas y otros artrópodos ricos en sustancias alcaloides. Como lo corroboraron estos autores en un análisis filogenético comparado entre 15 especies de esta familia, pertenecientes a 5 géneros (Fig. 1), existe una asociación recurrente entre la dieta y la presencia de alcaloides tóxicos en la piel a lo largo de su filogenia. Este patrón sugiere que un cambio evolutivo en la dieta estuvo relacionado con un cambio evolutivo en la cantidad de alcaloides en la piel. En otras palabras, este par de caracteres parecen haber evolucionado de forma correlacionada.

Este ejemplo (Fig. 1) brinda un marco de referencia para ilustrar el papel de la inercia filogenética en la determinación de los caracteres fenotípicos, especialmente en los géneros *Dendrobates* y *Phyllobates*. En todas estas especies se conserva la especialización de dieta y la presencia de alcaloides en la piel, a pesar de que se dieron una serie de eventos de especiación.

También podemos observar en este ejemplo la evolución independiente de un rasgo fenotípico, como la presencia de alcaloides en la piel, en cinco eventos: en el ancestro común del género *Allobates*, en una especie del género *Colostethus*, en dos grupos de especies del género *Epidendobates* y el ancestro común de los géneros *Phyllobates* y *Dendrobates* (Fig. 1).

Este ejemplo ilustra la forma en que la información filogenética y métodos filogenéticos comparativos permiten comprender el efecto tanto de la inercia filogenética como de la adaptación local en la diversidad fenotípica de las especies.

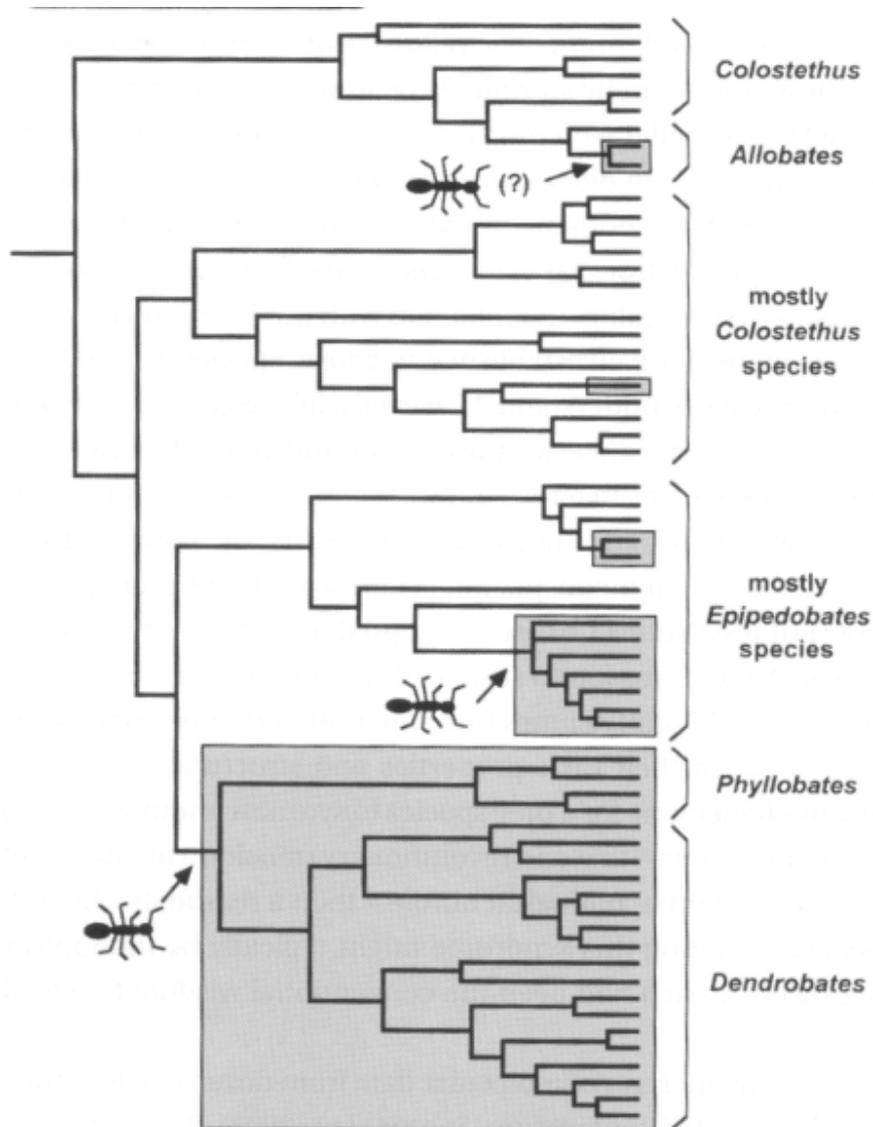


Figura 1. Filogenia de la familia de ranas venenosas tropicales Dendrobatiidae (Santos et al., 2003). Los cuadros grises indican linajes de ranas con presencia de alcaloides tóxicos en la piel, mientras que las hormigas representan una dieta rica en estos insectos. Tomada de Darst et al., 2005.

LA INERCIA FILOGENÉTICA COMO PATRÓN O PROCESO EVOLUTIVO

La inercia filogenética ha tenido varias acepciones a lo largo de la historia. Ha sido interpretada como un patrón del registro fósil, como una tendencia evolutiva, y recientemente como un patrón o un proceso en la evolución de los organismos (Blomberg y Garland, 2002). Actualmente, se define como la tendencia de los caracteres a resistir los cambios evolutivos, a pesar de perturbaciones ambientales (Edwards y Naeem, 1993). Es decir, la persistencia de un carácter a pesar del cese de las presiones selectivas que lo originaron y del surgimiento de presiones nuevas. Otra definición argumenta que la inercia filogenética es la proporción de varianza interespecífica en un carácter que es explicada por la hipótesis filogenética (Cheverud et al., 1985).

Aunque estas definiciones parecen claras, existe un debate sobre la naturaleza de la inercia filogenética (Blomberg y Garland, 2002). Por un lado es posible verla como un patrón en el que las especies cercanas tienen estados de carácter o valores similares de sus atributos fenotípicos. Por otro lado, la inercia puede interpretarse como una fuerza que evita el cambio evolutivo contrarrestando la acción de la selección natural. Entre los posibles procesos que podrían subyacer a la inercia se encuentran las correlaciones genéticas, la falta de variabilidad genética, la selección estabilizadora constante y los desfases temporales filogenéticos (Alberch, 1989; Harvey y Pagel, 1991; Stearns, 1992).

Probar la existencia de estos procesos es difícil. Por lo tanto, la interpretación de inercia filogenética que se emplea en esta investigación es la de un patrón, aquel en el que especies relacionadas tienen valores fenotípicos similares.

HISTORIAS DE VIDA

La vida de todo organismo consta de una secuencia de eventos que constituyen su "historia de vida". Este término, según Begon y sus colaboradores (2006), es el patrón de crecimiento, de diferenciación, de consumo y almacenamiento de energía y de reproducción que presenta un organismo a lo largo de su vida. Cada uno de los atributos que conforman dicho patrón, tales como la edad a la madurez, la tasa de mortalidad, la velocidad de crecimiento corporal, la fecundidad y el tamaño de puesta o camada, entre otros, repercuten directamente sobre su reproducción y

supervivencia, por lo que son altamente sensibles a fuerzas selectivas (Stearns, 1992). Estos atributos, por lo general, muestran una gran variación interespecífica (Roff, 2002) y se consideran el resultado tanto de procesos ecológicos locales como de la historia evolutiva (Stearns, 1992; Begon et al., 2006).

El estudio de la evolución de historias de vida es uno de los campos más complejos de la ecología, ya que busca describir y entender bajo qué condiciones ha evolucionado cada uno de los atributos que conforman el mosaico de diversidad de historias de vida que observamos hoy en día en la naturaleza. Los ecólogos evolutivos consideran que este tipo de caracteres cambian drásticamente dependiendo de las condiciones locales. Por ejemplo, individuos de una misma especie viviendo en zonas tropicales pueden exhibir una tasa de crecimiento muy rápida en comparación con individuos de la misma especie viviendo en zonas templadas (e.g., Rojas-González et al., 2008). Sin embargo, también es bien sabido que la microevolución de estos atributos puede verse fuertemente restringida y entonces no presentar variación entre especies.

Una de las principales causas que restringen la variación en un carácter de historia de vida es la presencia de disyuntivas o “trade-offs” y se refiere a que la energía que se destina a uno de los atributos de historia de vida, conlleva a la disminución en aquella que se destina al otro. Algunos de los principales atributos de historias de vida entre los que se han documentado este tipo de disyuntivas son: entre la reproducción y la probabilidad de supervivencia, entre la reproducción actual y la reproducción futura, entre el número y tamaño de los vástagos, entre la reproducción y la condición parental y entre la reproducción y el crecimiento. Un atributo que se encuentre bajo disyuntiva de asignación puede no exhibir variación entre especies relacionadas (Stearns, 1992).

Otras causas de falta de variación intra e interespecífica en atributos de historias de vida pueden ser aquellos procesos que subyacen al patrón de inercia o señal filogenética. Éstos pueden ser: la deriva génica, las restricciones ontogenéticas (Arlberch, 1989) y el determinismo o “contingencia histórica” (Taylor y McPhall, 2000). En muchos de estos caracteres se puede observar un patrón de similitud entre especies emparentadas filogenéticamente, como entre los miembros de la familia Gekkonidae que tienen puestas de dos huevos (Vitt, 1986), todas las especies de lagartijas del género *Xenosaurus* maduran tarde y tienen crecimiento lento (Zúñiga-

Vega 2005), todas las aves del género *Fregata* producen un solo huevo (Nelson, 1976). Estos patrones reflejan claramente inercia filogenética.

HISTORIAS DE VIDA DE TORTUGAS

Las tortugas son uno de los grupos de organismos más peculiares que hay en la naturaleza. Tienen rasgos morfológicos distintivos y una combinación de atributos de historia de vida única como: tasas de crecimiento bajas, edad a la madurez (o edad a la primera reproducción) tardía y longevidad alta (Gibbons y Greene, 2009). Sin embargo, en otros caracteres las tortugas presentan relativamente alta variabilidad entre especies, tales como en el periodo de incubación de los huevos (Goin et al., 1978), y en el tamaño de la puesta (Goin et al., 1978; Gibbons y Greene, 2009). Por ejemplo, el periodo de incubación parece variar entre 62 y 95 días en especies como *Chelydra serpentina* (Yntema, 1978) y entre 51 y 54 días en *Apalone mutica* (Ashimare y Janzen, 2003).

El tamaño de puesta es uno de los atributos más importantes para determinar la adecuación de un organismo, ya que, tiene un efecto directo sobre el número de descendientes reproductivos que deja un individuo a lo largo de su vida (Stearns, 1992; Frazer y Richardson, 1985). Además, según la teoría de historias de vida el tamaño de puesta es un reflejo de dos de los trade-offs más relevantes: el de número y tamaño de crías y el de reproducción actual y reproducción futura. Ambos, se encuentran subordinados tanto a las condiciones morfológicas y ecológicas que experimenta cada especie (Lutz et al., 2003; Gibbons y Greene, 2009), como a su historia evolutiva. Este atributo presenta una enorme variabilidad entre las tortugas, desde algunas dulceacuícolas y terrestres cuyo tamaño de puesta es menor a 10 huevos, como aquellas que ponen hasta 500 huevos al año (principalmente marinas). Esta alta variación indica que a pesar de la similitud evidente en las características morfológicas del grupo y otros muchos atributos que las hacen un grupo distintivo, cada especie ha evolucionado una estrategia reproductiva distinta. Aparentemente entonces, el tamaño de puesta es un carácter que, entre tortugas, ha respondido fácilmente a presiones locales de selección y por lo tanto, debe exhibir un bajo grado de inercia filogenética. Sin embargo, esta afirmación carece de apoyo hasta que se evalúe la proporción de variación en este carácter entre especies de tortugas que está determinado por la historia evolutiva compartida y la proporción explicada por

factores ecológicos que han provocado adaptaciones locales.

Hasta el momento no hay un trabajo que haya evaluado el efecto de la historia evolutiva sobre el tamaño de puesta de las tortugas, ni uno que sintetice cuáles factores provocan variación dentro de todo el orden. Por lo tanto, las preguntas que pretende resolver este trabajo son: (a) ¿En qué proporción la variación del tamaño de puesta de tortugas está determinado por inercia filogenética? y (b) ¿con qué factores ecológicos puede relacionarse la proporción de la variación que es independiente de la filogenia?

HIPÓTESIS

Dado que los caracteres de historia de vida afectan directamente la adecuación de los organismos y, por lo tanto, estos tienden a responder a presiones locales de selección (Stearns, 1992; Roff, 2002), espero que la variación interespecífica en el tamaño de puesta de las tortugas esté asociada principalmente con factores ecológicos y en menor medida con factores históricos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la proporción de variación interespecífica que hay en el tamaño de puesta de las tortuga y que puede ser explicada por sus relaciones filogenéticas. Complementariamente, encontrar cuáles son los factores ecológicos que pueden estar asociados con la variación no explicada por este componente histórico.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Llevar a cabo una revisión actualizada de la variación interespecífica que hay entre las tortugas con respecto al tamaño y la frecuencia de puestas, así como en el tamaño de las hembras.
- Hacer una reconstrucción filogenética, con base en marcadores nucleares y mitocondriales de las especies que serán analizadas.
- Mediante el uso de métodos filogenéticos comparativos y con base en una reconstrucción filogenética robusta, determinar la proporción de varianza que está determinada por inercia filogenética y aquella que se debe a factores ecológicos.
- Buscar asociaciones entre el componente específico de la variación del tamaño de camada (libre de inercia filogenética) y diferentes factores ambientales como: latitud, dieta y tipo de hábitat.

MÉTODOS

De acuerdo con los objetivos particulares, este trabajo puede dividirse en cuatro fases: la de recopilación de información, la de reconstrucción filogenética y la que corresponde a los métodos filogenéticos comparativos y sus simulaciones y por último, la búsqueda de relaciones entre los factores ambientales y la variación no explicada por la filogenia.

RECOPIACIÓN DE INFORMACIÓN

La delimitación del número de especies consideradas en este estudio se dio en dos etapas:

1. La compilación de datos de tamaño de puesta y tamaño de las hembras se hizo de las siguientes formas:

- Búsqueda en línea en los portales Web of Science y Google Scholar, con las palabras clave: *turtle clutch size*, *reproduction turtle*, *turtle egg*, *clutch size*, *tortoise*, *testudine clutch*, *turtle reproductive output* , *turtle life history*.
- Búsqueda en el portal de datos de biodiversidad “nlbif”, especializado en tortugas, Turtles of the world (<http://nlbif.eti.uva.nl/bis/turtles.php>).
- Búsqueda de literatura no disponible en la red y otros hallazgos en la Biblioteca de la Colección de Anfibios y Reptiles del Museo de Zoología Alfonso L. Herrera de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Como resultado de esta primera etapa se hallaron 70 especies de tortugas con datos de tamaño corporal y tamaño de puesta, de un total de 256 especies de tortugas registradas (Atner, 2008).

2. Búsqueda de marcadores genéticos en GenBank.

La selección de los marcadores incluidos para la reconstrucción filogenética de este trabajo se hizo con base en los utilizados en las últimas reconstrucciones filogenéticas publicadas para el grupo de las tortugas (Fuji et al., 2004; Krenz et al., 2005 y Barley et

al., 2010). Se utilizó el gen mitocondrial citocromo B (*cytb*) y los siguientes marcadores nucleares: la activasa de recombinación nuclear (RAG-1), el intrón R35, el gen del factor neurotrópico derivado cerebral (BDNF) y el loci anónimo TB29.

Se exploró la base de datos de GenBank en busca de los cinco genes para las 70 especies que contaban con datos reproductivos. Aproximadamente la mitad de estas especies no contaban con esta información, por lo que el número de especies incluidas en el estudio se limitó a aquellas que contaran con al menos dos de estos cinco genes. Finalmente, el total de especies que se incorporaron a este estudio fue de 36, pertenecientes a 10 familias (Tablas 1 y 2). Una vez establecidas las especies a utilizar en este estudio, se buscaron sus datos ecológicos de dieta, hábitat y área de distribución para realizar los análisis posteriores en el portal de datos de biodiversidad “nlbif”, especializado en tortugas, Turtles of the world (<http://nlbif.eti.uva.nl/bis/turtles.php>).

Actualmente se reconocen 14 familias de tortugas existentes en el Orden Testudines (Artner, 2008) y, a pesar de que no representan a la totalidad de familias, los datos utilizados en este estudio son representativos a nivel tanto de superfamilia como de suborden (Tabla 1). La omisión de algunas especies fue debida a que, en el momento en que se realizó la recopilación de información para la reconstrucción filogenética y la implementación de los métodos filogenéticos comparativos, éstas no contaban con alguno de los datos requeridos para este estudio.

Tabla 1. Detalle de familias existentes de tortugas. Al menos una especie de cada familia está representada en este estudio, excepto en el caso de las marcadas (*).

Orden Testudines	
Suborden Pleurodira	
	Familia
	Pelomedusidae
	Chelidae*
	Podocnemidae
Suborden Cryptodira	
Superfamilia	Familia
Testudinoidea	Chelydridae
	Platysternidae*
	Geoemydidae
	Emydidae
	Testudinidae
Chelonoidea	Cheloniidae
Trionychoidea	Dermochelyidae
	Dermatemydidae*
	Carettochelyidae
	Trionychidae
	Kinosternidae

Tabla 2. Relación de las especies incluidas en este trabajo y datos moleculares y ecológicos utilizados en este trabajo. Se muestran: los genes utilizados (*=*cytb*, ○=RAG-1, ■=R35, ◆=BDNF y ★=TB29), la talla de hembra (longitud curva del caparazón, mm) y el tamaño de puesta promedio (y su error estándar), hábitat (A=dulceacuícola, M=marino, T=terrestre), distribución (tc=templada cálida, tf=templada fría, ψ=tropical y sψ=subtropical) y dieta (O=omnívora, C=carnívora y H=herbívor). Para cada especie asigné una clave con la que serán identificadas en tablas y figuras.

Especie	Clave	Genes	Puesta	Tamaño	Hábitat	Distribución	Dieta
<i>Actinemys marmorata</i>	ACM	●○■◆★	5.7 (1.2)	151.6 (32.49)	A	tc	O
<i>Apalone mutica</i>	APM	●○	18	229	A	tc	C
<i>Apalone ferox</i>	AF	● ◆	20.6 (5.8)	401 (39)	A	tc	C
<i>Batagur baska</i>	BB	●○	11.3	488	A	ψ	O
<i>Callagur borneoensis</i>	CB	●○	12	460	A	ψ	H
<i>Caretta caretta</i>	CC	●○■◆	112.16 (15.93)	863.4 (68.34)	M	ψ	O
<i>Carettochelys insculpta</i>	CI	●○ ◆★	10.35 (0.797)	427.4 (15.97)**	A	sψ	O
<i>Chelonia mydas</i>	CM	●○■◆★	115.41 (9.59)	1024.9 (58.79)	M	sψ	O
<i>Chelydra serpentina</i>	CS	●○■◆★	31.20 (3.06)	269.6 (11.60)	A	tc	O
<i>Chrysemys picta</i>	CP	●○■◆★	7.28 (3.10)	141.77 (21.08)	A	tc	O
<i>Clemmys guttata</i>	CG	●○■ ★	4.25 (1.48)	96.25 (10.11)	A	tc	O
<i>Clemmys insculpta</i>	CLI	●○■ ★	8.5 (2.89)	154 (42.25)	T	tf	O
<i>Dermochelys coriacea</i>	DC	●○■	74.18 (19.37)	1461 (161.3)	M	ψ	C
<i>Emydoidea blandingii</i>	EB	●○■ ★	12.1 (6.5)	201.5 (89.9)	A	tf	O
<i>Emys orbicularis</i>	EO	●○ ★	5.4 (0.325)	134.53 (31.5)	A	tf	C
<i>Eretmochelys imbricata</i>	EI	● ◆	143.47 (27.36)	878.66 (49.17)	A	ψ	O
<i>Geochelone carbonaria</i>	GC	●○	8.5	289	T	sψ	O
<i>Geochelone denticulata</i>	GD	●○	10.5	361	T	ψ	O
<i>Graptemys geographica</i>	GG	●○■ ★	11 (1.61)	203.8 (3.17)	A	tc	C
<i>Graptemys ouachitensis</i>	GO	●○■ ★	10.5	145.4 **	A	tc	O
<i>Lepidochelys kempii</i>	LK	●○■◆	110	646	M	tc	C
<i>Lepidochelys olivacea</i>	LO	●○■◆	108.15 (10.11)	692.5 (30.41)	M	ψ	C
<i>Macrochelys temminckii</i>	MCT	●○■◆★	32	385	A	tc	O
<i>Malaclemys terrapin</i>	MT	●○■ ★	9.44 (2.39)	198 (16)**	A	tc	C
<i>Mauremys caspica</i>	MC	●○■	5	155	A	tf	C
<i>Mauremys leprosa</i>	ML	●○	8.5	139	A	tc	O
<i>Mauremys mutica</i>	MM	●○■ ★	1.5	147.5	A	tc	O
<i>Natator depressus</i>	ND	●○■◆	52.8 (0.81)	907 (81)	M	sψ	C
<i>Podocnemis expansa</i>	PE	●○■◆★	96.79 (11.40)	890*	A	ψ	H
<i>Podocnemis unifilis</i>	PU	●○	13.98 (4.12)	465*	A	ψ	H
<i>Sternotherus odoratus</i>	SO	●○■◆★	12.17 (7.36)	90.7 (10.88)	A	tc	O
<i>Terrapene carolina</i>	TCA	●○■ ★	3.68 (0.45)	119.2 (0.8)	T	tc	O
<i>Terrapene coahuila</i>	TCO	●○■ ★	4.5	101	A	tc	O
<i>Terrapene ornata</i>	TO	●○■ ★	3.67 (1.45)	118.5 (5.8)	T	tc	C
<i>Testudo graeca</i>	TG	●○ ◆★	6	194.6	T	tc	H
<i>Trachemys scripta</i>	TS	●○■ ★	12.77 (2.32)	206.65 (12.78)	A	sψ	O

Datos tomados de las referencias citadas en el Apéndice 1 o *tomados del sitio Turtles of the World (<http://wbd.etibioinformatics.nl/bis/turtles.php?menuentry=inleiding>), o ** de Gosnell et al. (2009).

La hipótesis filogenética constituye la base para la realización de los análisis filogenéticos comparativos. Por lo tanto, se reconstruyó la filogenia de las 36 especies incluidas con base en dos métodos distintos:

a) Parsimonia

Se obtuvieron las secuencias de los genes antes mencionados (Apéndice 2) en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>), mismas que se alinearon con la ayuda del programa SeaView versión 4.2.12, utilizando el algoritmo Clustalw2 y los parámetros estándar de dicho programa. Luego se editaron las secuencias de cada uno de los genes para poder eliminar los fragmentos no informativos y se codificaron como matrices numéricas. Estas secuencias se concatenaron en una misma matriz para el análisis final, utilizando el programa WinClada (Nixon, 1999-2002). La dimensión de la matriz final fue de 36 especies por 7481 nucleótidos. Los datos faltantes (genes ausentes) se manejaron como caracteres no informativos. Finalmente se realizó un análisis de parsimonia con ayuda del programa TNT versión 1.1, para el cual se utilizaron estrategias de búsqueda tradicionales y las de nueva tecnología (ratchet), aumentando la cantidad de árboles guardados en cada búsqueda de 10 a 100.

b) Inferencia Bayesiana

Se utilizaron las mismas secuencias de GenBank, alineadas con el programa Mesquite versión 2.74 y eliminando los fragmentos no informativos. Para obtener una matriz final que incluyera los cinco genes, las secuencias fueron concatenadas utilizando el programa WinClada (Nixon, 1999-2002). La dimensión de la matriz final fue de 36 especies por 6250 caracteres.

Por otro lado, para cada uno de los genes (o su partición en el caso del gen mitocondrial *cytb*) se buscaron los modelos evolutivos que mejor ajustaran según el criterio Bayesiano de información (BIC por sus siglas en inglés; Tabla 3), con la ayuda

del programa jMODELTEST versión 0.1.1 (Posada, 2008). El modelo con el menor valor de BIC se considera como el más verosímil.

Tabla 3. Modelos de sustitución más parsimoniosos y verosímiles (según el criterio de BIC) para cada uno de los cuatro genes nucleares, el gen mitocondrial *cytb* y sus particiones por posición de acuerdo con el programa jMODELTEST.

Gen o Partición	BIC
BDNF	K80
R35	HKY+G
RAG-1	TRN
TB29	HKY+G
<i>cytb</i>	HKY+G
<i>cytb</i> (posición 1)	TIM3+G
<i>cytb</i> (posición 2)	TIM3+G
<i>cytb</i> (posición 3)	G _r R+G

Las reconstrucciones filogenéticas se realizaron con el programa MrBayes v 3b4 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001) por medio del bioportal (bioportal.uio.no), con una simulación para 10 millones de generaciones y especificando los modelos que fueron seleccionados para cada gen (Tabla 3). Se hizo un análisis combinado utilizando un modelo de partición específica para reducir el error y aumentar la verosimilitud del análisis (Brandley et al., 2005). Se utilizaron 7 estrategias de partición (Tabla 4) con base en la identidad de los genes o las restricciones evolutivas de sus posiciones bioquímicas (en el caso del gen de *cytb*). Dado que un mayor número de particiones incrementa la verosimilitud el análisis pero también puede aumentar el error de la prueba es necesario buscar la estrategia de partición óptima. Esta búsqueda se hizo utilizando el método detallado por Brandley y colaboradores (2005). Este método se basa en la comparación entre pares de estrategias utilizando el factor de bayes, que mide el éxito relativo entre dos hipótesis al predecir los datos (Kass y Raftery, 1995). El factor de Bayes es calculado utilizando la media harmónica de cada una de las hipótesis, medida que se obtuvo con el comando *sump* en MrBayes 3b4 (Brandley et al., 2005) y corresponde con la proporción entre las medias harmónicas de los dos análisis a comparar donde la H_0 es la de mayor cantidad de parámetros y la H_1 es la de menor cantidad de parámetros (ver Tabla 5). Una vez obtenido este cociente, se calcula el doble del logaritmo natural de dicho factor y se interpreta de la siguiente

forma: un valor negativo apoya la H_0 , un valor entre 0 y 2 da un apoyo bajo a la H_1 , mientras que valores mayores a 2 dan evidencia positiva y respectivamente más fuerte a favor de la H_1 (Kass y Rafter, 1995).

Tabla 4. Estrategias de partición utilizadas en este estudio, diseñadas de acuerdo con los modelos que mejor se ajustaron a los datos moleculares (ver Tabla 1).

ESTRATEGIA DE PARTICIÓN	IDENTIDAD DE LA PARTICIÓN
P ₂	Una para mitocondrial
	Una para los nucleares
P ₃	Una para la primera y segunda posición mitocondrial
	Una para la tercera posición mitocondrial
	Una para los nucleares
P ₄	Una para la primera posición mitocondrial
	Una para la segunda posición mitocondrial
	Una para la tercera posición mitocondrial
	Una para los nucleares
P ₅	Una para la primera y segunda posición mitocondrial
	Una para la tercera posición mitocondrial
	Una para los genes R35 y TB29
P ₆	Una para cada uno de los otros genes nucleares (2)
	Una para la primera y segunda posiciones mitocondriales
	Una para la tercera posición mitocondrial
P ₇	Una para cada uno de los genes nucleares (4)
	Una para la primera posición del gen mitocondrial
	Una para la segunda posición
P ₇	Una para la tercera posición
	Una para cada uno de los genes nucleares (4)

Nota: Dado que no hubo convergencia entre ambas corridas de la reconstrucción P₇, la comparación se hizo separandolas para saber si alguna de estas (7A y 7B), presentaban un mejor ajuste.

Con base en los resultados de las reconstrucciones filogenéticas, se seleccionó la inferencia bayesiana como hipótesis filogenética para la implementación de los métodos comparativos debido a que la edición de las secuencias se hizo con mucho mayor detalle y la exploración de modelos fue exhaustiva. Además presenta un buen grado de soporte en la mayoría de las ramas.

MÉTODOS FILOGENÉTICOS COMPARATIVOS

El objetivo principal de este trabajo es estimar la inercia filogenética sobre el tamaño de puesta de las tortugas. Sin embargo, como éste ha demostrado tener una fuerte correlación con el tamaño de las hembras (Gosnell et al., 2009), se utilizaron los datos tanto de tamaño de puesta como de talla de la hembra (longitud curva de caparazón) en la implementación de todos los métodos comparativos.

Para la ejecución de algunos de estos métodos (excepto el de señal filogenética y el de ordenación canónica filogenética) fue necesario modificar la estructura del árbol de la siguiente forma: (i) Las politomías encontradas se resolvieron separando las ramas por una distancia mínima. (ii) Se aleatorizaron las longitudes de rama mediante el método propuesto por Housworth y Martins (2001). Esto se logró generando mil árboles con la misma topología que la original pero con distintas longitudes de rama en el programa COMPARE 4.6b (<http://www.indiana.edu/~martinsl/compare/>). Con este procedimiento se pudieron generar intervalos de confianza de cada uno de los parámetros de los métodos.

Método de autocorrelación filogenética de Cheverud, Dow y Leutenegger (1985)

Propuesto para evaluar la inercia filogenética, este método permite cuantificar la proporción de la variación en las características fenotípicas que es explicada por las relaciones filogenéticas (inercia filogenética) y aquella proporción que puede ser atribuida a evolución independiente. El modelo está representado por la ecuación:

$$y = \rho W y + e$$

donde y es un vector de los valores observados en los atributos fenotípicos, ρ es el coeficiente de autocorrelación filogenética, W es una matriz de similitudes filogenéticas (estimada directamente a partir de la hipótesis filogenética, cuantificando la distancia entre especies) y e es un vector de residuales. En este modelo, $\rho W y$ representa el “componente filogenético” (proporción del atributo que corresponde a la historia evolutiva del grupo) y e corresponde al “componente específico”

(proporción que puede ser considerada como resultado de la evolución independiente del arrastre filogenético). El coeficiente de autocorrelación filogenética (ρ) estima el grado de inercia filogenética en los atributos y puede tomar valores entre -1 y $+1$. Un valor igual a $+1$ indica constancia filogenética o, en otras palabras, que las especies cercanas son muy similares entre sí. Un valor igual a 0 implica que no hay efecto filogenético en el atributo en cuestión. Un valor de -1 indica que las especies más cercanas presentan las mayores diferencias en el atributo.

Este método fue implementado en el programa COMPARE 4.6b, con el módulo de Spatial Autocorrelation, para cada una de los mil árboles filogenéticos generados con distintas longitudes de rama. A partir de estos datos se calculó un promedio que fue considerado como estimador puntal de ρ . El error estándar se calculó como la desviación estándar de los mil valores del parámetro. El intervalo de confianza (95%) se construyó utilizando la distribución obtenida de los 1000 valores de ρ . El valor ordenado número 25 se consideró el límite inferior del intervalo y el valor ordenado número 975 se consideró el límite superior.

Método de mínimos cuadrados generalizados filogenéticos de Martins y Hansen (1997).

Este es uno de los métodos más poderosos que han sido desarrollados para evaluar distintos aspectos evolutivos considerando las relaciones filogenéticas entre las especies. Se puede utilizar para conocer la relación que existe entre varios caracteres o entre caracteres y ambientes, para establecer la tasa de evolución fenotípica, para evaluar el grado de efecto filogenético y para encontrar el estado ancestral de un carácter. Se basa en los modelos lineales generalizados que tienen la forma:

$$Y = \mu + \varepsilon$$

donde Y representa un atributo fenotípico de interés (variable respuesta), μ es el valor esperado de la variable respuesta dado el efecto de variables explicativas (que a su vez puede descomponerse en elementos de una regresión múltiple de la forma $\mu = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_n X_n$, donde cada X es una variable que explica la variación en Y) y ϵ es el término del error.

La flexibilidad que brinda este método está en que prácticamente cualquier variable puede ser incorporada en los términos de regresión de la ecuación (en las variables X). Además, se puede descomponer el término del error en los factores que lo determinan, que son: la varianza debida al error de medición (E_M), la varianza debida a las relaciones filogenéticas entre las especies (E_S) y la varianza debida a las imprecisiones de la reconstrucción filogenética (E_P). Esta descomposición se logra mediante el uso de mínimos cuadrados generalizados.

Para conocer la varianza debida a las relaciones filogenéticas entre las especies (que es el interés central de esta investigación), utilicé la derivación del método propuesto por Martins y Hansen (1997), que tiene la forma:

$$Var[\epsilon_s]_{ij} = \gamma \exp[-\alpha t_{ij}]$$

donde, el parámetro α evalúa la fuerza de restricción al cambio (i.e., estima inercia filogenética), el parámetro γ podría interpretarse como la varianza interespecífica que se alcanza cuando las fuerzas restrictivas y perturbadoras se hallan en equilibrio y t es la distancia a lo largo de la filogenia entre los taxones i y j . Cuando α tiene valores relativamente bajos, se trata de un atributo cuya evolución es restringida, lo que implica que el valor de los atributos es muy parecido entre especies cercanas. Cuando α tiene valores relativamente altos, refleja evolución independiente, que significa que hay una alta variabilidad en los atributos entre especies cercanamente emparentadas. Este método se implementó en Compare 4.6b, utilizando el módulo PGLS-ancestor, con la opción de modelo exponencial, para cada uno de los mil árboles generados con distintas longitudes de rama. El error estándar se calculó como la desviación estándar de los mil valores del parámetro. El intervalo de confianza (95%) se construyó utilizando la distribución obtenida de los 1000 valores de α . El valor ordenado número

25 se consideró el límite inferior del intervalo y el valor ordenado número 975 se consideró el límite superior.

Método de señal filogenética de Blomberg, Garland e Ives (2002 y 2003)

Este método evalúa la señal filogenética, definida como la tendencia de las especies cercanamente emparentadas a parecerse más entre ellas en comparación con cualquier otra especie de la filogenia (Blomberg y Garland, 2002; Blomberg et al., 2003). Este método consta de dos análisis. El primero de ellos es la prueba de aleatorización y el segundo es el cálculo del índice K.

La prueba de aleatorización comienza con el cálculo de contrastes independientes de la filogenia (Felsenstein, 1985), considerando la topología y la distribución de los valores originales. En los contrastes independientes de la filogenia se comparan los valores del atributo de las especies que comparten un mismo ancestro calculando un promedio ponderado por la distancia filogenética que las separa. De este modo, se obtiene un valor para el ancestro hipotético. De esta forma se van estableciendo contrastes a lo largo de toda la filogenia y se obtiene un valor final de varianza correspondiente a la distribución de valores observados (Fig. 2a). Evidentemente, cuando especies cercanamente relacionadas exhiben valores fenotípicos parecidos (i.e., efecto filogenético), la variabilidad en los contrastes independientes será relativamente baja.

El segundo paso en esta prueba de aleatorización es la permutación aleatoria de los valores del atributo de interés entre las puntas de las ramas, manteniendo siempre la misma topología. De tal manera que a cada especie se le asigna un nuevo valor del atributo por azar. Estos nuevos valores origina una nueva distribución filogenética de los atributos para la cual se calculan contrastes independientes de la filogenia y una varianza asociada. Dado que los valores están aleatorizados, especies cercanas tendrán valores del carácter considerablemente distintos originando que la varianza de los contrastes independientes de la filogenia sea relativamente alta. Estos escenarios aleatorios se observaría si no existiera señal filogenética (las especies cercanas no se parecen). Este procedimiento se repite 999 veces. Al final se tienen los

valores de varianza aleatorios y el valor de varianza observado a partir de los datos originales. Al compararlos, si al menos el 95% de las varianzas aleatorias son mayores a la original, se dice que existe señal filogenética significativa en el atributo evaluado (Fig. 2b). La prueba de aleatorización permite obtener un valor de P , que corresponde a la proporción de varianzas aleatorias que resultan iguales o menores que la observada. En otras palabras, corresponde a la probabilidad de obtener una varianza por azar igual a la observada con los datos originales bajo el escenario de nula señal filogenética.

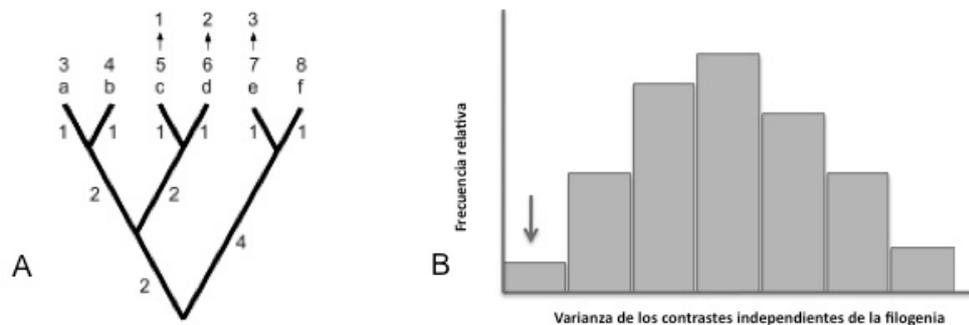


Figura 2. Esquema de aleatorizaciones para el método de señal filogenética de Blomberg. En (A) se muestran al lado de las ramas las longitudes consideradas para el cálculo de los contrastes independientes de filogenia (CIF), y en la parte superior con letras, las especies, con número los valores de atributos originales y, arriba de las flechas, el valor de los atributos luego de la permutación (Tomado de Blomberg y Garland, 2002). En (B) se muestra la distribución de frecuencias de las varianzas luego de las permutaciones. Cuando el valor de varianza original se encuentra en s , se dice que hay señal filogenética (es un valor bajo y menor que el 95% de los obtenidos en las 1000 aleatorizaciones). Cuando el valor se encuentra en otro punto, como ns , se dice que no hay señal filogenética.

Los contrastes independientes de la filogenia fueron implementados en el programa COMPARE 4.6b, utilizando el módulo de Independent Contrasts. Simultáneamente, se generaron mil permutaciones para los atributos de talla y tamaño de puesta en el programa Excel, para cada una de las cuales se calculó el valor de varianza asociada a los contrastes independientes de filogenia. De esta forma, se obtuvo una distribución de varianzas, que permitiera la comparación entre aquellas generadas por permutación y la original. El valor de P asociado a esta prueba se obtuvo directamente como la proporción de valores de varianza iguales o menores al observado en la filogenia original.

Por otra parte, el índice K es un estadístico descriptivo que indica la fuerza de la señal filogenética. Este índice permite comparar la varianza que se observaría en un escenario de evolución por movimiento browniano (i.e., este tipo de evolución generaría una distribución de caracteres donde las especies más cercanamente emparentadas tuvieran valores muy similares entre sí, mientras que las especies más lejanas tendrían valores de carácter diferentes y proporcionales a la longitud de las ramas) con aquella observada dada la distribución de los datos en la filogenia. La fórmula para calcular K es:

$$K = \frac{CME_0}{CME}$$

donde, CME_0 representa a la varianza de los datos observados en las puntas de las ramas de la filogenia y CME es la varianza en los datos que no puede explicarse por la estructura filogenética. Si la varianza en los datos que no se ajusta a la filogenia (CME) es muy alta, el índice K se vuelve pequeño y, por lo tanto, indica baja señal filogenética. Por el contrario, si los datos observados se ajustan bien a la estructura del árbol (especies cercanas se parecen entre sí), entonces la varianza no explicada por la filogenia (CME) será baja y el índice K tendrá valores relativamente altos, indicando alta señal filogenética. En un escenario en el que las especies no mostraran señal filogenética en absoluto, CME sería notablemente grande (la varianza no explicada por la filogenia sería muy alta), acercando el valor de K a cero. Se utilizó el programa PICANTE, implementado en R, para calcular el índice K de Blomberg y la probabilidad de que igual a cero.

EXPLORACIÓN DE LOS MÉTODOS CON SIMULACIONES

Debido a que algunos de los métodos no incluían la descripción clara de un intervalo de valores o no mostraron una tendencia clara (e.g., el parámetro α del método de mínimos cuadrados generalizados filogenéticos), realicé una serie de simulaciones para probar el intervalo de valores que tendría cada uno de los parámetros evaluados en tres distintos escenarios. En el primer escenario, para simular evolución independiente

de la filogenia, asigné de forma aleatoria los valores de los atributos en cada una de las ramas de la filogenia (Fig. 3). Este escenario simula una falta total de efecto filogenético y, por lo tanto, se espera el valor más bajo de los parámetros evaluados ρ y K , y el más alto para α . El segundo de estos escenarios simula evolución por movimiento browniano (i.e., la diferencia en el valor de un atributo sólo depende del tiempo o distancia filogenética entre las especies), por lo que esperaría observar un efecto filogenético fuerte. Para ello, los valores de los atributos están acomodados de forma tal que las especies hermanas poseen los valores mas cercanos (Fig. 4) y por lo tanto se esperan resultados relativamente altos para los parámetros ρ y K y un valor relativamente bajo para α . Por último, el tercer escenario es el de evolución totalmente restringida, en la que el efecto filogenético es absoluto, por lo que todas las especies poseen el mismo valor de atributos (Fig. 5). En este último escenario se esperan observar los valores más altos posibles en los parámetros ρ y K y el menor posible en α . Para todas las simulaciones se utilizó la filogenia original y los análisis fueron realizados en los mismos programas en que se realizaron los análisis originales.

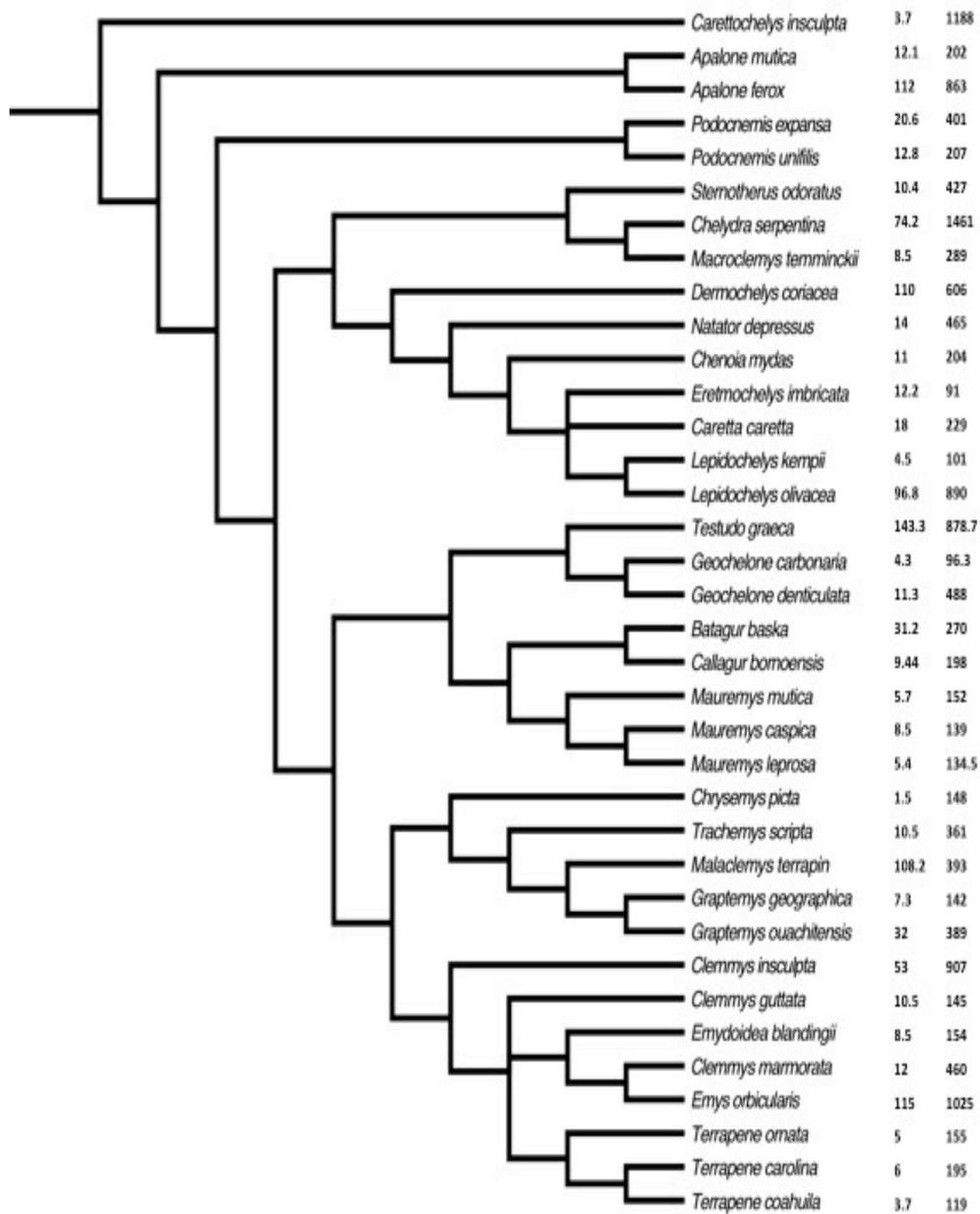


Figura 3. Escenario de evolución independiente que simula la carencia de efecto filogenético. La distribución de los valores de los atributos sobre la filogenia es aleatoria. En la columna derecha están los valores de talla promedio de las hembras (longitud curva del caparazón, mm) y en la columna izquierda se muestran los valores de tamaño de puesta (número de huevos).

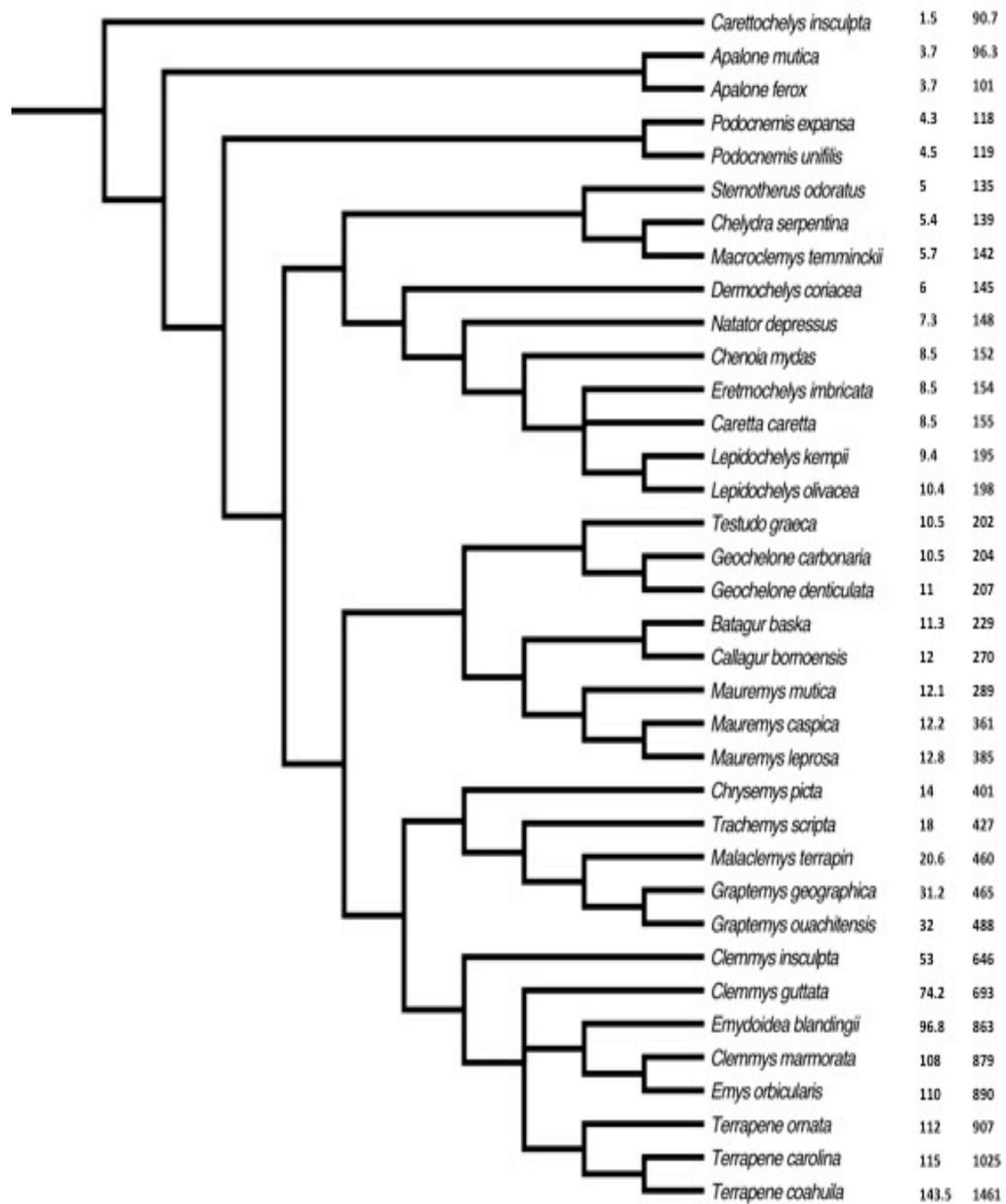


Figura 4. Escenario de evolución por movimiento browniano que simula un efecto considerable de la filogenia. La distribución de los valores de los atributos sobre la filogenia es ordenada (cambios mínimos entre especies hermanas). En la columna derecha están los valores de talla promedio de las hembras (longitud curva del caparazón, mm) y en la columna izquierda se muestran los valores de tamaño de puesta (número de huevos).

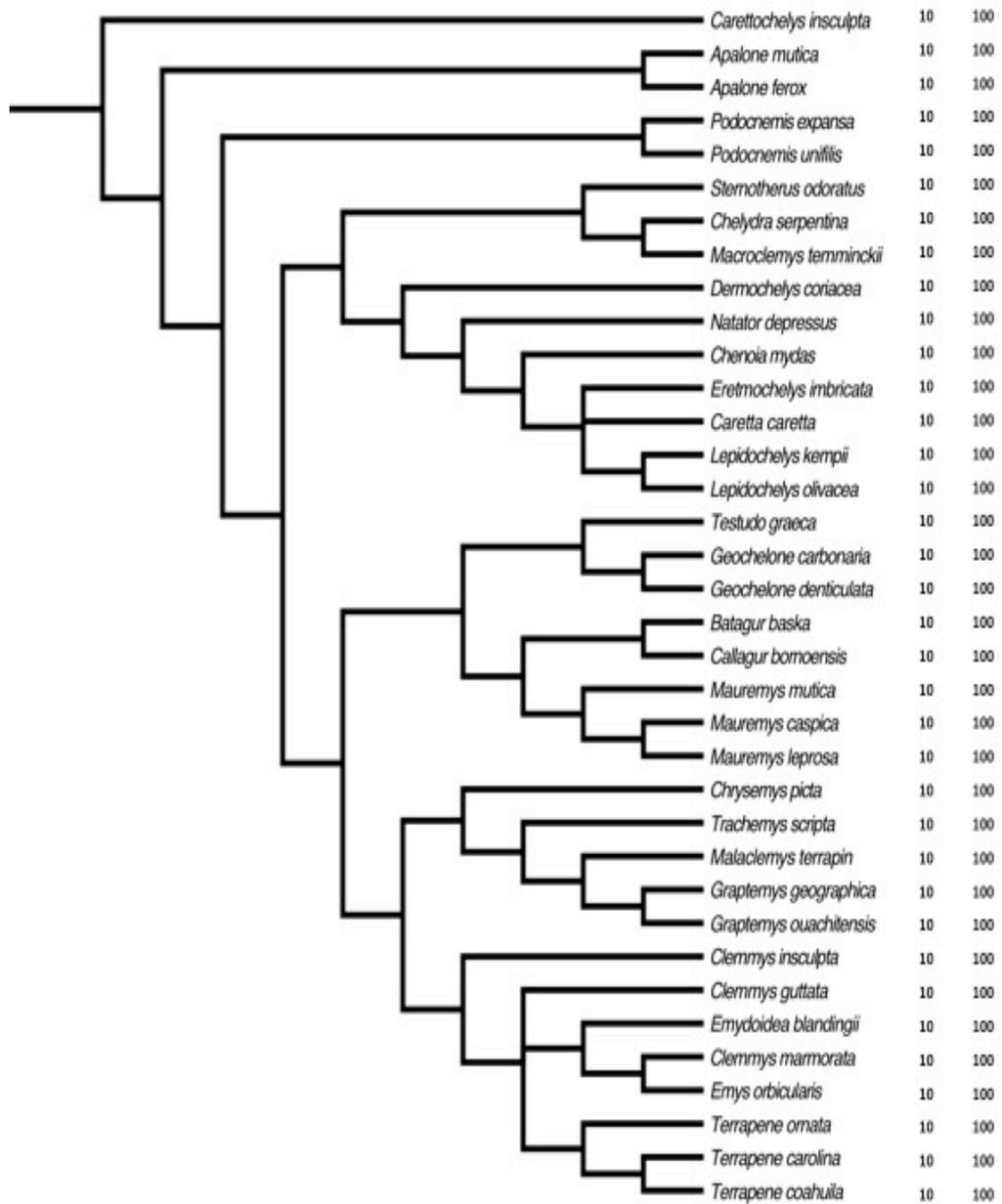


Figura 5. Escenario de evolución restringida donde la distribución de los datos sobre la filogenia es indistinta, pues los valores de los atributos son iguales. En la columna derecha se muestra un valor hipotético de talla promedio de las hembras (longitud curva del caparazón, mm) y en la columna izquierda se muestra un valor hipotético de tamaño de puesta (número de huevos).

Método de Ordenación Canónica Filogenética de Giannini (2003).

Este método estima el efecto filogenético sobre los atributos evaluados utilizando la topología del árbol como variable explicativa (X) y el valor observado de los atributos como variable dependiente (Y). La base matemática de este método es un modelo lineal generalizado de la forma:

$$Y = \beta X + \varepsilon$$

donde X y Y corresponden a matrices que contienen los datos comparativos (Fig. 6). En este caso particular, Y corresponde al vector de valores del atributo evaluado, β es un vector o matriz de parámetros cuantitativos (i.e., coeficientes de regresión) de la relación entre X y Y , X refleja la estructura filogenética y ε es el término de error.

Este análisis se desarrolla en cinco etapas: construcción de matrices, estimación de regresiones originales, prueba de permutaciones de Montecarlo, determinación de clados significativos y construcción de la matriz filogenética reducida.

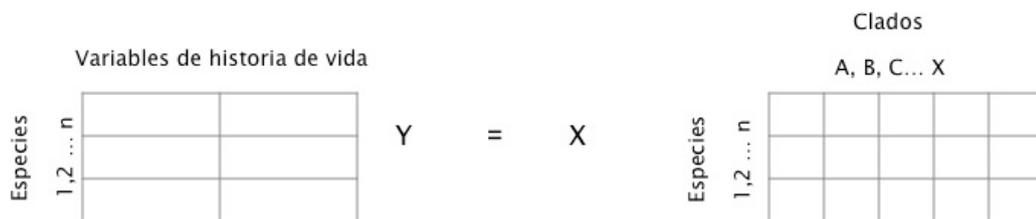


Figura 6. Estructura de matrices para el análisis de Ordenación Canónica Filogenética (CPO, por sus siglas en inglés). La matriz Y corresponde a los valores de atributos evaluados que en este estudio son caracteres de historia de vida. La matriz X corresponde a la topología filogenética.

La construcción de matrices comienza por la codificación de una matriz de topología (matriz X de la figura 6) en la que se deben hacer particiones por cada grupo filogenético (Fig. 6 y 7). Es decir, se le asigna a cada nodo de la filogenia un distintivo (letra, número, etc.) y para cada uno de ellos se hace un vector de variables binarias, donde el 1 indica que la especie pertenece al grupo y el 0 significa que dicha especie no pertenece al grupo X (Fig. 7). Por ejemplo, en la Fig. 7a el clado formado por las especies 1 y 2 se codifica en un vector (A) en el que solamente a estas dos especies se les asigna el 1 y a todas las demás, que no pertenecen a este grupo, se les asigna un 0.

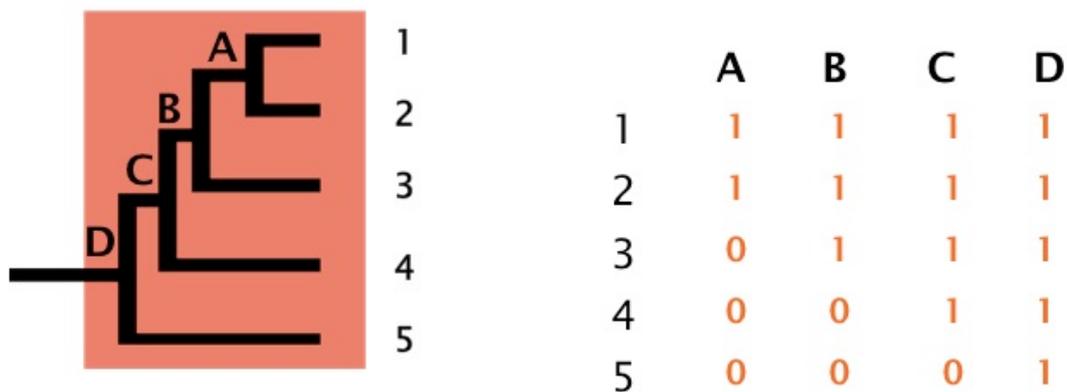


Figura 7. Ejemplo de codificación de grupos y construcción de matriz filogenética (X) para el método de CPO. En la filogenia los número 1-5 corresponden a especies en la filogenia y las letras A-D a los nodos. En tabla se muestran los vectores binarios del A al D que corresponden a los nodos de la filogenia y cada fila representa a una especie.

La construcción de la matriz Y (Fig. 7) se hace simplemente acomodando los valores de los atributos en el mismo orden en que se encuentran las especies en la matriz X. Cabe señalar que, dado que el script utilizado en este análisis no acepta valores mayores a 65, fue necesario convertir todas las variables a su logaritmo natural.

La siguiente etapa es la estimación de regresiones originales y consiste en ajustar, para cada grupo o nodo de la filogenia (A, B... X), una regresión entre los valores (Y) y su pertenencia al grupo (X; Fig. 8a). Se espera que si las especies que componen a un grupo (por ejemplo las especies 1 y 2 que componen al grupo A en la Fig. 7) exhiben valores parecidos entre sí y considerablemente más altos o más bajos en comparación con todas las otras especies que no están incluidas en dicho clado, la pendiente resultante debe ser distinta de cero. En cambio, si no existe un patrón claro en las especies que componen a un clado particular en lo que respecta a parecerse entre sí y ser diferentes al resto de las especies, se espera que la recta ajustada tenga una pendiente aproximadamente igual a cero (Fig. 8b).

La tercera etapa consiste en examinar estadísticamente si las pendientes ajustadas a los clados y los valores de los atributos de interés son significativamente diferentes de cero. Para lograr este objetivo, se realizan 999 permutaciones Montecarlo en los valores de la matriz Y (Fig. 6) para cada uno de los clados. En cada una de estas permutaciones se redistribuyen aleatoriamente los valores de los atributos a las especies. Para cada nueva distribución de valores, se hace el mismo

análisis de regresión descrito con anterioridad para calcular una nueva pendiente. Al final, después de tener el resultado de las mil regresiones (i.e., la original más 999 aleatorias), se determina si la pendiente ajustada a los datos originales de cada grupo es significativa a través de la comparación con la distribución de pendientes aleatorias. Cuando al menos 950 de estas pendientes aleatorias (el 95%) tienen un valor diferente al de la pendiente obtenida con los datos originales, es posible concluir que la pendiente original calculada es significativamente diferente de cero (énfasis que cuando los datos se distribuyen al azar entre las especies, las pendientes obtenidas estarán siempre alrededor del cero). Una pendiente significativa indica que en ese clado hay efecto filogenético. En esta prueba se ajusta el valor de significancia con la fórmula $(0.05/\sqrt{n})$ para corregir el error debido a prueba múltiples. Estas dos etapas del análisis, la estimación de regresiones originales y las permutaciones Montecarlo, se realizaron con un solo script en R (Apéndice 3).

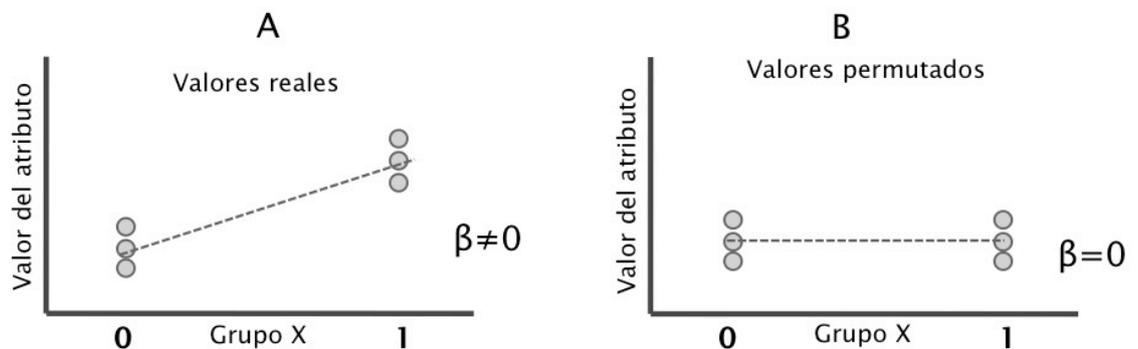


Figura 8. Estimaciones de regresión. El eje de las x 's corresponde a la pertenencia a un grupo. En (A) se muestra una situación hipotética de regresión original en el que la pendiente es diferente de cero (como ocurriría cuando los caracteres difieren significativamente dentro de un grupo). En (B) se muestra una situación de regresión en la que la pendiente es igual a cero y por lo tanto no hay efecto de la pertenencia al grupo sobre los valores de atributos (como correspondería en las permutaciones).

Una vez que se exploró la significancia estadística de las pendientes asociadas a todos los grupos (clados), se puede pasar a la etapa de la determinación de clados significativos. Esto se hace simplemente comparando cuáles de los nodos (A, B... X), muestran un valor de P menor o igual al valor ajustado de significancia, que en este caso fue de 0.008. Los clados significativos son los que presentan una distribución de

valores del atributo distinta a la del resto de las especies (i.e., dicho clado tiene un efecto filogenético en su distribución de valores, ya que sus atributos se parecen más entre ellas que al del resto de las especies).

La quinta y última etapa de este análisis consiste en la construcción de la matriz filogenética reducida que incluye al número mínimo de clados que concentran la mayor variación del atributo. A esta matriz puede atribuírsele con certeza un efecto filogenético. Esta reducción de grupos debe llevarse a cabo debido a que algunos de los clados que resultaron significativos según la etapa anterior del análisis son redundantes en lo que respecta a su composición de especies (i.e., algunos clados resultan significativos por estar contenidos en un grupo significativo más incluyente). Esta redundancia produce un efecto de colinealidad (i.e., dos clados son prácticamente iguales salvo por una o dos especies) que puede eliminarse al hacer un análisis de regresión por adición de factores (stepwise regression; Zar, 2009). En este análisis se incorporan sólo los clados individualmente significativos como factores independientes en la regresión. El resultado es un valor de P asociado a cada factor de regresión. Aquellos que resultan significativos de este análisis constituyen la matriz reducida, que es un modelo que explica la mayor cantidad de varianza y que incluye sólo al subgrupo de X 's que son significativas y no redundantes en cuanto a las especies que las componen. Por ejemplo, si en la cuarta etapa del análisis resultara significativo el grupo 3 de la Figura 7a, seguramente también resultarían significativos el 2 y el 1, ya que están anidados en el primero. Al hacer el análisis de regresión por adición de factores se incorporarían en un modelo lineal los tres clados como variables explicativas, de forma tal que, sólo aquellos que realmente expliquen una proporción considerable de la variación en el atributo serán el o los que resulten significativos y conformarán la matriz filogenética reducida. Este análisis se realizó en el programa R con el script descrito en el Apéndice 3, al cual se le cambiaron los términos de regresión dependiendo de los grupos significativos resultantes de la fase anterior del análisis para cada uno de los atributos evaluados.

Algunos de los métodos filogenéticos comparativos permiten hacer evaluaciones posteriores sobre la proporción de varianza no explicada por su historia evolutiva. Estas evaluaciones usualmente se enfocan en conocer si algún factor ambiental puede explicar la variación que no se relaciona con la filogenia. En otras palabras, se busca saber si ha habido evolución adaptativa en respuesta a presiones de selección locales en un tiempo evolutivo relativamente reciente. Para evaluar este efecto se realizaron los siguiente análisis:

I. Correlación entre residuos y latitud.

Como subproducto del método de autocorrelación filogenética, se obtiene la proporción del atributo que no es explicada por la filogenia (vector e del modelo de autocorrelación filogenética; Cheverud et al., 1985). Estos valores independientes de la filogenia se conocen como residuos o componentes independientes y se pueden correlacionar con algunos factores ambientales para explorar si existe alguna relación presumiblemente adaptativa. En este caso se calcularon correlaciones de Pearson en el programa Statistica 8.0 tanto para talla de las hembras como tamaño de puesta, entre los residuos de la autocorrelación y la latitud promedio a la que habitan las especies estudiadas (obtenida del portal Turtles of the World, (<http://nlbif.eti.uva.nl/bis/turtles.php>); Apéndice 4).

II. Método de Hansen con ambiente, dieta y latitud.

Este método fue desarrollado por Hansen (1997) para evaluar la importancia relativa de un factor ambiental en la evolución de un carácter. Este método estadístico estima el efecto de un factor selectivo sobre la posición de un óptimo adaptativo. Para esto considera que, dado el criterio de optimización, un estado de carácter se mantiene en su valor óptimo local por medio de selección estabilizadora y éste cambia a otro valor óptimo luego de una demanda funcional específica. En este escenario, se prueba si los

factores selectivos evaluados representaron esa demanda específica que derivó en un cambio en el estado de carácter.

El primer paso en este método es identificar a lo largo de la filogenia los cambios de un ambiente a otro. El primer paso es identificar en qué nodo, o nodos, de la filogenia hubo una transición entre un ambiente (o factor) ancestral (θ_2) hacia un ambiente o factor derivado, que representó una nueva demanda funcional (e.g., el cambio de un ancestro dulceacuícola a un descendiente marino). A partir de este mapa de cambios en la filogenia este método permite calcular, con base en mínimos cuadrados generalizados: un valor de la diferencia entre los fenotipos óptimos en el ambiente ancestral y el derivado (θ_1), el valor óptimo estimado del fenotipo ancestral (θ_2) y un valor de R^2 . Cuando el valor de la diferencia entre los fenotipos óptimos (θ_1) es significativamente diferente de cero, se puede asumir que hubo un cambio fenotípico asociado a un cambio histórico en el ambiente que produjo una nueva demanda funcional. Además, el valor de R^2 describe el ajuste del modelo en general y da una medida de la variación en el atributo que puede ser atribuida al cambio en el ambiente o factor evaluado.

Este método fue implementado en el programa COMPARE 4.6b utilizando el módulo de Hansen Adaptation Model y mapeando dentro del árbol aquellos clados donde se observa un cambio de factor ambiental (del carácter ancestral al carácter derivado; Figuras 9, 10 y 11). Los factores evaluados con este método fueron:

- Hábitat (dulceacuícola, marino y terrestre)
- Dieta (omnívora, carnívora y herbívora)
- Distribución latitudinal (tropical, subtropical, templada cálida y templada fría)

Las opciones dulceacuícola, omnívora y subtropical fueron consideradas como el estado de carácter ancestral, por encontrarse presente en la especie más basal del árbol (Li et al., 2008). Los factores evaluados para cada especie fueron determinados a partir de la información disponible en el portal "Turtles of the World". El tipo de dieta para cada especie va de acuerdo con los registros que se tienen de la alimentación de adultos en su hábitat natural. Se clasificaron como carnívoras aquellas especies con

registros de ingesta total o predominante de presas vivas (datos de ingesta esporádica o accidental de material vegetal). Se clasificaron como omnívoras aquellas con registros de ingesta tanto de material animal como vegetal, aunque este último se ingiera en menor proporción pero constituye parte importante de la dieta. Por último, las especies clasificadas como herbívoras fueron todas aquellas con registros de ingesta total o predominantemente herbívora (datos de ingesta esporádica o accidental de material animal).

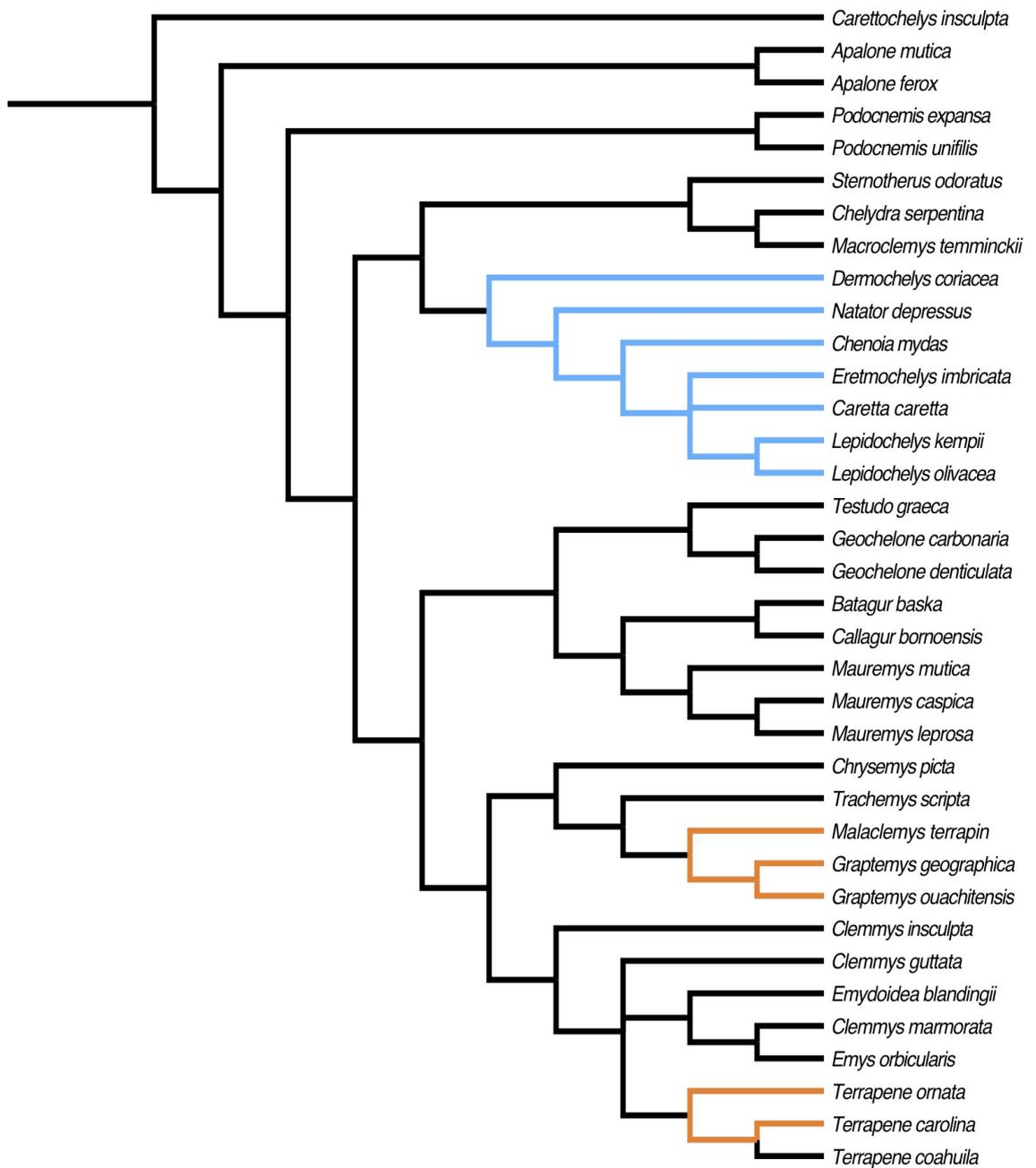


Figura 9. Mapeo del cambio de hábitat sobre la reconstrucción filogenética. En azul se muestran las especies marinas, en anaranjado, las especies terrestres y en negro, las especies con el hábitat ancestral, dulceacuícola.

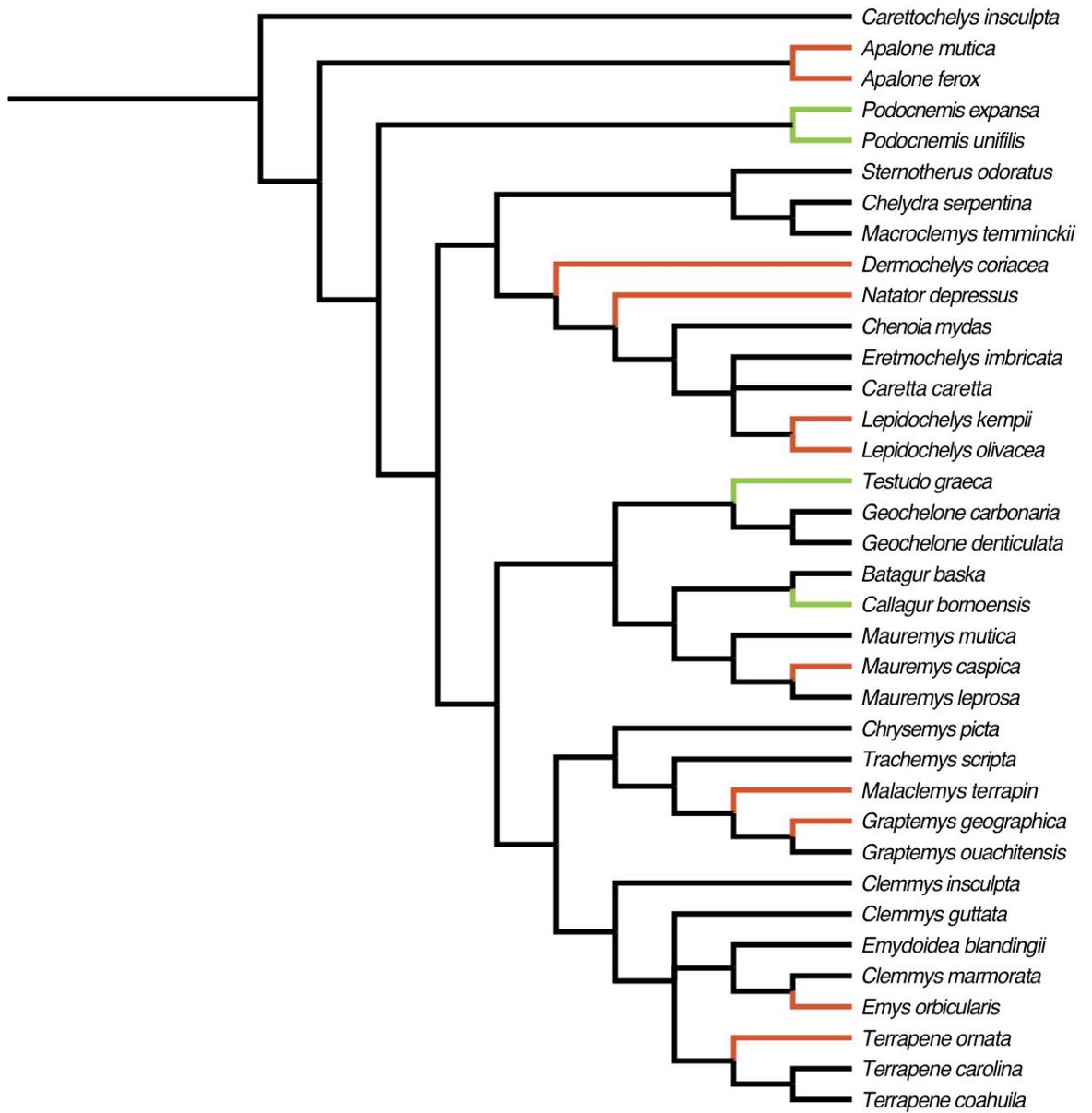


Figura 10. Mapeo del cambio de dieta sobre la reconstrucción filogenética. En rojo se muestran las especies con dieta carnívora, en verde las especies con dieta herbívora y en negro, las especies con dieta ancestral, omnívora.

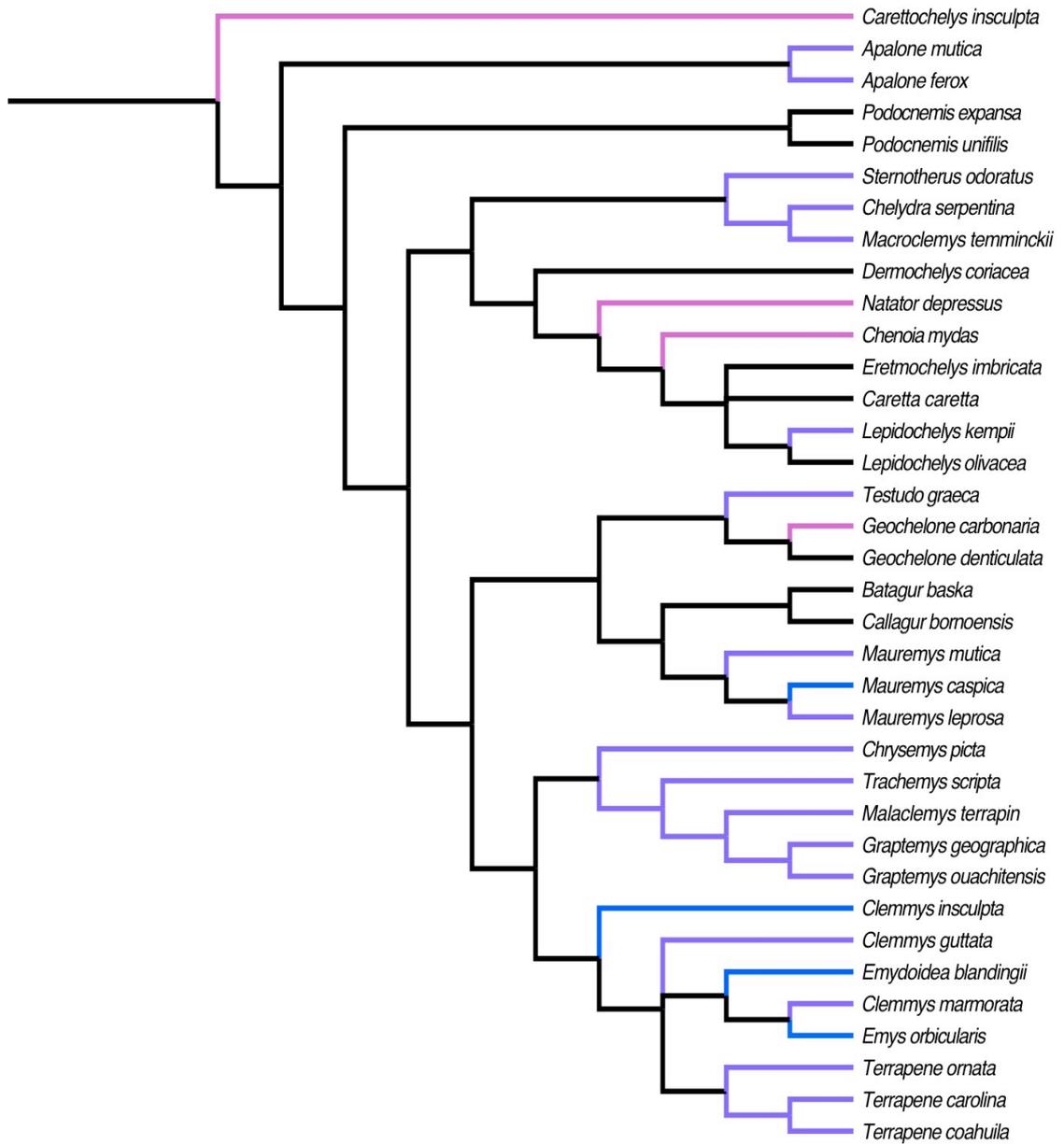


Figura 11. Mapeo del cambio de distribución sobre la reconstrucción filogenética. En morado, las especies con distribución templada cálida en azul las especies con distribución templada fría, en negro las especies con distribución tropical y en rosa, las especies con la distribución ancestral, subtropical.

RESULTADOS

Las 36 especies incluidas en este estudio representan al clado de las tortugas a nivel de subordenes y subfamilias (Tabla 1). Este nivel de representatividad permitió hacer un estudio de patrones macroevolutivos, cuyos resultados pueden dividirse en cuatro fases consecutivas: la de reconstrucción de la filogenia, la implementación de métodos filogenéticos comparativos, las simulaciones con algunos de éstos métodos para una exploración más profunda de los mismos y, por último, la búsqueda de asociaciones entre factores ambientales y la variación no explicada por la filogenia.

RECONSTRUCCIÓN FILOGENÉTICA

Actualmente, dos de los métodos de reconstrucción filogenética más utilizados son el de parsimonia y el de inferencia bayesiana. Por su naturaleza, resultan contrastantes, por lo que explorar ambas hipótesis de reconstrucción parecía indispensable. Como era de esperarse, las reconstrucciones obtenidas por ambos métodos fueron distintas. En términos generales la reconstrucción por parsimonia tuvo resolución muy baja en algunas de las ramas, lo que produjo siete árboles igualmente parsimoniosos. Este problema también afectó la reconstrucción por inferencia bayesiana, pues algunas ramas tuvieron un grado de soporte bajo pero, en términos generales, esta última resultó una reconstrucción con mejor grado de soporte y los clados resultantes están resueltos en la mayoría de los casos.

a) Parsimonia

Cuando existe un bajo grado de soporte en las ramas de una reconstrucción, el método de parsimonia selecciona como equivalentes a todas aquellas hipótesis que presenten el mayor grado de parsimonia (menor longitud; Morrone, 2003), debido principalmente a la homoplasia. En este caso, dado que en la parte basal del árbol el grado de soporte fue bajo, resultaron siete árboles igualmente parsimoniosos, cuya longitud fue de 3976 pasos y sus índices de consistencia (CI) y retención (RI) fueron 54 y 73 respectivamente. Estos valores miden el ajuste de los caracteres a la topología del

árbol, pero tienen sentido sólo al comparar hipótesis de topología en una misma reconstrucción, por lo que no resultan útiles en este caso. El árbol consenso (Figura 12) presenta varias politomías, resultado de las diferencias entre en las topologías e los distintos árboles, lo cual produce un bajo soporte que hubo en esas ramas.

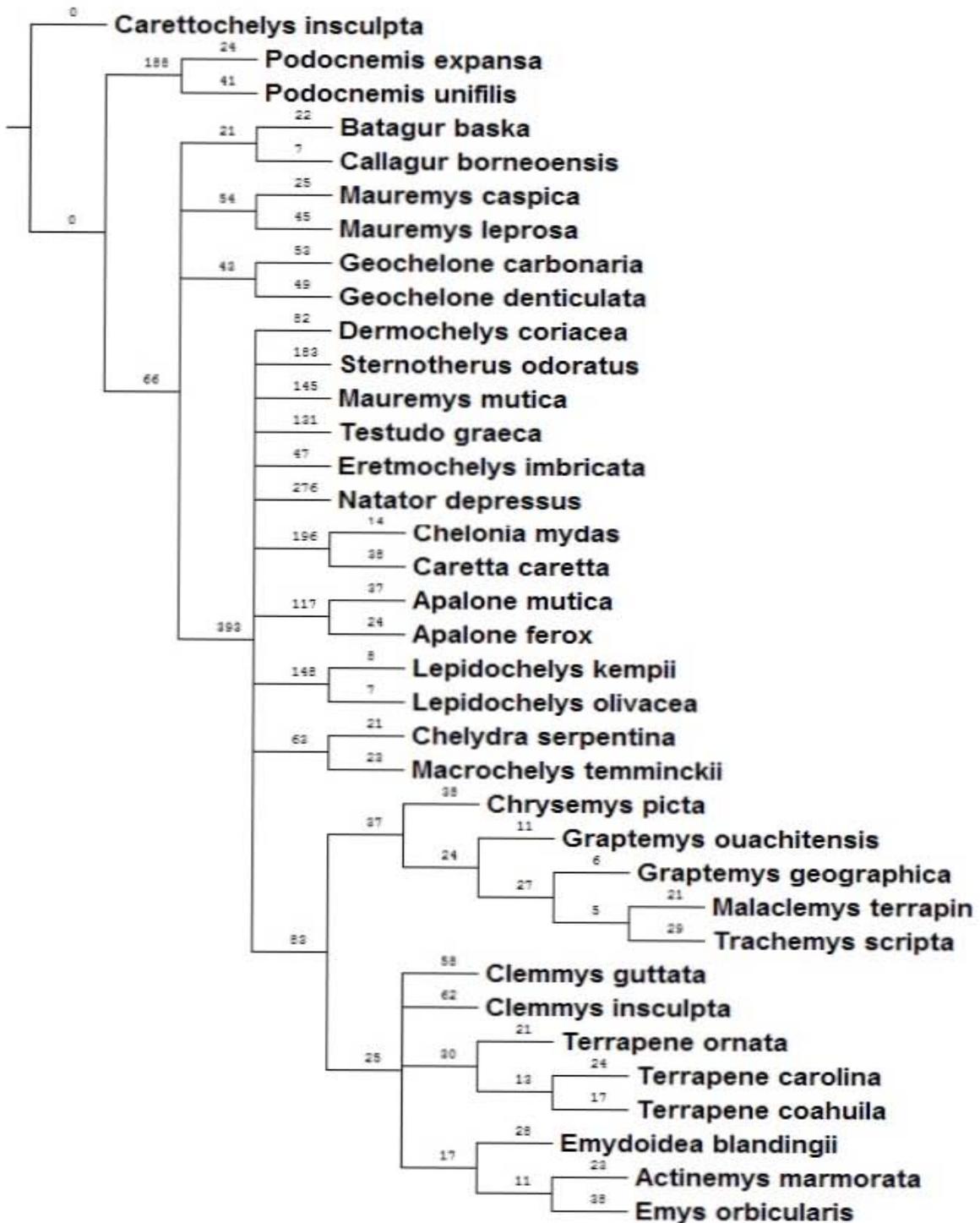


Figura 12. Árbol consenso de los 7 árboles más parsimoniosos, según el método de reconstrucción filogenética de Parsimonia. Estos árboles tuvieron una dimensión de 3976 y un índice de consistencia, CI=54 y de retención, RI=73. Por encima de las ramas se detalla la distancia en número de pasos.

b) Inferencia Bayesiana

Gracias a la naturaleza de este método, fue posible explorar varias posibilidades de reconstrucción utilizando distintos modelos evolutivos y variando las estrategias de partición. La mejor de éstas resultó la P₃ (Tabla 4 y 5), que incorporó un modelo evolutivo para la primera y segunda posición del gen mitocondrial, un modelo para la tercera posición del gen mitocondrial y un modelo más para todos los genes nucleares (*rag-1*, *r35*, *tb29* y *bndf*).

A pesar de que algunas de las ramas de la filogenia obtenida por este método muestran un nivel bajo de soporte, en términos generales esta reconstrucción muestra mejores grados de soporte y sólo tiene dos politomías. Por estas razones fue la hipótesis filogenética seleccionada para la implementación de los métodos filogenéticos comparativos (Fig. 13).

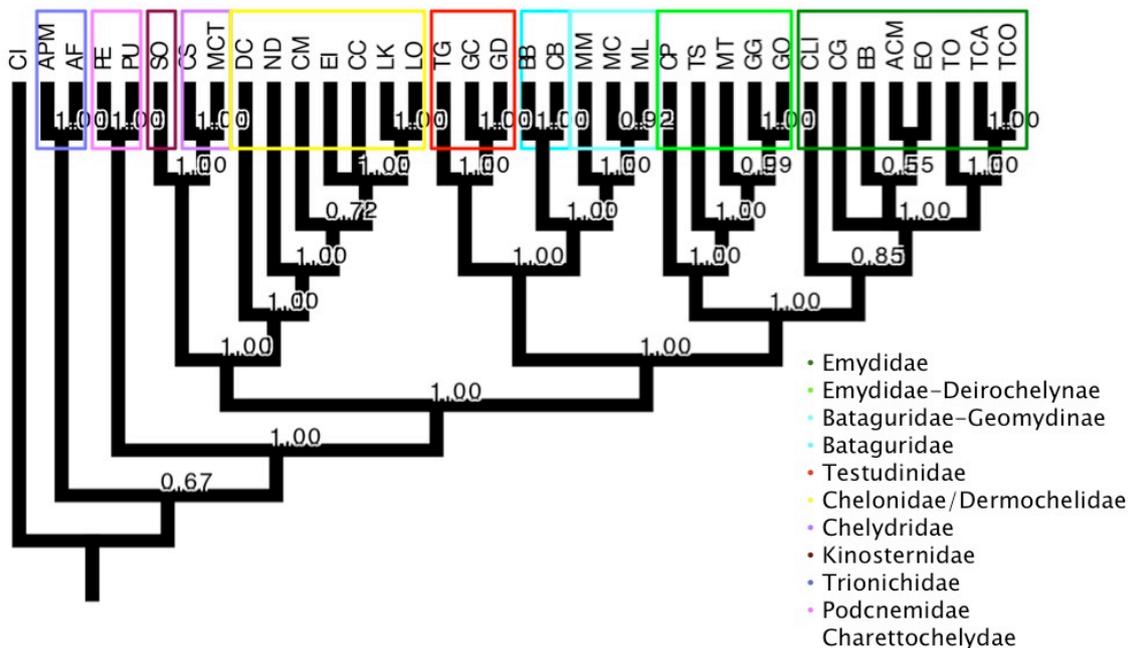


Figura 13. Árbol consenso de Inferencia Bayesiana, hecha con 10 millones de generaciones y 3 particiones, considerando los genes *cytb*, *RAG-1*, *R35*, *BDNF* y *TB29*. En los nodos se encuentra el valor de soporte. Las familias y subfamilias se detallan en los cuadros de color.

Tabla 5. Resultados de la comparación entre el factor de Bayes para todas las estrategias de partición. En cada fila se contrastan dos particiones mediante el doble del cociente de sus medias armónicas. Un valor positivo de este cociente se considera como evidencia a favor de la hipótesis con mayor cantidad de particiones (H_0). En negritas se resalta la estrategia de partición con mejor grado de verosimilitud.

Estrategias de Partición							
	P _{7A}	P _{7B}	P ₆	P ₅	P ₄	P ₃	P ₂
P ₂	1101	691	955	-4499	181	1107	-
P ₃	-6.34	-416	-151	-5606	-926	-	
P ₄	919	510	774	-4680	-		
P ₅	5600	5190	5455	-			
P ₆	145	-264	-				
P _{7A}	-	-					
P _{7B}	-						

Métodos filogenéticos comparativos

Los cuatro métodos utilizados para evaluar el efecto filogenético (también denominado inercia, señal o restricción) fueron consistentes en sus resultados. Existe un efecto de la filogenia sobre el tamaño de puesta y sobre la talla de las hembras dentro el grupo de las tortugas (Fig. 14). Sólo uno de estos métodos, el de ordenación canónica filogenética (Giannini, 2003), permitió hacer una exploración más fina dentro de la filogenia ubicando el o los clados donde el efecto filogenético es más fuerte.

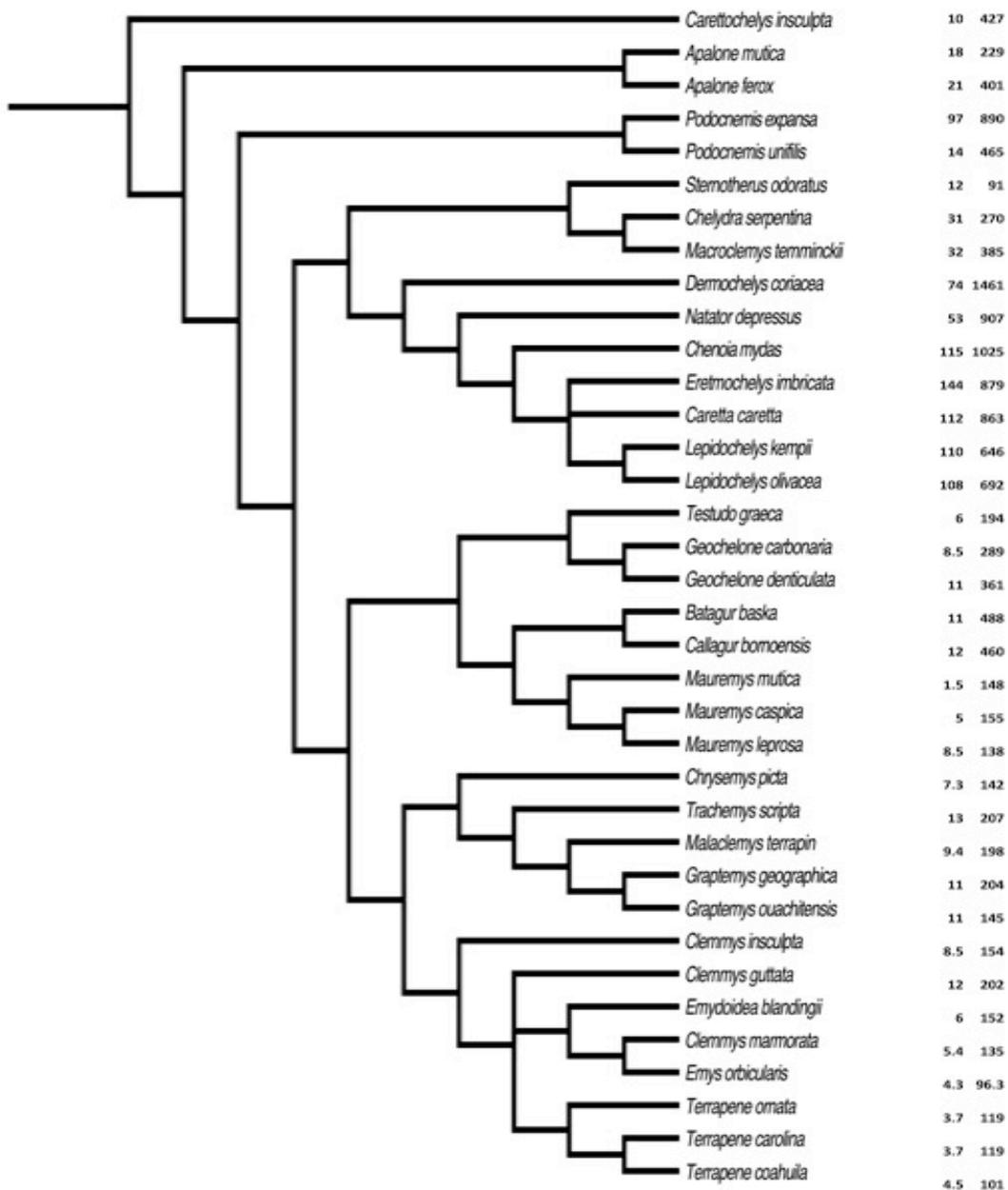


Figura 14. Reconstrucción filogenética y valores atributos reproductivos. En la columna de la izquierda, el tamaño de puesta (número de huevos). En la columna de la derecha, el tamaño de las hembras adultas (longitud curva del caparazón).

Autocorrelación filogenética

Los resultados obtenidos con este método muestran que tanto en la talla como en el tamaño de puesta existe inercia filogenética, ya que ambos atributos tienen un coeficiente de autocorrelación positivo y significativamente diferente de cero (Tabla 6). El efecto filogenético afecta en igual medida a ambos caracteres, pues no se aprecia una diferencia significativa entre los valores del parámetro ρ asociado a cada uno de los atributos (i.e., los intervalos de confianza se superponen).

Tabla 6. Valores de inercia filogenética ($\rho \pm e.e.$) en talla y tamaño de puesta en tortugas.

Atributo	ρ	Intervalo de confianza (95%)
Talla	0.58 ± 0.05	0.46 – 0.66
Puesta	0.67 ± 0.05	0.55 – .75

Mínimos cuadrados generalizados filogenéticos

Los resultados obtenidos con este método también muestran que existe restricción filogenética sobre los atributos de talla de las hembras y tamaño de puesta en las tortugas (Tabla 7), ya que en ambos casos α fue positivo y con valor intermedio (el valor más alto posible de α de acuerdo con el programa Compare fue de 15; Tabla 7). Esta restricción es mayor en el tamaño de puesta, pues tiene un valor de α significativamente menor al que tiene la talla. Este resultado indica que la probabilidad de evolución independiente es mayor en la talla en comparación con el tamaño de puesta.

Tabla 7. Valores de restricción filogenética ($\alpha \pm e.e.$) en talla y tamaño de puesta en tortugas.

Atributo	α	Intervalo de confianza (95%)
Talla	7.30 \pm 2.61	4.42 – 15
Puesta	5.83 \pm 1.37	3.86 – 8.9

Señal filogenética

Este método consta de dos análisis complementarios, la prueba de aleatorizaciones y el cálculo del índice K (Tabla 8). En lo que respecta a la prueba de aleatorizaciones, se demostró que existe señal filogenética tanto en la talla de las hembras como en el tamaño de puesta, pues la varianza observada de los contrastes independientes de la filogenia fue significativamente menor en comparación con las mil varianzas de los contrastes calculados a partir de los datos aleatorizados ($P=0.001$; Fig. 15). Este resultado indica que la variabilidad en los contrastes obtenidos con los datos observados es estadísticamente menor que la variabilidad de los contrastes obtenidos con datos aleatorizados.

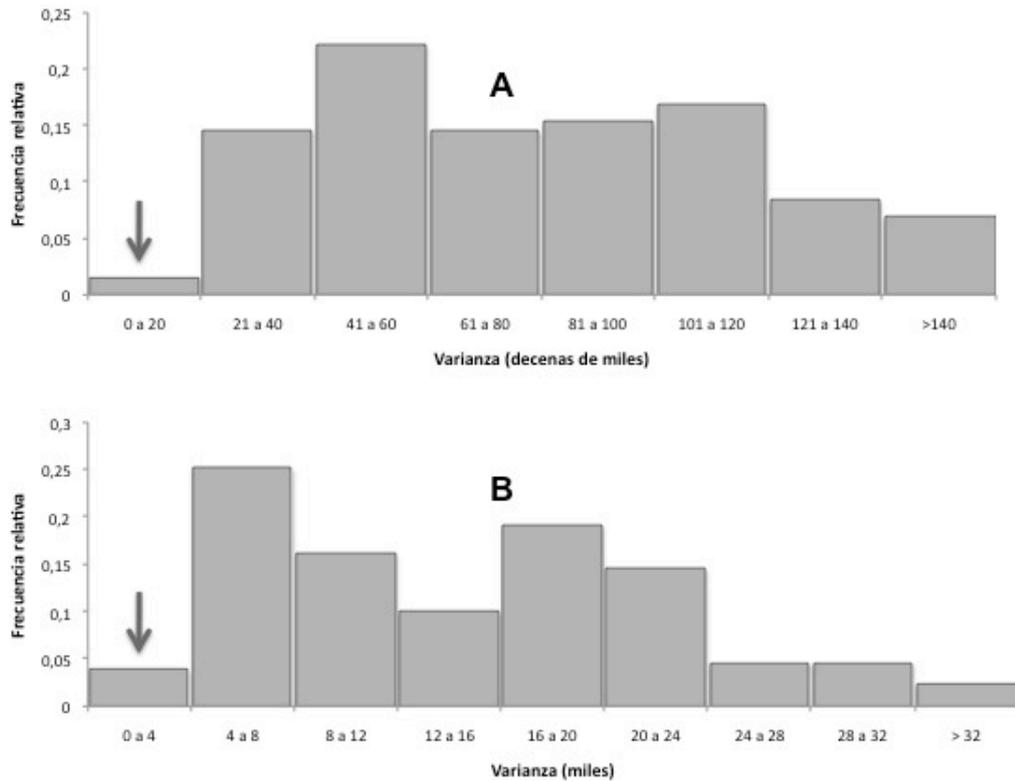


Figura 15. Distribución de frecuencias de las varianzas obtenidas a partir de los contrastes independientes de filogenia en la prueba de aleatorización de Blomberg. (A) para talla y (B) para tamaño de puesta. Las flechas indican el intervalo de valores donde se encuentra la varianza de los contrastes correspondiente a los valores de carácter originales (en ambos casos resultó el valor más bajo).

Similarmente, el valor obtenido del índice K (Tabla 8) indica que existe señal filogenética relativamente fuerte y prácticamente equivalente en ambos atributos, pues sus valores son muy similares. Tanto para la talla como para la puesta, K fue significativamente diferente de cero. Es decir, dentro del grupo de las tortugas, tanto la talla de las hembras como el tamaño de puesta tienden a presentar valores más parecidos entre especies en función del grado de parentesco que haya entre ellas.

Tabla 8. Valores de señal filogenética dados por el índice K y la P asociada a las aleatorizaciones de los contrastes.

Atributo	K	P
Talla	0.67	0.001
Puesta	0.69	0.001

Los tres métodos filogenéticos comparativos utilizados hasta este punto indicaron la existencia de efecto filogenético sobre los atributos. Sin embargo, la comparación entre ellos y la interpretación de sus valores no era clara en todos los casos (e.g., en la literatura no había reportado un intervalo de valores para el parámetro α). Por esta razón realicé una serie de simulaciones en tres distintos escenarios evolutivos que evidenciarían los valores extremos de los parámetros ρ y α , así como para el índice K.

Los resultados de estas simulaciones (Tabla 9) corresponden con lo esperado en lo que respecta a ρ y K, ya que los valores más bajos y no significativos se presentaron en el escenario de evolución independiente (escenario 1), valores intermedios y significativos en el escenario de evolución por movimiento browniano (escenario 2) y el valor máximo de ρ y la carencia de un valor para K (dado que no había valores que aleatorizar) en el caso del escenario de evolución restringida (escenario 3). En lo que respecta al parámetro α , el comportamiento no fue claro pues los valores obtenidos en los primeros dos escenarios fueron iguales a pesar de que simulaban condiciones evolutivas contrastantes. En el caso del tercer escenario que simulaba evolución totalmente restringida y, al cual le corresponderían los valores más bajos de α , generó resultados contrastantes en ambos atributos. En la talla, el valor obtenido fue bajo y muy cercano al esperado (1.01; Tabla 9) pero en el caso del tamaño de puesta, el valor obtenido fue muy alto (10.04), mucho más cercano al límite superior que al inferior.

Tabla 9. Valores obtenidos para inercia filogenética (ρ), restricción (α) y señal filogenética (K y P) para tres escenarios hipotéticos. El escenario uno simula evolución independiente con valores de atributos distribuidos aleatoriamente, el escenario dos simula evolución por movimiento browniano con valores de los atributos ordenados, de forma tal que hay valores semejantes entre especies emparentadas y, por último, el escenario tres simula evolución totalmente restringida con valores iguales para todas las especies. Se muestran también los errores estándar de los parámetros.

Parámetro	Escenario evolutivo					
	1. evolución independiente		2. por movimiento browniano		3. totalmente restringido	
	Talla	Puesta	Talla	Puesta	Talla	Puesta
ρ	-0.24 ± 0.48	-0.36 ± 0.5	0.79 ± 0.13	0.82 ± 0.11	0.99 ± 0	0.99 ± 0
α	15	15	15	15	1.01	10.04
K, P	0.075, 0.797	0.077, 0.719	0.547, 0.001	0.657, 0.001	Sin valor	Sin valor

NOTA: Los intervalos de valores para los parámetros son: ρ entre -1 y 1, α entre 1 y 15 y K entre 0 y 1.

Ordenación canónica filogenética

El resultado final de este método deriva de varios resultados parciales, el primero de los cuales es la codificación de la topología filogenética en una matriz (Fig. 15), donde cada columna o grupo corresponde a un clado (i.e., grupo de especies que comparten un ancestro común). En total los grupos codificados en esta filogenia fueron 33 (Figs. 16 y 17).

Cod	talla	puesta	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	q	r	s	t	u	v	w	x	y	z	aa	bb	cc	dd	ee	ff	gg				
CI	4.28	1.035	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
AMP	2.29	1.8	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
AF	4.01	2.06	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
PE	8.9	9.68	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
PU	4.65	1.39	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
SO	0.91	1.22	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
CS	2.69	3.12	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
MCT	3.85	3.2	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
DC	14.6	7.42	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
ND	9.07	5.28	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
CM	10.3	11.5	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
EI	8.78	14.4	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
CC	8.63	11.2	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
LK	6.46	11	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
LO	6.93	10.8	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
TG	1.95	0.6	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GC	2.89	0.85	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CD	3.61	1.05	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BB	4.88	1.13	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CB	4.6	1.2	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MM	1.48	0.15	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MC	1.55	0.5	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ML	1.39	0.85	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CP	1.42	0.73	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TS	2.07	1.28	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MT	1.98	0.94	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GG	2.04	1.1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GO	1.45	1.05	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CLI	1.54	0.85	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EB	2.02	1.21	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ACM	1.52	0.57	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EO	1.35	0.54	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CG	0.96	0.43	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TO	1.19	0.37	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TCA	1.19	0.37	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TCO	1.01	0.45	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Figura 16. Matrices para el análisis de ordenación canónica filogenética. La matriz Y incluye a los caracteres de historia de vida (talla y puesta). La matriz X es la matriz filogenética y está representada por las columnas siguientes, donde cada grupo (a-gg) corresponde con un clado (ver figura 17). En esta matriz, los 1's indican la pertenencia a un grupo particular, mientras que los 0's indican que esa especie no pertenece a dicho grupo.

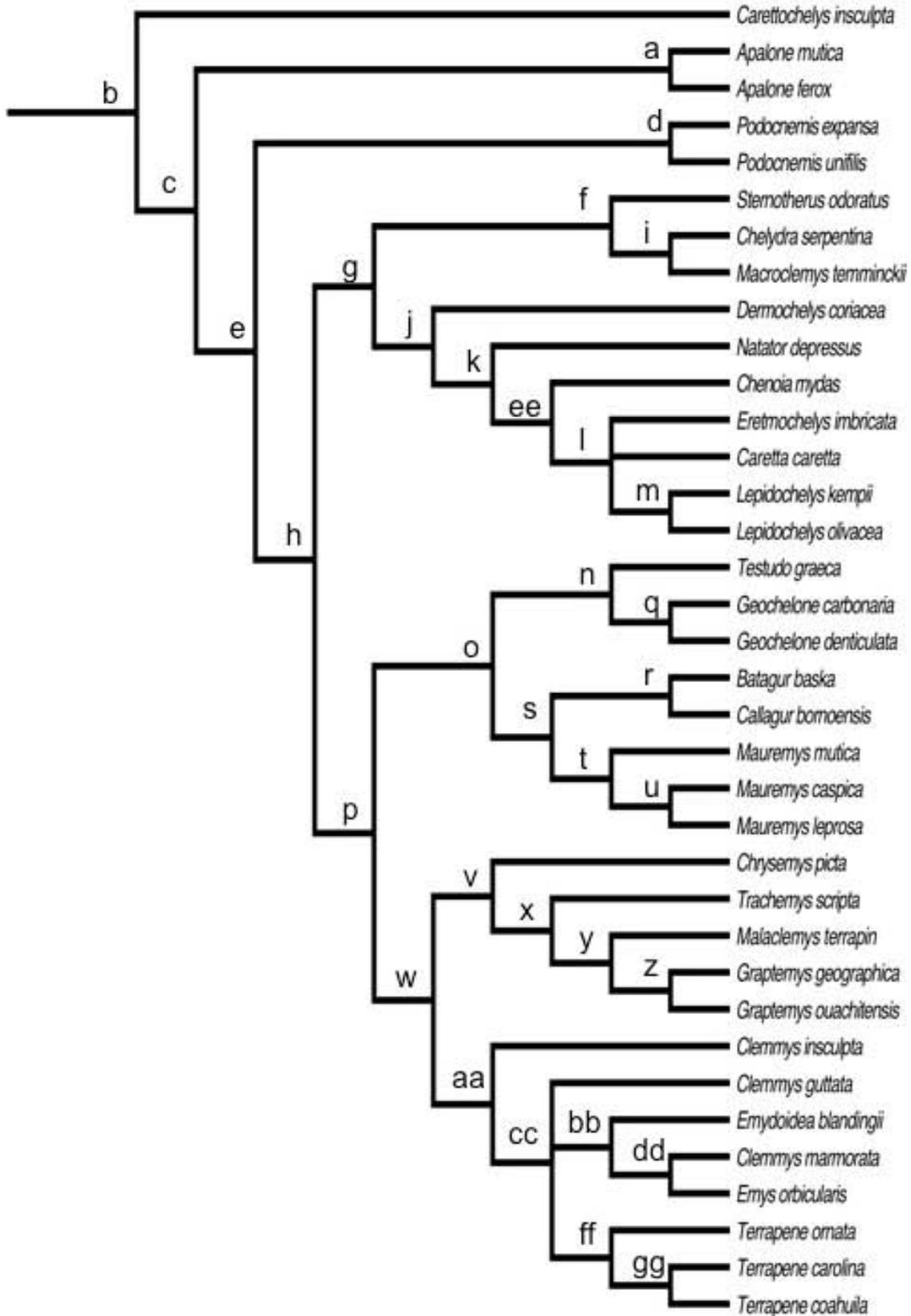


Figura 17. Reconstrucción filogenética con detalle en los grupos codificados en la matriz filogenética del método de ordenación canónica filogenética. Cada letra señala un grupo diferente.

El segundo resultado de este método fue la obtención de los grupos que, por sus valores de atributos, resultaron significativamente diferentes del resto de las especies de la filogenia ($P \leq 0.0087$). Esto se logró a partir de los cálculos de las pendientes de regresión originales y aleatorias para cada uno de los grupos (Tabla 10). Hubo nueve grupos que resultaron distintos por sus valores de talla y once grupos por su tamaño de puesta (Tabla 10; Fig. 18).

Tabla 10. Valores de significancia para los 33 grupos codificados en la matriz filogenética del análisis de ordenación canónica filogenética. En negritas se muestran los estimados de P de grupos significativamente diferentes ($P \leq 0.0087$) de acuerdo con su talla o tamaño de puesta.

Grupo	Talla	Puesta
a	0.4997	0.5583
b	0.4074	0.4617
c	0.4026	0.4592
d	0.1029	0.2738
e	0.4294	0.3385
f	0.2857	0.5091
g	0.0003	0.0001
h	0.2641	0.5359
i	0.5201	0.3668
j	0.0001	0.0001
k	0.0005	0.0001
l	0.0143	0.0002
m	0.1131	0.0154
n	0.3660	0.1357
o	0.1613	0.0064
p	0.0001	0.0001
q	0.5114	0.2894
r	0.3393	0.3998
s	0.2374	0.0302
t	0.0490	0.0106
u	0.1072	0.1103
v	0.0419	0.1187
w	0.0001	0.0001
x	0.0855	0.1984
y	0.1289	0.2415
z	0.1996	0.3540
aa	0.0001	0.0002
bb	0.0778	0.1093
cc	0.0002	0.0003
dd	0.0849	0.0619
ee	0.0001	0.0005
ff	0.0028	0.0025
gg	0.0135	0.0195

Hay nueve grupos significativos determinados por ambos atributos, éstos son, de menos a más incluyentes: ee, k, j y g, en una sección de la filogenia y ff, cc, aa, w y p, en otra sección de la filogenia (Tabla 10, Fig. 18). Hay dos grupos más que sólo resultaron significativos en para el tamaño de puesta. Estos son el grupo o, que está incluido en el p y el grupo l, que está incluido en dentro del ee. Todos los grupos significativos resultantes comparten gran parte de las especies, por lo que existe un efecto de colinealidad.

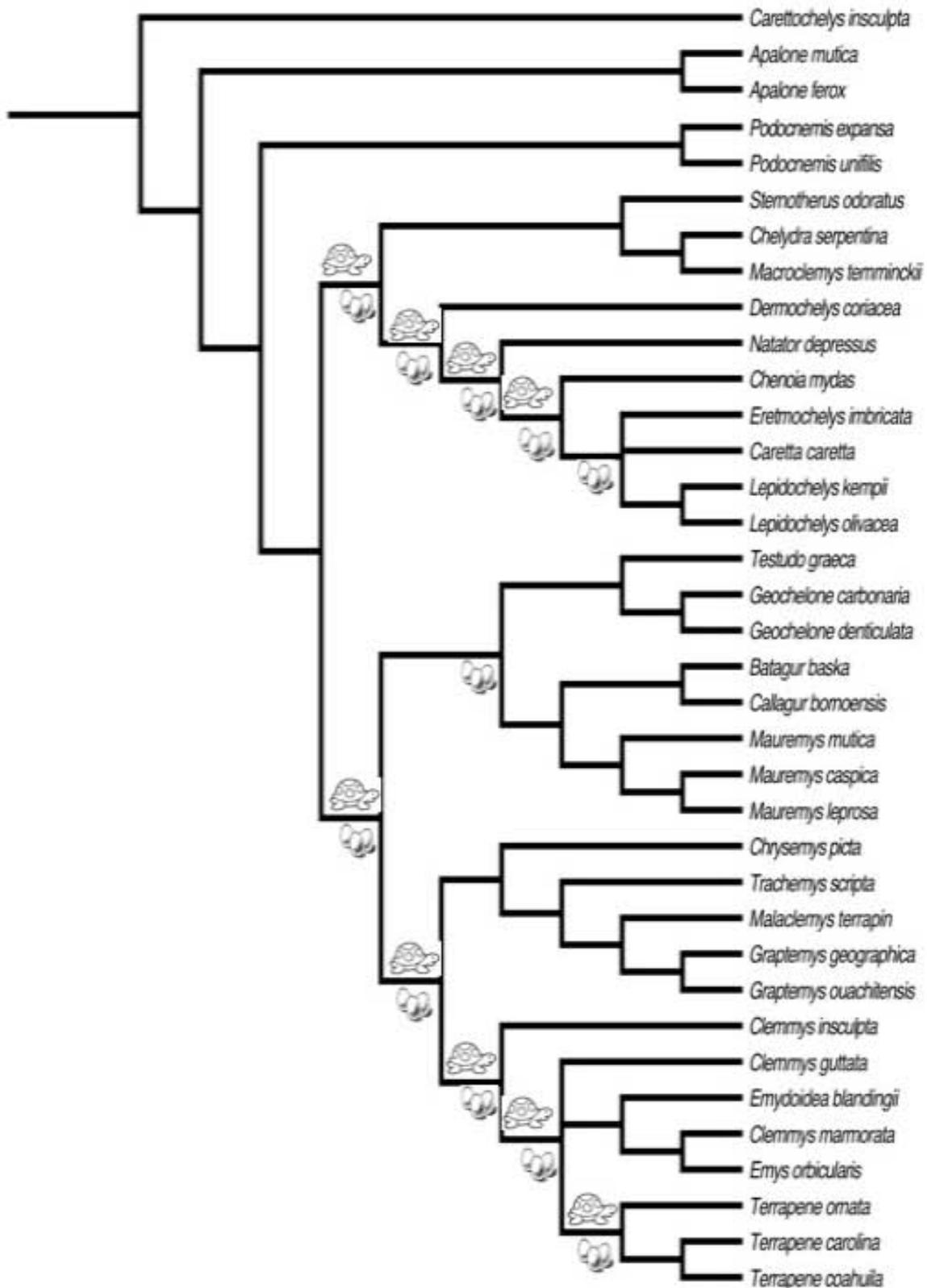


Figura 18. Clados significativos ($\alpha \leq 0.05$) según el método de ordenación canónica filogenética. Los clados precedidos por la imagen de tortuga, corresponden con aquellos que, por su talla, difieren significativamente del resto de las especies de la filogenia. Los precedidos por la imagen de huevos verde corresponden con aquellos que, por su tamaño de puesta, difieren significativamente del resto de las especies.

La regresión múltiple por adición de factores es la herramienta estadística utilizada para eliminar el efecto de colinearidad en este método. Como resultado de estas regresiones, se obtuvieron las matrices filogenéticas reducidas para cada uno de los atributos, éstas constituyen los resultados finales de la ordenación canónica filogenética. Según estas matrices, la variabilidad en los atributos tanto de talla como de tamaño de puesta, está concentrada en tres clados (Tabla 11; Fig. 17). Ambos atributos comparten dos de estos clados, el j y el p. El clado j está compuesto por las siete especies de tortugas marinas: *Dermochelys coriacea*, *Natator depressus*, *Chelonia mydas*, *Eretmochelys imbricata*, *Lepidochelys kempii* y *L. olivacea*. El clado p está compuesto por las 21 especies que, en este estudio, representan a la superfamilia Testudinoidea. Aunque el tercer clado de ambas matrices es diferente, los dos corresponden a un clado anidado en el clado j (Figs. 19 y 20).

Tabla 11. Matrices filogenéticas reducidas por los atributos analizados. Éstas sólo incluyen a los grupos significativos luego de eliminar el efecto de la colinearidad.

Matriz filogenética reducida	
Talla	Puesta
j	j
k	ee
p	p

El tercer clado de la matriz filogenética reducida de la talla es el k y está conformado sólo por las especies de tortugas marinas de la familia Cheloniidae, es decir, todas las antes mencionadas, a excepción de la especie *Dermochelys coreiaca* (Fig. 19). En el caso del tamaño de puesta este clado es el ee (Fig. 20), que es un subconjunto de las especies de tortugas marinas que sólo incluye a cinco especies: *Chelonia mydas*, *Eretmochelys imbricata*, *Caretta caretta*, y las dos especies del género *Lepidochelys*.

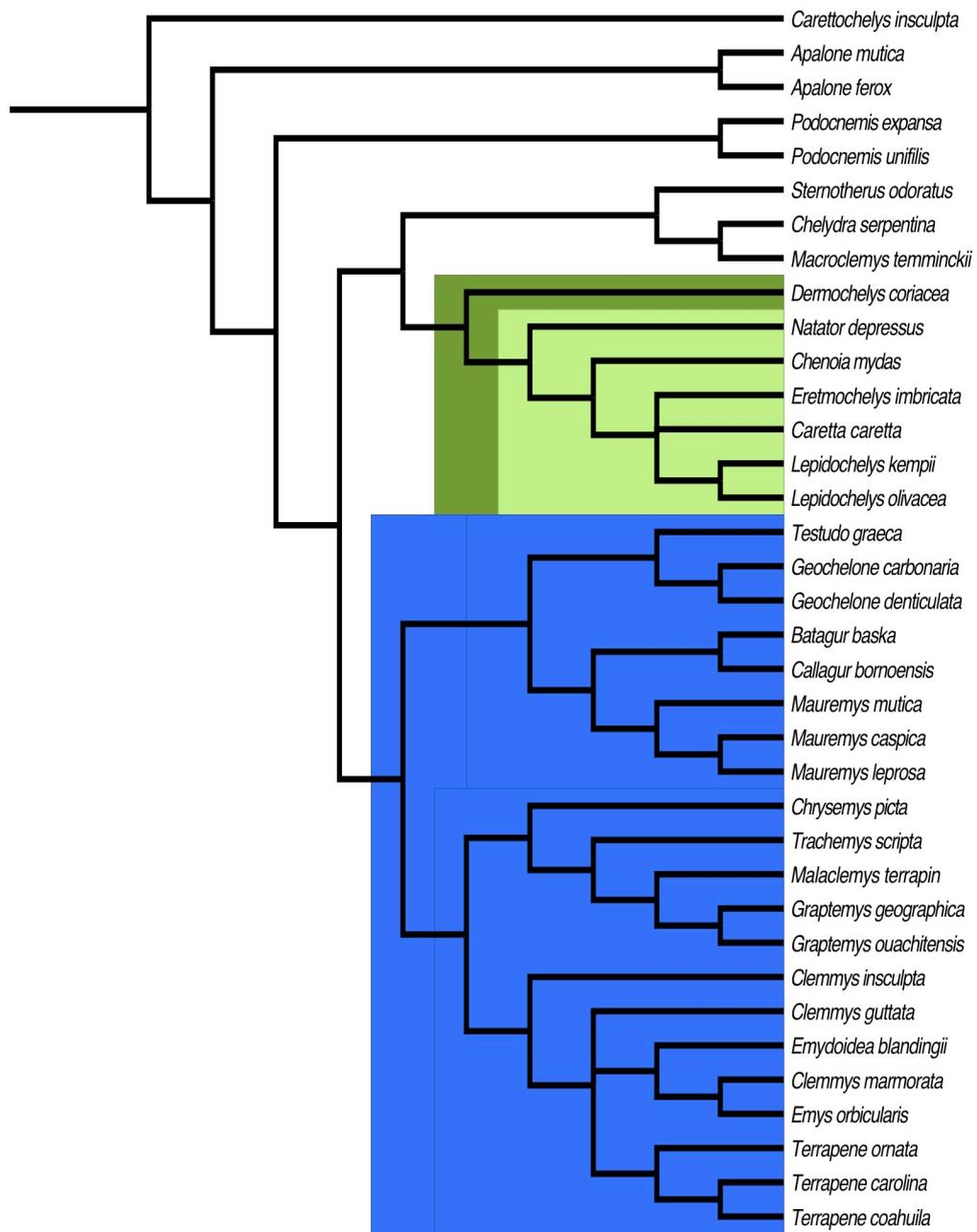


Figura 19. Matriz filogenética reducida para el atributo de talla. Cada color indica un clado significativamente diferente al resto de los presentes en la reconstrucción.

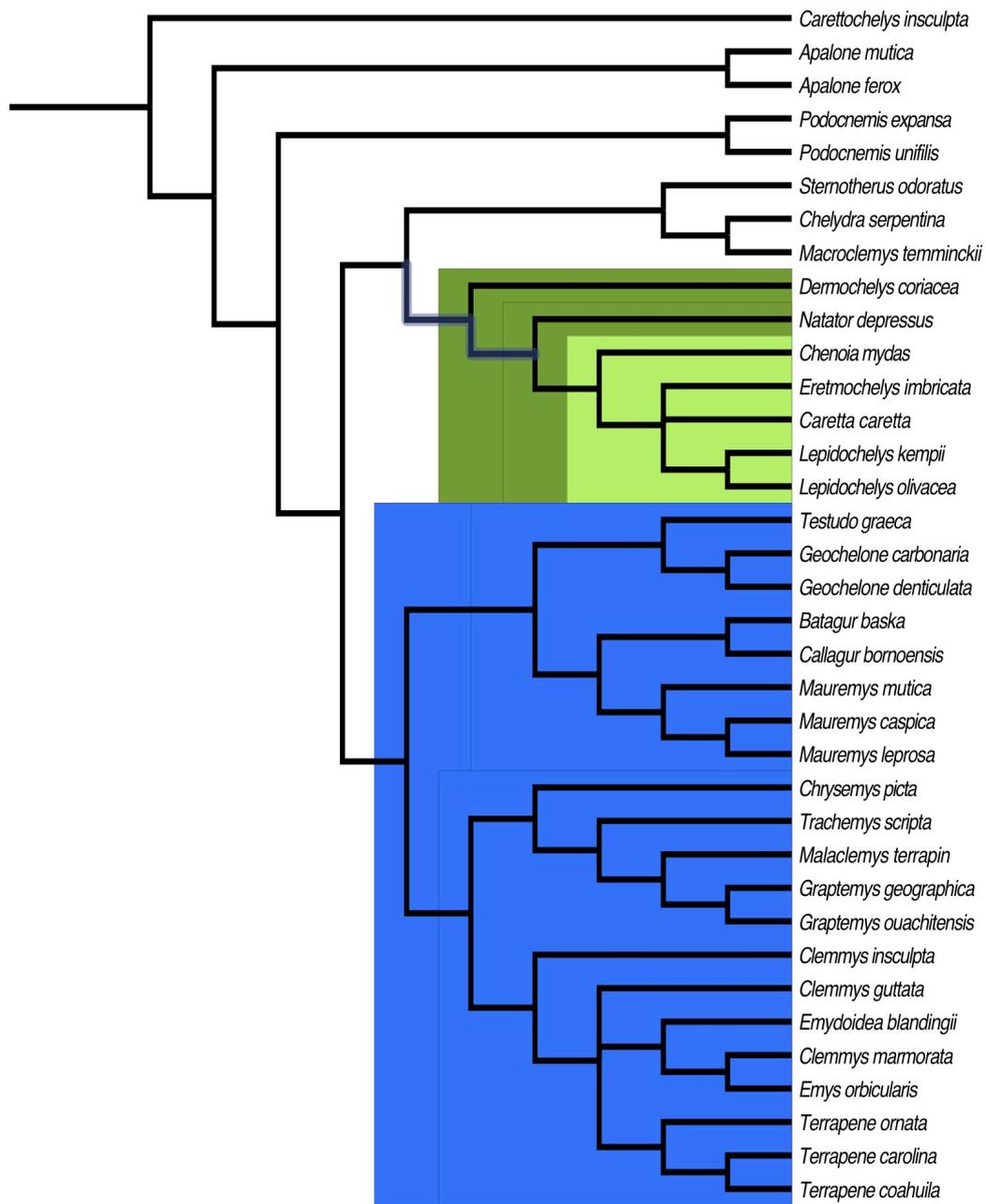


Figura 20. Matriz filogenética reducida para el atributo de tamaño de puesta. Cada color indica un clado significativamente diferente al resto de los presentes en la reconstrucción.

Una vez que los métodos filogenéticos comparativos permitieron determinar la proporción de varianza de los atributos atribuibles a la filogenia fue posible explorar la naturaleza de la varianza no explicada por el componente histórico, relacionándola con algunos factores ambientales. Los dos métodos utilizados en esta sección demuestran que existe un efecto de la latitud sobre los atributos evaluados. El método de Hansen, que permitió hacer una exploración más exhaustiva, mostró que también existe un efecto del hábitat sobre la talla y sobre el tamaño de puesta.

I. Correlación de residuos con latitud

La correlación de los residuos del modelo de autocorrelación filogenética (valores de los atributos libres de inercia filogenética) tanto de la talla de las hembras, como del tamaño de puesta con la latitud promedio que habitan las diferentes especies de tortugas (Tabla 12), mostró que existen correlaciones negativas y significativas de ambos atributos con la latitud (Fig. 21). Esta correlación fue ligeramente mayor para la talla que para el tamaño de puesta.

Tabla 12. Correlación (r) entre los valores observados de talla y tamaño de puesta contra latitud, y entre los residuos del análisis de autocorrelación filogenética (AF) y la latitud (* $P=0.002$; ** $P=0.0001$).

Atributo	Tipo de datos	Valor de correlación (r)
Talla	Observados	- 0.6986 **
	Residuos AF	- 0.6909 **
Puesta	Observados	- 0.5035 *
	Residuos AF	- 0.4962 *

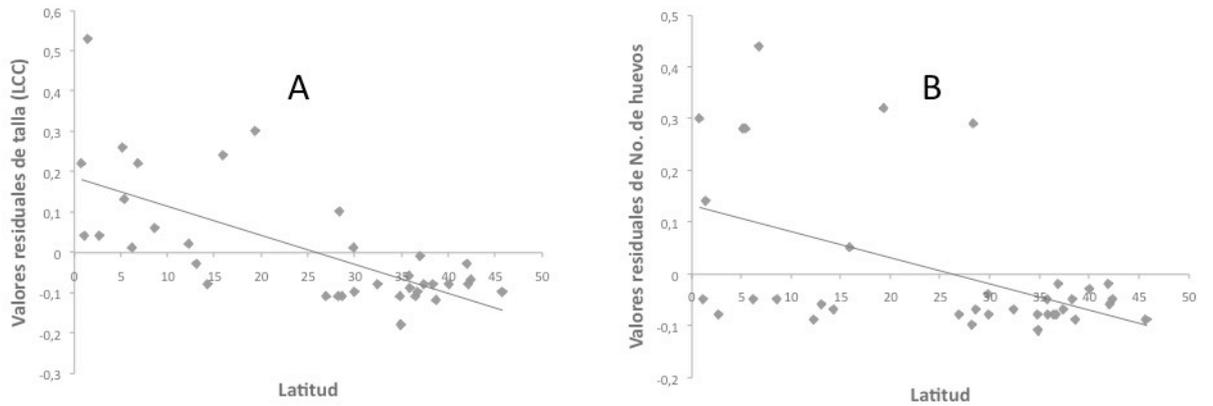


Figura 21. Correlación entre los valores residuales del método de autocorrelación filogenética (libres de inercia filogenética) de la talla de las hembras (A) y del tamaño de puesta (B) con la latitud promedio en que habitan las especies.

Notablemente, al llevar a cabo estas correlaciones con los valores observados antes de corregir por la filogenia, se observó el mismo resultado, una correlación negativa entre los valores de los atributos y la latitud (Fig. 22). Esto significa que, independientemente de la filogenia, a mayor latitud las tortugas presentan menor talla y menor tamaño de puesta.

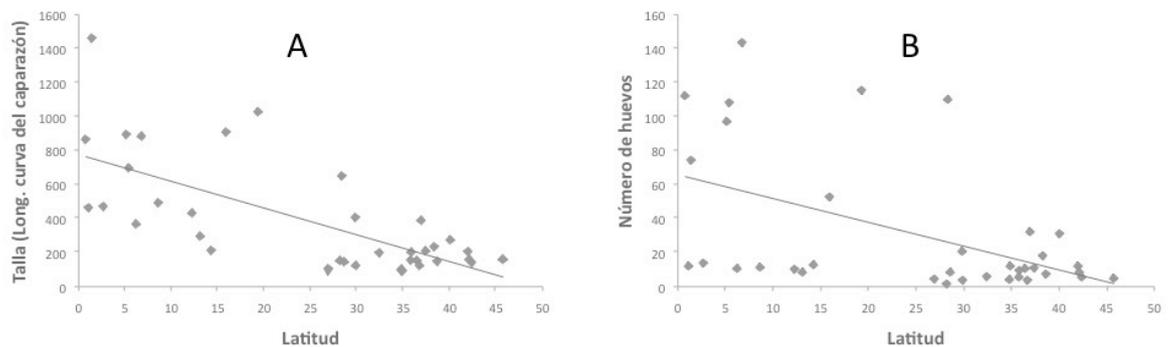


Figura 22. Correlación entre los valores observados de la talla de las hembras (A) y del tamaño de puesta (B) con la latitud promedio en que habitan las especies.

II. Método de Hansen

Este método permitió encontrar los factores ambientales que han tenido un efecto significativo sobre la talla y el tamaño de puesta a lo largo de la historia evolutiva de las tortugas. Aunque se esperaban encontrar efectos debidos a cambios en el hábitat, la dieta y la latitud, sólo se encontraron cambios asociados al hábitat y la latitud. De hecho, el único factor que tuvo efecto sobre ambos atributos fue el hábitat. La latitud tuvo efecto sólo sobre la talla y la dieta no tuvo efecto alguno sobre ningún carácter.

En lo que respecta al hábitat, se evaluaron los efectos que tuvo el cambio del ambiente ancestral dulceacuícola, a los ambientes derivados marino y terrestre. El único de estos cambios que tuvo un efecto significativo sobre los fenotipos tanto de talla como de tamaño de puesta fue el paso hacia al ambiente marino (Tabla 13; Fig. 23) pues la diferencia entre los valores óptimos de ambos atributos (θ_1) es significativamente distinta de cero (i.e., el intervalo de confianza de la diferencia no incluye al cero). Este cambio ambiental explica el 49.58% y el 64.39% de la varianza en estos atributos, respectivamente. De hecho, las especies de tortugas marinas tienen una talla promedio de 924 mm y un tamaño de puesta promedio de 102.31 huevos, mientras que en el resto de las especies tamaños el promedio de estos atributos es de 102.31 mm y 13.70 huevos respectivamente.

Tabla 13. Valor de la diferencia entre fenotipos (θ_1) generada por el paso del ambiente dulceacuícola al marino (*=diferencia significativa).

Atributo	θ_1 (\pm e.e.)	Intervalo de confianza	R ² (%)
Talla	723.84 \pm 125.77	477.33 – 970.35	49.58*
Puesta	102.31 \pm 13.05	76.73 – 127.89	64.39*

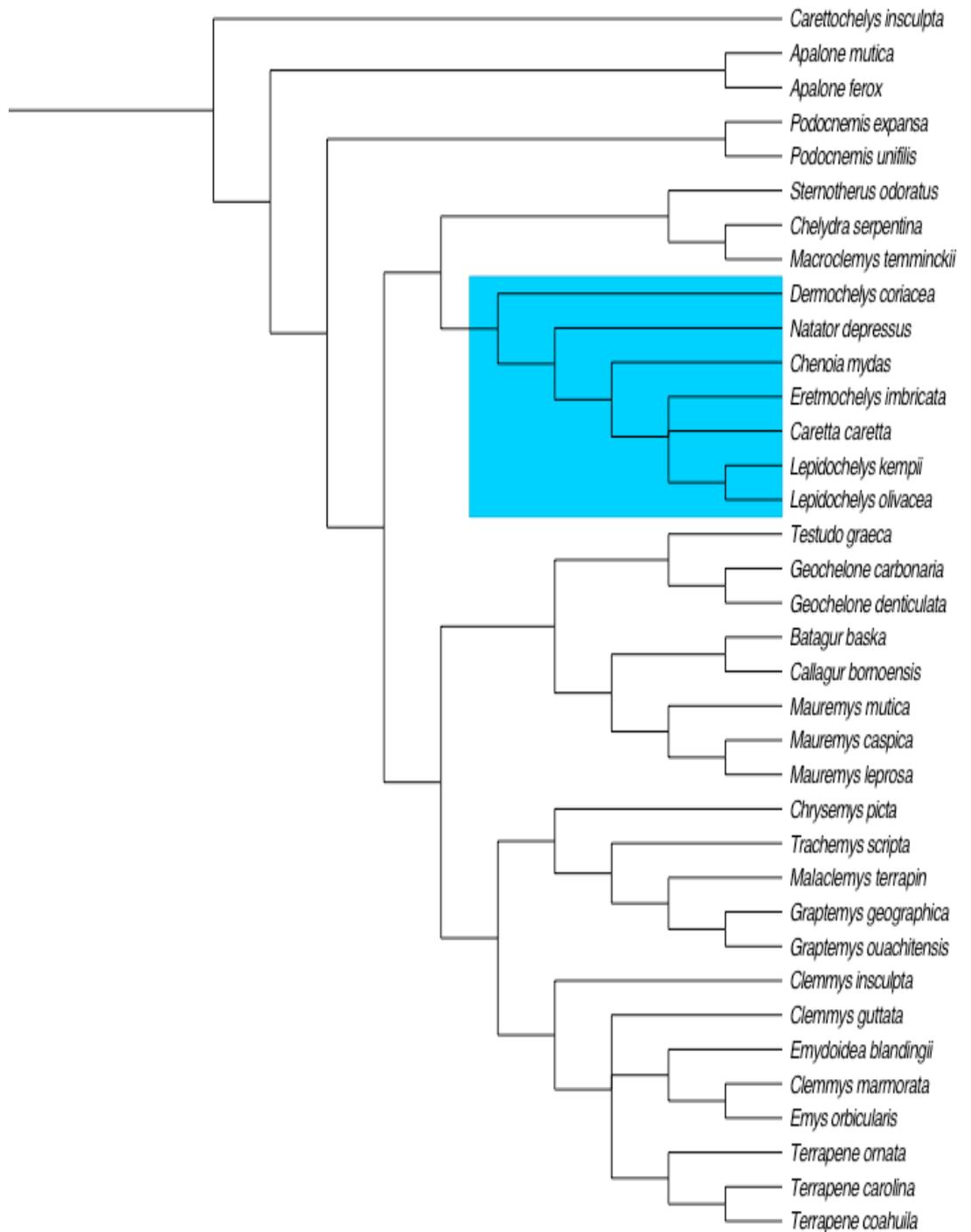


Figura 23. Reconstrucción filogenética con detalle en especies marinas. En el clado sombreado se dio un cambio del ambiente ancestral dulceacuícola al ambiente marino.

Por otra parte, el cambio del ambiente dulceacuícola al ambiente terrestre no tuvo efecto sobre ninguno de los dos caracteres (Tabla 14). El intervalo de confianza de la diferencia de los fenotipos óptimos entre ambientes en ambos atributos (θ_1) incluye

al cero y el valor de R^2 asociado es apenas de 0.57 en el caso de la talla y 0.75 en el caso del tamaño de puesta.

Tabla 14. Valor de diferencia entre fenotipos (θ_1) generada por el paso del ambiente dulceacuícola al terrestre (*=diferencia significativa).

Atributo	$\theta_1 (\pm e.e.)$	Intervalo de confianza	R^2 (%)
Talla	-647.41 \pm 1464.46	-3517.75 – 2222.93	0.57
Puesta	-52.58 \pm 103.73	-255.89 – 150.73	0.75

En lo referente al cambio de dieta, de la ancestral omnívora, hacia las dietas derivadas herbívora y carnívora, ninguno de estos cambios tuvo efecto sobre los atributos (Tablas 15 y 16). Los fenotipos óptimos en los tres ambientes no presentan diferencias significativas (i.e., todos los intervalos de las diferencias entre los fenotipos incluyen al cero y los valores de R^2 fueron menores al 6% en todos los casos).

Tabla 15. Valor de diferencia entre fenotipos (θ_1) generada por el paso de dieta omnívora a carnívora (*=diferencia significativa).

Atributo	$\theta_1 (\pm e.e.)$	Intervalo de confianza	R^2 (%)
Talla	-419.93 \pm 297.04	-1002.13 – 162.27	5.55
Puesta	-1247.26 \pm 1828.29	-4830.71 – 2336.14	1.35

Tabla 16. Valor de diferencia entre fenotipos (θ_1) generada por el paso de dieta omnívora a herbívora (*=diferencia significativa).

Atributo	$\theta_1 (\pm e.e.)$	Intervalo de confianza	R^2 (%)
Talla	-10.24 \pm 22.65	-54.63 – 34.15	0.60
Puesta	-423.97 \pm 140.78	-423.97 – 127.89	1.35

Respecto a los cambios en la distribución latitudinal de las especies, es decir el paso de la distribución ancestral subtropical a las distribuciones derivadas: tropical, templada cálida y templada fría, hubo un efecto significativo sólo para la talla en el paso hacia la distribución templada cálida (que es la más abundante) (Tabla 17-19). Las tallas óptimas en ambos ambientes difieren significativamente (i.e., el intervalo de θ_1 no abarca el cero) y el paso del ambiente tropical al templada explica un 24.09% de la varianza total de este atributo. A diferencia del efecto en la talla, este cambio histórico en la distribución no involucró un cambio significativo en el tamaño de puesta (i.e, el intervalo de confianza de θ_1 incluye al 0 y la proporción de varianza en este carácter explicada por este cambio fue de tan sólo 3.49%).

Tabla 17. Valor de diferencia entre fenotipos (θ_1) generada por el paso de la distribución subtropical a la templada cálida (*=diferencia significativa).

Atributo	θ_1 (\pm e.e.)	Intervalo de confianza	R^2 (%)
Talla	-1957.14 \pm 595.84	-3124.99 – -789.29	24.09*
Puesta	-83.34 \pm 74.14	-228.65 – 61.97	3.49

Tabla 18. Valor de diferencia entre fenotipos (θ_1) generada por el paso de la distribución subtropical a la tropical

Atributo	θ_1 (\pm e.e.)	Intervalo de confianza	R^2 (%)
Talla	314.26 \pm 173.55	-25.9 – 654.42	3.74
Puesta	12.22 \pm 21.88	-30.66 – 55.1	0.91

Tabla 19. Valor de diferencia entre fenotipos (θ_1) generada por el paso de la distribución subtropical a la templada fría.

Atributo	θ_1 (\pm e.e.)	Intervalo de confianza	R^2 (%)
Talla	151.45 \pm 257.35	-352.96 – 655.86	0.12
Puesta	-32.74 \pm 148.19	-323.19 – 257.71	0.14

DISCUSIÓN

Los resultados de esta investigación sugieren fuertemente que el tamaño de puesta en las tortugas exhibe un considerable nivel de efecto filogenético. En otras palabras, la adaptación a las condiciones locales que han experimentado las especies en un tiempo evolutivo reciente no puede explicar la totalidad de la variación observada entre especies en este atributo. El tipo de ambiente en que habitan (dulceacuícola, terrestre o marino) y la distribución latitudinal de las especies parecen explicar también proporciones considerables de la variación interespecífica en el tamaño de puesta y en la talla de las hembras.

La hipótesis de este trabajo suponía que la filogenia explicaría una proporción baja de la variabilidad en el tamaño de puesta. Sin embargo, encontramos que el efecto filogenético es considerable, pues existe alta señal filogenética sobre este atributo y sobre el tamaño de las hembras adultas. También existen factores ecológicos actuales, como la distribución, y ancestrales, como el hábitat, que han moldeado la evolución de estos caracteres evolutivos. Enseguida se discuten con detalle los principales resultados de este trabajo.

RECONSTRUCCIÓN FILOGENÉTICA

La reconstrucción filogenética utilizada en este estudio fue hecha por el método de inferencia bayesiana con base en cuatro loci nucleares y el gen mitocondrial CytB. Con respecto a las últimas reconstrucciones filogenéticas de tortugas basadas en caracteres morfológicos, en genes mitocondriales o en un sólo loci nuclear (Shaffer, 1997; Fuji et al., 2004; Krenz et al., 2005), el uso de varios loci nucleares ha demostrado mejorar la resolución de la reconstrucción filogenética, principalmente en los clados más profundos (Barley et al., 2010; Weins et al., 2010). En términos generales la reconstrucción filogenética de este trabajo mostró buenos grados de soporte en sus ramas, a excepción de las ramas más profundas de la filogenia, donde el soporte fue relativamente menor. En contraste con esto, la reconstrucción hecha por el método de parsimonia tuvo muy bajos grados de soporte tanto en la sección basal como en algunos grupos al interior de la filogenia, lo cual generó algunas inconsistencias que impidieron considerarla como hipótesis filogenética para la implementación de los métodos filogenéticos comparativos.

La sección basal de la filogenia donde el soporte de las ramas es menor, corresponde a las ramas que dan origen a las especies de las familias Pelomedusidae, Carettochelydae y Trionychidae. La falta de resolución en esta sección de la filogenia coincide con la reportada en los últimos trabajos de reconstrucciones filogenéticas de este grupo (Shaffer, 1997; Fuji et al., 2004; Krenz et al., 2005; Barley et al., 2010; Weins et al., 2010). El conflicto principal ha sido con respecto a las posiciones relativas de las familias Trionychidae y Carettochelydae, basales dentro del grupo Cryptodira (Fuji et al., 2004; Krenz et al., 2005). Incluso Shaffer (1997) reporta a este suborden como grupo polifilético y sugiere que esta falta de resolución puede deberse a que hubo una radiación rápida dentro de las especies del suborden Cryptodira hace aproximadamente 90 a 120 millones de años. Cabe señalar que un factor que incrementó la falta de soporte en estas ramas fue la falta de un grupo externo como el pollo, que ha sido utilizado en otros estudios para enraizar el árbol (Barley et al., 2010).

En lo que respecta al resto de la filogenia, es decir, a las ramas de evolución más reciente, los grados de soporte son buenos (Fig. 13) y es posible distinguir a dos grupos bien resueltos. Uno de ellos está conformado por dos clados hermanos, el de las especies marinas, que corresponden a las familias Chelonidae y Dermochelidae y su clado hermano, formado por las especies de las familias Kinosternidae y Chelydridae. El otro gran grupo reconocido en esta filogenia es el conformado por las familias Testudinidae, Bataguridae y Emydidae (de la superfamilia Testudioidea). Estos resultados coinciden con los reportados en las reconstrucciones filogenéticas más recientes para este grupo, en las que se han utilizado marcadores nucleares (Barley et al., 2010; Weins et al., 2010).

Al observar la distribución que tienen algunos caracteres ecológicos sobre la filogenia, se observan un par de patrones. En lo que respecta al hábitat, las especies que habitan el mar se encuentran dentro de un grupo monofilético, lo cual indica un solo origen del hábito marino. Mientras que las tortugas terrestres se encuentran dispersas a lo largo de la filogenia, formando parte de varios clados (Fig. 9). Respecto a la dieta, no hay un patrón definido; se observan especies con los tres tipos de dietas distribuidas indistintamente a lo largo de la filogenia (Fig. 10). En cambio, en lo que respecta a la distribución latitudinal, se observan clados que, a excepción de una o dos especies, comparten una misma distribución: tropical o templada (Fig. 11). Por otro

lado, la talla y el tamaño de puesta, presentan un patrón en al menos un grupo dentro de la filogenia donde los valores de ambos atributos son relativamente altos (Fig. 14). Este grupo también corresponde al clado de las tortugas marinas.

EFFECTO FILOGENÉTICO EN EL TAMAÑO DE PUESTA Y EN EL TAMAÑO ADULTO DE LAS HEMBRAS

Ambos atributos mostraron un nivel significativo de efecto filogenético. Las relaciones filogenéticas parecen explicar una proporción considerable de la variación tanto en el tamaño de puesta como en la talla adulta de estos organismos. En otras palabras, las especies cercanamente relacionadas tienden a parecerse más entre sí en comparación con especies lejanas.

En este estudio se encontró que existe un efecto filogenético sobre los atributos reproductivos. En comparación con éste, otros trabajos realizados con anfibios y reptiles muestran patrones distintos en la evolución de estos caracteres (Cox et al., 2003; Ivanovic et al., 2008; Warne y Charnov, 2008; Werneck et al., 2009a; Vukov et al., 2011). Los estudios hechos con salamandras (Ivanovic, 2008 y Vukov et al., 2011) muestran resultados contrastantes. Mientras que en el grupo de las salamandras europeas de los Balcanes existe señal filogenética tanto en el tamaño corporal de ambos sexos, como en el grado de dimorfismo sexual (Ivanovic, 2008), en el complejo de especies de salamandras del género *Triturus* no hay señal filogenética en el tamaño corporal ni en ningún otro carácter morfométrico evaluado (Vukov et al., 2011).

En lagartijas, que son el grupo más estudiado a este respecto, los principales trabajos muestran resultados consistentes con los que encontré en las tortugas, pues los atributos reproductivos muestran efecto de la filogenia. Por un lado, Cox y colaboradores (2003), estudiaron la evolución del dimorfismo sexual por tamaño considerando el efecto de la filogenia mediante el uso de contrastes independientes de la filogenia (Felsenstein, 1985). Los autores no reportan explícitamente cuales atributos tienen mayor efecto de la filogenia. Según este trabajo, el dimorfismo sexual por tamaño está correlacionado positivamente con el tamaño de puesta, negativamente con la frecuencia reproductiva y positivamente con el modo de reproducción. Es decir, que en aquellas especies de lagartijas en las que la hembra es

más grande, la inversión reproductiva total es mayor en comparación con las especies donde no hay dimorfismo o está sesgado hacia los machos.

Por otro lado, el trabajo de Warne y Charnov (2008), demuestra que dentro del grupo de las lagartijas hay una correlación positiva y filogenéticamente significativa entre el esfuerzo reproductivo anual y la talla a la madurez. Aunque también dan evidencia a favor de una disyuntiva (trade-off) entre el tamaño de puesta y el tamaño de las crías debido a que, considerando el efecto de la filogenia, existe una correlación negativa y significativa entre el tamaño de puesta y la talla de los recién eclosionados. Esta correlación presenta diferentes pendientes en las distintas familias.

Por último, el trabajo de Werneck y colaboradores (2009a), quienes estudian la filogenia, biogeografía y evolución del tamaño de puesta en las lagartijas del género sudamericano *Kentropyx*, representa el estudio más completo y comparable con el presente trabajo. Estos autores utilizan métodos filogenéticos comparativos para evaluar tanto el efecto de la filogenia como del tipo de hábitat (vegetación abierto vs. vegetación de bosque cerrado) sobre el tamaño de puesta. En este trabajo los autores argumentan que dentro de este género no existe un efecto filogenético sobre los atributos evaluados que permita separar entre clados con tendencias distintas. Es decir, que según el análisis no hay grupos de especies dentro de la filogenia que resulte significativamente diferentes del resto. A diferencia de ellos, yo encuentro que existe un efecto filogenético sobre el tamaño de puesta, cuya mayor fuerza se ubica en un par de grupos significativos: el de las tortugas marinas y el de la superfamilia Testudinoidea. Al interior de ambos clados, los valores de los atributos son muy similares entre sí (como en el caso de las lagartijas del género *Kentropyx*) y distintos de los del resto de las especies de la filogenia.

EFFECTO FILOGENÉTICO SOBRE OTROS ATRIBUTOS EN LAS TORTUGAS

En el grupo de las tortugas sólo se han hecho un par de estudios en que se haya evaluado el efecto de la filogenia sobre algún carácter o bien, en que se considere a la filogenia al momento de estimar correlación entre caracteres. Uno de estos estudios, donde se busca un patrón evolutivo de incremento en el tamaño corporal (Regla de Cope), reporta que el tamaño de las tortugas adultas tiene valores significativos de señal filogenética, al menos dentro del suborden Cryptodira (Moen, 2006). Otros

estudios que han evaluado el efecto filogenético se han enfocado en caracteres morfológicos, como en el caso del trabajo de Claude y colaboradores (2004), quienes estudiaron el efecto filogenético sobre la forma del cráneo. Estos autores encontraron que, aunque existe un efecto filogenético significativo sobre algunas secciones o estructuras craneales, la forma está determinada principalmente por el uso de recursos (combinación de dieta y hábitat) que tiene cada especie.

Por otra parte, Wilson y Sánchez-Villagra (2011) estudiaron la evolución de las trayectorias de crecimiento en las tortugas de la familia Chelidae, a través del análisis de la morfometría craneal. Sus resultados muestran que algunos de los caracteres craneales evaluados tienen efecto filogenético, lo cual muestra que la evolución de características alométricas puede estar relacionada significativamente con la filogenia, tal como lo demostraron Giannini y colaboradores (2004) en su estudio con los patrones alométricos de marsupiales.

Por último, uno de los trabajos más completos sobre la evolución de caracteres de historias de vida en tortugas es el de Gosnell y colaboradores (2009) quienes estudiaron la evolución del dimorfismo sexual por tamaño dentro del grupo y los factores que determinan la magnitud y dirección de dicho dimorfismo. A pesar de que utilizan el método de contrastes independientes de la filogenia (Felsenstein, 1985), para evaluar la correlación entre caracteres reproductivos y el tamaño de los adultos, no reportan explícitamente una medida del efecto filogenético sobre ninguno de los atributos reproductivos o de tamaño. Encontraron que aún considerando las relaciones entre las especies, existe un efecto positivo del tamaño de los adultos sobre los atributos de fecundidad como el tamaño de los huevos y el tamaño de puesta. Sin embargo, no existe ninguna correlación entre estos atributos y el grado de dimorfismo sexual.

De acuerdo con los trabajos previos y los hallazgos de este estudio, se puede decir que la mayoría de los atributos morfológicos tienen una proporción de varianza que puede ser explicada por la filogenia y otra que puede ser explicada por algunos factores ecológicos como la dieta, la distribución latitudinal y, sobre todo el hábitat. El efecto filogenético observado puede explicarse por tres fenómenos. 1) La variabilidad genética en el atributo es relativamente baja. A este respecto, varios autores han encontrado que en las tortugas la diversidad genética es relativamente baja (Avice et

al., 1992; Karl et al., 1992; Martin y Palumbi, 1993), como en las especies *Chelonia mydas* (Bjorndal et al., 2005), *Terrapene ornata* (Kuo y Janzen, 2004) y *Dermochelys coriacea* (Dutton et al., 1999). Probablemente esto se deba a que tienen tasas metabólicas lentas y un tiempo generacional relativamente largo (Bowen y Karl, 2007).

2) Las fuerzas selectivas a las que se han enfrentado en tiempos recientes no han sido lo suficientemente fuertes para promover cambios adaptativos drásticos. 3) Hay fuertes restricciones mecánicas en ambos caracteres. A este respecto se sabe que la cantidad de huevos que puede poner una hembra está relacionada positivamente con su tamaño. A mayor tamaño, el espacio dentro de la cavidad corporal y los recursos disponibles para la reproducción son relativamente mayores (Congdon y Gibbons, 1990). A su vez, el tamaño corporal de una tortuga adulta está limitado por el medio en el que habita, pues su capacidad de locomoción y de soporte corporal dependen del medio físico en el que se encuentran (Rieppel y Reisz, 1999).

4) La deriva génica, que corresponde al modelo evolutivo por movimiento browniano. Es otras palabras, la variabilidad en los atributos puede depender exclusivamente del tiempo de divergencia entre especies, en el cual no han existido presiones de selección locales que produzcan cambios más grandes de los que ocasiona el azar (Felsenstein, 1985; Blomberg y Garland, 2002). Todas estas razones potenciales que explicarían la presencia de inercia filogenética en el tamaño de puesta y en la talla de las hembras adultas de tortugas, representan hipótesis que requieren de exploraciones futuras.

ADAPTACIÓN LOCAL A LAS CONDICIONES AMBIENTALES

De acuerdo con los resultados del método de Hansen (1997) y del uso de los residuos del método de autocorrelación (Cheverud et al., 1985), los factores ambientales que de alguna manera han impactado la evolución del tamaño de puesta son el ambiente y la distribución latitudinal de las especies. Al parecer, el cambio del ambiente dulceacuícola al ambiente marino significó una presión selectiva drásticamente diferente. De hecho, este cambio explica el 64.4% de la variabilidad entre especies en el tamaño de puesta y el 49.6% en la talla. En ambientes marinos las tortugas son más grandes y ponen más huevos. El otro factor es la distribución latitudinal de las especies, que explica el 20% de la variabilidad en la talla y con la cual presenta una correlación negativa. Es decir, en las latitudes mayores, la talla de las hembras y sus

tamaños de puesta son menores, en comparación con las que habitan latitudes tropicales.

Los hallazgos más antiguos de fósiles de tortugas sugieren que este grupo se originó hace aproximadamente 210 millones de años, aunque existe una controversia con respecto al ambiente en que se dio el origen de este grupo. Algunos estudios sugieren que el ancestro de las tortugas era terrestre, dadas las características histológicas de los huesos (Scheyer y Sander, 2007) y a la forma y proporción de las extremidades (Rieppel y Reisz, 1999). Sin embargo, los últimos hallazgos muestran que el ejemplar más antiguo de las tortugas (Reisz y Head, 2008; Li et al., 2008), perteneciente al género *Odontochelys*, tenía características ancestrales en su caparazón, como la falta de osificación, que refleja una adaptación a la vida acuática. Además, el plastrón parece ser una adaptación a la vida acuática, pues en este ambiente provee protección ventral contra los depredadores (Rieppel y Reisz, 1999). Si esta última hipótesis es cierta, implica que en el hábitat en las tortugas pasó de un ancestro dulceacuícola a descendientes marinos y terrestres.

De acuerdo con mis resultados, el cambio al ambiente marino generó un incremento drástico en la talla de las hembras adultas y en el número de huevos. A este respecto, se sabe que la tendencia al aumento de tamaño en el ambiente marino fue una tendencia adquirida tempranamente dentro de su historia evolutiva en las tortugas (Kear y Lee, 2006). Las primeras tortugas marinas (del Cretácico Tardío) alcanzaban tallas de hasta 4 m y eran un grupo mucho más diverso. En ese periodo existían al menos cinco linajes de tortugas marinas de los cuales persisten sólo dos (Kear y Lee, 2006).

Aparentemente, en el ambiente marino, los organismos con tallas mayores tienen varias ventajas sobre aquellos con tallas relativamente menores. Por un lado, este tipo de ambiente provee flotabilidad, lo cual facilita tanto el soporte corporal como la locomoción (Rieppel y Reisz, 1999). Por otro lado, dentro de el mar, las tortugas de mayor talla tienen una ventaja considerable sobre las pequeñas en lo que respecta a la osmorregulación del agua salada (Dunson, 1986), ya que el flujo y la pérdida neta de agua en un ambiente marino es inversamente proporcional al tamaño. Otra de las habilidades indispensables dentro de este tipo de ambiente es la capacidad para el buceo. En lo que a esto se refiere, se sabe que el tamaño corporal es el

principal determinante en el desempeño del buceo (Halsey et al., 2006; Brischoux et al., 2008), pues tallas mayores proveen mayor capacidad pulmonar. Esto aumenta la cantidad de aire que puede retenerse y por lo tanto incrementa el tiempo en que puede permanecer sumergida una tortuga (Halsey et al., 2006).

Por otro lado, el ambiente marino favoreció la capacidad de producir puestas mucho más numerosas. Esto puede deberse a que el aumento en tamaño permitió incrementar el potencial reproductivo (Congdon y Gibbons, 1990), ya que aumentó el tamaño de la cavidad corporal y la cantidad de recursos disponibles para la reproducción. Otra teoría es que las puestas más grandes evolucionaron en respuesta a la alta e impredecible mortalidad durante las etapas de huevo y neonato (Van Buskirk y Crowder, 1994).

PATRONES LATITUDINALES

En este trabajo se encontró una correlación negativa tanto del tamaño de puesta como de la talla con la latitud. Existen varios trabajos previos que refieren algún patrón en los atributos reproductivos de las tortugas con respecto a su distribución latitudinal (Iverson, 1977, 1992; Iverson et al., 1993; Ashton y Feldman, 2003; Ashton et al., 2007). Sin embargo, ninguno de estos patrones ha sido estudiado considerando el efecto de la filogenia. Dentro del grupo de las aves, Patten (2007) encuentra que el tamaño de puesta aumenta con la latitud, es decir es mayor en latitudes lejanas a los trópicos (contrario a lo que encontré con las tortugas). Este patrón se presenta a nivel intraespecífico e interespecífico. Algunos de los factores que pudieran explicar este patrón son la estacionalidad, que es más marcada a mayor latitud y la limitación de recursos que hay en latitudes más norteñas dadas las condiciones climáticas (Iverson, 1977 y 1992). Estas dos condiciones generan que las temporadas reproductivas sean más cortas y menos frecuentes, por lo que estos organismos suelen hacer una inversión reproductiva más fuerte (Iverson et al., 1993), dado que la supervivencia hasta la siguiente reproducción es incierta. Otro factor que podría generar este patrón es la depredación, que suele ser menor conforme aumenta la latitud, ya que en general existe menos biodiversidad en estas latitudes (Ashton et al., 2007).

A diferencia del patrón latitudinal reportado en las aves, en las tortugas parece haber dos patrones contrastantes, dependiendo del nivel al que se estudien. Por un

lado, las comparaciones intraespecíficas muestran una correlación positiva del tamaño de puesta con la latitud (Iverson et al., 1993; Ashton et al., 2003; Ashton et al., 2007). Por otro lado, las comparaciones interespecíficas (entre las que se incluye esta investigación) demuestran la tendencia contraria, una correlación negativa entre la latitud y el tamaño de puesta (Iverson, 1992; Ashton et al., 2007).

La mayoría de los estudios que han evaluado diferencias en inversión reproducida en tortugas con respecto a la latitud, son comparaciones intraespecíficas (Iverson 1992; Iverson et al., 1993; Ashton y Feldman, 2003) y todos ellos encuentran una correlación positiva entre la latitud y el tamaño de puesta. Esto es, que las poblaciones que se distribuyen más hacia el norte, donde los climas son más fríos, tienen tallas y tamaños de puesta mayores (Iverson 1992; Iverson et al., 1993). Este patrón puede deberse a que las temporadas de anidamiento son más cortas, reduciendo la cantidad de eventos reproductivos anuales que pueden tener. Por ello la inversión reproductiva por puesta es mayor (Iverson, 1992). Otro trabajo que llama la atención es el de Litzgus y Mousseau (2006), quienes evalúan diferencias en la inversión reproductiva de *Clemmys gutata*, con respecto a la distribución geográfica de las poblaciones. Según sus hallazgos, en esta especie el tamaño de puesta no tiene correlación alguna con el tamaño de la madre ni con el tamaño del huevo. Éste sólo está correlacionado positivamente con la latitud, probablemente porque las condiciones climáticas a mayores latitudes así lo favorecen.

En los pocos trabajos realizados a nivel interespecífico, entre los que se cuenta la presente investigación, no se reporta una relación clara entre la latitud y la inversión reproductiva (Iverson 1977; Iverson 1992). Al parecer, la variación en el tamaño de puesta dentro del grupo de las tortugas responde en mayor medida a los niveles de recursos disponibles en el ambiente (Iverson, 1993), lo cual podría explicar el patrón que encontré ya que los recursos suelen estar más disponibles en el trópico, pues es una zona hay mayor productividad y energía disponible (Davies et al., 2008). Sólo se ha reportado una correlación negativa entre la latitud y un atributo reproductivo, que es la frecuencia de puesta anual. Esto se debe a que las tortugas en latitudes mayores tienen temporadas reproductivas más cortas y por lo tanto, menor frecuencia reproductiva, aunque suelen tener puestas de mayor peso relativo (Iverson, 1992).

Otra hipótesis que sugiero es que la disponibilidad de recursos en altas latitudes (i.e., en ambientes fríos y estacionales) es más baja y por lo tanto la capacidad de crecer mucho o de producir muchos huevos es limitada (Congdon y Gibbons, 1990). Esta hipótesis también requiere evidencia empírica.

EFFECTO DE LA DIETA

En este trabajo no se encontró que hubiera una relación entre la dieta y la talla de las hembras o el tamaño de puesta. Este resultado es contradictorio con lo argumentado por otros autores: el tipo de dieta puede influir en el tamaño de puesta ya que la inversión reproductiva depende de la acumulación de recursos (Iverson, 1992). A su vez, la acumulación de recursos depende de la eficiencia de asimilación del alimento que en teoría es mayor en vertebrados que comen animales que en aquellos que comen plantas (Woods, 1982 en Iverson 1992). Por otro lado, Broderick y colaboradores (2003) encontraron que dentro del grupo de las tortugas marinas la inversión reproductiva es sensible a la dieta de los adultos. En la especie herbívora *Chelonya midas*, la inversión reproductiva anual suele ser muy variable y el crecimiento anual es menor que en la especie carnívora *Caretta caretta*, que presenta mayores tasas de crecimiento anual. En este caso también el tamaño está positivamente correlacionado con la inversión reproductiva, de forma tal que un mayor tamaño provee de mayores recursos disponibles para la reproducción.

Independientemente de los estudios sobre atributos reproductivos, hay algunos trabajos en los que se considera a la filogenia al estudiar las correlaciones que tiene la dieta con otros caracteres fenotípicos. Por ejemplo, el trabajo de Herrel y colaboradores (2002), quienes encuentran que la dieta ha determinado la forma de algunas características craneales. Especies carnívoras parecen optimizar su desempeño como depredadores debido a su mayor fuerza de la mordedura que les permite comer especies de presas más grandes y duras.

En este trabajo no logramos identificar algún efecto de la dieta sobre los atributos reproductivos, esto se debe tal vez a que si existe algún efecto, éste sea evidente sólo en la comparación a niveles filogenéticos inferiores (como entre las tortugas marinas), ya que a nivel macroevolutivo, este factor no ha determinado ninguna tendencia en la evolución de las tortugas (i.e., de hecho los tipos de dieta se

encuentran dispersos indistintamente en la filogenia). Para probar la hipótesis anterior, se requieren estudios comparativos entre especies de un mismo clado donde se encuentren representadas especies con distintas dietas.

LA UTILIDAD DE LOS MÉTODOS FILOGENÉTICOS COMPARATIVOS

Los métodos filogenéticos comparativos son una familia de métodos estadísticos que han sido desarrollados para resolver el problema de falta de independencia que se enfrenta al hacer comparaciones entre especies que comparten un ancestro común (Blomberg y Garland, 2002; Diniz-Filho y Tôrres, 2002). En este trabajo se exploraron cuatro de los métodos filogenéticos comparativos más utilizados para estudiar evolución fenotípica. Todos ellos revelan un efecto significativo de la filogenia sobre la variabilidad interespecífica en la talla de las hembras y en el tamaño de puesta. Sin embargo, dada su naturaleza, sus supuestos iniciales y su poder analítico, estos métodos tienen una interpretación ligeramente distinta entre sí y parecen responder preguntas ligeramente diferentes.

El más antiguo de estos métodos es el de autocorrelación filogenética (Cheverud et al., 1985) que, aunque ha recibido algunas críticas con respecto a sus cálculos (Rohlf, 2001), resulta un método relativamente sencillo, intuitivo y consistente en sus resultados. En este estudio fue utilizado para conocer tanto el valor de ρ (que es una medida de la inercia filogenética), como para conocer los valores de los caracteres libres de efectos filogenéticos (residuos) y hacer las correlaciones con variables ambientales. En otros estudios ha sido utilizado para conocer la influencia de la inercia filogenética sobre distintos tipos de caracteres como algunos atributos demográficos y morfológicos en el género *Thitonia* (Asteraceae) (Morales, 2007), los caracteres determinantes del dimorfismo sexual en los primates (Cheverud et al., 1985) y algunos caracteres conductuales en Passeriformes (Edwards y Naeem, 1993).

Otro de los métodos que apliqué es el de mínimos cuadrados generalizados filogenéticos (Martins y Hansen, 1997). En teoría este es uno de los métodos más poderosos que existen, pues se basa en un modelo lineal generalizado, cuyos términos de regresión pueden modificarse para adecuarse a distintos tipos de análisis. Tienen el potencial de ser utilizado para evaluar la restricción filogenética sobre un carácter (como en el caso del presente estudio), buscar estados ancestrales de caracteres,

estimar tasas de evolución de los caracteres y buscar correlaciones entre caracteres o entre un carácter y un tipo de ambiente (Hansen, 1997; Martins y Hansen, 1997). Sin embargo, en este estudio encontré que no funcionó de forma consistente, pues los valores del parámetro α (que en teoría también es una medida de inercia filogenética) no responden de forma coherente ante distintos escenarios evolutivos. A pesar de que no fue útil para estimar el efecto filogenético, este método funciona bien para responder otras preguntas. Por ejemplo, ha sido utilizado para estimar estados ancestrales de algunos caracteres (Martins y Lamont, 1998; Martins 1999), para analizar correlaciones entre caracteres (Darst et al., 2005; Rönn et al., 2007), para estudiar las correlaciones entre caracteres y alguna condición del ambiente (Halsey et al., 2006; Kleynhans y Terplanche, 2009), para rastrear el origen y la tasa evolutiva de caracteres (Ord y Martins, 2006; White et al., 2007) y, por último, para conocer el efecto filogenético se ha usado en trabajos como el de Collin (2004) y el de Végvári y colaboradores (2010).

El tercero de los métodos explorados fue el de señal filogenética (Blomberg et al., 2003) que es el más utilizado en los trabajos actuales justo para estimar efectos potenciales de las relaciones ancestro-descendiente (Losos, 2008; Ackerly, 2009). Una de las utilidades de este método es que estima el índice K, que, al ser estandarizado permite la comparación entre estudios de distintas especies y con distintas reconstrucciones filogenéticas. Respecto a este parámetro los autores explican que puede tomar valores mayores o menores a uno (Blomberg et al., 2003). Sin embargo, tanto en las simulaciones como en los trabajos donde se ha utilizado este índice, K tiene valores entre 0 y 1. Este método permite obtener información valiosa sobre el patrón general del atributo dentro de la filogenia, sin embargo no permite ubicar a un nivel más fino dónde se encuentran las diferencias entre los distintos clados que conforman a la filogenia. Con base en este método, se ha evaluado la señal filogenética sobre caracteres morfológicos (Johnston et al., 2003; Ashton, 2004; Cubo et al., 2005; Lavin et al., 2008), sobre caracteres ecológicos (Gilbert y Webb, 2007; Losos, 2008; Ackerly, 2009) y sobre caracteres conductuales (Blomberg et al., 2003; Huey et al., 2006), entre otros.

El último y quizá el menos utilizado de los métodos filogenéticos comparativos es el de ordenación canónica filogenética (Giannini, 2003), que en este estudio resultó

ser el más útil. Este método no sólo permite estimar el efecto de la filogenia sobre los atributos, sino que permite ubicar en qué clado o clados se da este efecto y rastrear en la filogenia los cambios ecológicos que pudieron haber producido que haya o no señal filogenética en el grupo. Ha sido utilizado en varios estudios para evaluar el efecto filogenético sobre algunos atributos morfológicos o ecológicos y su relación con aspectos ambientales actuales e históricos (Mesquita et al., 2006; França et al., 2008; Werneck et al., 2009a,b; Morales y Giannini, 2010; Vera-Candioti y Altig, 2010).

Otros métodos actuales, como los de Pagel (1997 y 1999), Garland y colaboradores (1999), Thomas y colaboradores (2006) e Ives y colaboradores (2007), también han sido utilizados en estudios recientes (Freckleton et al., 2002; Labra et al., 2009). Sin embargo, existe un debate con respecto a la utilidad y validez que tienen toda esta familia de métodos (Freckleton, 2009). Algunos de los principales problemas que se han sugerido son: los supuestos evolutivos y estadísticos que subyacen a los análisis y que difícilmente son comprobables, la calidad de los datos que se utilizan (que suelen ser valores promedio de los atributos por especies, cuando la variabilidad intraespecífica no es despreciable) y la calidad de las reconstrucciones filogenéticas. Por otra parte, los métodos comparativos que utilizan la longitud de ramas como parte del análisis (Felsenstein, 1985; Blomberg et al., 2003) se basan en el supuesto de que la evolución de los caracteres es anagenética (i.e., tipo de evolución donde los cambios entre las especies son graduales y dependen sólo del tiempo), a pesar de que se han reconocido al menos cuatro tipos de formas en que pueden evolucionar los caracteres (Jablonski, 2007). En general, estos métodos se basan en supuestos evolutivos difíciles de comprobar, por lo que las inferencias hechas a partir de sus resultados deben hacerse con cautela y considerando estas limitaciones.

A pesar de que parten de supuestos difíciles de comprobar, estos son métodos que han tratado de incorporar la mayor cantidad de variables para tratar de explicar la variación interespecífica y el patrón macroevolutivo de los atributos. Por lo tanto, resultan la herramienta más útil y sofisticada disponible hasta el momento para tratar de conocer la forma en que han evolucionado algunos caracteres, especialmente aquellos presumiblemente asociados a condiciones ecológicas que han impuesto presiones de selección y que, por lo tanto, serían el resultado de adaptaciones locales.

CONCLUSIÓN

La variación interespecífica que existe dentro del grupo de las tortugas con respecto al tamaño de puesta y a la talla de las hembras adultas está explicada en parte porque ambos atributos exhiben un efecto filogenético considerable. En parte, las fuerzas que parecen influir sobre estos atributos han sido impuestas por factores ecológicos históricos o actuales. Por un lado, el paso del ambiente dulceacuícola al marino ejerció una gran influencia sobre ambos caracteres incrementando el potencial reproductivo de las tortugas marinas. Por otro lado, la distribución latitudinal se relaciona negativamente con ellos, por lo que la inversión reproductiva suele ser menor a mayores latitudes.

LITERATURA CITADA

- Ackerly, D. 2009. Conservatism and diversification of plant functional traits: Evolutionary rates versus phylogenetic signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 19699-19706.
- Alberch, P. 1989. The Logic of Monsters: evidence of internal constrain in developmental evolution. *Geobios Mémoire Spécial* No. 12: 21-57. Lyon.
- Aresco, M.J. y M.S. Gunzburger. 2007. Ecology and Morphology of *Chelydra serpentina* in Northwestern Florida. *Southeastern Naturalist* 6: 435-448.
- Artner, H. 2008. The World's Extant Turtle Species, parts 1 and 2. *EMYS* 15 (1 y 2).
- Ashimare, G.M., F.J. Janzen. 2003. Phenotypic variation in smooth softshell turtle (*Apalone mutica*) from eggs incubated in constant versus fluctuating temperatures. *Oecologia* 134: 182-188.
- Ashton, K.G. 2004. Comparing phylogenetic signal in intraspecific and interspecific body size datasets. *Journal of Evolutionary Biology* 17: 1157-1161.
- Ashton, K.G., R.L. Burke y J.N. Layne. 2007. Geographic Variation in Body and Clutch Size of Gopher Tortoises. *Copeia* 2007: 355-363.
- Ashton, K.G. Y C.R. Feldman. 2003. Bergmann's rule in nonavian reptiles: Turtles follow it, Lizards and Snakes reverse it. *Evolution* 57: 1151-1163.
- Avise, J.C., B.W. Bowen, T. Lamb, A.B. Meylan y E. Bermingham. 1992. Mitochondrial DNA Evolution at a Turtle's Pace: Evidence for Low Genetic Variability and Reduced Microevolutionary Rate in the Testudines. *Molecular Biology and Evolution* 9: 457-473.
- Avise, J. 2006. *Evolutionary Pathways in Nature. A Phylogenetic Approach*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Barley, A.J., P.Q. Spinks, R.C. Thomson y H.B. Shaffer. 2010. Fourteen nuclear genes provide phylogenetic resolution for difficult nodes in the turtles tree of life. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 1189-1194.
- Begon, M., C. R. Townsend y J. L. Harper. 2006. *Ecology, From Individuals to Ecosystems*. Blackwell Publishing. Oxford.
- Björklund, M. 1997. Are "comparative methods" always necessary? *OIKOS* 8: 607-612.
- Bjorndal, K.A. y A. Carr. 1989. Variation in Clutch Size and egg size in the green turtle nesting population at Tortuguero, Costa Rica. *Herpetologica* 45: 181-189.

- Bjorndal, K.A., A.B. Bolten y S.Troëng. 2005. Population structure and genetic diversity in green turtles nesting at Tortuguero, Costa Rica, based on mitochondrial DNA control region sequences. *Marine Biology* 147: 1449-1457.
- Blomberg, S.P. y T. Garland Jr. 2002. Tempo and mode in evolution: phylogenetic inertia, adaptation and comparative methods. *Journal of Evolutionary Biology* 15: 899-910.
- Blomberg, S.P., T. Garland Jr. y A.R. Ives. 2003. Testing for Phylogenetic Signal in comparative data: behavioral traits are more labile. *Evolution* 57: 717-745.
- Bowen, B.W. Y S.A. Karl. 2007. Population genetics and phylogeography of sea turtles. *Molecular Ecology* 16: 4886-4907.
- Brandley, M.C., A. Schmitz y T.W. Reeder. 2005. Partitioned Bayesian Analyses, Partition Choice, and the Phylogenetic Relationships of Scincid Lizards. *Systematic Biology* 54: 373-390.
- Brischoux, F., X. Bonnet, T.R. Cook y R. Shine. 2008. Allometry of diving capacities: ectothermy vs. Endothermy. *Journal of Evolutionary Biology* 21: 324-329.
- Broderick, A.C., F. Glen, B.J. Godley y G.C. Hays. 2003. Variation in reproductive output of marine turtles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 288: 95-109.
- Cheverud, J. M., M. M. Dow y W. Leutenegger. 1985. The quantitative assessment of Phylogenetic Constrains in Comparative Analyses: Sexual Dimorphism in Body Weight Among Primates. *Evolution* 39: 1335-1351.
- Clark, P.J., M.A. Ewert y C.E. Nelson. 2001. Physical apertures as constrains on egg size and shpaein the common Musk Turtle, *Sternotherus odoratus*. *Funtional Ecology* 15: 70-77.
- Claude, J., P. Pritchard, H. Tong, E. Paradis y J.C. Auffray. 2004. Ecological Correlates and Evolutionary Divergence in the Skull of Turtles: A Geometric Morphometric Assessment. *Systematic Biology* 53: 933-948.
- Clobert, J., T. Garland y R. Barbault. 1998. The evolution of demographic tactics in lizards: a test of some hypotheses concerning life history evolution. *Journal of Evolutionary Biology* 11: 329-364.
- Collin, R. 2004. Phylogenetic effects, the loss of complex characters, and the evolution of develoment in calyptraeid gastropods. *Evolution* 58: 1488-1502.

- Congdon, J.D., G.L. Bretenbach, R.C. van Loben Sels y D.W. Tinkle. 1987. Reproduction and Nesting Ecology of Shapping Turtles (*Chelydra serpentina*) in Southeastern Michigan. *Herpetologica* 43: 39-54.
- Congdon, J.D. y R.C. van Loben Sels. 1993. Relationships of reproductive traits and body size with attainment of sexual maturity and age in Blanding's turtles (*Emydoidea blandingii*). *Journal of Evolutionary Biology* 6: 547-557.
- Congdon, J.D. Y J.W. Gibbons. 1985. Egg Components and Reproductive Characteristics of Turtles: Relationships to Body Size. *Herpetologica* 41: 194-205.
- Congdon, J.D. y J.W. Gibbons. 1990. Turtle Eggs: Their ecology and Evolution. En: Gibbons J.W. Life History and Ecology of the Slider Turtle, 1990. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C. 109-123.
- Cooper, C. B., W. M. Hochachka, G. Butcher y A. A. Dhondt. 2005. Seasonal and Latitudinal trends in Clutch Size: Thermal Constrains during laying and incubation. *Ecology* 86: 2018-2031.
- Cox, R.M., S.L. Skelly, H.B. John-Alder. 2003. A Comparative Test of Adaptive Hypotheses for Sexual Size Dimorphism in Lizards. *Evolution* 57: 1653-1669.
- Cubo, J., F. Ponton, M. Laurin, E. de Margerie y J. Castanet. 2005. Phylogenetic Signal in Bone Microstructure of Sauropsids. *Systematic Biology* 54: 562-574.
- Darst, C., P.A. Menéndez-Guerrero, L.A. Coloma y D.C. Cannatella. 2005. Evolution of Dietary Specialization and Chemical Defense in Poison Frogs (*Dendrobatidae*): A Comparative Anaysis. *The American Naturalist* 165: 56-69.
- Davies, T, J., S.A. Fritz, R. Grenyer, C.D.L. Orme, J. Bielby, O.R.P. Bininda-Emonds, M. Cardillo, K.E. Jones, J.L. Gittleman, G.M. Marce y A. Purvis. 2008. Phylogenetic trees and the furture of mammalian biodiversity. *Proceedins of the National Academy of Sciences* 105: 11556-11563.
- Diamond, A.W. 1976. Breeding biology and Conservation of Hawksbill Turtles, *Eretmochelys imbricata* L., on Cousin Island, Seychlles. *Biological Conservation* 9: 199-215.
- Diniz-Filho, J.A.F. y N.M. Tôrres. 2002. Phylogenetic comparative methods and the geographic range size - body size relationship in new world terrestrial carnivora. *Evolutionary Ecology* 16: 351-367.

- Doody, J.S., A. Georgen y J.E. Young. 2003. Twice every second year: reproduction in the pig-nosed turtle, *Carettochelys insculpta*, in the wet-dry tropics of Australia. *Journal of Zoology (London)* 259: 179-188.
- Dunson W.A. 1986. Estuarine populations of the Snapping turtle (*Chelydra*) as a model for the evolution of marine adaptation in reptiles. *Copeia* 1986: 741-756.
- Dutton, P.H., B.W. Bowen, D.W. Owens, A. Barragan y S.K. Davis. 1999. Global phylogeography of the leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*) *Journal of Zoology (London)* 248: 397-409.
- Edwards, S.V. y S. Naeem. 1993. The Phylogenetic component of comparative breeding in perching birds. *American Naturalist* 14: 754-789.
- Ernst, C.H. y G.R. Zug. 1994. Observations on the Reproductive Biology of the Spotted Turtle, *Clemmys gultata*, in Southeastern Pennsylvania. *Journal of Herpetology* 28: 99-102.
- Farrel, R.F. y T.E. Graham. 1991. Ecological Notes on the Turtle *Clemmys insculpta* in Northwestern New Jersey. *Journal of Herpetology* 25: 1-9.
- Felsenstein, J. 1985. Phylogenies and the Comparative Method. *The American Naturalist* 125: 1-15.
- Fitch, H.S. 1985. Variation in Clutch and Litter Size in New World Reptiles. The University of Kansas Museum of Natural History. Miscellaneous Publications No. 76.
- Fowler, L.E. 1979. Hatching success and Nest Predation in the Green Sea Turtle, *Chelonia mydas*, at Tortuguero, Costa Rica. *Ecology* 60: 946-955.
- França, F.G.R., D.O. Mesquita, C.C. Nogueira y A.F.B. Araújo. 2008. Phylogeny and Ecology Determine Morphological Structure in a Snake Assemblage in the Central Brazilian Cerrado. *Copeia* 2008: 23-38.
- Frazer, N. B. y J. I. Richardson. 1985. Annual Variation in Clutch Size and Frequency for Loggerhead Turtles, *Caretta caretta*, nesting at Little Cumberland Island, Georgia, USA. *Herpetologica* 41: 246-251.
- Freckleton, R.P., P.H. Harvey y M. Pagel. 2002. Phylogenetic Analysis and Comparative Data: A Test and Review of Evidence. *The American Naturalist* 160: 712-726.

- Garland, Jr. T., P.E. Midford y A.R. Ives. 1999. An Introduction to Phylogenetically Based Statistical Methods, with a New Method for Confidence Intervals on Ancestral Values. *American Zoologist* 39: 374-388.
- Giannini, N.P. 2003. Canonical Phylogenetic Ordination. *Systematic Biology* 52: 684-695.
- Giannini, N.P., F. Abdala y D.A. Flores. 2004. Comparative Postnatal Ontogeny of the Skull in *Dromiciops gliroides* (Marsupialia: Microbiotheriidae). *American Museum Novitates* 3460, 17 pp.
- Gibbons, W. y J Greene. 2009. Turtles, the Animal Answer Guide. The Johns Hopkins University Press. Baltimore.
- Gibbons, J.W. y D.W. Tinkle. 1969. Reproductive Variation Between Turtle Populations in a Single Geographic Area. *Ecology* 50: 340-341.
- Gilbert, G.S. y C.O. Webb. 2007. Phylogenetic signal in plant pathogen-host range. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 4979-4983.
- Goin, C., O. Goin y G.R. Zug. 1978. Introduction to Herpetology 3ª edición. W.H. Freeman and Co. Nueva York.
- Halsey, L.G., P.J. Butler y T.M. Blackburn. 2006. A Phylogenetic Analysis of the Allometry of Diving. *The American Naturalist* 167: 276-287.
- Hansen, T.F. 1997. Stabilizing Selection and the Comparative Analyses of Adaptation. *Evolution* 51: 1341-1351.
- Harvey, P. H. y M. D. Pagel. 1991. *The Comparative Method in Evolutionary Biology*. Oxford University Press, Nueva York.
- Hays G.C. y J.R. Speakman. 1991. Reproductive Investment and Optimum Clutch Size of Loggerhead Sea Turtles (*Caretta caretta*). *Journal of Animal Ecology* 60: 455-462.
- Herrel, A., J.C. O'Reilly y A.M.M Richmond. 2002. Evolution of bite performance in turtles. *Journal of Evolutionary Biology* 15: 1083-1094.
- Huelsenbeck, J.P. y F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Ivanovic, A., K. Sotiropoulos, M. Furtula, G. Dzukic y M.L. Kalazic. 2008. Sexual size and shape evolution in European newts (Amphibia: Caudata: Salamandridae) on the Balkan Peninsula. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 46: 381-387.

- Iverson, J.B. 1977. Reproduction in freshwater and terrestrial turtles of north Florida. *Herpetologica* 33: 205-212.
- Iverson, J.B. 1992. Correlates of reproductive output in turtles (Order Testudines). *Herpetological Monographs* 6: 25-42.
- Iverson, J. B., C. P. Balgooyen, K. K. Byrd y K. K. Lyddan. 1993. Latitudinal variation in egg clutch size in turtles. *Canadian Journal of Zoology* 71: 2440-2461.
- Iverson, J.B. y P.E. Moler. 1997. The Female Reproductive Cycle of the Florida Softshell Turtle (*Apalone ferox*). *Journal of Herpetology* 31: 399-409.
- Iverson J.B. y G.R. Smith. 1993. Reproductive Ecology of the Painted Turtle (*Chrysemys picta*) in the Nebraska Sandhills and across its Range. *Copeia* 1993: 1-21.
- Ives, A.R., P.E. Midford y T. Garland Jr. 2007. Within-Species Variation and Measurement Error in Phylogenetic Comparative Methods. *Systematic Biology* 56: 252-270.
- Jablonski, D. 2007. Scale and hierarchy in Macroevolution. *Paleontology* 50: 87-109.
- Johnston, I.A., D.A. Fernández, J. Calvo, V.L.A. Vieira, A.W. North, M. Abercromby y T. Garland, Jr. 2003. Reduction in muscle fibre number during the adaptive radiation of notothenioid fishes: a phylogenetic perspective. *The Journal of Experimental Biology* 206: 2595-2609.
- Karl, S.A., B.W. Bowen y J.C. Avise. 1992. Global Population Genetic Structure and Male-Mediated Gene Flow in the Green Turtle (*Chelonia mydas*): RFLP Analyses of Anonymous Nuclear Loci. *Genetics* 131: 163-173.
- Kass, R.E. y A.E. Raftery. 1995. Bayes factores. *American Journal Statistical Association* 90: 773-795.
- Kear, B.P. y M.S.Y Lee. 2006. A primitive protostegid from Australia and early sea turtle evolution. *Biology Letters* 2006-2: 116-119.
- Kleynhans, E. y J.S. Terblanche. 2009. The evolution of water balance in *Glossina* (Diptera: Glossinidae): correlations with climate. *Biology Letters* 2009-5: 93-96.
- Krenz J.G., G.J.P. Naylor, H.B. Shaffer y F. Janzen. 2005. Molecular phylogenetics and evolution of turtles. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37: 178-191.
- Kuo, C.H., F.J. Janzen. 2004. Genetic effects of a persistent bottleneck on a natural population of ornate box turtles (*Terrapene ornata*). *Conservation Genetics* 5: 425-437.

- Labra, A., J. Pienaar y T.F. Hansen. 2009. Evolution of Thermal Physiology in Liolaemus Lizards: Adaptation, Phylogenetic Inertia, and Niche Tracking. *The American Naturalist* 174: 204-220.
- Lavin, S.R., W.H. Karasov, A.R. Ives, K.M. Middleton y T. Garland Jr. 2008. Morphometrics of the Avian Small Intestine Compared with That of Nonflying Mammals: A Phylogenetic Approach. *Physiological and Biochemical Zoology* 81: 526-550.
- Legler, J.M., 1960. Natural History of the Ornate Box Turtle *Terrapene ornata Agassizii*. University of Kansas. Publications of Museum of Natural History, Vol. II, No. 10, p. 527-669.
- Li, C., X.C. Wu, O. Rieppel, L.T. Wang y L.J. Zhao. 2008. An ancestral turtle from the Late Triassic of southwestern China. *Nature* 456: 497-501.
- Limpus, C.L. 1980. Observations on the Hawksbill Turtle (*Eretmochelys imbricata*) Nesting along the Great Barrier Reef. *Herpetologica* 36: 265-271.
- Litzgus, J.D. y R.J. Brooks. 1998. Reproduction in a northern population of *Clemmys guttata*. *Journal of Herpetology* 32: 252-259.
- Litzgus, J. y T.A. Mousseau. 2006. Geographic variation in reproduction in a freshwater turtle (*Clemmys guttata*). *Herpetologica* 62: 132-140.
- Lonke, D.J. y M.E. Obbard. 1977. Tag Success, Dimensions, Clutch Size and Nesting Site Fidelity for the Snapping Turtle, *Chelydra serpentina*, (Reptilia, Testudines, Chelydridae) in Algonquim Park, Ontario, Canada. *Journal of Herpetology* 11: 243-244.
- Losos, J.B. 2008. Phylogenetic niche conservatism, phylogenetic signal and the relationship between phylogenetic relatedness and ecological similarity among species. *Ecology Letters* 11: 995-1007.
- Lutz, P.L., J.A. Musick y J. Wyneken (eds.). 2003. The Biology of Sea Turtles, vol II. CRC Press. Boca Raton.
- Malvasio, A., G.S., Junior, A.M. de Souza, N.R. Modro. 2005. Análise da interferência do Manuseio dos ovos no índice de eclosão e no padrão de escutela ção do casuo e as correlações encontradas entre as medidas das covas, ovos e filhotes em *Podocnemis* (Schweigger, 1812) e *P. unifilis* (Troschel, 1848). (Testudines, Pelomedudidae). *Publ. Avulsas Instituto Pau Brasil de História Natural* 08-09: 15-

38.

- Martin, A.P. y S.R. Palumbi. 1993. Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90: 4087-4091.
- Martins, E. y T.F. Hansen. 1997. Phylogenies and the Comparative Method: A General Approach to Incorporating Phylogenetic Information into the Analyses of Interspecific Data. *The American Naturalist* 149: 646-667.
- Martins, E.P. y J. Lamont. 1998. Estimating ancestral states of a communicative display: a comparative study of *Cyclura* rock iguanas. *Animal Behaviour* 55: 1685-1706.
- Mesinger, M.A. y G.M. Patton. 1995. Five Years Study of Nesting of Captive *Terrapene carolina* triunguis. *Herpetological Reviews* 26: 193-195.
- Mesquita, D.O., G.R. Colli, F.G.R. França, L.J. Vitt y C.M. Taylor. 2006. Ecology of a Cerrado Lizard Assamblage in the Jalapao Region of Brazil. *Copeia* 2006: 460-471.
- Mitchell, J.C. 1985. Female Reproductive Cycle and Life History Attributes in a Virginia Population of Painted Turtles, *Chysemys picta*. *Journal of Herpetology* 19: 218-226.
- Moen, D.S. 2006. Cope's rule in cryptodoran turtles: do the body sizes of extant species reflect a trend of phyletic size increase? *Journal of Evolutionary Biology* 19: 1210-1221.
- Moll, E.D. 1973. Latitudinal and Intersubspecific Variation in Reproduction of the Painted Turtle, *Chysemis picta*. *Herpetologica* 29: 307-318.
- Morales, E. 2000. Estimating phylogenetic inertia in *Tithonia* (Asteraceae): A comparative Approach. *Evolution* 54: 475-484.
- Morales, M.M., y N.P. Giannini. 2010. Morphofunctional patterns in Neotropical felids: species co-existence and historical assamblage. *Biological Journal of the Linnean Society* 100: 711-724.
- Mortimer, J.A. y A. Carr. 1987. Reproduction and Migration of the Ascension Island Green Turtle (*Chelonia mydas*). *Copeia* 1987: 103-113.
- Nelson, J. B. 1976. The breeding biology of frigatebrids- a comparative review. *Living Bird* 14: 113-156.
- Nieuwolt-Ducanay, P.M. 1997. Reproduction in the western box turtle, *Terrapene ornata luteola*. *Copeia* 1997: 819-826.
- Nixon, K.C. 1999-2002. WinClada ver. 1.0000 Published by the author, Ithaca, NY, USA.

- Ord, T.J. y E.P. Martins. 2006. Tracing the origins of signal diversity in anole lizards: phylogenetic approaches to inferring the evolution of complex behaviour. *Animal Behaviour* 71: 1411-1429.
- Pagel, M. 1997. Inferring evolutionary process from phylogenies. *Zoologica Scripta* 26: 337-348.
- Pagel, M. 1999. Inverring the historical patterns of biological evolution. *Nature* 401: 877-884.
- Patten, M.A. 2007. Geographic variation in calcium and clutch size. *Journal of Avian Biology* 38: 637-643.
- Pérez-Castañeda, R., A. Salum-Fares y O. Defeo. 2007. Reproductive patterns of the hawksbill turtle *Eretmochelys imbricata* in sandy beaches of the Yucatan Peninsula. *Journal of Marine Biological Association of the UK* 87: 815-824.
- Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.
- Rees, A.F., A. Saad y M. Jony. 2008. Discovery of a regionally important green turtle *Chelonia mydas* rookery in Syria. *Oryx* 42: 456-459.
- Reisz, R.R. y J.J. Head. 2008. Turtle origins out to sea. *Nature* 456: 450-451.
- Rieppel, O. y R.R. Reisz. 1999. The Origin and Early Evolution of Turtles. *Annual Review of Ecology and Systematics* 30: 1-22.
- Roff, D. 2002. *Life History Evolution*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Rohlf, F.J. 2001. Comparative methods for the analysis of continuous variables: Geometric interpretations. *Evolution* 55: 2143-2160.
- Rojas-González, R.I., C.P. Jones, J.J. Zúñiga-Vega y J.A. Lemos-Espinal. 2008. Demography of *Xenosaurus platyceps* (Squamata: Xenosauridae): a comparison between tropical and temperate populations. *Amphibia-Reptilia* 29: 245-256.
- Rönn, J., M. Katvala y G. Arnqvist. 2007. Coevolution between harmful male genitalia and female resistance in seed beetles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 10921-10925.
- Roosenberg, W.H. y A.D. Dunham. 1997. Allocation of Reproductive Output Egg and Clutch-size Variation in the Diamondback Terrapin. *Copeia* 1997: 290-297.

- Rowe, J.W., K.A. Coval, K.C. Campbell. 2003. Reproductive characteristics of female midland painted turtles (*Chrysemys picta marginata*) from a population on Beaver Island, Michigan). *Copeia* 2003: 326-336.
- Ruane, S., S.A. Dinkelacker y J.B. Iverson. 2008. Demographic and Reproductive Traits of Blanding's Turtles *Emydoidea blandingii*, at the Western Edge of the Species' Range. *Copeia* 2008: 771-779.
- Ryan, K.M. y P.V. Lindeman. 2007. Reproductive Allometry in the Common Map Turtle, *Graptemys geographica*. *American Midland Naturalist* 158: 49-59.
- Santidrián-Tomillo, P., J.S. Suss, B.P. Wallace, K.D. Magrini, G. Blanco, F.V. Paladino y J.R. Spotila. 2009. Influence of emergence success on the annual reproductive output of leatherback turtles. *Marine Biology* 156: 2021-2031.
- Santos, J.C., L.A. Coloma y D.C. Cannatella. 2003. Mulples, recurring origins of aposematic and diet specialization in poison frogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 12792-7.
- Scheyer, T.M. y P.M. Sander. 2007. Shell bone histology indicates terrestrial palaeoecology of basal turtles. *Proceedings of the Royal Society B* 274: 1885-1893.
- Shaffer, H.B., P. Meylan y M.L. McKnight. 1997. Test of Turtle Phylogeny: Molecular, Morphological, and Paleontological Approaches. *Systematic Biology* 46: 235-268.
- Shine, R. 2005. Life-history evolution in reptiles. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 36: 23-46.
- Stearns, S. C., 1992. *The Evolution of Live Histories*. Oxford University Press. Nueva York.
- Stearns, S. C. 2000. Life history evolution: successes, limitations and prospects. *Naturwissenschaften* 87: 476-486.
- Taylor, E.B. y J.D. McPhall. 2000. Historical contingency and ecological determinism interact to prime speciation in sticklebacks, *Gasterosteus*. *Proceedings of the Royal Society B*. 267: 2375-2384.
- Thomas, G.H., R.P. Freckleton y T. Székely. 2006. Comparative analyses of the influence of developmental mode on phenotypic diversification rates in shorebirds. *Proceedings of the Royal Society B* 273: 1619-1624.

- Tiwari M, K.A. Bjorndal. 2000. Variation in morphology and reproduction in loggerheads, *Caretta caretta*, nesting in the United States, Brazil and Greece. *Herpetologica* 56: 343-356.
- Tucker, A.D. Y N.B. Frazer. 1991. Reproductive Variation in Leatherback Turtles, *Dermochelys coriacea*, at Culebra National Wildlife Refuge, Puerto Rico. *Herpetologica* 47: 115-124.
- Tucker, J.K., G.L. Paukstis y F.J. Janzen. 1998. Annual and local variation in reproduction in the red-eared slider, *Trachemys scripta elegans*. *Journal of Herpetology* 32: 515-526.
- Tucker J.K. Y D.A. Warner. 1999. Microgeographic variation in response of re-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) embryos to similar incubation environments. *Jornal of Herpetology* 33: 549-557.
- Van Buskirk, J. Y L.B. Crowder. 1994. Life-History Variation in Marine Turtles. *Copeia* 1994: 66-81.
- Vanzolini, P.E. 2003. On Clutch size and hatching success of the South American turtles *Podocnemis expansa* (Schwelgger, 1812) y *P. unifilis* Troschel, 1848 (Testudines, Podocnemididae). *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 75: 415-430.
- Végvári, Z., V. Bókonyi, Z. Barta y G. Kovács. 2010. Life history predicts advancement of avian spring migration in response to climate change. *Global Change Biology* 16: 1-11.
- Vera-Candioti, M.F. y R. Altig. 2010. A survey of shape variation in keratinized labial teeth of anuran larvae as related to phylogeny and ecology. *Biological Journal of the Linnean Society* 101: 609-625.
- Vitt, L.J. 1986. Reproductive Tactics of Sympatric Gekkonid Lizards with a comment on the Evolutionary and Ecological Consequences of Invariant Clutch Size. *Copeia* 1986: 773-786.
- Vukov, T.D., K. Sotiropoulos, B. Wielstra, G. Dzukic y L. Kalzeic. 2011. The evolution of the adult body form of the crested newt (*Triturus cristatus* superspecies, Caudata, Salamandridae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 49: 324-334.

- Wallace, B.P., P.R. Sotherland, P. Santidrián-Tomillo, R.D. Reina, J.D. Spotila y F.V. Paladino. 2007. Maternal investment in reproduction and its consequences in leatherback turtles. *Oecologia* 152: 37-47.
- Warne, R.W. Y E.L. Charnov. 2008. Reproductive Allometry and the Size-Number Trade-Off for Lizards. *The American Naturalist* 172: E80-E98.
- Werneck, F.P., L.G. Giugliano, R.G. Collevatti y G.R. Colli. 2009. Phylogeny, biogeography and evolution of clutch size in South American lizards of the genus *Kentropyx* (Squamata: Teiidae). *Molecular Ecology* 18: 262-278.
- Werneck, F.P., G.R. Colli y L.J. Vitt. 2009b. Determinants of assemblage structure in Neotropical dry forest lizards. *Austral Ecology* 34: 97-115.
- White, C.R., T.M. Blackburn, J.S. Terblanche, E. Marias M. Gibernau y S.L. Chown. 2007. Evolutionary responses to discontinuous gas exchange in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 8357-8361.
- Wiens, J.J., C.A. Kuczynski Y P.R. Stephens. 2010. Discordant mitochondrial and nuclear gene phylogenies in emydid turtles: implicatons for speciation and conservation. *Journal of The Linnean Society* 99: 445-461.
- Wilkinson, L.R. y J.W. Gibbons. 2005. Patterns of reproductive Allocation: Clutch and Egg Size Variation in Three Freshwater Turtles. *Copeia* 2005: 868–879.
- Wilson, L.A.B., M.R. Sánchez-Villagra. 2011. Evolution and phylogenetic signal of growth trajectories: the case of chelid turtles. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Develpmental Evolution* 316B: 50-60.
- Woods, P.E. 1982. Vertebrate digestive and assimilation efficiencies: Taxonomic and trophic comparisons. *Biologist* 64: 58-77.
- Yntema, C.L. 1978. Incubation time for eggs of the turtle *Chelydra serpentina* (Testudines: Chelydridae) at various temperatures. *Herpetologica* 34: 274-277.
- Zar, J.H. 2009. Biostatistical Analysis 5th Ed. Pearson Education. Nueva Jersey.
- Zuffi, M.A., A. Celani, E. Foschi y S. Tripepi. 2007. Reproductive strategies and body shpae in the European pond turtle (*Emys orbicularis*) from contrasting habitats in Italy. *Journal of Zoology* 271: 218-224.
- Zuffi, M.A.L., F. Odetti y P. Meozzi. 1999. Body Size and Clutch Size in the European pond turtle (*Emys orbicularis*) from central Italy. *Journal of Zoology* 247: 139-143.

Apéndice 1.

Lista de referencias de las que se obtuvieron los datos de tamaño de puesta y tamaño de las hembras adultas (longitud curva del caparazón).

Especie	Referencia
<i>Apalone ferox</i>	Iverson y Moler, 1997
<i>Caretta caretta</i>	Fitch, 1985 Hays y Speakman, 1991 Tiwari y Bjorndal, 2000
<i>Carettochelys insculpta</i>	Doody et al., 2003 Mortimer y Carr, 1987
<i>Chelonia mydas</i>	Bjorndal y Carr, 1989 Fowler, 1979 Rees et al., 2008
<i>Chelydra serpentina</i>	Congdon et al., 1987 Lonke y Obbard, 1977 Aresco y Gunzburger, 2007 Iverson y Smith, 1993
<i>Chrysemys picta</i>	Rowe et al., 2003 Moll, 1973 Mitchell, 1985 Gibbons y Tinkle, 1969
<i>Clemmys guttata</i>	Ernst y Zug Litzgus y Brooks, 1998
<i>Clemmys insculpta</i>	Farrel y Graham, 1991 Tucker y Frazer, 1991
<i>Dermochelys coriacea</i>	Santidrián-Tomillo et al., 2009 Wallace et al., 2007
<i>Emydoidea blandingii</i>	Congdon y van Loben Sels, 1993 Ruane et al., 2008
<i>Emys orbicularis</i>	Zuffi et al., 1999 Zuffi et al., 2007 Limpus, 1980
<i>Eretmochelys imbricata</i>	Diamond, 1976 Pérez-Castañeda et al., 2007
<i>Graptemys geographica</i>	Ryan y Lindeman, 2007
<i>Malaclemys terrapin</i>	Roosenbert y Dunham, 1997
<i>Podocnemis expansa</i>	Vanzoleni, 2003
<i>Podocnemis unifilis</i>	Malvasio et al., 2005 Vanzoleni, 2003
<i>Sternotherus odoratus</i>	Wilkinson y Gibbons, 2005 Clark et al., 2001
<i>Terrapene carolina</i>	Messinger y Patton, 1995
<i>Terrapene ornata</i>	Legler, 1960 Nieuwott-Decanay, 1997 Congdon y Gibbons, 1990
<i>Trachemys scripta</i>	Tucker y Warner, 1999 Tucker et al., 1998

Apéndice 2.

Claves de acceso de GenBank para los genes utilizado en las reconstrucciones filogenéticas.

Especie	cytb	RAG-1	R35 intron 1	BDNF	TB29
<i>Apalone mutica</i>	AY259556.1	DQ529173.1			
<i>Apalone ferox</i>	AY259555.1			GU930987.1	
<i>Batagur baska</i>	AM922510.1	FN256245.1			
<i>Callagur borneoensis</i>	AY434601.1	EU030234.1			
<i>Caretta caretta</i>	AY770552.1	FJ009032.1	FJ009031.1	FJ009029.1	
<i>Carettochelys insculpta</i>	U81355.1	AY687904.1		GU085547.1	GU085712.1
<i>Chelonia mydas</i>	AY770551.1	AY687907.1	FJ039952.1	GU085548.1	EU787266.1
<i>Chelydra serpentina</i>	L12713.1	AY687906.1	FJ230856.1	GU085550.1	EU907535.1
<i>Chrysemys picta</i>	AF258878.1	GU085670.1	FJ770670.1	GU085549.1	GU085713.1
<i>Clemmys guttata</i>	AF258870.1	FJ770719.1	FJ770674.1		FJ770808.1
<i>Clemmys insculpta</i>	FJ770595.1	EU787248.1	FJ770680.1		FJ770815.1
<i>Clemmys marmorata</i>	AJ131430.1	GU085673.1	AY339631.1	GU085553.1	GU085716.1
<i>Dermochelys coriacea</i>	L12712.1	AY687908.1	AY742460.1		
<i>Emydoidea blandingii</i>	AF258869.1	EU787254.1	DQ649462.1		EU787281.1
<i>Emys orbicularis</i>	AF258868.1	EU787263.1			EU787289.1
<i>Eretmochelys imbricata</i>	L12718.1			FJ039972.1	
<i>Geochelone carbonaria</i>	DQ497296.1	EU930790.1			
<i>Geochelone denticulata</i>	DQ497298.1	EU930792.1			
<i>Graptemys geographica</i>	FJ770598.1	FJ770730.1	FJ770686.1		FJ770821.1
<i>Graptemys ouachitensis</i>	FJ770599.1	FJ770732.1	FJ770687.1		FJ770822.1
<i>Lepidochelys kempii</i>	AF385668.1	FJ039996.1	FJ039995.1	FJ039993.1	
<i>Lepidochelys olivacea</i>	AF385670.1	FJ039982.1	FJ039988.1	FJ039986.1	
<i>Macrochelys temminckii</i>	AF159026.1	FJ230864.1	FJ230863.1	GU085557.1	GU085720.1
<i>Malaclemys terrapin</i>	FJ770602.1	FJ770735.1	FJ770690.1		FJ770825.1
<i>Mauremys caspica</i>	AY434594.1	EU930796.1	AY339630.1		
<i>Mauremys leprosa</i>	AY434592.1	EU930797.1			
<i>Mauremys mutica</i>	FJ770585.1	FJ770713.1	DQ386666.1		FJ770803.1
<i>Natator depressus</i>	AF385674.1	L12762.1	FJ039960.1	FJ039957.1	
<i>Podocnemis expansa</i>	U81360.1	AY988100.1	AY742456.1	AY988079.1	EU907531.1
<i>Podocnemis unifilis</i>	AM943829.1		AY339634.1		
<i>Sternotherus odoratus</i>	U81350.1	AY687911.1	AY742463.1	GU085563.1	GU085723.1
<i>Terrapene carolina</i>	AF258871.1	FJ770742.1	FJ770698.1		FJ770839.1
<i>Terrapene coahuila</i>	FJ770612.1	FJ770744.1	FJ770700.1		FJ770836.1
<i>Terrapene ornata</i>	FJ770613.1	FJ770749.1	FJ770704.1		FJ770840.1
<i>Testudo graeca</i>	DQ497321.1	GU085681.1		GU085564.1	GU085724.1
<i>Trachemys scripta</i>	FJ770619.1	AY687915.1	AY742458.1		FJ770843.1

Apéndice 3.

Script de R para hacer el análisis de Ordenación Canónica Filogenética (Norberto Giannini):

```
rm(list=ls())
da=(read.table("C:\\N2b2011\\R_scripts\\TOR-CPO.txt", header=T))

attach(da)
names(da)
i=numeric()
app=numeric()
group=c(1:100)
reps=c(9999)

y=(da[,4])
x=(da[,40])

m=lm(y~x)
m
b=(m$coefficients[2])
b

for (i in 1:reps)
{
  ry=sample(y, replace=FALSE)
  mrnd=lm(ry~x)
  brnd=(mrnd$coefficients[2])
  app=c(app, brnd)
  rm=(ry)
  rm=(mrnd)
}
app=sort(app)

{ if (b<0) (exceed=app[app<=b])
  else {(exceed=app[app>=b])}}
rm=(b)
P=(length(exceed)+1)/(length(app)+1)
P
rm=(m)

(write.table (app, file="C:\\N2b2010\\R_scripts\\results\\CPO\\rnd-app.txt"))

detach(da)
rm(list=ls())
```

Apéndice 4.

Especies, distribución geográfica y latitud utilizada en el análisis de correlación entre residuos de AF y latitud.

Clave de especie	Residuos talla	Residuos puesta	Latitud
CI	0.02	-0.09	12.3
APM	-0.08	-0.05	38.36
AF	0.01	-0.04	29.89
PE	0.26	0.28	5.19
PU	0.04	-0.08	2.74
SO	-0.18	-0.11	34.92
CS	-0.08	-0.03	40.08
MCT	-0.01	-0.02	36.96
DC	0.53	0.14	1.46
ND	0.24	0.05	15.95
CM	0.3	0.32	19.36
EI	0.22	0.44	6.81
CC	0.22	0.3	0.75
LK	0.1	0.29	28.4
LO	0.13	0.28	5.43
TG	-0.08	-0.07	32.48
GC	-0.03	-0.06	13.11
GD	0.01	-0.05	6.25
BB	0.06	-0.05	8.64
CB	0.04	-0.05	1.14
MM	-0.11	-0.1	28.23
MC	-0.1	-0.09	45.76
ML	-0.11	-0.07	28.64
CP	-0.12	-0.09	38.69
TS	-0.08	-0.07	14.3
MT	-0.09	-0.08	35.92
GG	-0.08	-0.07	37.43
GO	-0.11	-0.08	36.48
CLI	-0.08	-0.06	42.13
EB	-0.03	-0.02	42.01
ACM	-0.06	-0.05	35.85
EO	-0.07	-0.05	42.42
CG	-0.11	-0.08	34.83
TO	-0.1	-0.08	36.75
TCA	-0.1	-0.08	29.95
TCO	-0.11	-0.08	26.95