



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE ECOLOGÍA

**Estructura genética y conectividad de la tortuga bisagra (*Terrapene*
coahuila) en Cuatro Ciénegas, México**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

XOCHIQUETZAL CORTÉS RODRÍGUEZ

DIRECTORA DE TESIS
ELLA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR
VALERIA SOUZA SALDÍVAR
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

OSCAR ALBERTO FLORES VILLELA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO, 2023



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.



PDCB/IE/0023/2023

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

LIC. DIANA GONZÁLEZ NIETO
Directora de Certificación y Control Documental
Dirección General de Administración Escolar, UNAM
Presente.

Nos permitimos informarle que el Comité Académico de DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS, en su sesión 532 del 26 de abril de 2023 designó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTORA EN CIENCIAS de la alumna CORTES RODRIGUEZ XOCHIQUETZAL, con número de cuenta: 508019469, con la tesis titulada: "ESTRUCTURA GENÉTICA Y CONECTIVIDAD DE LA TORTUGA BISAGRA (TERRAPENE COAHUILA) EN CUATRO CIÉNEGAS, MÉXICO", dirigida por la DRA. ELLA GLORIA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ

Presidente: DR. ALBERTO KEN OYAMA NAKAGAWA
Vocal: DR. JORGE ALBERTO CONTRERAS GARDUÑO
Vocal: DR. ANTONIO GÓNZALEZ RODRIGUEZ
Vocal: DRA. LAURA ROXANA TORRES AVILÉS
Secretario: DRA. ELLA GLORIA VAZQUEZ DOMINGUEZ

Asimismo, informo a usted y a los honorables miembros del jurado que, de acuerdo con los Lineamientos generales para el funcionamiento del posgrado, tendrán un máximo de 30 días contados a partir del momento en que oficialmente reciban el manuscrito de la tesis para revisar el documento y emitir por escrito su voto probatorio fundamentado.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx, a 27 de abril de 2023

DR. ALEJANDRO E. GONZÁLEZ VOYER
REPRESENTANTE EN LA ENTIDAD ACADÉMICA

c.c.p: Expediente alumno

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado de Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante la elaboración del proyecto de Doctorado.

A mi comité tutorial:

Dra. Ella Vázquez Domínguez, Instituto Ecología UNAM

Dra. Valeria Souza Saldivar, Instituto de Ecología, UNAM.

Dr. Oscar Alberto Flores Villela, Facultad de Ciencias de la UNAM.

A los miembros del jurado:

Presidente: Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa
Vocal: Dr. Jorge Alberto Contreras Garduño
Vocal: Dr. Antonio González Rodríguez
Vocal: Dra. Laura Roxana Torres Avilés
Secretario: Dra. Ella Gloria Vázquez Domínguez

Al Laboratorio de Genética y Ecología, Instituto Ecología UNAM que proporcionó espacio y equipo para la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi tutora la Dra. Ella Vázquez Domínguez por las horas dedicadas a mi formación, por su apoyo, por embarcarse conmigo en este proyecto que y volverlo realidad, por su paciencia y por la oportunidad de pertenecer a su laboratorio.

A mi comité tutorial por sus valiosos comentarios y apoyo en la realización de este proyecto. En especial a la Dra. Valeria Souza quien me brindó un espacio en Cuatrociénegas, así como por sus contactos los cuales facilitaron enormemente mi estadía y obtención de los datos además de contagiarme de su pasión por este lugar.

Al Dr. Rodney Dyer, por permitirme realizar mi estancia de investigación la cual fue clave para el desarrollo del capítulo dedicado a la Genética del Paisaje. Gracias a los miembros de su laboratorio principalmente a Jane Remfert y Lindsay Miles por hacerme tan agradable la estancia.

El Dr. Antonio González Rodríguez y la Dra. Clementina González Zaragoza por su valioso apoyo para concluir el último capítulo.

A mis padres y mis hermanos. Por ser mi apoyo incondicional.

A Omar Chassin gracias por su amor, por compartir conmigo la vida, la pasión por la biología y soñar conmigo este trabajo de principio a fin.

Al laboratorio de Genética del Instituto de Ecología. En especial a Ruth, Sayra y Alejandro con quienes compartí múltiples aprendizajes y horas de trabajo y de quienes, además, me llevo su amistad. A mis amigos de la vida Ceci (gracias por dejarme transmitir mi amor por la ciencia), Miri, Edward y Rob gracias por sus porras siempre.

Un reconocimiento especial a Catarino Benítez y Jesús Benítez jóvenes de la comunidad de Cuatrociénegas, ellos fueron mis compañeros en el trabajo de campo cuando eran estudiantes de preparatoria, guardo muchos recuerdos juntos aprendiendo de las maravillas del valle.

**A MIS PADRES
RAFAEL CORTÉS RODRÍGUEZ
ELIA MA. RODRÍGUEZ Y TERÁN**

**A LOS QUE ME ACOMPAÑAN DESDE LAS ESTRELLAS
GLORIA TERÁN BERISTAIN
ENRIQUE RODRÍGUEZ MÉNDEZ**

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN GENERAL	4
CAPÍTULO 1: “Las tortugas dulceacuícolas y terrestres en la Genética del Paisaje”...9	
CAPÍTULO 2: “Striking habitat reduction, decreased genetic diversity, and imperilled conservation of natural populations of <i>Terrapene coahuila</i> ”24	
CAPÍTULO 3: “ Tortuga bisagra: una aproximación desde la genética del paisaje”... 50	
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES FINALES	72
LITERATURA CITADA	75

RESUMEN

Las especies endémicas y restringidas, que además tienen baja capacidad de dispersión, comúnmente presentan tamaños poblacionales pequeños y flujo genético limitado, por lo cual enfrentan procesos genéticos estocásticos como deriva génica y endogamia. La tortuga bisagra (*Terrapene coahuila*) es una especie semiacuática, microendémica, cuya distribución está limitada a pozas y humedales en el valle de Cuatrociénegas, Coahuila, México. Está catalogada como “En peligro” por la IUCN. El hábitat de la tortuga bisagra se ha reducido en más de 70% por causas antropogénicas, donde la pérdida de hábitat por sobreexplotación del acuífero ha resultado en poblaciones aisladas de *T. coahuila*, ocasionando que la dispersión a través de la matriz del desierto sea limitada. En este estudio evaluamos los patrones genéticos tanto históricos como contemporáneos de seis localidades de muestreo de *T. coahuila* con diferente grado de aislamiento. Utilizamos 12 loci de microsatélites, un gen nuclear (GAPD) y dos mitocondriales (citocromo *b* y d-loop). Los objetivos fueron: 1) caracterizar la diversidad y estructura genética de la tortuga bisagra en Cuatrociénegas, a nivel nuclear (microsatélites y gen nuclear) y mitocondrial; 2) descifrar procesos históricos y relaciones filogenéticas de la especie y determinar procesos contemporáneos como cuellos de botella y relaciones de parentesco; y 3) evaluar las características del hábitat y de la matriz del paisaje donde se distribuyen las poblaciones (conectividad estructural), así como el flujo génico entre poblaciones (conectividad funcional), para determinar la relación entre los patrones genéticos observados y las características del paisaje.

Nuestros resultados sugieren el tiempo del ancestro común más reciente de *T. coahuila* hace 10.1 millones de años, con la mayor diversificación durante el Holoceno. La estructura identificada con los diferentes marcadores y métodos de análisis fue de dos grupos genéticos, Cuatrociénegas Este y Cuatrociénegas Oeste, a ambos lados de la principal barrera histórica, la Sierra San Marcos. Los resultados demográficos apoyaron una divergencia entre poblaciones occidentales y poblaciones orientales desde hace 47,500 a 110,950 años, y la colonización de la distribución occidental más al sur (Churince) en 28,500–66,500 años atrás, población que experimentó un cuello de botella reciente. Todas las poblaciones mostraron valores bajos de diversidad haplotípica y de diversidad genética nuclear, migración limitada, y tamaño efectivo poblacional pequeño. También se identificaron señales significativas de consanguinidad y cuellos de botella dentro de los dos grupos genéticos.

Encontramos una tendencia general de disminución de la variación genética, incremento de la diferenciación genética y disminución del tamaño poblacional como consecuencia de la pérdida y fragmentación del hábitat contemporáneo en todo el valle. Los resultados de genética del paisaje mostraron patrones particulares de conectividad asociados con el paisaje. La elevación, la vegetación (medida como NDVI) y la humedad (TWI) fueron los mejores predictores de los patrones de flujo génico, lo cual está relacionado con la fragmentación actual del paisaje y la dinámica de los humedales, y con la capacidad de dispersión de la especie, alimentación y patrones de conducta de protección y estivaje.

Los cambios en la demografía de las especies y la conectividad de las poblaciones tienen el potencial para alterar permanentemente los patrones genéticos de las especies de agua dulce. Por lo tanto, dada su distribución restringida, alta especificidad de hábitat y pérdida de área de distribución, *Terrapene coahuila* está en peligro extremo de extinción. Además, es crucial restaurar la conectividad entre humedales para la conservación de ésta y otras especies y del valle de Cuatrociénegas en conjunto.

Palabras clave: conectividad, estructura genética, desiertos, Cuatrociénegas, diversidad genética, flujo génico, genética del paisaje, tortugas terrestres, conservación

ABSTRACT

Endemic and restricted species, which have low dispersal abilities, frequently have small population sizes and limited gene flow. Thus, they face stochastic genetic processes such as genetic drift and inbreeding. The Coahuilan box turtle *Terrapene coahuila* is a semi aquatic and micro endemic turtle species with a limited distribution to ponds and wetlands across the Cuatrociénegas valley in Coahuila Mexico. It is listed as Endangered by the IUCN. Its habitat has been reduced in more than 70% due to anthropogenic causes, which in turn has rendered isolated populations and a limited dispersion across the desert matrix. The aim of this work was to study historical and contemporary genetic patterns of *T. coahuila* at six sampling localities that exhibit different isolation degrees. We used 12 microsatellites loci and one nuclear (GAPD) and two mitochondrial (cytochrome b and d-loop) genes. Our objectives were: 1) to characterize the genetic diversity and structure of this species in Cuatrociénegas at the nuclear (microsatellites and nuclear gen) and mitochondrial levels. 2) to describe its historical diversification and phylogenetic relationships, 3) to determine contemporary population genetic patterns, including bottlenecks and kinship relationships, and 4) to evaluate the landscape matrix (habitat variables) along its distribution (structural connectivity) in order to elucidate the relationship between the observed genetic patterns and the landscape features (functional connectivity).

Results suggest that the most common ancestor of *T. coahuila* dates to ca. 10.1 million years ago, with the greatest diversification during the Holocene period. Genetic structure, evaluated with different methods and markers, indicated two genetic groups (East and West Cuatrociénegas), located on both sides of a main historical barrier, the Sierra de San Marcos. Demographic results support the divergence between the western and eastern genetic clusters since 47,500 to 110,950 years ago, while the colonization of the western distribution further south (at Churince) at 28,500 to 66,500 years ago. Also, that this latter group experienced a recent bottleneck. Genetic patterns at the sampling locality level showed low haplotypic and nuclear genetic diversity values, limited migration and small effective size population. In addition, significant signals of inbreeding and bottlenecks were identified in genetic clusters.

An overall decrease of genetic variation and population size, as well as an increase of genetic differentiation were found. Such patterns are clearly linked to the contemporary habitat loss and fragmentation across the valley. The landscape genetics results showed that the elevation, the vegetation index (measured as NDVI) and the humidity index (TWI) were the best predictors of connectivity (gene flow). Notably, these variables are related to the landscape fragmentation, the change in wetlands dynamics, and the species dispersal abilities, feeding, and behavior patterns.

The species demographic changes and significantly diminished functional connectivity have the potential to permanently transform the genetic patterns of this freshwater species. Hence, given the restricted distribution, high habitat specificity and loss of wetlands and freshwater bodies, *Terrapene coahuila* is considered in extreme threat of extinction. It is crucial to restore the connectivity between the wetlands in order to promote the conservation of this and other species as well as of the entire Cuatrociénegas valley.

Keywords: connectivity, conservation, Cuatrociénegas, deserts, genetic structure, genetic diversity, gene flow, landscape genetics, tortoises

INTRODUCCIÓN GENERAL

Genética de poblaciones, filogeografía y genética del paisaje

La diversidad genética es uno de los tres niveles de diversidad reconocidos junto con la diversidad de especies y de ecosistemas (Frankham y Briscoe, 2002; Allendorf y Luikart, 2007). Esta diversidad es moldeada de manera temporal y espacial por procesos macroevolutivos, aquellos que dan origen, extinción y diversificación de los taxa y microevolutivos como la mutación, migración, deriva génica y selección natural (Futuyma y Kirkpatrick, 2017).

La genética de poblaciones estudia el origen, los niveles y la distribución de la variación genética presente en las poblaciones en el tiempo y espacio y en términos cuantitativos y predictivos (Vázquez-Domínguez et al., 2007; Templeton, 2021). Esta disciplina surgió en entre 1920 y 1930 cuando se extendieron las leyes de Mendel al estudio de las poblaciones (Spies, 1968) y utiliza la ley de Hardy-Weinberg como el modelo nulo, el cual asume una población con reproducción aleatoria en el que no hay fuerzas selectivas que provoquen un cambio genético de generación en generación (Allendorf y Luikart, 2007). Bajo dichos supuestos, este modelo provee la base para detectar desviaciones originadas por procesos de mutación, migración, la deriva génica y la selección natural (Frankham y Briscoe, 2002).

Un poco más tarde, entre 1980 y 1990, la integración entre la genética y la sistemática dio origen a la filogeografía, una disciplina que estudia los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de los linajes genealógicos (Avise et al., 1987; Avise, 2000). La filogeografía trata de explicar los procesos históricos que han determinado la demografía poblacional y en consecuencia ha influido en la distribución geográfica contemporánea de los linajes, por lo que es considerada un puente entre la microevolución y la macroevolución (Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez, 2009; Avise, 2000).

Finalmente, en 2003 surgió la genética del paisaje la cual tiene como objetivo evaluar la interacción entre las características del paisaje y procesos microevolutivos, como el flujo de génico, la deriva génica y la selección. Esta disciplina propone integrar datos genéticos y aspectos más complejos de la composición del paisaje y su configuración, además de cuantificar explícitamente sus efectos en la conectividad funcional entre individuos y poblaciones (flujo génico) (Manel et al., 2003; Holderegger y Wagner, 2006; Storfer et al., 2007). El desarrollo de esta disciplina integra análisis de la ecología del paisaje (como técnicas de teledetección de alta calidad y sistemas de información geográfica) y datos moleculares, así como estadísticos capaces de detectar correlaciones, discontinuidades geográficas y barreras al flujo génico y migración (Diniz-Filho et al., 2008).

Los marcadores moleculares más comúnmente usados en estos campos incluyen al ADN mitocondrial, así como loci neutrales, incluyendo los microsatélites y los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) (Frankham y Briscoe 2002). Estos marcadores permiten obtener datos de variación genética en el tiempo y el espacio dentro y entre poblaciones, la cual depende directamente del nivel de flujo génico, tamaños poblacionales, cuellos de botella, tasas de migración y procesos de adaptación y selección. Los microsatélites son un marcador altamente utilizado en genética de poblaciones y del paisaje debido a su bajo costo y porque proporcionan una resolución adecuada para detectar cambios recientes en el paisaje, presentan un alto

polimorfismo incluso en poblaciones pequeñas y especies en peligro de extinción, derivado de su alta tasa de mutación (Waits y Storfer, 2015). Por otro lado, el uso de genes tanto mitocondriales como nucleares permiten la evaluación de procesos asociados al sexo y a tiempos históricos, lo cual también se relaciona con su tasa de mutación (Allendorf y Luikart, 2007).

En este proyecto utilizamos las tres disciplinas de estudio descritas para evaluar la historia evolutiva y contemporánea que dio origen y moldeó las poblaciones de la tortuga bisagra *Terrapene coahuila* en el valle de Cuatrociénegas, Coahuila, México.

El valle de Cuatrociénegas

El valle de Cuatrociénegas se encuentra en el desierto chihuahuense (26°45'00" - 27°00'00" N; 101°48'49" y 102°17'53" O), tiene una extensión de 1,500 km², en su zona más amplia mide aproximadamente 40 km de este a oeste y 30 km de norte a sur. Se encuentra a 740 m sobre el nivel del mar, con una topografía prácticamente plana (Minckley, 1969; Carabias et al., 1999). Se encuentra rodeado por las sierras La Madera y La Menchaca al norte, al oeste La Purísima y San Vicente, al sur San Marcos y Pinos y al sureste La Fragua. También es conocido como el valle de la mariposa debido a que se encuentra dividido en dos lóbulos por la Sierra de San Marcos. La sierra históricamente ha funcionado como una barrera, limitando la dispersión de algunas de las especies que habitan el valle, lo que se traduce en la presencia de estructura genética en pocos kilómetros (Johnson, 2005; Carson y Dowling 2006; Chaves-Campos et al. 2011; Cortés-Rodríguez et al., 2021;).

Este valle, presenta escasas precipitaciones pluviales que varían entre 100 y 440 mm anuales (Carabias et al., 1999). El valle tenía un registro inicial de 500 cuerpos de agua compuestos por manantiales, pantanos, ríos y estanques (Minckley, 1969; Wolaver et al., 2008), sin embargo, muchos de ellos han desaparecido. Actualmente hay un registro de ca. 200 cuerpos de agua dentro del valle, cuyas características físico-químicas son muy variables, con temperaturas que oscilan entre 18 y 35°C y valores de pH de 5.76 a 8.3 y de conductividad entre 782 y 7.52 µS (Carabias et al., 1999). En 1969, Minckley describió siete sistemas de flujo de agua en la cuenca: El Churince, Becerra/Garabatal, Río Mezquites, Río Puente Chiquito, Tío Cándido/Escobedo, Santa Tecla y Río Salado de los Nadadores (Río Grande). Existen también otros cuerpos de agua como pozas, lagunas y humedales. La vegetación dominante en el valle incluye desde pastizal halófilo y vegetación acuática en el piso de la cuenca hasta especies endémicas de plantas gipsófilas que habitan en las dunas de yeso y el matorral xerófilo y submontano en las partes más elevadas (Carabias et al., 1999).

Debido a las características tan particulares de la zona se favoreció el desarrollo de uno de los endemismos más altos de América del Norte. Se tiene registro de más de 70 especies endémicas incluyendo peces, caracoles, crustáceos y varias especies de herpetofauna, entre éstas tres especies endémicas de tortugas (Minckley, 1969; Semarnat, 1999; Souza et al., 2006; McGaugh, 2012). Notablemente, la rica biodiversidad y los hábitats acuáticos aunado a la fragmentación del valle de Cuatrociénegas contribuyeron a que fuera declarado Reserva de la Biosfera (UNESCOMAB 2006).

Tortugas dulceacuícolas y *Terrapene coahuila*

Las tortugas de la familia Emydidae son cosmopolitas y en su mayoría son acuáticas o semiacuáticas, sin embargo, algunos géneros han desarrollado adaptaciones terrestres como el género *Terrapene*. Este género, también conocido como tortugas de caja, está distribuido en

Norteamérica y se compone de cinco especies y 11 subespecies (Milstead y Tinkle, 1967; Martin et al., 2013). Dentro de este género se encuentra la tortura bisagra *Terrapene coahuila*, una especie microendémica cuya distribución está limitada al valle de Cuatrociénegas (Minckley, 1969). Es la única especie semiacuática del género y se piensa que pudo haberse aislado, adaptándose al medio acuático en relativamente poco tiempo durante el Pleistoceno, a través de evolución rápida mediada por fuertes presiones selectivas (Milstead, 1967)

Terrapene coahuila tiene el caparazón de color marrón oliva oscuro y presenta dimorfismo sexual, los machos alcanzan tamaños de 144.4 mm mientras que las hembras de 127.7 mm (Howeth y Brown, 2011) Figura 1. Asimismo, los machos adultos tienen una concavidad plastral que está ausente en las hembras (Brown, 1971). Se desconocen las tasas de supervivencia y longevidad, sin embargo, con base en su especie hermana *T. carolina* (Stickel y Bunck, 1989), se estima que madura sexualmente a los 15 años y vive más de 65 años (Miller, 2001). Las hembras ponen aproximadamente tres nidadas por año, con tamaños de nidada de entre 1-3 huevos (Brown, 1971). Sumado a las frágiles características reproductivas, la especie se encuentra actualmente bajo fuertes presiones antrópicas que han disminuido significativamente sus poblaciones. Brown (1974) estimó una población total de aproximadamente 10,000 individuos, y 40 años después Howeth et al. (2011) estimaron que había 2,500 tortugas. El cálculo más reciente del tamaño poblacional en 2020 fue de sólo 1,791 individuos (Gaytán et al., 2020), lo que significa una reducción de poco más del 80%.



Foto Cecilia Vargas

Figura 1. *Terrapene coahuila*. Endémica del Valle de Cuatrociénegas.

Durante los últimos 50 años los humedales se han fragmentado significativamente, sobre todo por la extracción de agua y desvío a través de un complejo sistema de canales y pozos dentro del valle y en los valles vecinos (Minckley, 1992; Souza et al., 2006). Humedales que alguna vez fueron continuos ahora están fragmentados, espacialmente aislados por grandes extensiones de matriz terrestre (Hendrickson et al., 2008). Como consecuencia, la distribución geográfica actual de la tortura bisagra se ha reducido de aproximadamente 600 km² en 1960 a cerca de 360 km² en 2002 y el apenas 5.4 km² de hábitat efectivo en 2022 (van Dijk et al., 2007, CITES, 2022). Dicha pérdida de hábitat y fragmentación ha resultado en diferentes poblaciones aisladas de *T. coahuila*, para las que la dispersión a través de la matriz del desierto es limitada. Howeth y colaboradores (2008) describieron que *T. coahuila* exhibe dos tipos de comportamiento de dispersión, movimientos cortos y frecuentes entre humedales locales, y dispersión relativamente poco frecuente a larga distancia (regional). La dispersión de larga distancia tiene implicaciones importantes en cuanto al flujo de genes y la estructura genética de esta tortura

(McGaugh, 2012), aspectos clave para su persistencia y conservación. Diversos estudios con otras especies que habitan en el valle han demostrado que existe estructuración genética poblacional asociada a la fragmentación del hábitat (ver Chaves-Campos et al., 2011). Otro factor que afecta a *T. coahuila* es la naturaleza estacional de los humedales, debido a que en la época de secas algunos pueden disminuir significativamente su nivel de agua, con una consecuente alta mortalidad de individuos. Dado que el desierto Chihuahuense se considera una región vulnerable a los efectos del calentamiento global (WWF, 2019) y que continúa la extracción de agua para la agricultura, estos impactos negativos podrían exacerbarse en los próximos años.

Por todo lo anterior *Terrapene coahuila* está catalogada como “En peligro” por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, por sus siglas en inglés) y como “Sujeta a protección especial” por la normatividad mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010). Es notable así que a pesar de que *T. coahuila* se encuentra identificada como una de las 40 especies de tortugas en alto riesgo de extinción a nivel mundial (Rhodin et al., 2011), se sabe muy poco de sus patrones históricos de diversificación y establecimiento en el valle, así como de los patrones y procesos contemporáneos que determinan su diversidad y estructura genética. Por todo ello, en este trabajo planteamos desarrollar un análisis detallado de los patrones genéticos de *T. coahuila* con base en marcadores nucleares y mitocondriales, considerando asimismo los elementos del paisaje asociados con la fragmentación y la estacionalidad del hábitat. Nos interesaba contar con una evaluación completa, histórica y contemporánea, que permitiera obtener un panorama certero de los impactos sobre las poblaciones de *T. coahuila* y del estado genético de la especie.

Para ello se establecieron los siguientes objetivos específicos: 1) caracterizar la diversidad y estructura genética de la tortuga bisagra en Cuatrociénegas, a nivel nuclear (microsatélites y gen nuclear) y mitocondrial (citocromo b y región control); 2) determinar procesos actuales como cuellos de botella y relaciones de parentesco, así como descifrar procesos históricos y relaciones filogenéticas de la especie; 3) evaluar las características del hábitat y de la matriz del paisaje donde se distribuyen las poblaciones (conectividad estructural), así como el flujo génico entre poblaciones (conectividad funcional), para determinar la relación entre los patrones genéticos observados y las características del paisaje. Así, la tesis comprende tres capítulos.

En el primer capítulo se incluye una revisión titulada “Las tortugas dulceacuícolas y terrestres en la genética del paisaje”, documento que forma parte del libro “Estudios sobre la biología y la conservación de las tortugas de México” publicado por la Sociedad Herpetológica Mexicana. Se realizó una revisión detallada de los trabajos a nivel mundial que analizan específicamente la interacción de alguna característica del paisaje o ambiente con la estructura genética o la conectividad funcional de las poblaciones de tortugas dulceacuícolas y terrestres. Compilamos los patrones generales entre variables y características específicas del paisaje y la estructura y variación genética en este linaje. Concluimos enfatizando que se deben llevar a cabo trabajos en diversas especies, que incorporen herramientas de estudio genético actualizadas, para dilucidar los patrones que permitan diseñar programas de manejo y conservación adecuados.

En el capítulo dos realizamos un estudio genético en donde describimos procesos en distintos tiempos evolutivos, uno que abarca el contexto histórico que contempla desde el surgimiento de la especie y cómo fue el proceso de colonización del valle, y el contexto contemporáneo donde evaluamos el tamaño poblacional, el flujo génico y la estructura genética. Este trabajo se publicó en la revista *Freshwater Biology*, como artículo científico titulado “Striking habitat reduction, decreased genetic diversity, and conservation imperils of *Terrapene coahuila* natural populations”

Finalmente, dado el riesgo de extinción que enfrenta *T. coahuila*, en el tercer capítulo exploramos los factores del paisaje que moldean la distribución de sus poblaciones y cómo estos determinan la estructura genética, con base en lo cual determinamos la conectividad funcional de las poblaciones. Los resultados de este capítulo serán enviados como artículo científico a la revista *Conservation Genetics*.

CAPÍTULO 1

“Las Tortugas Dulceacuícolas y Terrestres en la Genética del Paisaje”

Xochiquetzal Cortés-Rodríguez y Ella Vázquez-Domínguez

Las Tortugas Dulceacuícolas y Terrestres en la Genética del Paisaje

Xochiquetzal
Cortés
Rodríguez

Ella
Vázquez
Domínguez

Resumen.

El estudio de las tortugas dulceacuícolas y terrestres, en particular sobre aspectos taxonómicos, filogenéticos, de genética poblacional y sistemas de apareamiento, se incrementó a partir del surgimiento de las técnicas moleculares. De las 341 especies existentes, 62 están dentro de la lista de la IUCN catalogadas como vulnerables, 44 en peligro de extinción y 49 en peligro crítico de extinción. Las principales amenazas son el tráfico ilegal de fauna, la pérdida y fragmentación de hábitat, el cambio de uso de suelo, el crecimiento urbano, la depredación y las carreteras. Así, es esencial conocer cuáles son los elementos del paisaje que determinan los procesos genéticos contemporáneos de sus poblaciones. La genética del paisaje (GP) es el área de investigación que nos permite abordar estos problemas. En esta revisión evaluamos exhaustivamente los trabajos publicados donde se hubiera estudiado la GP en tortugas, desde la aparición de la disciplina en 2003 hasta el 2021. De una primera lista general de 200 trabajos, 26 (11%) fueron del tema de la revisión y de estos últimos sólo nueve (34%) hicieron una evaluación estricta de GP, desde el análisis de la diversidad y estructura genética hasta su correlación con factores del paisaje. Estos trabajos incluyen apenas el 5.8% de las especies vivientes, concentrados en cinco de las 12 familias de tortugas continentales. La distancia geográfica es la variable más analizada, seguida de la pendiente, montañas y hábitats fragmentados; sólo un trabajo incorporó variables específicas del medio acuático. Los efectos del paisaje están determinados mayormente por la capacidad de dispersión de las especies. Enfatizamos la necesidad de realizar estudios que incluyan las nuevas tecnologías y métodos analíticos de GP, así como la urgencia de incluir una mayor diversidad de especies. Ello redundará en diseñar esquemas adecuados de manejo y conservación para las múltiples especies en categorías de conservación.

Palabras clave. DNA, flujo génico, poblaciones, microsátélites, tortugas.

Abstract.

Based on the advances of molecular techniques, freshwater turtles and tortoises have been widely studied about their taxonomy, phylogeny, population genetics, and mating systems. From the 341 recognized turtles' species, 62 are within the IUCN red list categorized as vulnerable, 44 are endangered and 49 are critically endangered. Their main threats are illegal wildlife trafficking, land use change, habitat loss and fragmentation, urbanization, predation, and road kills. Hence, it is crucial to learn which landscape elements determine contemporary genetic processes of their populations. Landscape genetics (LG) is the research area that enables to study these problems. In this review, we exhaustively evaluated published studies where LG analyses of turtles were performed, since the start of the discipline in 2003 until 2021. From an initial general list of 200 studies, 26 (11%) fulfilled the search criteria and in only nine (34%) a strict LG evaluation is performed, including from the analysis of genetic diversity and structure to their correlation with landscape factors. Barely, 5.8% of the living species are included, concentrated in five of the 12 families of continental turtles. Geographic distance is the most frequently analyzed variable, followed by slope, mountains and fragmentation; only one study incorporated specific variables from the aquatic realm. Landscape effects are mostly determined by the dispersal capacity of species. We emphasize the need to perform studies that make use of the novel LG technologies and analytical methods, and the urgency of including many more species. This will allow to develop adequate conservation and management schemes for the numerous species facing conservation threats.

Key words. DNA, gene flow, microsatellites loci, population genetics, turtles.

La genética del paisaje la definen por primera vez Manel et al. (2003), la cual tiene como objetivo evaluar la interacción de las características del paisaje y variables ambientales con procesos microevolutivos como flujo genético, deriva génica o selección natural. Posteriormente Holderegger y Wagner (2006) y Storfer et al. (2007) acotaron e incorporaron otros elementos a la definición, tales como la necesidad de evaluar y cuantificar la composición y configuración del paisaje. Así, considerando la aportación de varios autores, la genética del paisaje (GP) se puede definir como el área de investigación que combina la genética de poblaciones y la ecología del paisaje, junto con técnicas analíticas espaciales para cuantificar de forma explícita los efectos de la composición, la configuración y la calidad de la matriz del paisaje en los procesos microevolutivos como el flujo genético, la deriva génica y la selección natural, utilizando datos genéticos neutrales o adaptativos (Balkenhol et al., 2016).

Las hipótesis que pueden abordarse desde la GP incluyen aquellas que prueban la estructura de las poblaciones e identifican barreras o corredores que limitan o facilitan el flujo genético, respectivamente; las que determinan la relación entre las variables del paisaje su dicha estructura y flujo genético; las que evalúan el flujo genético y las adaptaciones locales moldeadas por los factores del paisaje; y las que determinan patrones de genética del paisaje con base en procesos históricos y contemporáneos de flujo y diferenciación genética (Storfer et al., 2007; Garrido-Garduño & Vázquez-Domínguez, 2013; Wang et al., 2013; Rico, 2019).

Este tipo de estudios pueden realizarse mediante tres estrategias generales: 1) medir la variación y estructura genética de las poblaciones, 2) cuantificar la heterogeneidad del paisaje de modo que sea posible capturar la composición, configuración y calidad de la matriz del paisaje y 3) analizar estadísticamente la heterogeneidad del paisaje y su efecto sobre la variación y estructuración genética (Balkenhol et al., 2016). Sin embargo, los límites entre estos tres pasos no son muy claros, por lo que en esta revisión evaluamos la información y determinamos los patrones encontrados con base en la propuesta de Garrido-Garduño & Vázquez-Domínguez (2013), en la cual proponen cinco pasos que deben seguirse para llevar al cabo estudios de genética del paisaje:

1. Evaluar los patrones de variación y estructura genética
2. Evaluar los patrones de estructura genética en el espacio

3. Evaluar el flujo genético— conectividad funcional
4. Evaluar las características del paisaje— conectividad estructural
5. Correlacionar los patrones genéticos con las características del paisaje

Las tortugas terrestres y dulceacuícolas como modelo de estudio. La aparición de las tortugas como linaje se remonta a más de 200 millones de años, en el Triásico. Actualmente existen 341 especies de tortugas terrestres y dulceacuícolas, las cuales están agrupadas en dos subórdenes y 12 familias (Guillon et al., 2012; Orenstein, 2012; ITWG, 2017).

♦ Suborden Pleurodira, las tortugas de este suborden son predominantemente de agua dulce. Se limitan al Hemisferio Sur, en gran parte de Australia, Sudamérica y África, con tres familias: Chelidae, Pelomedusidae y Podocnemididae.

♦ Suborden Cryptodira, en este se agrupan la mayoría de las tortugas existentes, con nueve familias: Chelydridae, Platysternidae, Carettochelyidae (monotípica), Trionychidae, Dermatemydidae (monotípica), Kinosternidae, Emydidae, Geomydidae y Testudinidae. Sesenta y dos de estas especies se encuentran dentro de la lista de la IUCN (2020) catalogadas como vulnerables, 44 en peligro de extinción y 49 en peligro crítico de extinción.

Estos dos subórdenes contienen los taxa más amenazados de entre todos los reptiles, y las principales amenazas que enfrentan son el tráfico ilegal de fauna, la pérdida y fragmentación de hábitat, el cambio de uso de suelo, el crecimiento urbano, la depredación por animales domésticos o ferales y mortandad asociada al sistema carretero y de autopistas (van Dijk et al., 2000; Gibbs & Shriver, 2002; Stanford et al., 2020; Cortés-Rodríguez et al., 2021). La pérdida de hábitat y su fragmentación incrementa la distancia entre parches de hábitat, lo que se refleja en una disminución de la dispersión efectiva y en una baja conectividad. Así, estos fragmentos de hábitat aislados se asocian con una reducción del tamaño poblacional, un incremento de la endogamia y una mayor susceptibilidad a procesos de deriva génica (Hartl & Clark, 2007; Frankham, 1996). A pesar de estos antecedentes, en general existe poca información sobre los factores que limitan la dispersión de las tortugas dentro de paisajes fragmentados y el rol que juegan en el decremento de sus poblaciones (Gibbs, 1993), la cual es aún más escasa en nuestro país.



Por lo tanto, dado el estado de conservación de las tortugas en general, es esencial conocer cuáles son los elementos del paisaje, ya sean bióticos o abióticos, que determinan los procesos genéticos contemporáneos de sus poblaciones. Las tortugas dulceacuícolas y terrestres son un excelente modelo para estudios de genética del paisaje, ya que, se distribuyen en una gran diversidad de hábitat (ríos, lagos, desiertos, humedales, etc.) y presentan rangos de distribución contrastantes (desde microendémicas hasta de gran extensión). Asimismo, las tortugas son muy longevas, presentan tiempos generacionales amplios, filopatría y tasas de dispersión relativamente bajas (McGaugh et al., 2007). Estas características hacen que sus poblaciones experimenten los efectos del paisaje a escalas desde históricas y contemporáneas, hasta locales y regionales (Frankham et al., 2002).

El objetivo de este trabajo fue llevar a cabo una revisión exhaustiva de trabajos publicados donde se abordaran preguntas de genética del paisaje y utilizando como modelo a las tortugas de hábitat terrestre y dulceacuícola. Con base en la información recopilada describimos qué tanto se ha estudiado la relación entre el paisaje y la genética en estas especies, y compilamos los patrones generales entre variables y características específicas del paisaje y la estructura y variación genética en este linaje.

MATERIAL Y MÉTODOS

Realizamos una búsqueda exhaustiva de artículos científicos publicados utilizando cuatro buscadores: Scopus, Web of Science, Scielo y Google Scholar, y las palabras clave: "Landscape", "genetics", "turtle" y "connectivity". Se seleccionaron las publicaciones a partir del 2003, año cuando Manel et al. (2003) definen por primera vez el concepto de genética del paisaje, y hasta febrero de 2021. De la primera lista que se obtuvo se consideraron sólo los artículos que específicamente analizaran la interacción de alguna característica del paisaje (ríos, montañas, distancia, etc.) o ambiente (salinidad, temperatura, etc.) con la estructura genética o la conectividad funcional (es decir, aquella medida a partir de datos genéticos) de las poblaciones de tortugas dulceacuícolas y terrestres.

RESULTADOS

Encontramos un total de 200 artículos, de los cuales una vez depurada la lista con los criterios mencionados, obtuvimos un número final de 26 artículos (Tabla 1). Estos 26 trabajos abordan alguna

pregunta de genética del paisaje, desde el enfoque más simple en donde no se plantean hipótesis *a priori* y donde sólo se atribuye la diferenciación a ciertas características del paisaje, hasta evaluaciones complejas donde evalúan la configuración del paisaje, la contribución univariada y multivariada de los factores del paisaje, y cuya relación se analiza estadísticamente. Los artículos se publicaron en revistas herpetológicas, de conservación y de ecología molecular (Conservation Genetics, Copeia, Diversity and Distributions, Ecology and Evolution, Scientific Reports, Herpetológica, Herpetological Conservation and Biology, Journal of Heredity, Journal of Biogeography, Landscape Ecology, Evolutionary Ecology, Molecular Ecology, Frontiers of Biogeography y PLoS ONE). Cabe resaltar que todos tuvieron un enfoque de conservación.

En términos de la región donde se realizó el estudio, 18 fueron en Canadá y Estados Unidos, uno en México, cuatro en Sudamérica, mientras que África y Europa están pobremente representados con solo tres artículos. Es en 2005 que se realizan los primeros trabajos que abordan problemáticas relacionadas con la genética del paisaje, utilizando como modelo a las tortugas, mientras que 2011 y 2014 fueron los años con mayor número de publicaciones. A pesar de que la producción científica no ha tenido un aumento significativo a la fecha, los estudios han sido cada vez más completos, incluyendo hipótesis a probar, utilizando análisis más complejos y a mayor detalle. Donde sí existe un sesgo importante es en las especies estudiadas, pues los trabajos utilizaron 20 especies de cinco familias (Chelydridae, Chelidae, Emydidae, Podocnemidae y Testudinidae), y donde una especie, *Emydoidea blandingii* es más estudiada (cuatro artículos).

En general, la mayoría de los trabajos utilizan *loci* de microsatélites como marcador molecular, con base en cuatro *loci* como mínimo y máximo 20; solo dos trabajos utilizan polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs por sus siglas en inglés), dos además incorporan al estudio un marcador mitocondrial para tener un contexto histórico con el cual poder diferenciar procesos de escala temporal diferente. Únicamente un trabajo utiliza la región control como único marcador, debido su alto nivel de polimorfismo en *Podocnemis erythrocephala* y *P. sextuberculata* en particular (dos Anjos et al., 2019).

Los patrones encontrados se pueden resumir, con base en los pasos sugeridos por Garrido-Garduño y Vázquez-Domínguez (2013) para

Tabla 1
Resumen de los artículos revisados sobre estudios de genética del paisaje en tortugas dulceacuicolas y terrestres.
Marcadores: Ms. n (Mitosatélites y número de loci), mtDNA (DNA Mitocondrial), SNPs polimorfismo de nucleótido único.
Ambientes: * Dulceacuática, + semiacuática, ω terrestre.

Taxa	Región	N	Marcador	Software	Referencia
<i>Aldabrachelys gigantea</i> ω	Atolón de Aldraba	112	MtD Ms. 8	STRUCTURE, Wombsoft	Balmer et al., 2011.
<i>Emydoidea blandingii</i> +	Ontario	110	Ms. 4	BAYESASS, MIGRATE,, GENECLASS	Howes et al., 2009.
<i>Emydoidea blandingii</i> +	Wisconsin (EUA)	371	Ms. 9	GENEPOP, HP-RARE	Reid & Peery 2014.
<i>Chrysemys picta</i> *		461		lme4 R. AICcmodavg R	
<i>Chelydra serpentina</i> *		208			
<i>Chelydra serpentina</i> *	EUA	1500	Ms. 14	STRUCTURE, MRDM, Ecodist R,	Reid, et al., 2017.
<i>Emydoidea blandingii</i> +			Ms. 9	MLPE R , NLME R	
<i>Clemmys guttata</i> *	Ontario (Canadá)	97	Ms. 11	SMOGD, GENALEX (MANTEL), STRUCTURE, TESS, GENELAND, GENECLASS, BOTTLE-NECK, BDWS	Davy et al., 2014.
<i>Emydoidea blandingii</i> +	EUA y Canadá	300	Ms. 5	Arlequin (AMOVA), TFGA (MANTEL) BARRIER	Mockford et al., 2007.
<i>Emys blandingii</i> +	Ontario (Canadá)	256	Ms. 12	BAYESASS, STRUCTURE, GENECLASS, TESS, SMOGD, IBDWS (MANTEL)	Davy et al., 2014.
<i>Emys orbicularis occidentalis</i> *	África y Península Ibérica	453	Ms. 7	STRUCTURE, ADEGENET (sPCA), Arlequin (Fst), BAYESASS, ADE4 (MANTEL)	Pereira et al., 2018.
<i>Glyptemys insculpta</i> +	Canadá	331	Ms. 9	STRUCTURE, TESS, RDA R Vegan R	Bouchard et al., 2019.
<i>Glyptemys insculpta</i> +	Ontario (Canadá)	79	Ms. 5	SMOGD (MANTEL), STRUCTURE, ADE4 (PCA)	Fridgen et al., 2013.
<i>Glyptemys muhlenbergii</i> +	EUA	234	Ms. 15	BOTTLE-NECK, BAPS, STRUCTURE, ADE4 (MANTEL), Simulaciones R	Shoemaker & Gibbs 2013.
<i>Gopherus agassizii</i> ω	California	55	Ms. 24	FST, STRUCTURE	Lovich et al., 2020.
<i>Gopherus agassizii</i> ω	California (EUA)	646	SNPs 6,859	GSTUDIO R (IBD), MLPE R, ResistanciaGA R, RCM R, ecodist R	Sánchez-Ramírez et al., 2018
<i>Gopherus agassizii</i> ω	EUA	744	Ms. 20	GRASS GIS, CIRCUIT-SCAPE, VEGAN R (MANTEL, MANTEL PARCIAL)	Hagerty et al., 2011
<i>Gopherus agassizii</i> ω	California (EUA)	859	Ms. 16	GeNELAND, STRUCTURE, GENALEX (Auto-correlación), ZT software (MANTEL y MANTEL PARCIAL)	Latch et al., 2011.
<i>Gopherus polyphemus</i> ω	Mississippi (EUA)	340	Ms. 9	BOTTLENECK, STRUCTURE, MANTEL test, Análisis de regresión, Pruebas de t no pareadas	Richter et al., 2011.
<i>Malaclemys terrapin</i> +	Louisiana (EUA)	573	Ms. 13	GeNELAND, STRUCTURE, GenAIEx (Autocorrelación), Isolation by Distance Web Service (MANTEL), BOTTLE-NECK, MIGRATE	Petre et al., 2015.
<i>Malaclemys terrapin</i> +	EUA	220	Ms. 6	MANTEL, Arlequin (AMOVA), GENECLASS, BOTTLE-NECK	Hauswaldt et al., 2003.
<i>Mesoclemmys dahli</i> +	Colombia	175	SNPs 3,211	STRUCTURE, ADEGENET (DAPC), GDISTANCE (IBD, IBR), LME4 (MLPE)	Gallego-García et al., 2019.
<i>Podocnemis erythrocephala</i> *	Brasil, Colombia, Venezuela	609	Región control mtDNA	GDISTANCE R (IBD), GLMs R, AICcmodavg R	dos Anjos et al., 2019.
<i>P. sextuberculata</i> *					
<i>Podocnemis expansa</i> *	Brasil, Perú, Colombia, Venezuela	453	Ms. 9	STRUCTURE, GENEPOP, (MANTEL), BAPS, BOTTLE-NECK, BAYESASS	Pearse et al., 2006.
<i>Podocnemis unifilis</i> *	Venezuela, Colombia, Perú, Brasil	312	Ms. 9	GENETIX, PASSaGE (MANTEL), STRUCTURE, GENECLASS, BOTTLE-NECK	Escalona et al., 2009.
<i>Terrapene carolina</i> ω	EUA	886	Ms. 11	GENELAND, STRUCTURE, ML-RELATE, COANCES-TRY	Kimble et al., 2014.
<i>Terrapene carolina</i> ω	EUA	779	Ms. 11	GeNELAND, GENECLASS, STRUCTURE, Alleles in Space (MANTEL), BAYESASS, MIGRATE	Kimble et al., 2014.
<i>Terrapene coahuila</i> +	México	156	MS. 9	IBDWS (MANTEL) MIGRATE	Howeth et al., 2008.
<i>Testudo marginata</i> ω	Grecia, Italia	207	Ms. 11	GeNELAND, STRUCTURE, GENEPOP (MANTEL), BAYESASS BOTTLE-NECK, MIGRATE	Perez et al., 2012.

realizar un estudio de genética del paisaje, como sigue a continuación:

1) *Variación y estructura genética.* Los trabajos analizados presentan tamaños de muestra diferentes, que van desde 79 hasta 886 individuos por especie, lo cual está asociado con la abundancia y tamaño del área de estudio. Se conoce, por estudios de genética de poblaciones tradicional, que las tortugas presentan en general altos niveles de heterocigosidad, en promedio de 0.64 basado en *loci* de microsátelites, con un rango de 0.34-0.88 (FitzSimmons & Hart, 2007; Cortés-Rodríguez et al., 2021). En nuestra revisión encontramos que la heterocigosidad reportada tiene un intervalo un poco más amplio, de 0.209 en *Gopherus polyphemus* (Richter et al., 2011) hasta 1.0 en *Malaclemys terrapin* (Petre et al., 2015), con un promedio de 0.617.

Aunque en la mayoría de los trabajos estudiaron especies con problemas de disminución y/o alteración de hábitat, así como con disminución drástica del tamaño poblacional, el efecto esperado de pérdida de diversidad no es tan evidente en algunos de estos. Ello se explica con base en la hipótesis de que dicho efecto puede estar siendo amortiguado por la alta longevidad de estos organismos; como además tienen un importante traslape de generaciones, ello permite que las poblaciones se establezcan antes de que los efectos genéticos sean evidentes (Davy, 2013). En otros casos se sugiere que no ha pasado el suficiente tiempo para que dicho efecto pueda detectarse con los análisis realizados. Entre los trabajos que sí evidencian la pérdida de diversidad está el de FridGen et al. (2013), quienes evaluaron la diversidad genética de cuatro poblaciones de *Glyptemys insculpta* a lo largo de un paisaje fragmentado. Ellos analizaron sus datos por cohortes de edad para capturar la pérdida de la diversidad en esta especie tan longeva (más de 58 años), la cual alcanza la madurez hasta los 17 años. Los autores encontraron que las tortugas de menos de 15 años tienen niveles más bajos de heterocigosidad esperada y observada y de número de alelos, en comparación con aquellas de entre 16 a 25 y mayores de 25 años de edad.

Respecto a patrones de estructura genética, el índice más utilizado de diferenciación entre poblaciones en los estudios revisados fue *Fst* (Nei, 1973). El patrón más común es de poca o moderada estructuración, con valores de 0 (nula estructura) hasta 0.465 en *E. blandingii* quien tiene los valores extremos (Mockford et al., 2007). El resto de los estudios reportan un promedio bajo de *Fst* (0.08).

Las tortugas en general presentan poca estructuración y, sobre todo, es difícil documentarla en escalas pequeñas. Kimble et al. (2014a) exploran la estructura genética a escala fina en cuatro sitios a lo largo de la distribución de *Terrapene carolina*, que presenta diferentes grados de fragmentación y calidad del hábitat. Sus resultados sugieren que a pesar de las diferencias del ambiente y del paisaje, existe poca estructura genética en escalas espaciales de más de 30 km. Sin embargo, los patrones de estructura genética pueden evidenciarse sobre todo asociados al medio ambiente. En un trabajo realizado en el 2010 con *G. agassizii*, Hagerty y Tracy (2010) encontraron valores de *Fst* 0.009 comparando un par de localidades separadas por aproximadamente 66 km de distancia en línea recta, mientras que en otras dos localidades alejadas la misma distancia, pero, separadas por montañas, obtuvieron valores mayores (0.023). Llama la atención que *Fst* sea el índice más reportado, aunque ya existen numerosos índices para medir estructura, por ejemplo *Gst* (Hedrick, 2005), *Rst* (Slatkin, 1995) y *Dst* (Jost, 2008). Se ha demostrado que no siempre es el índice más adecuado (Kitada et al., 2017); lo cual puede también estar relacionado con los valores bajos de estructura, y que ello sea un error del estimador utilizado y no una generalidad en poblaciones de tortugas.

2) *Patrones de estructura genética en el espacio.* La distribución de la variación genética en el espacio fue analizada en 23 de los 26 artículos revisados, de estos 18 pusieron a prueba hipótesis de aislamiento por distancia (IBD por sus siglas en inglés) con base en pruebas de Mantel. Este modelo implica que la diferenciación genética (distancia genética) se incrementa a mayor distancia geográfica. El rango de distancia entre las poblaciones estudiadas con la que se probó la hipótesis de IBD varió considerablemente, desde escalas pequeñas como el estudio de Shoemaker y Gibbs (2013), quienes estudiaron siete poblaciones de *Glyptemys muhlenbergii* separadas entre 0.1 y 10 km, y otras cuatro poblaciones separadas 20, 38 y 48 km. Es decir, las distancias entre todas las poblaciones son pequeñas aún entre las más distantes entre sí. Otro ejemplo, pero con distancias mayores es el trabajo de Davy et al. (2014a) en donde los rangos de distancia entre poblaciones de *Clemmys guttata* van de 3.2 hasta 670 km. En otro ejemplo, Escalona et al. (2009) analizaron aislamiento en poblaciones de *Podocnemis unifilis* separadas de 86 hasta 7,682 km.

Como vemos, existe una gran variedad de escenarios analizados. En 14 trabajos se encontró

un patrón de aislamiento por distancia en donde la diferenciación genética aumenta con la distancia geográfica a partir de los 3.2 hasta los 7,682 km. Sin embargo, este patrón no es general y cada especie presentó ciertas particularidades. Para *Glyptemys mublenbergii* se identificó aislamiento sólo a partir de los 5 km (Shoemaker & Gibbs, 2013), mientras que en *Terrapene carolina* el aislamiento se detectó hasta los 300 o 500 km (Kimble et al., 2014b). Ello puede estar relacionado con la capacidad de dispersión de las especies, pues *G. mublenbergii* puede moverse 2.7 km mientras que *T. carolina* más de 10 km.

También se reportan casos donde no se detectó aislamiento, por ejemplo Richter et al. (2011), Latch et al. (2011) y Kimble et al. (2014a), quienes estudiaron tortugas de desierto, lo cual sugiere que en este hábitat pudieran ser otros los factores que influyen en la estructura genética.

Existen otras formas de analizar los patrones de estructuración en el espacio, por ejemplo, los análisis de autocorrelación espacial, que cuantifican y dividen el espacio en rangos de distancia. La autocorrelación espacial positiva en un contexto genético-espacial implica que los genotipos de un individuo en una localidad no son independientes de los genotipos de un individuo de una localidad cercana (Manel et al., 2003). Este análisis puede ayudar a complementar e inferir otros patrones además del de IBD. Latch et al. (2011) estudiaron a *Gopherus agassizii* en una escala fina (área de estudio pequeña de 97 km²) y aunque no encontraron IBD (con Mantel), detectaron autocorrelación positiva en intervalos de distancia pequeños. Una forma complementaria de medir estructura es por medio de la identificación de discontinuidades genéticas entre poblaciones, con programas como Geneland (Guillot et al., 2005) y Barrier (Manni et al., 2004). Mockford et al. (2007) evaluaron la variación y la distribución de la diversidad a lo largo de toda la distribución en Norteamérica (Nueva Escocia, Nueva York, Massachusetts, Ontario, Minesota e Illinois) de *Emydoidea blandingii*, e identificaron aislamiento por distancia y barreras al flujo génico, las cuales coinciden con los montes Apalaches y el Río Hudson.

Finalmente, también se pueden detectar discontinuidades genéticas identificando barreras a partir de variables continuas y localidades geográficas, tomando en cuenta la dispersión promedio de la especie de estudio, con programas como Wombsoft (Crida & Mannel, 2007). Balmer et al. (2011) analizaron los patrones de variación genética de las tortugas gigantes de Aldabra, en

el Atolón de Aldraba en el Océano Índico, entre tres poblaciones separadas 45 km por barreras de agua, paisaje y elementos ecológicos. Los autores encontraron dos regiones de discontinuidad asociadas con ciertas barreras geográficas dentro de la isla, incluyendo zonas costeras rocosas, así como con diferencias ecológicas como manchones de matorrales cerrados que impiden el movimiento de los individuos.

3) *Flujo genético (conectividad funcional)*. El flujo génico hace referencia a la migración, es decir, el número de individuos que se mueven y reproducen en una población diferente a la de nacimiento, el cual refleja procesos microevolutivos y de estructura genética entre las poblaciones (Hedrick, 2005). En siete artículos se abordaron temas de flujo génico, sin embargo, sólo en cuatro se enfocan específicamente en el flujo génico reciente.

Pérez et al. (2012) analizaron seis poblaciones de *Testudo marginata* en Grecia, una de las cuales es un morfotipo enano, además de una población de Italia (localidad de Sardinia); esta última población fue introducida a principios del Siglo XIX y se encuentra alejada del resto aproximadamente a 750 km. Los autores identificaron tres grupos genéticos (entre los cuales existe bajo flujo génico). Un grupo está formado por el morfotipo enano en Grecia, que está aislado y tiene nulo flujo génico, el cual está asociado con características del paisaje y cambio de uso de suelo, así como a la baja capacidad de dispersión de esta especie. El grupo de Cerdeña en Italia es el único con flujo génico de hasta de un 27% con una localidad en Grecia; los autores determinan que ello es resultado de la translocación de individuos desde su área de origen, dado que sería imposible que las tortugas se hubieran trasladado nadando de un sitio al otro.

Otro ejemplo es *Terrapene carolina*, especie que tiene una amplia capacidad de dispersión (10 km). Kimble et al. (2014b) analizaron sus patrones de flujo génico y encontraron que presenta flujo histórico alto y flujo contemporáneo nulo entre ambos lados de los montes Apalaches que dividen su área de distribución. Ello es clara señal de la reciente reducción en la conectividad entre poblaciones, asociada a su vez a la pérdida del hábitat, lo cual ha incrementado la distancia entre los parches de hábitat dentro de la matriz del paisaje. Asimismo, Howes et al. (2009) estimaron conectividad bidireccional entre tres poblaciones de *Emydoidea blandingii*, que tiene una capacidad aún mayor de dispersión (15 km) y determinaron que los corredores de hábitat dentro del paisaje son lo más importante para mantener la conectividad

entre sus poblaciones. Los autores encontraron disminución entre dos de las poblaciones, mientras que entre otro par de poblaciones hubo un incremento del flujo génico, posiblemente asociado con impactos antropogénicos asociados con un aumento en la densidad de carreteras. En otro estudio con *Emys blandingii* en Ontario se encontró bajo flujo génico (promedio = 0.036) a pesar de que su capacidad de dispersión es de 10 km (Davy et al., 2014b).

La fragmentación del hábitat, el cambio en la calidad de este y el aumento de actividades antropogénicas son un común denominador en los ambientes en donde se evaluó el flujo génico. También se observa que, aunque se detecten tasas de dispersión variables, el flujo génico se ha perdido en comparación al del pasado y/o que actualmente es bajo.

4) *Evaluación de las características del paisaje (conectividad estructural)*. La conectividad estructural hace referencia a la estructura del paisaje, por ejemplo, composición y calidad de la matriz (parches) del hábitat, continuidad del hábitat y presencia de barreras. Para evaluar la conectividad estructural se construyen mapas de resistencia, en los cuales se asignan valores de resistencia a cada elemento del paisaje (valores determinados con base en las características y la biología de la especie de estudio) para evaluar el grado en que el paisaje facilita o limita el movimiento de los individuos en un área determinada (Garrido-Garduño & Vázquez-Domínguez, 2013).

De los trabajos revisados, únicamente Hagerty et al. (2011) llevaron a cabo una evaluación como tal de la conectividad estructural. Los autores utilizaron dos métodos de evaluación del paisaje, el camino de menor costo o *Least-cost-path* (Adriensen et al., 2003) y aislamiento por resistencia con Circuitscape (McRae, 2006; Shah & McRae, 2008), con base en los cuales evaluaron las hipótesis que explicarían el aislamiento de las poblaciones de *Gopherus agassizii* en Utah, Arizona, Nevada y California (EUA). Los autores investigaron tres factores que podrían afectar la conectividad: distancia geográfica, barreras a la dispersión y resistencia de los factores del paisaje. Las variables utilizadas para el modelo incluyeron topografía, vegetación, suelo y clima. Con ambos métodos se encontraron barreras y corredores similares, donde cordilleras y valles de menos elevación funcionan como barreras al flujo génico. Existen otros trabajos (Reid et al., 2017; Sánchez-Ramírez et al., 2018; Bouchard et al., 2019; dos Anjos et al., 2019; Gallego-García et al., 2019) que

hacen referencia a la calidad del paisaje y presencia de barreras, como distancia topográfica, calidad del hábitat, elevación, clima, inclinación, tipo de suelo, tipo de cuerpo de agua, posición relativa a las carreteras y líneas eléctricas, entre otros. Sin embargo, únicamente generaron matrices con valores para cada variable sin hacer una evaluación basada en modelos como *Least-cost-path*, aislamiento por resistencia u otro.

5) *Correlación de los patrones genéticos con las características del paisaje*. En sentido estricto, la genética del paisaje evalúa la correlación entre los patrones genéticos y las características del paisaje, así que los pasos anteriores son necesarios para llevar a cabo cabalmente dicha evaluación.

Sólo nueve trabajos hicieron dicha evaluación mediante un método específico, por ejemplo, a través de pruebas de Mantel, Mantel parcial, regresiones logísticas y lineales para evaluar las correlaciones entre variables y genética. De estos, cuatro utilizaron como modelo tortugas de desierto del género *Gopherus*, en áreas de estudio desde pequeñas hasta aquellas que abarcaron varios estados de Norteamérica. Para *G. agassizii*, la estructura genética de sus poblaciones parece estar influenciada a nivel local por las características particulares de cada sitio, que a su vez se relacionan con patrones de conectividad en escalas más amplias (Latch et al., 2011). Esto puede explicarse con dos estudios realizados con esta especie a dos escalas contrastantes. En el primero, Hagerty et al. (2011) trabajaron un área de gran escala (160,000 km²) en su trabajo de genética del paisaje de *G. agassizii* y evaluaron diferentes hipótesis (distancia geográfica, barreras de dispersión y valores de fricción del paisaje) para explicar el aislamiento de las poblaciones. Es notable que encontraron patrones distintos: con el método de *Least-cost path* detectaron una relación entre la estructura genética y la combinación de la distancia geográfica y ciertas barreras, sugiriendo que las montañas y valles de baja elevación determinan la conectividad, a pesar de la alta capacidad de dispersión de los individuos (más de 30 km). Sin embargo, con Circuitscape la distancia geográfica fue la única variable que definieron como distancia de resistencia. Los autores atribuyen los resultados a las dos maneras en que cuantifican la fricción los métodos que usaron. En el caso de *G. agassizii*, Sánchez-Ramírez et al. (2018) evaluaron la influencia de las características del paisaje en la estructura, y encontraron que la elevación, la precipitación media y la idoneidad del hábitat fueron los factores determinantes de la conectividad entre sus poblaciones.

Latch et al. (2011) evaluaron el flujo génico a una escala fina (área de muestreo de 97 km²) y las potenciales barreras en *G. agassizii*. Caracterizaron el grado en que las variables del paisaje, tales como elevación, pendiente, carreteras, discontinuidades de hábitat y líneas de energía eléctrica podían explicar el flujo génico. Aunque los autores encontraron estructura genética débil, identificaron dos poblaciones estructuradas dentro del área de estudio. Se identificaron variables naturales del paisaje (pendiente) y antropogénicas (carreteras) que han influido significativamente en el flujo génico de esa población local. En contraste, Richter et al. (2011) estudiaron a *G. polyphemus* en un área de 560 km² donde existen “colonias” de tortugas distribuidas a lo largo del paisaje. Analizaron si el tipo de uso de suelo, la calidad de hábitat y el tamaño poblacional eran factores que afectan la variación genética. Sin embargo, no encontraron ninguna relación significativa.

En hábitats acuáticos y semiacuáticos no se encontró asociación entre la diversidad genética de *Emydoidea blandingii* (semiacuática), *Chrysemys picta* (acuática) y *Chelydra serpentina* (acuática) con la variable ambiental de interés, el cambio en la temperatura ambiental (Reid & Peery 2014). Sin embargo, identificaron que la densidad de los caminos y la intensidad de uso de suelo sí afecta la diversidad genética y la proporción de sexos de esta especie. Estas diferencias pueden estar asociadas con los hábitos semiacuáticos de la especie y a los tamaños poblacionales pequeños.

Trabajos recientes con metodologías más actualizadas para determinar la asociación entre paisaje y genética encontraron una gran diversidad de variables ambientales de interés. Reid et al. (2017) encontraron que las variables que explican la estructura genética en *Chrysemys picta* son la distancia, la pendiente, la presencia de humedales y de pastos, en *C. serpentina* fueron la distancia y el agua mientras que para *E. blandingii* resaltan las tierras de cultivo combinadas con la distancia. En cuanto a *Mesoclemmys dabli* el tipo de cobertura vegetal fue el factor determinante (Gallego-García et al., 2019). La distancia al centro urbano más cercano y el coeficiente de variación del caudal del río se asocian con la conectividad en *Podocnemis erythrocephala*, para *P. sextuberculata* fueron la productividad del río y la distancia a la desembocadura (dos Anjos et al., 2019), mientras que finalmente para *Glyptemys insculpta* fue el aislamiento por cuenca (Bouchard et al., 2019). Considerando los patrones que encontraron en estos trabajos, vemos la riqueza de características bióticas y abióticas que desempeñan un papel

esencial en el flujo y la estructura genética en las poblaciones de tortugas, más allá de la distancia geográfica.

DISCUSIÓN

Con nuestra revisión mostramos que, en términos de la investigación sobre genética del paisaje, las tortugas de América del Norte son las que han recibido la mayor atención hasta la fecha (18 trabajos o 69%). Hay varias razones para este resultado: de las 341 tortugas dulceacuícolas y terrestres reconocidas actualmente, EUA encabeza la lista de los 25 países con mayor riqueza, con 62 especies, seguido de México con 49. En contraste, en esta lista se encuentran varios países de Centro y Sudamérica, Asia y África, los cuales sin embargo cuentan con pocas o nulas investigaciones (TTWG, 2017). También podemos considerar el hecho de que un alto porcentaje de las tortugas continentales presentan problemas críticos de conservación y las que habitan en Norteamérica no son excepción, esto sumado a que países como EUA y Canadá cuentan con una alta disponibilidad de recursos económicos para la investigación.

Cabe resaltar que encontramos pocos trabajos que abordaran preguntas de genética del paisaje, sólo 26 (11%) de 200 trabajos obtenidos en la búsqueda general, es decir, aquellos que como mínimo correlacionaran la distancia geográfica con la distribución de la variación y estructura genética. Estos trabajos se realizaron apenas con el 5.8% de las especies vivientes y están concentrados en cinco de las 12 familias de tortugas continentales. En sentido estricto, únicamente nueve trabajos (34%) llevaron a cabo una evaluación de genética del paisaje, desde el análisis de la diversidad y estructura genética hasta su correlación con factores del paisaje (Garrido-Garduño & Vázquez-Domínguez, 2013). Las preguntas que más se abordan son sobre el flujo y estructura genética de las poblaciones, siendo incipientes los trabajos que estudian aspectos de adaptación local.

Aunque la genética del paisaje es un área relativamente reciente, los métodos y formas de análisis que emplea han evolucionado rápidamente. En los primeros trabajos, las hipótesis planteadas apenas sugieren la asociación entre los procesos genéticos y el paisaje; mientras que en años más recientes se formulan hipótesis complejas *a priori*, que posteriormente se ponen a prueba con diversos métodos. Sin embargo, esta evolución no se aprecia del todo en los estudios de genética del paisaje con tortugas de nuestra revisión. La



mayoría de los trabajos usaron pruebas de Mantel y Mantel parcial, método que ha sido criticado si se utiliza como base de las conclusiones de genética del paisaje (Guillot & Rousset, 2013). Los trabajos más recientes sí emplean otros métodos, como modelos lineales generalizados (GLM), modelos de efectos mixtos (MLPE), modelado de disimilitud generalizada (GDM) y simulaciones en R.

Durante los primeros años los trabajos revisados utilizaron *loci* de microsatélites como marcador, aunque ya en los últimos se analizan SNPs, los cuales permiten detectar estructura poblacional a un nivel y escalas más finas, además de ser una herramienta clave para estudios sobre selección natural y adaptación local. En general, la distancia geográfica es la variable más analizada, seguida de la pendiente, montañas y hábitats fragmentados. Asimismo, los trabajos que usan como modelo tortugas estrictamente acuáticas evalúan en su mayoría variables del paisaje terrestre que rodea a este ecosistema; sólo un trabajo incorporó variables específicas del medio acuático (dos Anjos et al., 2019). Ello puede deberse a la falta del desarrollo de herramientas metodológicas y analíticas para poder evaluar aspectos del paisaje en ambientes acuáticos. Riginos et al. (2013), Selkoe et al. (2016) y Davis et al. (2018) sugieren la necesidad de desarrollar métodos analíticos específicos para los ambientes acuáticos que se adapten a sus características particulares. Mencionan además que será difícil que los métodos de genética del paisaje puedan transferirse a estos ambientes, debido a las limitaciones ejercidas por la estructura física ramificada de los ecosistemas fluviales, los cuales forman vías restringidas para la dispersión. El movimiento direccional del agua y la baja disponibilidad de datos espaciales continuos para estos cuerpos de agua son otra complicación para considerar.

Algunas de las variables que se han trabajado y tratado de cuantificar en los estudios de genética del paisaje de ambientes acuáticos, con diversos organismos, incluyen la influencia de los rasgos físicos y bióticos como hidrogeomorfología, flujo de corriente, gradientes de salinidad y temperatura, pendiente de ríos y su escala tributaria (Davis et al., 2018). Hay que considerar además los hábitats dulceacuícolas y de desierto, donde las barreras

geográficas y ambientales no son tan evidentes. En la revisión encontramos que varios trabajos incorporaron análisis a nivel individual, de parentesco y de división por cohortes de edad, con base en lo cual pudieron detectar cambios genéticos asociados al paisaje. Nosotros sugerimos además que deben contemplar información que combine la capacidad de dispersión de los individuos, el tamaño del área de distribución, la distancia geográfica y factores de historia de vida como longevidad y tiempo generacional, los que están estructurando a las poblaciones.

CONCLUSIONES

Para el caso de tortugas dulceacuícolas y terrestres, los cambios recientes del paisaje afectan el flujo génico a diferentes escalas, determinado mayormente por su capacidad de dispersión. Se muestra que sí puede detectarse la conectividad estructural y la conectividad funcional en estas especies, contrario a lo que se pensaba en organismos tan longevos. Landguth et al. (2010) cuantificaron el tiempo en el cual pueden detectarse barreras del paisaje y encontraron que va desde una sola generación cuando se usan análisis basados a nivel individual.

Con base en la compilación de información que realizamos, es evidente la necesidad de realizar trabajos de genética del paisaje de tortugas terrestres y dulceacuícolas que saquen provecho de las nuevas tecnologías, métodos analíticos y enorme variedad de programas de software, para poder explorar hipótesis multivariadas a través de diferentes escalas espaciales y temporales, y que puedan ponerse a prueba con estadística robusta. Ello permitiría determinar la relación entre diversidad, estructuración y flujo génico y la capacidad de dispersión, tipo de hábitat, escala geográfica y elementos del paisaje. Estudios de este tipo servirían además como modelo para otras especies con tiempos generacionales largos. Finalmente, es clave reconocer que es urgente realizar estudios de genética del paisaje de tortugas terrestres y dulceacuícolas, que incluyan una mayor diversidad de especies, con base en los cuales puedan diseñarse esquemas adecuados de manejo y conservación de las numerosas especies en categorías de conservación.

LITERATURA CITADA

- Adriensen, F., J.P. Chardon, G. De Blust, E. Swinnen, S. Villalba, H. Gulink & E. Matthysen. 2003. The application of "least-cost" modeling as a functional landscape model. *Landscape and Urban Planning* 64:233-247.
- Balkenhol, N., S.A. Cushman, A. Storfer & L.P. Waits. 2016. Introduction to Landscape Genetics—Concepts, Methods, Applications. Pp. 1-8. En N. Balkenhol, S.A. Cushman, A. Storfer & L.P. Waits (Eds.). *Landscape Genetics: Concepts, Methods, Applications*. Wiley-Blackwell, Hoboken, New Jersey, USA.
- Balmer, O., C. Ciofi, D.A. Galbraith, I.R. Swingland, G.R. Zug & A. Caccone. 2011. Population genetic structure of Aldabra giant tortoises. *Journal of Heredity* 102:29-37.
- Bouchard, C., Tessier, N., & F.J. Lapointe. 2019. Watersheds influence the wood turtle's (*Glyptemys insculpta*) genetic structure. *Conservation Genetics* 20:653-664.
- Cortés-Rodríguez, X., G. Borja-Martínez & E. Vázquez-Domínguez. 2021. Striking habitat reduction, decreased genetic diversity, and imperiled conservation of natural populations of *Terrapene coahuila*. *Freshwater Biology* 66:842-858.
- Crida, A. & S. Manel. 2007. Wombsoft: a R package that implements the Wombling method to identify genetic boundary. *Molecular Ecology Notes* 7:588-591.
- Davis, C.D., C.W. Epps, R.L. Flitcroft & M.A. Banks. 2018. Refining and defining riverscape genetics: How rivers influence population genetic structure. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Water* 5:e1269.
- Davy, C.M. & R.W. Murphy. 2014a. Conservation genetics of the endangered Spotted Turtle (*Clemmys guttata*) illustrate the risks of "bottleneck tests". *Canadian Journal of Zoology* 92:149-162.
- Davy, C. M., P.H. Bernardo & R.W. Murphy. 2014b. A Bayesian approach to conservation genetics of Blanding's turtle (*Emys blandingii*) in Ontario, Canada. *Conservation Genetics* 15:319-330.
- Davy, C.M. 2013. Conservation genetics of freshwater turtles. PhD Dissertation. University of Toronto. Toronto, Canadá.
- dos Anjos Oliveira, J., I.P. Farias, G.C. Costa & F.P. Werneck. 2019. Model-based riverscape genetics: disentangling the roles of local and connectivity factors in shaping spatial genetic patterns of two Amazonian turtles with different dispersal abilities. *Evolutionary Ecology* 33:273-298.
- Escalona, T., T.N. Engstrom, O.E. Hernandez, B.C. Bock, R.C. Vogt & N. Valenzuela. 2009. Population genetics of the endangered South American freshwater turtle, *Podocnemis unifilis*, inferred from microsatellite DNA data. *Conservation Genetics* 10:1683-1696.
- FitzSimmons, N.N. & K.M. Hart. 2007. Genetic studies of freshwater turtle and tortoises: a review of the past 70 years. *Chelonian Research Monographs* 4:15-46.
- Frankham, R. 1996. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology* 10:1500-1508.
- Frankham, R., J.D. Ballou & D.A. Briscoe. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

- Fridgen, C., L. Finnegan, C. Reaume, J. Cepek, J. Trottier & P.J. Wilson. 2013. Conservation genetics of wood turtle (*Glyptemys insculpta*) populations in Ontario, Canada. *Herpetological Conservation and Biology* 8:351-358.
- Gallego-García, N., G. Forero-Medina, M. Vargas-Ramírez, S. Caballero & H.B. Shaffer. 2019. Landscape genomic signatures indicate reduced gene flow and forest-associated adaptive divergence in an endangered neotropical turtle. *Molecular Ecology* 28:2757-2771.
- Garrido-Garduño, T. & E. Vázquez-Domínguez. 2013. Métodos de análisis genéticos, espaciales y de conectividad en genética del paisaje. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84:1031-1054.
- Gibbs, J.P. 1993. Importance of small wetlands for the persistence of local populations of wetland-associated animals. *Wetlands* 13:25-31.
- Gibbs, J.P. & W.G. Shriver. 2002. Estimating the effects of road mortality on turtle populations. *Conservation Biology* 16:1647-1652.
- Guillon, J.M., L. Guéry, V. Hulin & M. Girondot. 2012. A large phylogeny of turtles (Testudines) using molecular data. *Contributions to Zoology* 81:147-158.
- Guillot, G. & F. Rousset. 2013. Dismantling the Mantel tests. *Methods in Ecology and Evolution* 4:336-344.
- Guillot, G., F. Mortier & A. Estoup. 2005. GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes* 5:708-701.
- Hagerty, B.E. & C.R. Tracy. 2010. Defining population structure for the Mojave Desert tortoise. *Conservation Genetics* 11:1795-1807.
- Hagerty, B.E., K.E. Nussear, T.C. Esque & C.R. Tracy. 2011. Making molehills out of mountains: landscape genetics of the Mojave Desert tortoise. *Landscape Ecology* 26:267-280.
- Hartl, D.L., & A.G. Clark. 2007. *Principles of Population Genetics*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Hauswaldt, J.S. & T.C. Glenn. 2003. Microsatellite DNA *loci* from the Diamondback terrapin (*Malaclemys terrapin*). *Molecular Ecology Notes* 3:174-176.
- Hedrick P.W. 2005. A standardized genetic differentiation measure. *Evolution* 59:1633-1638.
- Hedrick, P.W. 2005. *Genetics of populations*, 2nd edition. Jones and Bartlett, Sudbury, Massachusetts, USA.
- Holderegger, R. & H. Wagner. 2006. A brief guide to landscape genetics. *Landscape Ecology* 21:793-796.
- Howes, B.J., J.W. Brown, H.L. Gibbs, T.B. Herman, S.W. Mockford, K.A. Prior & P.J. Weatherhead. 2009. Directional gene flow patterns in disjunct populations of the black ratsnake (*Pantheropsis obsoletus*) and the Blanding's turtle (*Emydoidea blandingii*). *Conservation Genetics* 10:407-417.
- Howeth, J.G., S.E. McGaugh & D.A. Hendrickson. 2008. Contrasting demographic and genetic estimates of dispersal in the endangered Coahuilan box turtle: a contemporary approach to conservation. *Molecular Ecology* 17:4209-4221.

IUCN. 2020. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2020-3. <https://www.iucnredlist.org>. [Consultado en febrero 2021].

Jost, L. 2008. GST and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology* 17:4015-4026.

Kitada, S., R. Nakamichi & H. Kishino. 2017. The empirical Bayes estimators of fine-scale population structure in high gene flow species. *Molecular Ecology Resources* 17:1210-1222.

Kimble, S.J., O.E. Jr Rhodes & R.N. Williams. 2014a. Relatedness and other fine scale population genetic analyses in the threatened eastern box turtle (*Terrapene c. carolina*) suggest unexpectedly high vagility with important conservation implications. *Conservation Genetics* 15:967-979.

Kimble, S.J., O.E. Rhodes Jr, & R.N. Williams. 2014b. Unexpectedly low range wide population genetic structure of the imperiled eastern box turtle *Terrapene c. carolina*. *PLoS One* 9:e92274.

Landguth, E.L., S.A. Cushman, M.K. Schwartz, K.S. McKelvey, M. Murphy & G. Luikart. 2010. Quantifying the lag time to detect barriers in landscape genetics. *Molecular Ecology* 19:4179-4191.

Latch, E.K., W.I. Boarman, A. Walde & R.C. Fleischer. 2011. Fine-scale analysis reveals cryptic landscape genetic structure in desert tortoises. *PLoS One* 6:e27794.

Manel, S., M.K. Schwartz, G. Luikart & P. Taberlet. 2003. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution* 18:189-197.

Manni, F., E. Guérard & E. Heyer. 2004. Geographic patterns of (Genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. *Human Biology* 76:173-190.

McCaugh, S.E., E.A. Alacs, S.V. Edwards, C.R. Feldman, A. Georges, J.W. Sites & N. Valenzuela. 2007. Pp. 8-12. En H.B. Shaffer, N.N. FitzSimmons & A. Rhodin. (Eds). From molecules to organisms: research applications of modern genetic tools for turtle biology and conservation. In *Advances in Turtle Genetics and Systematics. Proceedings of a Workshop on Genetics, Ethics, and Taxonomy of Freshwater Turtles and Tortoises*. Cambridge, Massachusetts, USA. McRae, B.H. 2006. Isolation by resistance. *Evolution* 60:1551-1561.

Mockford, S.W., T.B. Herman, M. Snyder & J.M. Wright 2007. Conservation genetics of Blanding's turtle and its application in the identification of evolutionarily significant units. *Conservation Genetics* 8:209-219.

Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 70:3321-3323.

Orenstein, R.I. 2012. *Turtles, tortoises and terrapins: a natural history*. Firefly Books. Richmond Hill, Ontario, Canada.

Pearse, D.E., A.D. Arndt, N. Valenzuela, B.A. Miller, V. Cantarelli & J.W. Sites. 2006. Estimating population structure under nonequilibrium conditions in a conservation context: continent-wide population genetics of the giant Amazon River turtle, *Podocnemis expansa* (Chelonia; Podocnemididae). *Molecular Ecology* 15:985-1006.

Perez, M., R. Leblois, B. Livoreil, R. Bour, J. Lambourdiere, S. Samadi, & M.C. Boisselier. 2012. Effects of landscape features and demographic history on the genetic structure of *Testudo marginata* populations in the southern Peloponnese and Sardinia. *Biological Journal of the Linnean Society* 105:591-606.



Petre, C., W. Selman, B. Kreiser, S.H. Pearson & J.J. Wiebe. 2015. Population genetics of the diamondback terrapin, *Malaclemys terrapin*, in Louisiana. *Conservation Genetics* 16:1243-1252.

Reid, B.N. & M.Z. Peery. 2014. Land use patterns skew sex ratios, decrease genetic diversity and trump the effects of recent climate change in an endangered turtle. *Diversity and Distributions* 20:1425-1437.

Reid, B.N., D.J. Mladenoff & M.Z. Peery. 2017. Genetic effects of landscape, habitat preference and demography on three co-occurring turtle species. *Molecular Ecology* 26:781-798.

TTWG (Turtle Taxonomy Working Group, Rhodin, A.G., J.B. Iverson, R. Bour, U. Fritz, A. Georges, H.B. Shaffer & P.P. van Dijk). 2017. *Turtles of the World: Annotated Checklist and Atlas of Taxonomy, Synonymy, Distribution, and Conservation Status*. Chelonian Research Monographs 7:1-292.

Richter, S.C., J.A. Jackson, M. Hinderliter, D. Epperson, C.W. Theodorakis & S.M. Adams. 2011. Conservation genetics of the largest cluster of federally threatened gopher tortoise (*Gopherus polyphemus*) colonies with implications for species management. *Herpetologica* 67: 406-419.

Rico, Y. 2019. Landscape genetics of Mexican biodiversity: a review. *Acta Universitaria* 29: e1894.

Riginos, C. & L. Liggins. 2013. Seascape genetics: populations, individuals, and genes marooned and adrift. *Geography Compass* 7:197-216.

Sánchez-Ramírez, S., Y. Rico, K.H. Berry, T. Edwards, A.E. Karl, B.T. Henen & R.W. Murphy. 2018. Landscape limits gene flow and drives population structure in Agassiz's desert tortoise (*Gopherus agassizii*). *Scientific Reports* 8:1-17.

Selkoe, K.A., C.C. Aloia, E.D. Crandall, M. Iacchi, L. Liggins, J.B. Puritz & R.J. Toonen. 2016. A decade of seascape genetics: contributions to basic and applied marine connectivity. *Marine Ecology Progress Series* 554:1-19.

Shah, V.B. & B.H. McRae. 2008. Circuitscape: a tool for landscape ecology. Pp. 62-66. En G. Varoquaux, T. Vaught & J. Millman (Eds.). *Proceedings of the 7th Python in Science Conference*. Pasadena, California, USA.

Shoemaker, K.T. & J.P. Gibbs. 2013. Genetic connectivity among populations of the threatened Bog Turtle (*Glyptemys mublenbergii*) and the need for a regional approach to turtle conservation. *Copeia* 2013:324-331.

Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139:457- 463.

Stanford, C.B., J.B. Iverson, A.G. Rhodin, P.P. van Dijk, R.A. Mittermeier, G. Kuchling, K.H. Berry, A. Bertolero, K.A. Bjorndal, T.E.G. Blanck, K.A. Buhlmann, R.L. Burke, J.D. Congdon, T. Diagne, T. Edwards, C.C. Eisemberg, J.R. Ennen, G. Forero-Medina, M. Frankel, U. Fritz, N. Gallego-García, A. Georges, J.W. Gibbons, S. Gong, E.V. Goode, H.T. Shi, H. Hoang, M.D. Hofmeyr, B.D. Horne, R. Hudson, J.O. Juvik, R.A. Kiestler, P. Koval, M. Le, P.V. Lindeman, J.E. Lovich, L. Luiselli, T.E.M. McCormack, G.A. Meyer, V.P. Páez, K. Platt, S.G. Platt, P.C.H. Pritchard, H.R. Quinn, W.M. Roosenburg, J.A. Seminoff, H.B. Shaffer, R. Spencer, J.U. Van Dyke, R.C. Vogt & A.D. Walde. 2020. Turtles and tortoises are in trouble. *Current Biology* 30:R721-R735.

Storfer, A., M.A. Murphy, J.S. Evans, C.S. Goldberg, S. Robinson, S.F. Spear, R. Dezzani, E. Delmelle, L. Vierling & L.P. Waits. 2007. Putting the landscape in landscape genetics. *Heredity* 98:129-142.

van Dijk, P.P., B.I. Stuart & A.G. Rhodin. 2000. Asian Turtle Trade: Proceedings of a Workshop on Conservation and Trade of Freshwater Turtles and Tortoises in Asia. Chelonian Research Monographs 2:1-164.

Wang, I.J., R.R. Glor & J.B. Losos. 2013. Quantifying the roles of ecology and geography in spatial genetic divergence. Ecology Letters 16:175-182.

CAPÍTULO 2

**“Striking habitat reduction,
decreased genetic diversity, and
imperilled conservation of natural
populations of *Terrapene coahuila*”**

Xochiquetzal Cortés-Rodríguez, Gabriela Borja-Martínez y Ella
Vázquez-Domínguez

Striking habitat reduction, decreased genetic diversity, and imperilled conservation of natural populations of *Terrapene coahuila*

Xochiquetzal Cortés-Rodríguez^{1,2} | Gabriela Borja-Martínez¹ | Ella Vázquez-Domínguez¹ 

¹Departamento de Ecología de la Biodiversidad, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, México

²Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

Correspondence

Ella Vázquez-Domínguez, Departamento de Ecología de la Biodiversidad, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México 04510, México.
Email: evazquez@ecologia.unam.mx

Funding information

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

Abstract

1. Long-term evolutionary history and demographic processes shape current patterns of genetic variation in natural populations. Genetic diversity is of prime importance for the long-term survival of species, especially those threatened or endangered, which can be lost in a few generations and can take hundreds to recover. Notably, turtles are among the most endangered vertebrate taxa in the world. The Coahuilan box turtle *Terrapene coahuila* is the only aquatic species within the genus, microendemic to the desert-spring ecosystem of the Cuatrociénegas Basin (CCB). The CCB has experienced significant habitat changes during recent decades, fragmenting otherwise interconnected wetlands systems. We aimed to perform a detailed evaluation of the evolutionary and genetic patterns of *T. coahuila*, both historical and contemporary, linked to the biogeography of the CCB and processes governing the species distribution.
2. We assessed the contributions of historical and contemporary population demographic processes to genetic diversity and structure, by using two mitochondrial DNA genes (cytochrome *b* and d-loop), one nuclear gene (*GAPD*), and 12 nuclear microsatellite loci. We comprehensively analysed these data to address historical patterns of demography, migration, genetic diversity, and times of divergence across the valley for *T. coahuila*. We also evaluated recent patterns of genetic variation and structure, inbreeding, bottleneck signals, and effective population size.
3. Our results dated the time to the most recent common ancestor for *T. coahuila* in the CCB at c. 10.1 million years ago, with highest diversification during the Holocene. Structure consistently comprised two genetic clusters, Cuatrociénegas East and Cuatrociénegas West on either side of the main historical barrier, the Sierra San Marcos. Demographic results supported a divergence between western and eastern populations from 47,500 to 110,950 years ago, and colonisation of the southernmost Cuatrociénegas West distribution (Churince) 28,500–66,500 years ago, which experienced a recent bottleneck. All populations showed low values of haplotype and nuclear genetic diversity, migration, effective population size, and relatedness; significant inbreeding and bottleneck signals were also identified within genetic clusters.

4. In accordance with the biogeographic history of the basin, our results show that *T. coahuila*'s diversification across the Cuatrociénegas valley continued throughout the Pleistocene, peaking during the Holocene, when the valley started to gradually dry. As predicted, *T. coahuila* exhibited an overall, long-term, and probably continuing decrement in genetic variation, increased genetic differentiation, and low population sizes, as a consequence of contemporary habitat loss and fragmentation across the CCB.
5. Changes in species demography and population connectivity have the potential to permanently alter the genetic patterns of freshwater species. Hence, given its restricted distribution, high habitat specificity and habitat loss, *Terrapene coahuila* is at utmost risk of extinction. Captive breeding programmes of the Coahuilan box turtle should consider our results, to prevent further loss of genetic diversity and truly expect reintroduction success. Also, it is crucial to restore connectivity among wetlands, for the conservation of species and the Cuatrociénegas valley altogether.

KEYWORDS

Coahuilan box turtle, Cuatrociénegas valley, endangered species, freshwater turtle, microendemic

1 | INTRODUCTION

Long-term evolutionary history and demographic processes of a species, together with its geographic distribution, life-history characteristics, and habitat constraints, significantly shape the genetic patterns of current populations (Avice, 2000). Genetic diversity is important for the long-term survival of species, more significantly so for populations and species that are threatened or endangered (Allendorf et al., 2013; Mimura et al., 2017). Ominously, genetic variation can be lost in a few generations, but it can take hundreds to recover (Frankham, 1995; Nei et al., 1975). Endemic animal species, particularly those with naturally restricted distributions, are highly susceptible to environmental change (Espindola et al., 2014; Lande, 1993). In addition, endemic species and those with small geographic range that have low dispersal abilities, frequently exhibit small population sizes and limited connectivity. Consequently, they may face stochastic genetic processes such as drift and inbreeding, and their populations may show low levels of genetic variability and be highly structured (Allendorf et al., 2013; Argentina et al., 2018; Sunny et al., 2014).

Turtles are among the most endangered vertebrate taxa in the world (Böhm et al., 2013; Standford et al., 2020). Their main threats include habitat loss and fragmentation, pollution, the illegal wildlife trade, and introduction of exotic species (Klemens, 2000; Espindola et al., 2019). Several genetic studies of freshwater turtle species have found low genetic diversity at both historical and contemporary levels: in the common snapping turtle *Chelydra serpentina* (Walker et al., 1998), the Magdalena River turtle *Podocnemis lewytana* (Vargas-Ramírez et al., 2007), and the Central American river turtle *Dermatemys mawii* (González-Porter et al., 2011). Low genetic divergence and diversity levels are often found in turtle species

with limited vagility, where different historical and contemporary scenarios of isolation, post-colonisation expansion, and/or population size decrease are involved (Reid & Peery, 2014; Shoemaker & Gibbs, 2013; Walker et al., 1998). Additionally, habitat fragmentation has significant negative effects on species that are poor dispersers, mainly due to loss of genetic connectivity, population declines, and genetic bottlenecks (Gibbons et al., 2000; Todd et al., 2010).

Mexico has the second highest reptile species richness of any country globally, with 61 species and subspecies of freshwater and terrestrial turtles (Flores-Villela & García-Vázquez, 2014; Macip-Ríos et al., 2015). The Coahuilan box turtle *Terrapene coahuila* (Schmidt & Owens, 1944) is the only aquatic species within the genus and is microendemic to the desert-spring ecosystem of the Cuatrociénegas Basin (CCB), Coahuila, Mexico. This species is only found in permanent and seasonal wetlands across the CCB valley (Brown, 1974; Webb et al., 1963). It is protected by international and national laws, classified as Endangered (van Dijk et al., 2007) and as Under Special Protection (Semarnat, 2010), respectively. The CCB is semi-isolated in the Chihuahuan desert catchment, described as a rare oasis with a biological endemism similar to that of the Galapagos islands (Souza et al., 2006, 2012). It harbours over 70 endemic species (Meyer, 1973), among which three turtle species co-exist: *Terrapene coahuila*, *Trachemys taylori*, and *Apalone atra*. The valley is divided along its centre by the Sierra San Marcos, a geographic feature that is associated with the separation and structuring of different species (Carson & Dowling, 2006; Chaves-Campos et al., 2011).

The CCB wetland has shrunk 90% in the last 60 years, mainly as a result of water extraction and channelling through a complex system of artificial courses and canals (Souza et al., 2006, 2018), which has significantly reduced the box turtle's natural distribution from approximately

600 km² in 1960 to less than 360 km² in 2002 (Hendrickson et al., 2008). Consequently, some populations have completely disappeared, and most extant ones are isolated due to the absence of interconnecting waterbodies (van Dijk et al., 2014; Castañeda-Gaytán et al., 2020). The seasonal nature of the wetlands and springs also governs the turtle's movement and dispersal dynamics, because water levels decrease drastically in some wetlands during the dry season. These dry season declines, coupled with the shrinking of the turtle's habitat, has caused high mortality rates in several populations.

Our objective in the present study was to comprehensively evaluate the evolutionary and genetic patterns of *T. coahuila*. To this end, we assessed the contributions of historical and contemporary population demographic processes to *T. coahuila*'s population genetic diversity and structure, by using two mitochondrial DNA genes (cytochrome *b* [cyt *b*] and *d*-loop), one nuclear gene (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *GAPD*), and 12 nuclear microsatellite loci. Specifically, we aimed to address historical patterns of demography, migration, genetic diversity, and divergence times across the valley, while also

evaluating recent patterns of genetic variation and structure, inbreeding, bottleneck signals, and effective population size.

We expected to identify deep divergence, historical low diversity values, and strong differentiation in *T. coahuila* populations, associated with biogeographic processes that defined the CCB along with key features like the Sierra San Marcos. As *T. coahuila* has a restricted distribution, high habitat specificity, and small and isolated populations in the CCB, we predicted low effective population sizes and bottleneck signals, jointly with a continuing decrement in genetic variation and marked spatial structuring at the among-population level.

2 | METHODS

2.1 | Sample collection

Fieldwork was conducted at the Cuatrociénegas basin natural protected area, encompassing the entire range of *T. coahuila*, from

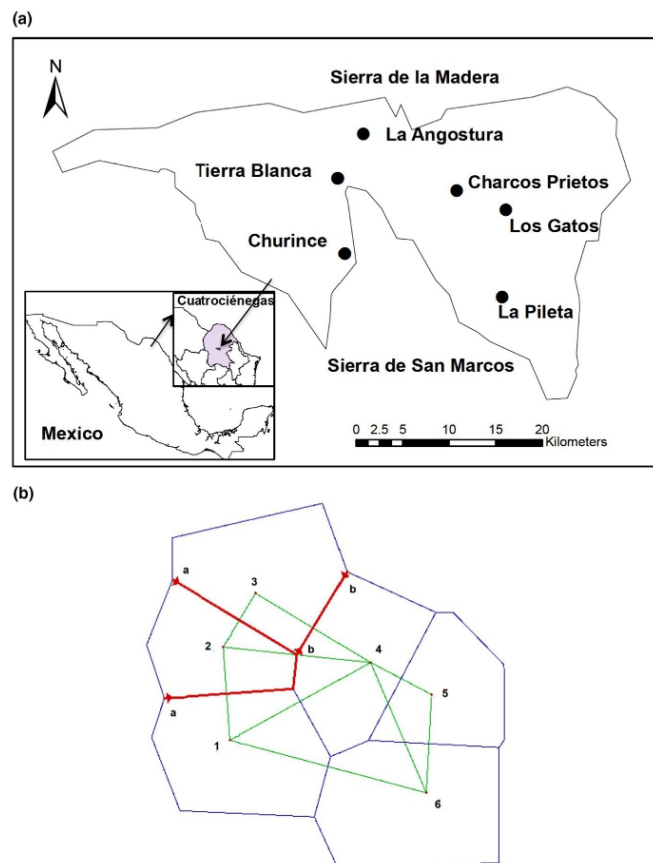


FIGURE 1 (a) Map depicting the distribution range of *Terrapene coahuila* on the Cuatrociénegas valley, in the state of Coahuila, Mexico, east and west of the Sierra San Marcos. Six sampling localities are shown where turtles were captured for the present study. (b) Genetic boundaries (red lines) detected using genetic distance from concatenated genes with Barrier 2.2 (Manni et al., 2004). The order of the alphabetical pairs represents the sequence of the boundary formation. Numbers correspond to the sampling localities plotted along the ordination: (1) Churince, (2) Tierra Blanca, (3) La Angostura, (4) Charcos Prietos, (5) Los Gatos, and (6) La Pileta. Green lines depict the Delaunay triangulation

May 2015 to March 2016. We visited 17 waterbodies throughout the basin area where the species had been recorded or fitted the habitat characteristics of the species, although we were able to capture individuals only in six permanent ponds and wetlands (sampling localities: Churince, Tierra Blanca, La Angostura, Charcos Prietos, Los Gatos, and La Pileta; Figure 1a), either because the sites were consistently dry or lacked *T. coahuila* populations. We sampled 110 turtles (48 females, 56 males, and 6 immature individuals), captured opportunistically by walking linear and circular transects around each waterbody; individuals were measured (length and width of carapace and plastron with a digital vernier calliper) and weighed; tissue samples (~3 mm²) were obtained from the tail and blood samples (<0.5 ml) were taken from the caudal vein for genetic analysis, stored in labelled Eppendorf tubes with 96% ethanol, and blood buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 100 mM EDTA, 10 mM NaCl, 2% SDS; pH 8.0), respectively. We avoided recapturing by two means: individuals had the marginal scutes notched in a unique pattern (from an ongoing survey performed by the protected area personnel) or by detailed photography and paint marking done by us; all individuals were released at the sampling locality.

2.2 | Nuclear and mitochondrial markers

Using genetic markers with different mutation rates and inheritance characteristics can help disentangle population demographic histories; for instance, mitochondrial DNA (mtDNA) sequences with relatively slow mutation rates enable analysis of ancient evolutionary events and population history, while more recent population genetic processes can be evaluated with rapidly mutating markers such as microsatellite loci (Jacobsen et al., 2012; Gonzalez et al., 2014). Life-history aspects such as generation time and longevity also influence the temporal resolution of the different genes. Accordingly, we amplified both mitochondrial and nuclear sequences and microsatellites.

DNA was extracted with the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) following the manufacturer's instructions. We amplified two mtDNA genes (cyt *b* and d-loop) and one nuclear gene (GAPD) in a subset of 37 individuals: we targeted the entire 1,097 base pairs (bp) of the cyt *b* along with part of the adjacent tRNA-threonine (tRNA-thr), amplified with primers CytbG and THR-8 (Engstrom et al., 2007; Martin et al., 2013; Spinks et al., 2016), while primers DES-1 and DES-2 were used for a 720 bp d-loop fragment. For the GAPD gene (430 bp), including intron 11 and partial coding region, we used primers GAPDL890 and GAPDH950 (Friesen et al., 1997; Martin et al., 2013). We followed the same polymerase chain reaction protocol for the three genes as described in Martin et al. (2013) and Butler et al. (2011).

We tested 16 fluorescently labelled microsatellite primers, nine developed for *Glyptemys muhlenbergii* (GmuB8, GmuD16, GmuD21, GmuD40, GmuD51, GmuD70, GmuD90, GmuD107, GmuD121; King & Julian, 2004) and seven for *Terrapene carolina* (TCTB2, TCTG7, TCTO11, TCTP11, TCTQ17, TCTR7, TCTS2; Buchman et al., 2009), four of which were monomorphic (TCTB2, TCTO11, TCTP11,

TCTQ17) thus not included in further analyses. Microsatellite amplification (polymerase chain reaction) followed Cureton et al. (2011). All reactions were carried out in a 12.5- μ l total volume containing 0.4 μ M HEX or FAM-labelled forward primer, 0.4 μ M reverse primer, 1 \times buffer, 0.01 μ M dNTP, 2 mM MgCl₂, 0.08 μ L *Taq* polymerase (Vivantis), and 2.5 μ L 10–100 ng/ μ L DNA. Microsatellite products were run on an ABI Prism 3730xl and 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), with ROX-500 as internal size standard and allele size determined with GeneMarker v2.2.0 (SoftGenetics), and rounded to integers with TANDEM 1.8 (Matschiner & Salzburger, 2009). We included negative controls in all runs and multiple samples were sized at least twice to assure reproducibility and correct readings.

2.3 | Historical genetic diversity and structure inferences

We used CLUSTALW v.2.1 (Larkin et al., 2007) in BioEDIT v.7.2.5 (Hall, 1999) to align sequences. The GAPD nuclear gene showed only one haplotype (GenBank Accession # MW291437) and could not be used in any further analyses. Hence, to evaluate historical patterns of diversity and structure, we based the following analyses on the mitochondrial sequences. We estimated genetic variability based on the number of segregating sites (*S*) and haplotype (*h*) and nucleotide diversity (π) for each cyt *b* and d-loop genes, with Arlequin 3.5.1.3 (Excoffier et al., 2005), while also testing for neutrality with the Tajima's *D* (Tajima, 1989) and Fu and Li's *F* (Fu & Li, 1993) indices, using Arlequin, and Fu's *F*_s (Fu, 1997) with DnaSP 5.10 (Librado & Rozas, 2009). To determine the relationship among mitochondrial haplotypes, we constructed a rooted haplotype network using TCS 1.2.1 (Clement et al., 2000), with a 95% probability connection limit and treating gaps as missing data.

To define historical genetic structuring (differentiation) of *T. coahuila* across its distribution across the basin based on our sequence data, we used SAMOVA 1.0 (Dupanloup et al., 2002), an analysis that simulates different partitions of *n* populations into *K* groups and retains the partition with the highest proportion of genetic variation among groups. The method is based on a simulated annealing procedure that maximises the proportion of genetic variance that can be explained by differences between groups of populations. Grouping was done by sampling locality for each gene and the concatenated dataset, testing values of *K* = 2–6. Our analyses were based on 100 simulated annealing steps, for each analysis with increasing *K*, we examined the proportion of genetic variance due to differences between groups (Φ_{CT}), targeting the *K* range at which Φ_{CT} was largest and statistically significant. Considering the higher dispersal of male individuals and overall philopatry in females, we next evaluated genetic differentiation between males and females using an analysis of molecular variance (AMOVA). Lastly, we analysed potential genetic barriers associated with each sampling locality using the Monmonier's maximum difference algorithm in BARRIER 2.2 (Manni et al., 2004) and the concatenated dataset. This method uses Delaunay triangulation to connect (triangulate) adjacent points (localities) on a plane (map).

2.4 | Divergence time estimation

With the aim of establishing divergence patterns and the time to the most recent common ancestor for the *T. coahuila* Cuatrociénegas populations, we estimated divergence times with the *cyt b* dataset using a Bayesian framework implemented in BEAST 1.8.2 (Drummond et al., 2012). The best fit model of DNA substitution obtained with jModelTest v.2.1.9 (Darriba et al., 2012), based on the Akaike information criterion scores, was GTR + G. Outgroup species sequences were obtained from GenBank, including one representative of each genus of Emydidae: *Terrapene carolina*, *Terrapene ornata*, *Terrapene nelsoni*, *T. coahuila*, *G. muhlenbergii*, *Glyptemys insculpta*, *Emydoidea blandingii*, *Emys marmorata*, *Clemmys guttata*, *Trachemys scripta*, *Malaclemys terrapin*, *Graptemys flavimaculata*, *Chrysemys picta*, *Pseudemys rubiventris*, and *Deirochelys reticularia* (Table S1). Analyses were run with the GTR + G model, the birth-death tree prior, and the uncorrelated lognormal relaxed clock method, with two Markov chain Monte Carlo chains for 1×10^7 generations, sampling every 1,000th, and 10% of the initial samples discarded as burn-in. We used six calibration (in million years) and error estimates points derived from a lognormal distribution, including the time to the most recent common ancestor (MRCA) to Emydidae (41.8 million years ago [My] ± 32 –71) and Emydinae (28.8 My ± 18 –51) in millions of years, the MRCA to *Emys* (25.4 My ± 15 –45), *Clemmys* (22.4 My ± 13 –39), and the *T. ornata*–*T. nelsoni* (14.2 My ± 8 –25) and *T. carolina*–*T. coahuila* (10 My ± 0.054) splits (Martin et al., 2013; Spinks et al., 2016). Based on fossil information, the MRCA to *T. ornata* and to *T. carolina* was calibrated at 12.5 My ± 1.00 and 10.0 My ± 1.00 , respectively (Holman & Fritz, 2005; Spinks & Shaffer, 2009). Convergence and stationarity were visualised with Tracer v.1.6 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>) and a maximum clade credibility tree was constructed with TreeAnnotator 1.8.2 (Rambaut & Drummond, 2015).

2.5 | Demographic analyses

With the aim of inferring the time, expressed as number of generations, and demographic (expansion, bottleneck) patterns of the *T. coahuila* populations of either side of their historical barrier, Sierra San Marcos (SSM; Figure 1a), we used the approximate Bayesian computation method (Beaumont et al., 2002), implemented in DiyABC v2.04 (Cornuet et al., 2014), with the microsatellites dataset. In these analyses, datasets are simulated by coalescence from prior distribution parameters; simulated and observed data are compared by likelihood and, if they have a similar distribution, the corresponding model is accepted (Bertorelle et al., 2010; Cornuet et al., 2014). This similarity is verified by a polychotomous logistic regression between the statistical summaries of classical parameters in population genetics, such as mean and variance of heterozygosity, F_{ST} , and number of private alleles (Sousa et al., 2012). We defined three groups based on the historical (concatenated haplotype network, SAMOVA and BARRIER) and the contemporary structure and migration results (see Results below), where Pop1 included the Churince sampling site,

Pop2 Tierra Blanca, and Pop3 the remaining four sites, and evaluated three simple demographic scenarios: Scenario 1, we tested for a bottleneck signal in Pop1 due to dispersal and isolation along the west side of SSM; Scenario 2, we hypothesised a population expansion for Pop3 (east of SSM) as a result of the continuous flooding events across the valley from 1.3 million years to 11,000 year ago (Castiglia & Fawcett, 2006; Minckley & Jackson, 2008; Smith, 1984); Scenario 3, where both a bottleneck (Pop1) and expansion (Pop3) occurred. Before comparing scenarios, we tested if Pop1 diverged from Pop2 or vice versa, but the models could not be statistically distinguished. The scenarios were compared with the logistic and direct approaches with the following parameters: 5×10^6 simulated datasets, a uniform prior distribution of probabilities across the three scenarios, a range of population sizes of 20,000–40,000 individuals, and divergence times among populations ranging from 700–12,000 generations ago, the default values (Brouat et al. 2014; Cornuet et al., 2014) and the generalised stepwise mutation model for mutational parameters. Analyses were performed using both all the summary statistics and the means of number of alleles, genetic diversity, and size variance within and between populations, considering that the use of many statistics can increase the error rate due to statistical noise (Beaumont, 2010), while the use of few statistical summaries implies a loss of information that can generate unreliable results (Estoup et al., 2012). Here, in all cases, the best model remained the same. To evaluate confidence for the best scenario we generated 500 pods (pseudo-observed data) obtained from the prior distribution to estimate the false allocation rate, where Type I error (i.e. probability in which the true scenario is rejected) is the proportion of pods for which the scenario does not have the highest posterior probability; and Type II error (i.e. probability of accepting a scenario when it is not true), is the proportion of pods of which the scenario with the highest posterior probability is not the scenario evaluated (Estoup et al., 2012). We were able to estimate the time of divergence between east and west of SSM main populations, considering two generation times, 15 and 35 years. The former has been derived by analogy with *Terrapene* congeners (Miller, 2001), whereas we estimated the second based on life-history data and Pianka's formula for generation time ($GT = IR + FR/2$) (Pianka, 1974). Initial reproduction age (IR) for box turtles is estimated at 9–15 years (9–10 cm) and 60–65 years for final reproduction (FR) (Brown, 1974; Miller, 2001), thus we estimated $GT = 9 + 61/2 = 35$.

2.6 | Contemporary genetic variability and clustering

For the complementary evaluation of more contemporary patterns of genetic diversity and structure in *T. coahuila*, we performed the following analyses with the 12 microsatellite loci that were polymorphic. We assessed signal of null alleles and allelic dropout with Micro-Checker v.2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004), using 1,000 Monte Carlo simulations. We tested linkage disequilibrium across the entire population using Fisher's exact test (1,000 batches and

10,000 iterations) with GENEPop v.6 (Rousset, 2008) and deviations from Hardy-Weinberg equilibrium with Arlequin 3.5.1.3. The α value was adjusted for multiple comparisons where appropriate using a Bonferroni correction (Rice, 1989).

We inferred current genetic structuring (microsatellite loci) across the basin with a Bayesian clustering method that uses multilocus genotype data and identifies the number of K clusters (genetic groups), implemented in STRUCTURE v.2.3.4 (Pritchard et al., 2000). We tested values from $K = 1-6$, using the admixture model with correlated allele frequencies. Twenty runs were performed for each value of K , based on 10×10^6 Monte Carlo Markov Chain iterations and 500,000 as burnin. The most likely number of clusters (K) was obtained with Structure Harvester (Earl & Vonholdt, 2012), based on the posterior probability $\ln P(K)$ (Pritchard et al., 2000). To further evaluate genetic differentiation, we also estimated pairwise F_{ST} between sampling localities and between genetic clusters corrected for null alleles with FreeNa (Chapuis & Estoup, 2006) and without correction in Arlequin 3.5.1.3. Genetic diversity was estimated per sampling localities and per genetic clusters defined by STRUCTURE, assessing the number of alleles per locus (N_a), the number of effective (A_e) and private (A_p) alleles, the observed (H_o) and expected heterozygosity (H_e), and Nei's unbiased expected heterozygosity (H_{Nei}), using Genalex 6 (Peakall & Smouse, 2006), while the inbreeding coefficient (F_{is}) was calculated with Arlequin 3.5.1.3.

To test for potential contemporary genetic bottlenecks, i.e. a genetic signature of recent historical reduction in the effective population size, we evaluated heterozygote excess under mutation-drift equilibrium, for sampling localities with more than 20 individuals and for each genetic cluster, with BOTTLENECK 5.1.26 (Piry et al., 1999). For this, we compared observed and expected heterozygosity values estimated under the infinite allele (IAM), stepwise mutation (SMM), and two-phase (SMM: 70%; IAM: 30%) mutational models; the latter model is considered more appropriate for microsatellites. Models were run with 10,000 replicates and excess heterozygosity was tested using one-tailed Wilcoxon test. We estimated the effective population size (N_e) using the linkage disequilibrium method in NeEstimator v2.1 (Do et al., 2014), using the random mating model and the parametric method for estimating confidence intervals (Jones et al., 2017). Because rare alleles tend to upwardly bias linkage disequilibrium estimates of N_e , excluding allele frequencies lower than 0.02 and 0.01 can be allowed to boost precision without substantially increasing bias (Waples & Do, 2010); thus we report $P_{crit} = 0.02$ and 0.01. Relatedness between individuals was assessed with ML-Relate, which has the advantages that it is designed for microsatellites and considers null alleles (Kalinowski et al., 2006). Finally, we estimated recent gene flow between sampling localities with Bayesass + v1.3, excluding two microsatellite loci (GmuD51, TCS29) as suggested in the software if a signal of null alleles is detected (Wilson & Rannala, 2003), which uses Markov chain Monte Carlo resampling to estimate a migration rate (m) and the direction of migration. The migration rate estimates are based on the proportion of individuals in each

population (sampling locality) that are assigned to other population with high probability. Analyses were run using of 5×10^8 iterations, 500,000 burnin, and 2,000 sampling frequency. Run convergence was confirmed with Tracer v.1.6.

3 | RESULTS

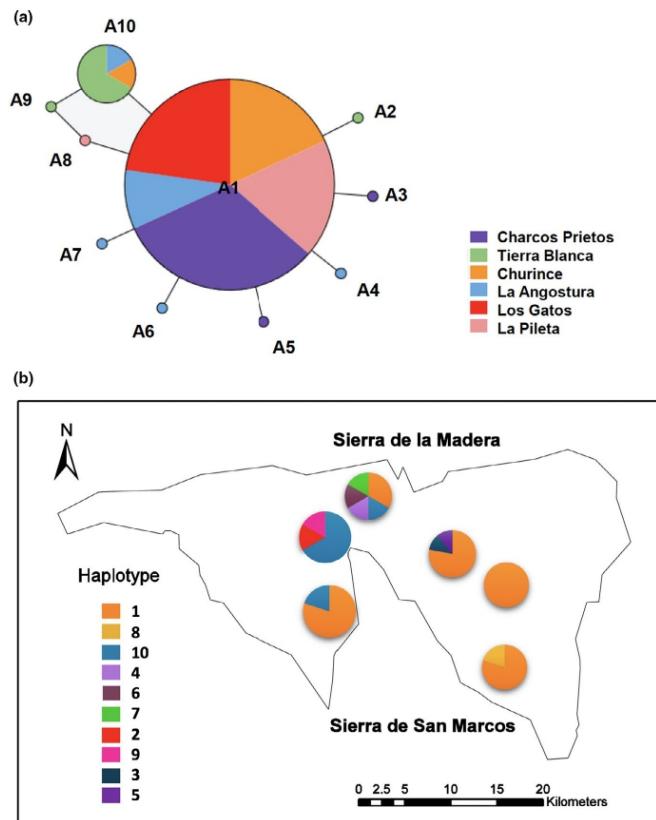
3.1 | Historical genetic diversity and structure and times of divergence

We successfully sequenced 1,033 bp of the *cyt b* gene, identifying five different haplotypes (GenBank Accession# MW291438-MW291442), defined by four polymorphic sites; low levels of haplotype ($h = 0.254$) and nucleotide diversity ($\pi = 0.00031$) were obtained for the entire sample. A 585-bp d-loop fragment was also amplified, with five haplotypes (GenBank Accession # MW291443-MW291447), defined by four polymorphic sites and similar haplotype and nucleotide diversity values ($h = 0.441$; $\pi = 0.00081$). The estimated Tr/Tv ratio for *cyt b* was 3/3, with mean nucleotide frequencies of A: 30.78%, C: 31.37%, G: 11.91%, T: 25.94%; d-loop had Tr/Tv = 3/1; A: 31.31%, C: 19.84%, G: 13.99%, T: 34.87%. The HK + I and the TIM1 + I evolutionary models were selected for d-loop and *cyt b*/concatenated genes, respectively. Regarding neutrality tests, for the concatenated genes all indices were negative and significant ($D = -1.762$; $p = 0.017$; $F = -2.790$, $p < 0.05$; $F_s = -7.575$, $p < 0.001$); the values for *cyt b* and d-loop separately were similar (Table S2).

Results of the *cyt b* haplotype network (Figure S1a) showed one central, most frequent and widespread haplotype (C1) present in all populations, and the rest were exclusively found in the other sampling localities; a very similar pattern was observed for the five d-loop haplotypes (Figure S1b). The pattern shown by the concatenated network (Figure 2), with 10 haplotypes, also showed a central, widespread haplotype (A1) found in all populations except Tierra Blanca, an another (A10) shared by Tierra Blanca, La Angostura, and Churince; exclusive haplotypes from different sampling localities were A2 and A9 present in Tierra Blanca; A3 and A5 in Charcos Prietos; A4, A6, and A7 in La Angostura; A8 only in La Pileta.

The structure results from SAMOVA yielded an optimum of two groups for the concatenated genes and the d-loop: Group 1 included Tierra Blanca and Group 2 the rest of sampling localities (Figure S2), whereas with the *cyt b* such structure was not clearly detected. The distribution of genetic variation indices for d-loop showed a higher percentage between groups (63.9%) and within populations (36.6%; Table S3b), with similar results based on the concatenated dataset (Table S3c). The AMOVA between sexes was performed with the d-loop based on the higher resolution of this gene, where results showed that genetic variance is 100% significantly distributed among sampling localities for females ($\Phi_{ST} = 100$; $p = 0.028$), and not for males ($\Phi_{ST} = 13.8$; $p > 0.05$). The genetic boundaries analysis showed two main barriers (Figure 1b), the first between Churince and La Angostura, separating Tierra

FIGURE 2 (a) Haplotype network based on the concatenated cytochrome *b* and *d*-loop genes for *Terrapene coahuila* from Cuatrociénegas, México. Circle size indicates the relative haplotype frequency, while sampling sites are shown in different colours: Charcos Prietos (purple), Tierra Blanca (green), Churince (orange), La Angostura (blue), Los Gatos (red), La Pileta (pink). (b) Map depicting the geographic distribution of the 10 haplotypes recovered and their frequencies per sampling locality



Blanca from the rest of sampling localities; the second barrier is shown between Tierra Blanca and Charcos Prietos, isolating La Angostura from the rest.

The divergence time evaluation (BEAST) dated the MCRA for *T. coahuila* in the Cuatrociénegas valley around 10.1 My (95% highest posterior density: 9.08–11.2; Figure 3). A large range of diverging times within the *T. coahuila*'s clade is evident, from approximately 8 My to 600,000 years.

3.2 | Demographic analyses

Model comparisons showed that Scenario 1, in which we tested a bottleneck signal for Pop1 (Figure 4a), had the highest probability values (direct $p = 0.580$, 95% confidence interval [CI] = 0.147, 1.0; Figure 4f,g) and (logistic $p = 0.615$, 95% CI = 0.617, 0.655; Figure 4h,i). The other scenarios were poorly supported by the data ($p = 0.295$ and 0.069, Scenarios 2 and 3, respectively). Pre-evaluation of model scenarios via principal component analysis indicated that the

observed data fall within the cluster of simulated data points based on the three demographic scenarios for both all the summary statistics (Figure 4b) and the means of number of alleles, genetic diversity, and size variance within and between populations (Figure 4c). Results of the confidence test for scenario choice showed that Type I error was 0.32 for the logistic approach of the final constrained run, while Type II error, based on scenarios 2 and 3 simulated datasets, were 0.14 and 0.17, respectively, for the logistic approach of the final run. The goodness-of-fit test using the posterior predictions exhibited that parameter values and summary statistics from the simulated datasets based on Scenario 1 closely matched the empirical data (Figure 4d, e). Hence, based on the final computation results, the estimated bottleneck duration (db) was 230 generations and, based on the two generation times considered (15, 35 years), our results suggest that divergence ($t5$) between west (Pop1–Pop2) and east (Pop3) of SMM occurred 3.17×10^3 generations ago (95% CI = 2.33 – 6.3×10^3) or 47,500–110,950 years ago. The colonisation ($t1$) of Churince (Pop1) took place 28,500–66,500 years ago (190×10^3 generations ago; 95% CI = 7.27×10^2 – 4.57×10^3).

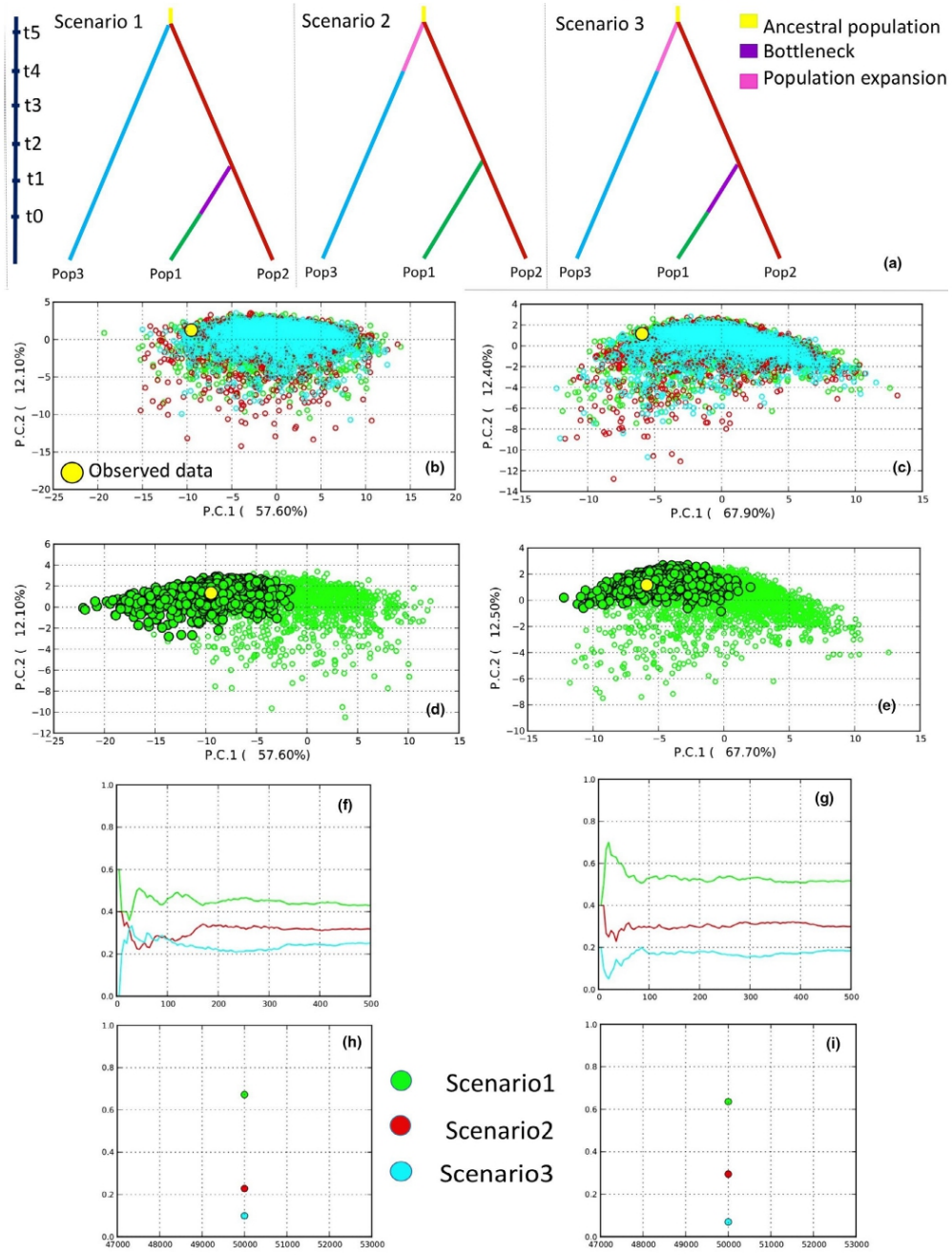


FIGURE 4 (a) The three scenarios tested for demographic analyses of *Terrapene coahuila* from Cuatrociénegas, México, with DiyABC v2.04 (Cornuet et al., 2014). Scenario 1: bottleneck signal in Churince (Pop1) due to dispersal and isolation; Scenario 2: a population expansion (Pop3) as a result of continuous flooding events; Scenario 3, combines the two previous ones (bottleneck and expansion), based on all the summary statistics (b, d, f, h) and the means of number of alleles, genetic diversity, and size variance within and between populations (c, e, g, i). Note that time is not to scale. (b, c) Prior distribution of parameters corresponding to the three scenarios tested, where the first two axes are shown. (d, e) Posterior predictive test of model fit corresponding to Scenario 1. (f, g) Direct and (h, i) logistic approaches of the three scenario model comparisons

3.3 | Contemporary genetic clustering, diversity and bottleneck signal

We successfully amplified 12 polymorphic microsatellite loci (out of the 16 tested) for *T. coahuila*. No linkage disequilibrium was detected between any pair of loci. Significant evidence for null alleles, although no consistently across all sampling localities, and departures from Hardy-Weinberg equilibrium were found at Gmud51, Gmud70, Gmud121, TCTS2. The results of the Bayesian inference of admixture proportions (STRUCTURE) showed that the number of clusters that best fit the data was a $K = 2$ ($\ln \Pr[K = 2] = -3801.165$; Figure 5). The genetic clusters were named based on their geographic distribution and that the majority of individuals had >75% ancestry, as Cuatrociénegas West (CW), formed by Churince, Tierra Blanca, and La Angostura, and Cuatrociénegas East (CE), including Charcos Prietos, Los Gatos, and La Pileta.

Diversity indices showed a total of 95 alleles with an average of 7.9 alleles per locus, 3.8 effective alleles, and moderate expected and observed heterozygosity values ($H_o = 0.562$; $H_e = 0.644$; $H_{Ne} = 0.647$; Table 1). Values were similar within sampling localities ($H_o = 0.600$ – 0.522 ; $H_e = 0.649$ – 0.536 ; $H_{Ne} = 0.657$ – 0.585), where Charcos Prietos and La Pileta had the highest and lowest values, respectively; genetic clusters differed mostly in their number of private alleles ($CE = 15$, $CW = 4$). All populations showed positive and significant F_{IS} values (indicating inbreeding), except La Pileta (probably due to low sampling size). Relatively low genetic differentiation was detected with F_{ST} pairwise values between sampling localities (0–0.0423 with Arlequin and 0–0.0397 with FreeNa; Table S4) and between clusters (0.0132 and 0.0124 with Arlequin and FreeNa, respectively). Bayesass + exhibited a high proportion of individuals native to their sampling locality (range 0.687–0.746), indicating low rates of migration between localities (Figure S3). The exchange of a comparatively low proportion of migrants was shown between close sampling sites, Charcos Prietos to Los Gatos in both directions ($m = 0.206$ $m = 0.178$, respectively), La Angostura to Los Gatos ($m = 0.125$), La Pileta to Charcos Prietos ($m = 0.119$); the Tierra Blanca to Los Gatos ($m = 0.130$) is most probably associated with a historical signal rather than current migration; migrants in most other directions were negligible. Relatedness (ML-Relate) results indicated that most individuals are unrelated whether considering sampling localities (87%–100%) or genetic clusters (85%), followed by half-siblings and low parent–offspring relationships (Table S5).

The bottleneck test showed significant results under the IAM model for Charcos Prietos and for both genetic clusters ($p < 0.05$; Table S6). The estimates of effective population size (Table S7)

showed low values for the CE genetic cluster ($N_e = 308.4$), while CW had half the estimate ($N_e = 139.8$; $P_{crit} = 0.01$); with $P_{crit} = 0.02$, the CI upper bound in CW was infinite ($144.8 - \infty$); however, Waples and Do (2010) indicate in such cases that if adequate data are available, the lower bound of the CI generally will be finite, providing plausible limits.

4 | DISCUSSION

4.1 | Historical diversification, demography, and diversity patterns

Our prediction of deep divergence, historical low diversity values, and strong differentiation of populations of *T. coahuila* is supported by the low mitochondrial nucleotide and haplotype diversity levels observed. This demonstrates that *T. coahuila* is similar to other species with restricted distribution ranges and limited vagility, such as the bog turtle *G. muhlenbergii* (Rosenbaum et al., 2007) and the Madagascar spider tortoise *Pyxis arachnoides* (Chiari et al., 2005), particularly after experiencing isolation, post-colonisation, expansion, or population declines (Bloor et al., 2008; Hay et al., 2003). Furthermore, microendemic species often exhibit low or no variation, as in the Colombian river turtle *Podocnemis lewyana* (Vargas-Ramírez et al., 2012) and the Aldabra giant tortoise *Aldabrachelys gigantea* (Balmer et al., 2011). Importantly, on the basis of the low mutation rate of the mitochondrial DNA in turtles (Avice et al., 1992), even low genetic variation is sufficient to decipher their evolutionary histories (Beheregaray et al., 2004; Spinks & Shaffer, 2009; Martin et al. 2013).

The genus *Terrapene* has a long evolutionary history in North America, with the oldest fossils dating from the middle Miocene (Butler et al., 2011), where the separation of *T. carolina*, the closest living species to *T. coahuila*, occurred approximately 15.3 My ago (Martin et al., 2013). *Terrapene coahuila* is believed to have evolved from a remnant population of *T. carolina* that was subjected to rigorous selective pressures compared to other members of the genus (Milstead, 1960). Accordingly, our results indicate that the time to the most recent common ancestor of *T. coahuila* dates back to the late Miocene (10.1 My; 95% highest posterior density: 9.08–11.2) (Spinks & Shaffer, 2009; Martin et al., 2013). Furthermore, our results show that *T. coahuila*'s diversification across the Cuatrociénegas valley continued throughout the Pleistocene, with its highest during the Holocene (Figure 3), in association with the biogeographic history of the basin. Since approximately 1.3 My ago, the Chihuahuá desert

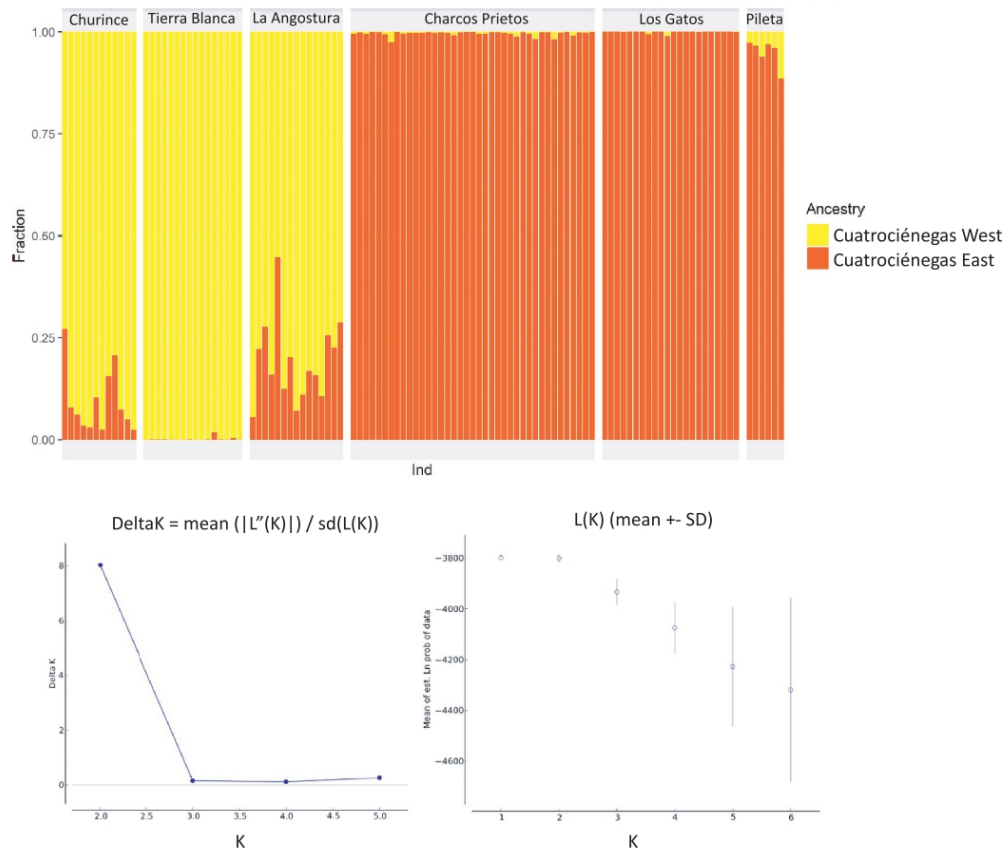


FIGURE 5 Admixture proportions from Structure ($K = 2$) for *Terrapene coahuila* from Cuatrociénegas, México. Each horizontal bar corresponds to an individual and yellow and red colours indicate their ancestry to Cluster 1 (Cuatrociénegas West) and Cluster 2 (Cuatrociénegas East), respectively. Individuals are ordered following the geographic distribution of sampling localities from West to East of the Sierra San Marcos (see Figure 1): (1) Churince, (2) Tierra Blanca, (3) La Angostura, (4) Charcos Prietos, (5) Los Gatos, (6) La Pileta. Plots of the posterior $\ln P(K)$ (bottom right) and the mean \pm SD $L(K)$ (bottom left) are shown

experienced repeated humid cycles that increased the water levels of the lagoons to the extent of generating significant changes in vegetation (Metcalfe et al., 2002; Smith, 1984). The dominating forests were distributed at low elevations but, when temperature increased and the climate became more arid, their distribution shifted towards higher elevations (Milstead, 1960; Minckley & Jackson, 2008). The latest isolation of the Cuatrociénegas basin occurred from the beginning of the Holocene (c. 11,000 years ago), when the valley began to gradually dry (Wolaver et al., 2008) and the fauna exchange from north-eastern species with nearby areas stopped as a result of the dominant aridity (Minckley & Jackson, 2008). Indeed, the colonisation of the basin from north-eastern *Terrapene* ancestors and later expansion within the valley (Milstead, 1960; Minckley & Jackson, 2008) are supported by the signal of historical population

expansion we identified and the star topology of the haplotype networks.

The cycles of expansion and contraction of water bodies and formation of fragmented wetlands, all contributed to the structuring of different species dependent on this environment across the valley, while also favouring a west to east colonisation along the SSM (Carson & Dowling, 2006; Chaves-Campos et al., 2011; Johnson, 2005). Indeed, *T. coahuila* exhibits two differentiated mitochondrial genetic groups consistent with the barriers identified, one between Churince and Angostura separating Tierra Blanca, and a second between Tierra Blanca and Charcos Prietos isolating Angostura. This separation pattern is supported by the historical relationship between haplotypes, where an ancient and widespread haplotype is found in all populations except Tierra Blanca, and another common

TABLE 1 Summary of genetic diversity for *Terrapene coahuila* from Cuatrociénegas, Mexico, based on 12 polymorphic microsatellite loci. Values are given for the six sampling localities and two genetic clusters (CE, CW). Number of genotyped individuals (N), mean number of observed alleles per locus (N_a), number of effective (A_e) and private alleles (A_p), observed (H_o) and expected heterozygosity (H_e), Nei's unbiased expected heterozygosity (H_{Nei}), and inbreeding coefficient (F_{IS}). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Sampling locality	N	N_a	A_e	A_p	H_o	H_e	H_{Nei}	F_{IS}
Charcos Prietos	39	7.083	3.919	6	0.600	0.649	0.657	0.0923***
Churince	12	4.833	3.475	1	0.556	0.621	0.648	0.1485**
La Angostura	15	5.417	3.378	1	0.522	0.593	0.613	0.1531***
La Pileta	6	4.000	2.877	0	0.569	0.536	0.585	0.0284
Los Gatos	22	6.167	3.360	2	0.540	0.622	0.636	0.1601***
Tierra Blanca	16	5.583	3.254	1	0.536	0.621	0.641	0.1673***
Cluster CE	67	7.583	3.798	15	0.578	0.642	0.647	0.1118***
Cluster CW	43	6.667	3.587	4	0.537	0.630	0.638	0.1595***
Global	110	7.917	3.821		0.562	0.644	0.647	0.1353***

haplotype is shared by Tierra Blanca, La Angostura, and Churince, all localities to the west of SSM. Notably, we were able to infer the time (number of generations) and demographic expansion and bottleneck patterns of the *T. coahuila* populations considering those historical barriers. Our results suggest that divergence between west and east of SMM occurred 47,500–110,950 years ago and the colonisation of Churince took place 28,500–66,500 years ago; also, the best fit scenario showed a bottleneck signal for Churince during the Holocene (8,000–3,450 years). These demographic results further support *T. coahuila*'s dispersal patterns and its populations latest isolation on the southernmost west side (Churince).

The historical separation of the *T. coahuila* populations in the wetlands/desert system of Cuatrociénegas becomes more evident with the observed significant differentiation delimiting an eastern (CE) and a western (CW) genetic cluster separated by the SSM. This structuring between the east and west is a pattern repeatedly observed in other species from the CCB, including freshwater invertebrates and fish (Carson & Dowling, 2006; Chaves-Campos et al., 2011; Johnson, 2005). Interestingly, in other members of the *Terrapene* genus genetic differentiation has only been found at geographic scales greater than 865 km. However, in other turtles of the family such as the yellow-bellied slider turtle *Pseudemys scripta*, genetic structure has been detected between groups separated by distances < 30 km (Scribner et al., 1986).

4.2 | Contemporary population fragmentation and isolation on the CCB

As we predicted, *T. coahuila* exhibits decreased genetic variability, increased genetic differentiation and low population sizes as a consequence of contemporary habitat loss and fragmentation across the CCB. Habitat disturbance in the Cuatrociénegas valley began in the 1950s. In the past, the Churince complex encompassed three waterbodies, Laguna Grande, Los Güeros or Intermediate lagoon, and Churince. Laguna Grande had been reported as the most genetically

diverse population in the only previous genetic analysis of this turtle (Howeth et al., 2008). However, in 2010 Laguna Grande dried up permanently, hence Los Güeros and other intermediate ponds served as a refuge for the turtles from Laguna Grande. Worse, in 2018 this site also became completely dry. During our fieldwork in this area, we found turtles restricted to small intermittent ponds and pools that are formed by runoff from a stream that leads to Churince.

Charcos Prietos is the population we identified with the highest diversity values, probably associated with the fact that it is one of the still better conserved areas, located within our defined east cluster (CE), which has a relatively wide wetland extension and highest turtle population numbers. Also on the CE, La Pileta had the lowest diversity values; this is an artificial waterbody that was formed by the runoff of an adjacent water built-transport channel, and hence has a relatively small population. Again, during the course of our study along the CE we did not find turtles in wetlands previously registered (Howeth et al., 2008), we believe as a result of the many disturbances to which they have been exposed, including low water levels, proximity to roads and presence of humans and horses (Castañeda-Gaytán et al., 2020). Therefore, it is not surprising that *T. coahuila*'s genetic diversity exhibits and overall, long-term, and probably continuing decrement as a consequence of habitat loss and the isolation of its populations. Regional dispersal limitation in wetland turtles induced by fragmentation, especially when they have markedly restricted distributions, can lead to geographic and/or spatial isolation, resulting in closed populations that eventually suffer from reduced genetic variation, are vulnerable to inbreeding depression and drift, and have a limited capacity to adapt to changing environments (FitzSimmons & Hart, 2007; Kuo & Janzen, 2004).

It could seem paradoxical that overall differentiation (F_{ST}) among localities and between CW and CE clusters exhibited low values, while at the same time low migration rates were identified. Nonetheless, such patterns are recognised for species characterised by metapopulation dynamics (Sunny et al., 2019); the Cuatrociénegas wetlands are naturally subjected to seasonal flooding, intermittently connecting wide extensions and allowing individual turtle movement

between waterbodies otherwise separated (Souza et al., 2006, 2018). Furthermore, the low differentiation is likely to be a reflection of the high historical connectivity levels during wet periods (Metcalf et al., 2002; Smith, 1984), as shown by our results of long-distance migration. Population differentiation in *T. coahuila* is within the range observed in other aquatic turtles of the family Emydidae, including *G. insculpta* (Tessier et al., 2005), *Malaclemys terrapin* (Hauswaldt & Glenn, 2005), and *Emydoidea blandingii* (Mockford et al. 2005), all of which are threatened or endangered and have experienced substantial habitat fragmentation over the last century. In addition, migration patterns are affected by habitat loss, as shown by *Pseudemys geometricus* (Burke & Gibbons, 1995) and *T. carolina* (Kimble et al., 2014), which have low levels of differentiation, the latter also showing low relatedness within populations. Female fidelity to nesting sites, a common phenomenon in turtles, also influences migration patterns, while dispersal is carried out by juvenile males. These behaviours are reflected in the AMOVA results showing a 100% differentiation between locations for females while for males it was very low.

The negative impacts of habitat loss and anthropogenic activities on *T. coahuila* populations have had further genetic consequences. Effective population size numbers are extremely low for both CE ($N_e = 308.4$) and CW (139.8), while also exhibiting bottleneck signals. Although significant, these bottlenecks were identified only under the IAM model, so they should be used with caution. Nonetheless, it is important to consider that recent bottleneck effects may cause a drop in alleles before a drop in levels of heterozygosity (Allendorf & Luikart, 2007). This means that these populations may be suffering the initial stages of a bottleneck that are not yet fully manifested in genetic signatures, especially in this long-lived species. Indeed, it has been estimated that the species overall population went from having a historical maximum of 10,000 individuals to 1,500. Genetic bottlenecks have been identified in Cuatrociénegas for other taxa such as the spring snail *Mexipyrigus churinceanus* populations on the west of SSM, dating back 50,000 years (Johnson, 2005). Populations exhibit some level of inbreeding but no close relationship among individuals, whether considering sampling localities (87%–100% individuals are unrelated) or genetic clusters (85%), a pattern shown in other *Terrapene* (Kimble et al., 2014). *Terrapene coahuila* individuals exhibit rather high mortality rates via desiccation of wetlands across the valley, rendering populations with mostly adults and a very few juveniles, where inbreeding indices result from the constant reduction of within population numbers, and adults have low percentages of among-individual relationships. Additionally, being long-lived animals, it is likely that the impacts they are suffering now have not yet had consequences on endogamy.

4.3 | A species in peril and conservation urgency

The reduction of population size and isolation among populations contributes to the loss of variability and genetic drift, with extreme consequences leading to diminished evolutionary potential to adapt to the changing environment and ultimately population extinctions.

Moreover, slow evolutionary responses might occur because the long generation times (as in turtles) mean that the population declines before adaptive responses are evident (Allendorf et al., 2013; Frankham & Ralls, 1998; Franklin & Frankham, 1998; Hoffman et al., 2017; Kuo & Janzen, 2004). Therefore, the main result of our study is that *T. coahuila*, given its restricted distribution, high habitat specificity and fragmentation, small isolated populations, decreased genetic diversity, bottlenecks, and inbreeding is at utmost risk of extinction.

Changes in species demographics and population connectivity have the potential to permanently alter the genetic patterns of freshwater species, such as for instance in the variegated darter (*Etheostoma variatum*) inhabiting the Ohio river basin where dams have fragmented and isolated populations (Argentina et al., 2018). Hence, the maintenance of gene flow between populations is essential for the conservation of species, especially when they have small populations. In the short term, gene flow from neighbouring populations can prevent genetic drift and other harmful effects of inbreeding (Dudash & Fenster, 2000). In the long term, dispersal among populations helps maintain large effective sizes and adaptive genetic diversity (Sherwin & Moritz, 2000). Hence, our genetic data can aid towards the conservation planning for the Coahuilan box turtle and many other species inhabiting the basin. It is crucial to restore and maintain connectivity between localities across the Cuatrociénegas valley, both through corridors and adequate water management, aiming to recover the wetlands' original dynamics. It is also imperative to keep track of changes in population sizes at the different inhabited waterbodies and of future genetic changes. It is even more urgent that ongoing (Castañeda-Gaytán et al., 2020) captive breeding programmes incorporate genetic information to prevent the loss of genetic diversity and to maintain heterozygosity in the captive population for subsequent reintroduction to standing and restored wetlands. Breeding plans should be based on the principles of population genetics and demography to increase their chances of long-term survival. Importantly, within captivity, genetic changes can occur that reduce a species' ability to persist once a population is reintroduced back into its natural habitat (Williams and Hoffman 2009; Wakchaure & Ganguly, 2016). Taking into account our results for future breeding programmes, optimal breeding pairs should be established, taking into consideration each differentiated population (genetic cluster) and consisting of distant (unrelated) individuals. Finally, we still have much to learn about *T. coahuila*'s natural history and ecology, to improve our understanding of the dynamics of this and other species in the Cuatrociénegas valley.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to O. Flores-Villela, V. Souza, O. Chassin-Noria, and the members of the Genetics and Ecology laboratory, for helpful discussions throughout the entire project. We thank T. Garrido-Garduño for laboratory assistance; A. González and M. Baltazar for computer systems support; and M. Carrillo, R. Medina, S. Espindola, C. Vargas, C. Benitez, and J. Benitez for their

enthusiastic help during fieldwork. We are in debt to the people from Cuatrociénegas for allowing us to work on their ejidos and private properties, and with the students from the CBTA 22. We also acknowledge all the help from the Conanp personnel Juan Carlos Ibarra Flores, Gloria Jordan García, and Benjamin Ornelas Borrego; and Pronatura Noreste A.C. for access to Rancho San Pablo and their constant support. Sampling was performed in compliance with the guidelines for use of live amphibians and reptiles in field and laboratory research (HACC, 2004), and with the appropriate scientific collecting permit from Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat-FAUT-0168). Xochiquetzal Cortés Rodríguez acknowledges that this paper was a part of her doctoral thesis in the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. X.C.R. had a scholarship and financial support provided by the National Council of Science (CONACyT CVU 251014 / Reg. becario 215456), Program for Postgraduate Studies (PAEP) and UNAM. E.V.D. acknowledges project funding from Conacyt (grant # 237228).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interests.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Mitochondrial cytochrome *b* and d-loop sequences are deposited in GenBank (Accession numbers MW291437-MW291447).

ORCID

Ella Vázquez-Domínguez  <https://orcid.org/0000-0001-6131-2014>

REFERENCES

- Allendorf, F. W., Luikart, G., & Aitken, S. N. (2013). *Conservation and the genetics of populations*. Wiley-Blackwell.
- Argentina, J. E., Angermeier, P. L., Hallerman, E. M., & Welsh, S. A. (2018). Spatial extent of analysis influences observed patterns of population genetic structure in a widespread darter species (Percidae). *Freshwater Biology*, 63, 1185–1198. <https://doi.org/10.1111/fwb.13106>
- Avise, J. C. (2000). *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press.
- Avise, J. C., Bowen, B. W., Lamb, T., Meylan, A. B., & Bermingham, E. (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.
- Balmer, O., Ciofi, C., Galbraith, D. A., Swingland, I. R., Zug, G. R., & Caccone, A. (2011). Population genetic structure of Aldabra giant tortoises. *Journal of Heredity*, 102, 29–37. <https://doi.org/10.1093/jhered/esq096>
- Beaumont, M. A. (2010). Approximate Bayesian computation in evolution and ecology. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 41, 379–406. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-102209-144621>
- Beaumont, M. A., Zhang, W., & Balding, D. J. (2002). Approximate Bayesian computation in population genetics. *Genetics*, 162, 2025–2035.
- Beheregaray, L. B., Gibbs, J. P., Havill, N., Fritts, T. H., Powell, J. R., & Caccone, A. (2004). Giant tortoises are not so slow: Rapid diversification and biogeographic consensus in the Galápagos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 6514–6519.
- Bertorelle, G., Benazzo, A., & Mona, S. (2010). ABC as a flexible framework to estimate demography over space and time: Some cons many pros. *Molecular Ecology*, 19, 2609–2625. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04690.x>
- Bloor, P., Kemp, S. J., & Brown, R. P. (2008). Recent volcanism and mitochondrial DNA structuring in the lizard *Gallotia atlantica* from the island of Lanzarote. *Molecular Ecology*, 17, 854–866. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03575.x>
- Böhm, M., Collen, B., Baillie, J. E. M., Bowles, P., Chanson, J., Cox, N., ... Zug, G. (2013). The conservation status of the world's reptiles. *Biological Conservation*, 157, 372–385. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2012.07.015>
- Brouat, C., Tollenare, C., Estoup, A., Lioiseau, A., Sommer, S., Soanandrasana, R., ... Duplatier, J. M. (2014). Invasion genetics of a human commensal rodent; the black rat *Rattus rattus* in Madagascar. *Molecular Ecology*, 23, 4153–4167.
- Brown, W. S. (1974). Ecology of the aquatic box turtle, *Terrapene coahuila* (Chelonia, Emydidae) in northern Mexico. *Bulletin of the Florida State Museum. Biological Sciences*, 19, 1–67.
- Buchman, A. B., Deaton, R., Randle, C. P., Brummel, T., Wilson, E. D., & Lutterschmidt, W. I. (2009). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci for the three-toed box turtle (*Terrapene carolina triunguis*) and cross-amplification in other *Terrapene* species. *Molecular Ecology Resources*, 9, 1169–1171.
- Burke, V. J., & Gibbons, J. W. (1995). Terrestrial buffer zones and wetland conservation: A case study of freshwater turtles in a Carolina bay. *Conservation Biology*, 9, 1365–1369. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1995.09061365.x>
- Butler, J. M., Dodd, C. K. Jr, Aresco, M., & Austin, J. D. (2011). Morphological and molecular evidence indicates that the Gulf Coast box turtle (*Terrapene carolina major*) is not a distinct evolutionary lineage in the Florida Panhandle. *Biological Journal of the Linnean Society*, 102, 889–901. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2011.01625.x>
- Carson, E. W., & Dowling, T. E. (2006). Influence of hydrogeographic history and hybridization on the distribution of genetic variation in the pupfishes *Cyprinodon atrotus* and *C. bifasciatus*. *Molecular Ecology*, 15, 667. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02763.x>
- Castiglia, P. J., & Fawcett, P. J. (2006). Large Holocene lakes and climate change in the Chihuahuan desert. *Geology*, 34, 113–116. <https://doi.org/10.1130/G22036.1>
- Chapuis, M. P., & Estoup, A. (2006). Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 621–631. <https://doi.org/10.1093/molbev/msl191>
- Chaves-Campos, J., Johnson, S. G., De León, F. J. G., & Hulsey, C. D. (2011). Phylogeography, genetic structure, and gene flow in the endemic freshwater shrimp *Palaemonetes suttkusi* from Cuatro Ciénegas, Mexico. *Conservation Genetics*, 12, 557–567. <https://doi.org/10.1007/s10592-010-0163-z>
- Chiari, Y., Thomas, M., Pedrono, M., & Vieites, D. R. (2005). Preliminary data on genetic differentiation within the Madagascar spider tortoise, *Pyxis arachnoides* (Bell, 1827). *Salamandra-Bonn*, 41, 35.
- Clement, M., Posada, D. C. K. A., & Crandall, K. A. (2000). TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9, 1657–1659. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x>
- Cornuet, J.-M., Pudlo, P., Veyssier, J., Dehne-Garcia, A., Gautier, M., Leblois, R., Marin, J.-M., & Estoup, A. (2014). DIYABC v2.0: A software to make approximate Bayesian computation inferences about population history using single nucleotide polymorphism, DNA sequence and microsatellite data. *Bioinformatics*, 30(8), 1187–1189. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt763>
- Cureton, J. C., Buchman, A. B., Deaton, R., & Lutterschmidt, W. I. (2011). Molecular analysis of hybridization between the box turtles *Terrapene carolina* and *T. ornata*. *Copeia*, 2011, 270–277. <https://doi.org/10.1643/CG-10-066>

- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- van Dijk, P. P., Flores-Villela, O., & Howeth, J. (2007). *Terrapene coahuila* (errata version published in 2016). The IUCN Red List of Threatened Species 2007. Downloaded on 10 December 2018.
- van Dijk, P. P., Iverson, J. B., Rhodin, A. G. J., Shaffer, H. B., Bour, R., & Turtle Taxonomy Working Group (2014). Turtles of the world, 7th edition: Annotated checklist of taxonomy, synonymy, distribution, and conservation status. *Chelonian Research Monographs*, 5, 329–479.
- Do, C., Waples, R. S., Peel, D., Macbeth, G. M., Tillett, B. J., & Ovenden, J. R. (2014). NeEstimator v2: Re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. *Molecular Ecology Resources*, 14, 209–214.
- Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D., & Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29, 1969–1973. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss075>
- Dudash, M. R., & Fenster, C. B. (2000). Inbreeding and outbreeding depression in fragmented populations. In A. Young, & G. Clarke (Eds.), *Genetics, demography and viability of fragmented populations* (pp. 35–53). Cambridge University Press.
- Dupanloup, I., Schneider, S., & Excoffier, L. (2002). A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, 11, 2571–2581. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01650.x>
- Earl, D. A., & vonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4, 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Engstrom, T. N., Edwards, T., Osentoski, T. F., & Myers, E. M. (2007). A compendium of PCR primers for mtDNA, microsatellite, and other nuclear loci for freshwater turtles and tortoises. *Chelonian Research Monographs*, 4, 124–141.
- Espindola, S., Gaggioli, O., Cuarón, A. D., & Vázquez-Domínguez, E. (2014). High genetic structure in the Cozumel Harvest mice, an endangered island endemic: Conservation implications. *Conservation Genetics*, 15, 1393–1402.
- Espindola, S., Parra, J. L., & Vázquez-Domínguez, E. (2019). Fundamental niche unfilling and potential invasion risk of the slider turtle *Trachemys scripta*. *PeerJ*, 7, e7923.
- Estoup, A., Lombaert, E., Marin, J. M., Guillemaund, T., Pudlo, P., Robert, C. P., & Cornuet, J. M. (2012). Estimation of demo-genetic model probabilities with Approximate Bayesian Computation using linear discriminant analysis on summary statistics. *Molecular Ecology Resources*, 12, 846–855.
- Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. (2005). Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, 1, 47–50.
- FitzSimmons, N. N., & Hart, K. M. (2007). Genetic studies of freshwater turtle and tortoises: A review of the past 70 years. *Workshop on Genetics, Ethics, and Taxonomy of Freshwater Turtles and Tortoises*, 4, 15–46.
- Flores-Villela, O., & García-Vázquez, U. O. (2014). Biodiversidad de reptiles en México. *Revista Mexicana De Biodiversidad*, 85, 467–475. <https://doi.org/10.7550/rmb.43236>
- Frankham, R. (1995). Effective population size/adult population size ratios in wildlife: A review. *Genetics Research*, 66, 95–107. <https://doi.org/10.1017/S0016672300034455>
- Frankham, R., & Ralls, K. (1998). Inbreeding leads to extinction. *Nature*, 392(6675), 441–442. <https://doi.org/10.1038/33022>
- Franklin, I. R., & Frankham, R. (1998). How large must populations be to retain evolutionary potential? *Animal Conservation*, 1, 69–70. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1795.1998.tb00228.x>
- Friesen, V. L., Congdon, B. C., Walsh, H. E., & Birt, T. P. (1997). Intron variation in marbled murrelets detected using analyses of single-stranded conformational polymorphisms. *Molecular Ecology*, 6, 1047–1058. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1997.00277.x>
- Fu, Y. X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147, 915–925.
- Fu, Y. X., & Li, W. H. (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 133, 693–709.
- Gaytan, G. C., Becerra-López, E., Valenzuela-Ceballos, S., Borja-Jiménez, M., Rodríguez-López, B., Castañeda, J., Sánchez-Salas, J., & Stanford, C. B. (2020). Conservation status and sex ratios of the Coahuila box turtle (*Terrapene coahuila*) in the Cuatro Ciénegas Valley of Coahuila, Mexico, 2011–2018. *Chelonian Conservation and Biology*, 19, 14–21. <https://doi.org/10.2744/CCB-1422.1>
- Gibbons, J. W., Scott, D. E., Ryan, T. J., Buhlmann, K. A., Tuberville, T. D., Metts, B. S., & Winne, C. T. (2000). The global decline of reptiles, déjà vu amphibians. *BioScience*, 50, 653–666.
- González, E. G., Cerón-Souza, I., Mateo, J. A., & Zardoya, R. (2014). Island survivors: Population genetic structure and demography of the critically endangered giant lizard of La Gomera, *Gallotia bravoana*. *BMC Genetics*, 15, 121. <https://doi.org/10.1186/s12863-014-0121-8>
- González-Porter, G. P., Hailer, F., Flores-Villela, O., García-Anleu, G., & Maldonado, J. E. (2011). Patterns of genetic diversity in the critically endangered Central American river turtle: Human influence since the Mayan age? *Conservation Genetics*, 12, 1229–1242. <https://doi.org/10.1007/s10592-011-0225-x>
- HACC. (2004). Guidelines for use of live amphibians and reptiles in field and laboratory research. Revised by the Herpetological Animal Care and Use Committee of the American Society of Ichthyologists and Herpetologists.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Hauswaldt, J. S., & Glenn, T. C. (2005). Population genetics of the diamondback terrapin (*Malaclemys terrapin*). *Molecular Ecology*, 14, 723–732. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02451.x>
- Hay, J. M., Daugherty, C. H., Cree, A., & Maxson, L. R. (2003). Low genetic divergence obscures phylogeny among populations of *Sphenodon*, remnant of an ancient reptile lineage. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29, 1–19. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00091-5](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00091-5)
- Hendrickson, D. A., Marks, J. C., Moline, A. B., Dinger, E., & Cohen, A. E. (2008). Combining ecological research and conservation: A case study in Cuatro Ciénegas, Mexico. In L. Stevens, & V. J. Meretsky (Eds.), *Aridland springs in North America: Ecology and conservation* (pp. 127–157). University of Arizona Press.
- Hoffman, A. A., Sgrò, C. M., & Kristensen, T. N. (2017). Revisiting adaptive potential, population size, and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 32, 506–517. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2017.03.012>
- Holman, J. A., & Fritz, U. (2005). The box turtle genus *Terrapene* (Testudines: Emydidae) in the Miocene of the USA. *The Herpetological Journal*, 15, 81–90.
- Howeth, J. G., McGaugh, S. E., & Hendrickson, D. A. (2008). Contrasting demographic and genetic estimates of dispersal in the endangered Coahuilan box turtle: A contemporary approach to conservation. *Molecular Ecology*, 17, 4209–4221. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03904.x>
- Jacobsen, M. W., Hansen, M. M., Orlando, L., Bekkevoeld, D., Bernatchez, L., Willerslev, E., & Gilbert, M. T. P. (2012). Mitogenome sequencing reveals shallow evolutionary histories and recent divergence time between morphologically and ecologically distinct European whitefish (*Coregonus* spp.). *Molecular Ecology*, 21, 2727–2742.
- Johnson, S. G. (2005). Age, phylogeography, and population structure of the microendemic banded spring snail, *Mexipyrargus churinceanus*. *Molecular Ecology*, 14, 2299–2311. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2005.02580.x>

- Jones, A. T., Ovenden, J. R., & Wang, Y. G. (2017). Improved confidence intervals for the linkage disequilibrium method for estimating effective population size. *Heredity*, 117, 217–223. <https://doi.org/10.1038/hdy.2016.19>
- Kalinowski, S. T., Wagner, A. P., & Taper, M. L. (2006). ML-Relate: A computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes*, 6, 576–579. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01256.x>
- Kimble, S. J. A., Rhodes, O. E. Jr, & Williams, R. N. (2014). Unexpectedly low rangewide population genetic structure of the imperiled eastern box turtle *Terrapene c. carolina*. *PLoS ONE*, 9, e92274. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092274>
- King, T. L., & Julian, S. E. (2004). Conservation of microsatellite DNA flanking sequence across 13 emydid genera assayed with novel bog turtle (*Glyptemys muhlenbergii*) loci. *Conservation Genetics*, 5, 719–725. <https://doi.org/10.1007/s10592-004-1854-0>
- Klemens, M. W. (2000). Introduction. In M. W. Klemens (Ed.), *Turtle conservation* (pp. 1–4). Smithsonian Institution Press.
- Kuo, C. H., & Janzen, F. J. (2004). Genetic effects of a persistent bottleneck on a natural population of ornate box turtles (*Terrapene ornata*). *Conservation Genetics*, 5, 425–437. <https://doi.org/10.1023/B:COGE.0000041020.54140.45>
- Lande, R. (1993). Risks of population extinction from demographic and environmental stochasticity and random catastrophes. *The American Naturalist*, 142, 911–927. <https://doi.org/10.1086/285580>
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., ... Thompson, J. D. (2007). Clustal W and Clustal X v2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947–2948.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451–1452. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
- Macip-Rios, R., Ontiveros, R., López-Alcaide, S., & Casas-Andreu, G. (2015). The conservation status of the freshwater and terrestrial turtles of Mexico: A critical review of biodiversity conservation strategies. *Revista Mexicana De Biodiversidad*, 86, 1048–1057. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2015.09.013>
- Manni, F., Guerard, E., & Heyer, E. (2004). Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: How barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. *Human Biology*, 76, 173–190. <https://doi.org/10.1353/hub.2004.0034>
- Martin, B. T., Bernstein, N. P., Birkhead, R. D., Koukl, J. F., Musmann, S. M., & Placyk, J. S. Jr (2013). Sequence-based molecular phylogenetics and phylogeography of the American box turtles (*Terrapene* spp.) with support from DNA barcoding. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 68, 119–213. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.03.006>
- Matschiner, M., & Salzburger, W. (2009). TANDEM: Integrating automated allele binning into genetics and genomics workflows. *Bioinformatics*, 25, 1982–1983. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp303>
- Metcalfe, S., Say, A., Black, S., McCulloch, R., & O'Hara, S. (2002). Wet conditions during the last glaciation in the Chihuahuan Desert, Alta Babicora Basin, Mexico. *Quaternary Research*, 57, 91–101. <https://doi.org/10.1006/qres.2001.2292>
- Meyer, E. R. (1973). Late-Quaternary paleoecology of the Cuatro Ciénegas Basin, Coahuila, Mexico. *Ecology*, 54, 982–995. <https://doi.org/10.2307/1935565>
- Miller, J. K. (2001). Escaping senescence: Demographic data from the three-toed box turtle (*Terrapene carolina triunguis*). *Experimental Gerontology*, 36, 829–832. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(00\)00243-6](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00243-6)
- Milstead, W. W. (1960). Relict species of the Chihuahuan Desert. *The Southwestern Naturalist*, 5, 75–88. <https://doi.org/10.2307/3669459>
- Mimura, M., Yahara, T., Faith, D. P., Vázquez-Domínguez, E., Colautti, R. I., Araki, H., ... Hendry, A. P. (2017). Understanding and monitoring the consequences of human impacts on intraspecific variation. *Evolutionary Applications*, 10, 121–139. <https://doi.org/10.1111/eva.12436>
- Minckley, T. A., & Jackson, S. T. (2008). Ecological stability in a changing world? Reassessment of the palaeoenvironmental history of Cuatrociénegas, Mexico. *Journal of Biogeography*, 35, 188–190. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2007.01829.x>
- Mockford, S. W., McEachern, L., Herman, T. B., Snyder, M., & Wright, J. M. (2005). Population genetic structure of a disjunct population of Blanding's turtle (*Emydoidea blandingii*) in Nova Scotia, Canada. *Biological Conservation*, 123, 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2004.11.021>
- Nei, M., Maruyama, T., & Chakraborty, R. (1975). The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, 29, 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1975.tb00807.x>
- Peakall, R. O. D., & Smouse, P. E. (2006). GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 288–295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
- Pianka, E. R. (1974). *Evolutionary ecology*. Harper and Rowe.
- Piry, S., Luikart, G., & Cornuet, J. M. (1999). BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, 90, 502–503.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945–959.
- Rambaut, A., & Drummond, A. J. (2015). TreeAnnotator v1. 8.2. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. Retrieved from <https://beast.community/treeannotator>
- Reid, B. N., & Peery, M. Z. (2014). Land use patterns skew sex ratios, decrease genetic diversity and trump the effects of recent climate change in an endangered turtle. *Diversity and Distributions*, 20, 1425–1437. <https://doi.org/10.1111/ddi.12243>
- Rice, W. R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43, 223–225. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1989.tb04220.x>
- Rosenbaum, P. A., Robertson, J. M., & Zamudio, K. R. (2007). Unexpectedly low genetic divergences among populations of the threatened bog turtle (*Glyptemys muhlenbergii*). *Conservation Genetics*, 8, 331–342. <https://doi.org/10.1007/s10592-006-9172-3>
- Rousset, F. (2008). Genepop'007: A complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, 103–106. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x>
- Schmidt, K. P., & Owens, D. W. (1944). Amphibians and reptiles of northern Coahuila, Mexico. *Zoological Series of the Field Museum of Natural History*, 29, 97–116.
- Scribner, K. T., Evans, J. E., Morreale, S. J., Smith, M. H., & Gibbons, J. W. (1986). Genetic divergence among populations of the yellow-bellied slider turtle (*Pseudemys scripta*) separated by aquatic and terrestrial habitats. *Copeia*, 1986, 691–700. <https://doi.org/10.2307/1444951>
- Semarnat (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, protección ambiental especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación, 6 de marzo 2002.
- Sherwin, W. B., & Moritz, C. (2000). Managing and monitoring genetic erosion. In A. G. Young, & G. M. Clarke (Eds.), *Genetics, demography and viability of fragmented populations* (pp. 9–34). Cambridge University Press.
- Shoemaker, K. T., & Gibbs, J. P. (2013). Genetic connectivity among populations of the threatened bog turtle (*Glyptemys muhlenbergii*) and the need for a regional approach to turtle conservation. *Copeia*, 2013, 324–331. <https://doi.org/10.1643/OT-12-022>
- Smith, G. I. (1984). Paleohydrologic regimes in the southwestern great basin, 0–3.2 my ago, compared with other long records of "global" climate. *Quaternary Research*, 22, 1–17.

- Souza, V. C., Beaumont, M. A., Fernandes, P., Coelho, M. M., & Chikhi, L. (2012). Population divergence with or without admixture: Selecting models using an ABC approach. *Heredity*, 108, 521–530. <https://doi.org/10.1038/hdy.2011.116>
- Souza, V., Espinosa-Asuar, L., Escalante, A. E., Eguarte, L. E., Farmer, J., Forney, L., Lloret, L., Rodríguez-Martínez, J. M., Soberon, X., Dirzo, R., & Elser, J. J. (2006). An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahuan desert. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 6565–6570. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601434103>
- Souza, V., Moreno-Letelier, A., Travisano, M., Alcaraz, L. D., Olmedo, G., & Eguarte, L. E. (2018). The lost world of Cuatro Ciénegas Basin, a relictual bacterial niche in a desert oasis. *eLife*, 7, e38278. <https://doi.org/10.7554/eLife.38278>
- Souza, V., Siefert, J. L., Escalante, A. E., Elser, J. J., & Eguarte, L. E. (2012). The Cuatro Ciénegas Basin in Coahuila, Mexico: An astrobiological precambrian park. *Astrobiology*, 12, 641–647. <https://doi.org/10.1089/ast.2011.0675>
- Spinks, P. Q., & Shaffer, H. B. (2009). Conflicting mitochondrial and nuclear phylogenies for the widely disjunct Emys (Testudines: Emydidae) species complex, and what they tell us about biogeography and hybridization. *Systematic Biology*, 58, 1–20. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syp005>
- Spinks, P. Q., Thomson, R. C., McCartney-Melstad, E., & Shaffer, H. B. (2016). Phylogeny and temporal diversification of the New World pond turtles (Emydidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 103, 85–97.
- Standford, C. B., Iverson, J. B., Rhodin, A. G. J., Paul van Dijk, P., Mittermeier, R. A., Kuchling, G., ... Walde, A. D. (2020). Turtles and tortoises are in trouble. *Current Biology*, 30, R721–R735.
- Sunny, A., Duarte-deJesus, L., Aguilera-Hernández, A., Ramírez-Corona, F., Suárez-Atilano, M., Percino-Daniel, R., ... González-Fernández, A. (2019). Genetic diversity and demography of the critically endangered Roberts' false brook salamander (*Pseudoeurycea robertsi*) in Central Mexico. *Genetica*, 147, 149–164. <https://doi.org/10.1007/s10709-019-00058-2>
- Sunny, A., Monroy-Vilchis, O., Reyna-Valencia, C., & Zarco-González, M. M. (2014). Microhabitat types promote the genetic structure of a micro-endemic and critically endangered mole salamander (*Ambystoma leorae*) of Central Mexico. *PLoS ONE*, 9, e103595. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103595>
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123, 585–595.
- Tessier, N., Paquette, S. R., & Lapointe, F. J. (2005). Conservation genetics of the wood turtle (*Glyptemys insculpta*) in Quebec, Canada. *Canadian Journal of Zoology*, 83, 765–772.
- Todd, B. D., Willson, J. D., & Gibbons, J. W. (2010). The global status of reptiles and causes of their decline. In D. W. Sparling, C. A. Bishop, & S. Krest (Eds.), *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*, 2nd ed. (pp. 47–67). CRC Press.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P., & Shipley, P. (2004). MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4, 535–538. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>
- Vargas-Ramírez, M., Chiari, Y., Castaño-Mora, O. V., & Mens, S. B. (2007). Low genetic variability in the endangered Colombian endemic freshwater turtle *Podocnemis lewyana* (Testudines, Podocnemididae). *Contributions to Zoology*, 76, 1–7. <https://doi.org/10.1163/18759866-07601001>
- Vargas-Ramírez, M., Stuckas, H., Castano-Mora, O. V., & Fritz, U. (2012). Extremely low genetic diversity and weak population differentiation in the endangered Colombian river turtle *Podocnemis lewyana* (Testudines: Podocnemididae). *Conservation Genetics*, 13, 65–77. <https://doi.org/10.1007/s10592-011-0263-4>
- Wakchaure, R., & Ganguly, S. (2016). Captive breeding in endangered wildlife: A review. *Journal of Biological & Scientific Opinion*, 4, 186–187. <https://doi.org/10.7897/2321-6328.04544>
- Walker, D., Moler, P. E., Buhlmann, K. A., & Avise, J. C. (1998). Phylogeographic uniformity in mitochondrial DNA of the snapping turtle (*Chelydra serpentina*). *Animal Conservation*, 1, 55–60. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1795.1998.tb00226.x>
- Waples, R. S., & Do, C. (2010). Linkage disequilibrium estimates of contemporary N_e using highly variable genetic markers: A largely untapped resource for applied conservation and evolution. *Evolutionary Applications*, 3, 244–262.
- Webb, R. G., Minckley, W. L., & Craddock, J. E. (1963). Remarks on the Coahuilan box turtle, *Terrapene coahuila* (Testudines, Emydidae). *The Southwestern Naturalist*, 8, 89–99. <https://doi.org/10.2307/3669551>
- Williams, S. E., & Hoffman, E. A. (2009). Minimizing genetic adaptation in captive breeding programs: A review. *Biological Conservation*, 142, 2388–2400. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.05.034>
- Wilson, G. A., & Rannala, B. (2003). Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics*, 163, 1177–1191.
- Wolaver, B. D., Sharp, J. M. Jr, Rodríguez, J. M., & Ibarra-Flores, J. C. (2008). Delineation of regional arid karstic aquifers: An integrative data approach. *Ground Water*, 2008, 1–16. <https://doi.org/10.1111/j.1745-6584.2007.00405.x>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Cortés-Rodríguez X, Borja-Martínez G, Vázquez-Domínguez E. Striking habitat reduction, decreased genetic diversity, and imperilled conservation of natural populations of *Terrapene coahuila*. *Freshw Biol.* 2021;00:1–17. <https://doi.org/10.1111/fwb.13681>

Striking habitat reduction, decreased genetic diversity, and imperiled conservation of natural populations of *Terrapene coahuila*

Xochiquetzal Cortés-Rodríguez, Gabriela Borja-Martínez, Ella Vázquez-Domínguez

Supplementary material

Tables S1-S7

Figures S1-S3

Table S1. GenBank accession numbers of the sequences used in the divergence time estimation for *Terrapene coahuila* from Cuatrociénegas, México.

Species	GenBank Accession number
<i>Terrapene carolina</i>	EU787029, AF258871
<i>Terrapene ornata</i>	AF258874
<i>Terrapene nelsoni</i>	AF258873
<i>Terrapene coahuila</i>	AF258872
<i>Glyptemys muhlenbergii</i>	DQ499648
<i>Glyptemys insculpta</i>	DQ499650
<i>Emydoidea blandingii</i>	AF258869
<i>Emys marmorata</i>	AF258867
<i>Clemmys guttata</i>	AF258870
<i>Trachemys scripta</i>	AF207750
<i>Malaclemys terrapin</i>	NC_031300
<i>Graptemys flavimaculata</i>	LT827419
<i>Chrysemys picta</i>	AF258878
<i>Pseudemys rubiventris</i>	HE590309
<i>Deirochelys reticularia</i>	AF258877

Table S2. Genetic diversity and neutrality tests for *Terrapene coahuila* from Cuatrociénegas, México, based on the cytochrome *b* (*cyt b*) and d-loop genes (37 sequences), and the concatenated dataset (Conc; 36 sequences). Diversity indices: number of haplotypes (Nh), number of segregating sites (*S*), haplotype (*h*) and nucleotide (π) diversity; neutrality tests: Tajima's *D*, Fu and Li's *F*, and Fu's *F_S*.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

gene	Nh	S	<i>h</i>	π	<i>D</i>	<i>F</i>	<i>F_S</i>
<i>cyt b</i>	5	4	0.254	0.00031	-1.754**	-2.339	-3.588 ***
d-loop	5	4	0.441	0.00081	-1.220	2.153	-2.413*
Conc	10	8	0.609	0.0005	-1.762**	-2.790*	-7.575***

Table S3. SAMOVA results based on cytochrome *b*: five groups detected (**a**), d-loop: 2 groups (**b**) and concatenated genes: two groups (**c**), considering the six sampling localities (populations) of *Terrapene coahuila* from Cuatrociénegas, Mexico.

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
a)				
Between groups	4	0.987	0.03926	16.24
Among populations within groups	1	0.000	-0.04547	-18.80
Within populations	31	7.689	0.24803	102.57
Total	36	8.676	0.24182	
b)				
Between groups	1	2.987	0.28254	63.93
Among populations within groups	4	0.585	-0.00257	-0.58
Within populations	31	5.022	0.16201	36.65
Total	36	8.595	0.44198	
c)				
Between groups	1	3.211	0.29167	43.48
Among populations within groups	4	1.189	-0.01673	-2.49
Within populations	30	11.878	0.39593	59.02
Total	35	16.278	0.67086	

Table S4. Pairwise F_{ST} between sampling localities for *Terrapene coahuila* from Cuatrociénegas, Mexico. Values shown from Arlequin (below diagonal) and FreeNa (above). Significant values: * $p < 0.05$

	Charcos Prietos	Churince	La Angostura	La Pileta	Los Gatos	Tierra Blanca
Charcos Prietos	0	0.0157	0.0109	0	0.0091	0.0122
Churince	0.0180*	0	0.0181	0.0397	0.0339	0.0066
La Angostura	0.0122*	0.0182	0	0.0111	0.0210	0.0089
La Pileta	-0.0051	0.0423*	0.0110	0	0.0002	0.0189
Los Gatos	0.0104	0.0384*	0.0264*	0.0016	0	0.0173
Tierra Blanca	0.0075	0.0083	0.0050	0.0123	0.0221*	0

Table S5. Relatedness (%) between individuals of *Terrapene coahuila* from Cuatrociénegas, Mexico, per sampling locality (CP: Charcos Prietos, Ch: Churince, LA: La Angostura, LP: La Pileta, LG: Los Gatos, TB: Tierra Blanca) and per genetic cluster (CE and CW).

	CP	Ch	LA	LP	LG	TB	CE	CW
Unrelated	86.8	93.94	94.3	100	88.3	90.8	84.6	85.3
Half-siblings	11.3	3.03	4.8	0	9.6	8.3	13.7	13.3
Full-siblings	1.2	3.03	0.9	0	0.4	0.8	0.8	0.8
Parent/offspring	0.7	0	0	0	1.7	0	0.9	0.6

Table S6. Bottleneck results for *Terrapene coahuila* from Cuatrociénegas, Mexico, tested for heterozygote excess under mutation-drift equilibrium with Bottleneck v5.1.26, per sampling locality (< 20 individuals) and per genetic cluster. Significance was evaluated with a Wilcoxon test, one-tailed (indicted with asterisk).

Sampling locality	Mutational models	P
Charcos Prietos	IAM	0.01709*
	SMM	0.97876
	TPM (SMM: 70%; IAM: 30%)	0.08813
Los Gatos	IAM	0.16968
	SMM	0.99829
	TPM (SMM: 70%; IAM: 30%)	0.74072
Genetic cluster		
Genetic cluster CE	IAM	0.00671*
	SMM	0.99878
	TPM (SMM: 70%; IAM: 30%)	0.28467
Genetic cluster CW	IAM	0.00122*
	SMM	0.98291
	TPM (SMM: 70%; IAM: 30%)	0.28467

Table S7. Effective population sizes (N_e) for the two genetic clusters (CE, CW) estimated with the Linkage disequilibrium method and two values for excluding low allele frequencies (0.02, 0.01), using NeEstimator; 95% confidence intervals (CI) based on the parametric test.

	N_e (0.02)	95% CI	N_e (0.01)	95% CI
Cluster CE	343.5	168.3 - 6128.9	308.4	161.1 - 1827.7
Cluster CW	625	144.8 - ∞	139.8	79.2 - 440.5

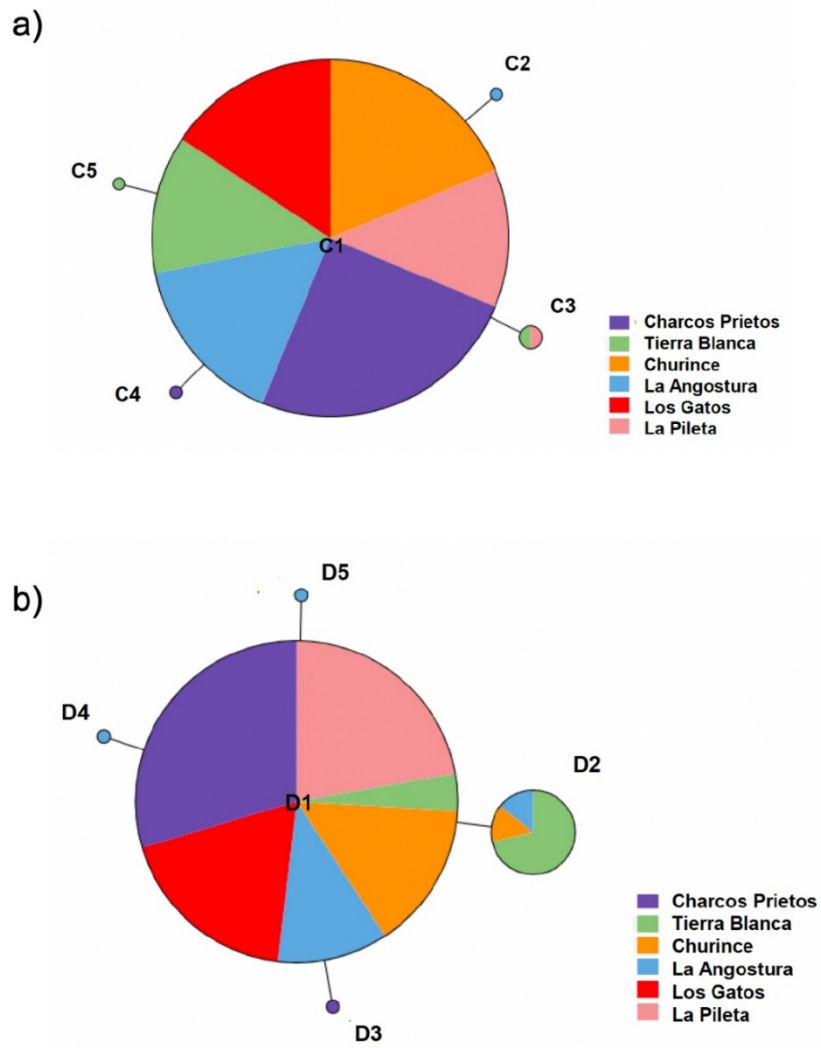


Figure S1. Haplotype networks based on cytochrome b (a) and d-loop (b) for *Terrapene coahuila* from Cuatrociénegas, México. Circle size proportional to the relative haplotype frequency, while sampling sites are shown in different colors: Charcos Prietos (purple), Tierra Blanca (green), Churince (orange), La Angostura (blue), Los Gatos (red) and La pileta (pink).

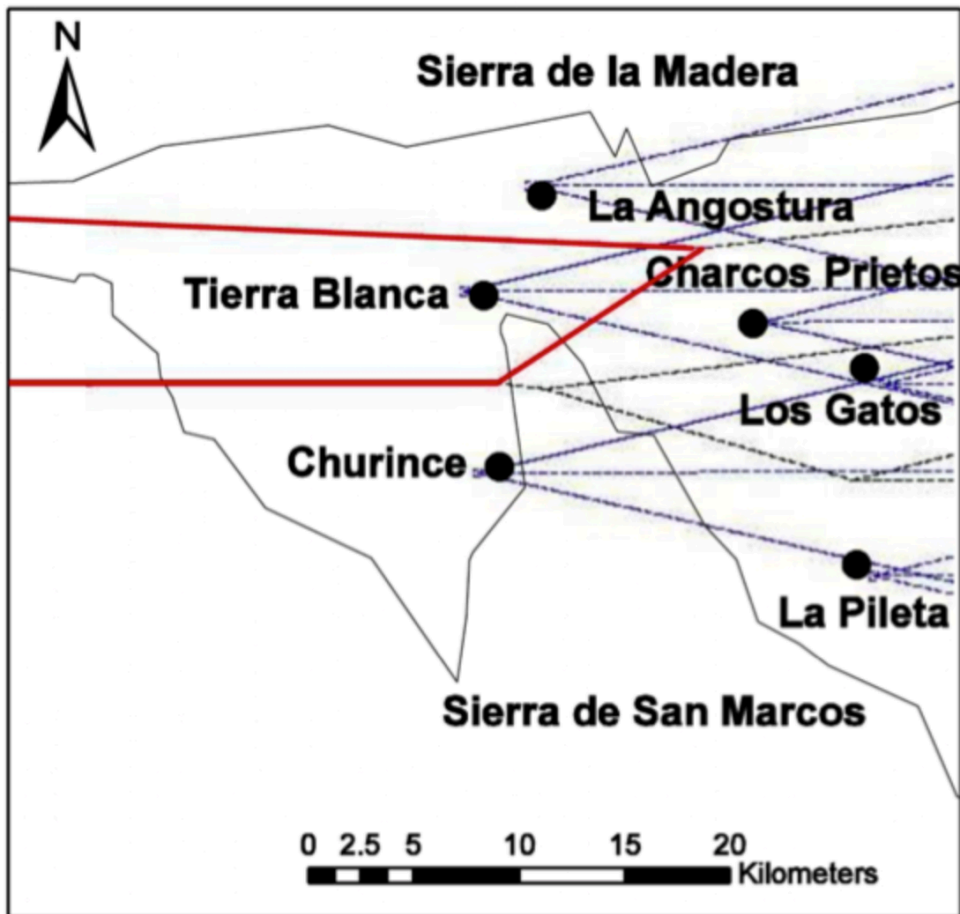


Figure S2. SAMOVA map for the cytochrome b and d-loop concatenated genes for *Terrapene coahuila* from Cuatrociénegas, México. Genetic barriers between groups are shown in red, where Group 1 includes Tierra Blanca and Group 2 the rest of sampling localities. Blue lines correspond to Voronoi cells.

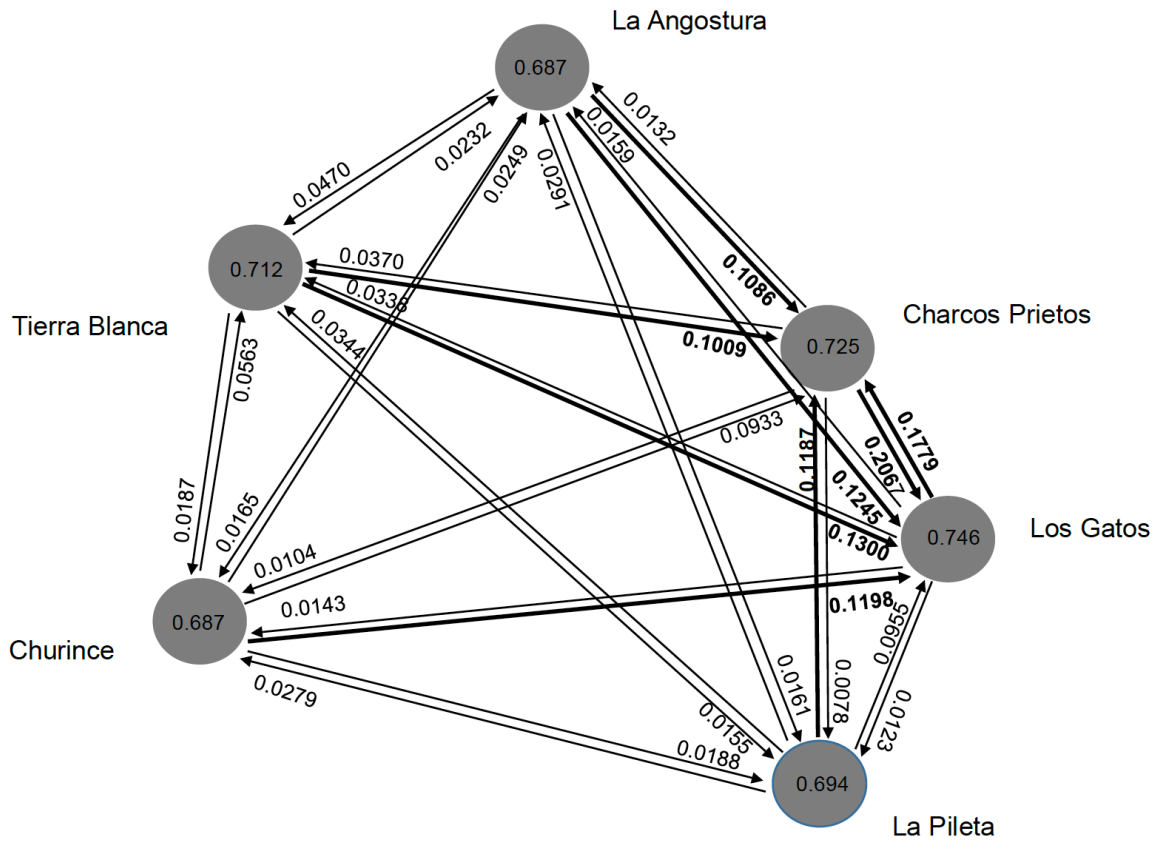


Figure S3. Migration rates between sampling localities of *Terrapene coahuila* from Cuatrociénegas, México estimated with BayesAss v.1.1.3. Values within circles show the percentages of residents in each sampling locality. The tips of the arrows indicate the direction of migration, values above tips show migration rates and dark lines with bold numbers indicate the highest migration rates.

CAPÍTULO 3

“Tortuga bisagra: una aproximación desde la genética del paisaje”

Xochiquetzal Cortés-Rodríguez y Ella Vázquez-Domínguez

CAPÍTULO 3

Tortuga bisagra: una aproximación desde la genética del paisaje

Xochiquetzal Cortes Rodríguez^{1,2} Ella Vázquez Domínguez¹

1 Departamento de Ecología de la Biodiversidad, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, México

2 Posgrado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

Autor de correspondencia

Ella Vázquez-Domínguez, Departamento de Ecología de la Biodiversidad, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México 04510, México.

Email: evazquez@ecologia.unam.mx

INTRODUCCIÓN

Los desiertos están definidos por sus condiciones áridas, esencialmente por la escasa precipitación. A pesar de que los desiertos son uno de los ecosistemas más extendidos del mundo, la heterogeneidad que hay entre ellos es mucho más alta que la de cualquier otro bioma (Ward, 2016; WWF, 2022). En este ambiente, la selección natural actúa en condiciones extremas sobre los organismos, teniendo como resultado una gran cantidad de endemismos (Ward, 2016). El desierto Chihuahuense es el más grande de Norteamérica, se extiende desde el sur de Nuevo México hasta el centro de México y alberga una alta diversidad biológica (Grünberger, 2004). Al interior de este desierto se encuentra el valle de Cuatrociénegas que alberga cerca de 70 especies endémicas (Souza et al., 2006). Esta región está considerada vulnerable por la WWF (2022), cuyas principales amenazas son el cambio de uso de suelo, sobre todo por actividad agrícola, cambio climático global, cambio en los regímenes de incendios y deterioro de los ecosistemas dulceacuícolas (Briggs, 2019). Estas presiones ambientales se traducen directamente en pérdida y fragmentación del hábitat y alteran procesos ecológicos, de conectividad y uso del paisaje. Todo ello afecta directamente a las poblaciones naturales de flora y fauna, disminuyendo el tamaño poblacional y poniéndolas eventualmente en riesgo de extinción (Ewers y Didham, 2006; Hand et al., 2014, Haddad et al., 2015).

Diversos autores han descrito que la fragmentación reduce el flujo génico entre las poblaciones, lo que tiene efectos adversos como la depresión por endogamia, reducción en la diversidad tanto neutral como adaptativa y la susceptibilidad a la deriva génica (Lander et al., 2019; Nevill et al., 2019). Por lo tanto, es de suma importancia incluir en los trabajos enfocados a la conservación, preguntas que involucren tanto la caracterización y evaluación del hábitat, como su impacto en los patrones genéticos de las especies (Spear et al., 2010). La genética del paisaje combina modelos espaciales y datos de genética de poblaciones para determinar cómo las características del paisaje pueden actuar como barreras o corredores para el flujo génico y a su vez modelar la distribución espacial de la diversidad genética, es decir la conectividad funcional (Holderegger y Wagner, 2006).

El efecto de los factores del paisaje sobre la distribución y estructura genética se ha evaluado comúnmente con base en tres principales hipótesis, la primera, la cual funciona generalmente como hipótesis nula, es el aislamiento por distancia (IBD por sus siglas en inglés), la cual predice que las diferencias genéticas aumentan con la distancia geográfica entre poblaciones (Wright, 1943; Jenkins et al., 2010). Como hipótesis alternas se pueden considerar

las hipótesis de aislamiento por resistencia (IBR por sus siglas en inglés) y de aislamiento por ambiente (IBE por sus siglas en inglés), donde en la primera se asignan valores de resistencia para estimar la conectividad del paisaje usando algoritmos como el de Circuitscape. Los valores de resistencia del paisaje posteriormente se comparan con distancias genéticas pareadas para identificar qué características del paisaje predicen mejor los patrones de diversidad y estructura genética (McRae, 2006; Spear et al., 2010, 2015; Zeller et al., 2012; Van Etten, 2017; Peterman et al., 2014, 2018). El aislamiento por ambiente se define como un patrón en el que la diferenciación genética aumenta con las diferencias ambientales, independientemente de la distancia geográfica, su evaluación en su forma más sencilla, se lleva a cabo comparando distancias generadas considerando variables abióticas y bióticas (heterogeneidad ambiental) y distancias genéticas, con base en las cuales se determina la relación entre ambiente y flujo génico (Manel et al., 2003; Wang y Bradburd, 2014). Cabe señalar que, desde el enfoque de la genética del paisaje, es posible realizar estas evaluaciones tanto a nivel individual como poblacional, según sea la distribución de las especies de estudio en el ambiente natural (Balkenhol et al., 2016).

Aunque las tortugas son un modelo muy estudiado, Cortés-Rodríguez y Vázquez-Domínguez (en prensa), en una revisión sobre genética del paisaje, encontraron sólo cuatro trabajos realizados en desiertos. Dichos estudios se basaron en tortugas del género *Gopherus* (Latch et al., 2011; Hagerty et al., 2011; Richter et al., 2011; Sánchez-Ramírez et al., 2018). Ello hace evidente, en primer lugar, la necesidad de evaluar otras especies de tortugas, para poder conocer y describir los patrones entre la diversidad genética, estructuración, flujo génico y elementos del paisaje de estos organismos en ecosistemas desérticos. Asimismo, dado que la conectividad funcional depende, entre otros, de la capacidad de dispersión, es clave considerar las características particulares de historia de vida de las especies, así como el tipo de hábitat, el área de distribución y la escala geográfica del estudio.

La tortuga bisagra *Terrapene coahuila* es una especie microendémica que habita en el valle de Cuatrociénegas, Coahuila, México. Se caracteriza por ser longeva y con bajos índices de dispersión. Está catalogada como amenazada según la Norma Oficial Mexicana (Semarnat, 2010) y clasificada como “en Peligro” por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) (van Dijk et al., 2017). Sólo existen dos trabajos que hayan evaluado genéticamente las poblaciones de esta especie (Howeth et al., 2008 y Cortés-Rodríguez et al., 2021). Estos estudios han documentado estructuración y diferenciación genética, así como el papel que juega la distancia en la conectividad en estas tortugas. Sin embargo, no se ha evaluado cuantitativamente el efecto de la matriz del desierto, los cuerpos de agua y elementos antropogénicos en el valle sobre dicha conectividad. Ello es urgente debido a que el hábitat de la tortuga bisagra se ha reducido en un 90%, alcanzando actualmente apenas 5.4 km² (CITES, 2022). La genética del paisaje provee el marco teórico y las herramientas metodológicas adecuadas para realizar una evaluación de esta naturaleza. En otras especies de tortugas de desierto se ha encontrado que la perturbación en los ecosistemas áridos tiene impactos no sólo a corto plazo, sino que a largo plazo existe el riesgo de que el hábitat no pueda recuperarse (USFWS, 2011).

En el presente trabajo planteamos los siguientes objetivos, 1) caracterizar las variables del desierto que definen la matriz del paisaje a lo largo de la distribución de *Terrapene coahuila* en el valle de Cuatrociénegas (distancia geográfica, vegetación, presencia cuerpos de agua, humedad, caminos y canales y elevación), 2) evaluar los efectos de las características del paisaje y su relación con los patrones de estructura genética y flujo de génico de las poblaciones de la tortuga bisagra, y 3) determinar cuál es la asociación de las características biológicas de la especie con los resultados genéticos del paisaje.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y muestreo

El Área de Protección de Flora y Fauna Cuatrociénegas es un valle casi plano (700 msnm), con una superficie de 150,000 ha, ubicada en la parte central del estado de Coahuila (26°45'00"-27°00'00" N; 101°48'49"-102°17'53" O). Está delimitada por las sierras La Madera y La Menchaca al norte, al oeste La Purísima y San Vicente, al sur San Marcos y Pinos y al sureste La Fragua (Carabias et al., 1999). El clima se caracteriza por ser seco, semicálido, con lluvias predominantes en verano con temperaturas altas de hasta 44°C e inviernos frescos con temperaturas bajo cero (Minckley, 1969). El clima y la vegetación en la cuenca se ha mantenido similar durante ca. 30.000 años, como se infiere de la cronología del polen y la datación por radiocarbono (Meyer, 1973).

La precipitación pluvial varía entre 100 y 440 mm, con un potencial de evaporación anual de hasta 2,000 mm (Carabias et al., 1999; SEMARNAT, 2003). En el valle existen algunos ríos, arroyos y cerca de 200 cuerpos de agua, pozas y humedales formados a partir de manantiales geotérmicos con diámetros que van desde menos de un metro hasta más de 100 m, y profundidades entre 50 cm hasta 18 m. Algunas de las pozas están comunicadas de forma natural, pero también artificialmente por un sistema de canales (Evans, 2005). La cuenca de Cuatrociénegas estuvo naturalmente cerrada hasta 1898 cuando se abrió artificialmente a través de diversos canales, tales como de la Puerta Colorada, Canal de Escobedo, Canal de Tío Cándido, Canal de las Puentes Cuatas, Canal del Puente Chiquito, Canal Saca Salada, Canal de la Becerra y Santa Tecla (Minckley, 1969; WWF, 1999). A partir de la mitad del siglo pasado se han ido fragmentando los humedales que alguna vez fueron contiguos, resultando en varios complejos de cuerpos de agua separados por grandes extensiones de matriz del desierto (Souza et al., 2006).

La vegetación dominante incluye pastizal halófilo y vegetación acuática en el piso de la cuenca (*Carex* spp., *Chara* sp., *Cladium mariscus*, *Distichlis stricta*, *Eleocharis rostellata*, *Fimbristylis thermalis*, *Schoenoplectus americanus* y *Scirpus olneyi*) (Meyer, 1973; Brown, 1974; Pinkava 1984; Howeth et al., 2011), mientras que en las partes más elevadas hay plantas gipsófilas, matorral xerófilo y matorral submontano. Los bosques de pino están por encima de los 2000 m en las cimas de las montañas colindantes (Meyer, 1973).

El muestreo abarcó el área de distribución completa de *Terrapene coahuila* (Figura 1) colectándose 110 individuos en seis cuerpos de agua (pozas y humedales): Churince (CH), Tierra Blanca (TB), La Angostura (LA), Charcos Prietos (CP), Los Gatos (LG) y La Pileta (LP), de mayo de 2015 a marzo de 2016. Las tortugas se capturaron de manera oportunista caminando en transectos lineales y circulares alrededor de cada cuerpo de agua. Los individuos fueron marcados con marcas en el caparazón, fotografías y marcas previas realizadas por la CONANP para evitar remuestreo, se tomaron muestras de tejido (cola, <0.5cm²) y sangre (<0.5 ml) de la vena caudal, que se almacenaron en etanol al 70% y buffer de sangre, respectivamente (Tris-HCl 100 mM, pH 8.0; EDTA 100 mM, pH 8.0; NaCl 10 mM; 2% SDS), las cuales se trasladaron al laboratorio para posterior trabajo molecular.

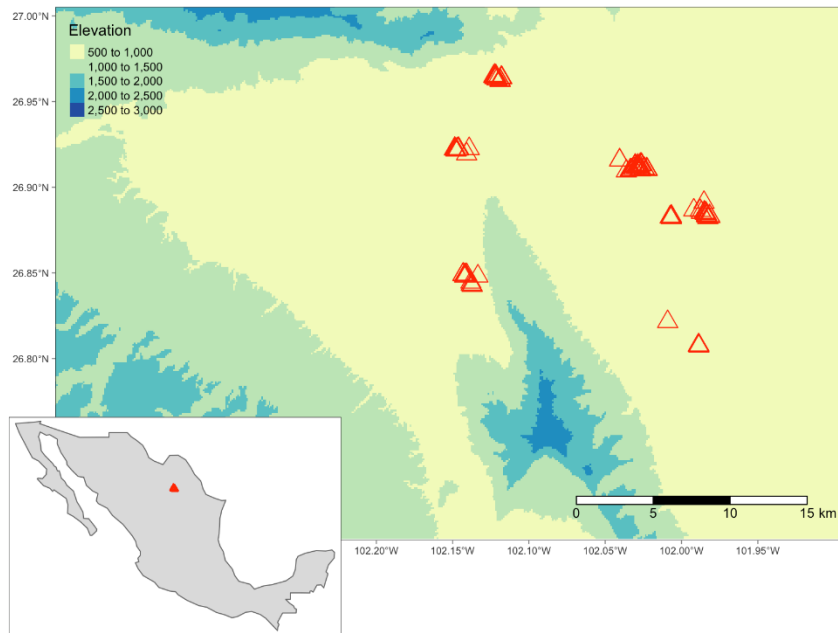


Figura 1. Sitio de estudio y localidades de muestreo. Los triángulos rojos indican la ubicación de los individuos muestreados de *Terrapene coahuila* en Cuatrociénegas, Coahuila, México, proyectados sobre una capa de elevación donde los tonos azules corresponden a elevaciones superiores a 1000 metros y los amarillos entre 500 y 1000.

Extracción ADN y análisis genéticos

Se extrajo el ADN con el kit DNAeasy Blood & Tissue (Qiagen, Valencia, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se amplificaron 16 loci de microsatélites, nueve desarrollados para *Glyptemys muhlenbergii* (GmuB8, GmuD16, GmuD21, GmuD40, GmuD51, GmuD70, GmuD90, GmuD107, GmuD121; King & Julian., 2004) y siete para *Terrapene carolina* (TCTB2, TCTG7, TCTO11, TCTP11, TCTQ17, TCTR7, TCTS2; Buchman et al., 2009). Las condiciones de PCR se describen en Cortes-Rodríguez et al. (2021). Solo 12 microsatélites fueron polimórficos (Tabla S1. Suplementario), por lo que se eliminaron cuatro (TCTB2, TCTO11, TCTP11, TCTQ17). El genotipado se llevó a cabo utilizando el estándar de tamaño GeneScan-500 ROX (Applied Biosystems), las lecturas de los alelos se confirmaron manualmente utilizando GENEMARKER, v.2.6.2 (SoftGenetics State College, EUA) y el redondeo del tamaño de los alelos se realizó en TANDEM (Matschiner y Salzburger 2009). Para evaluar la presencia de alelos nulos se usó Micro-Checker v.2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004), con 1000 simulaciones de Monte Carlo y un intervalo de confianza del 95% corregido por Bonferroni.

Se evaluó el desequilibrio de ligamiento entre pares de loci con una aproximación de cadenas de Markov y una prueba exacta con GenePop web v.3.6 (Rousset, 2008). Las

desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg se determinaron con Arlequin v.3.5.1.3, ajustando el valor de α con una corrección de Bonferroni (Rice, 1989).

Para evaluar la diferenciación y estructura genética se utilizó un Análisis de Discriminantes de Componentes Principales (DAPC) con el paquete adegenet 2.1.5 (Jombart et al., 2016) en R v.4.1.0 (R Core Team, 2021). Este es un método multivariado que no asume ningún modelo genético (Jombart et al., 2016) y se basa en un algoritmo de agrupación que identifica un número de grupos (k) que maximiza la variación entre grupos. Se infirió primero el número de clusters genéticos con el algoritmo K-means, probando de 1 a 6 clusters; se seleccionó el k más probable con base en el valor más pequeño del criterio de información bayesiano (BIC). Para este primer paso en la función find.clusters se conservaron 80% de los componentes principales y posteriormente se aplicó el análisis DAPC en el que se conservaron 64 componentes principales y 64 componentes de los discriminantes lineales. Se estimó asimismo la distancia de Nei corregida (Nei, 1978) entre poblaciones con gstudio (Dyer, 2014). Se evaluó aislamiento por distancia con una prueba de Mantel simple entre la distancia genética y la distancia geográfica (Euclidiana) con adegenet. Para probar autocorrelación espacial se realizó un correlograma de Mantel con ecodist (Goslee & Urban, 2007) a una escala fina (clases de 500 m), con base en la dispersión media reportada para la especie (Cueto-Mares et al., 2017). Para ambos análisis se hicieron 1000 permutaciones de Spearman y se corrieron en R.

VARIABLES DEL PAISAJE

Se generaron varias superficies (capas) de información del paisaje para la zona de estudio, considerando las variables que son significativas para la presencia, movimiento y sobrevivencia de *Terrapene coahuila*, incluyendo así el índice de Vegetación de Diferencia Normalizada (NDVI), el índice de humedad topográfica (TWI), la presencia de cuerpos de agua, la elevación y la presencia de caminos y canales, utilizando el paquete Raster en R (Hijmans, R.J. 2022) (Figuras S1-S5). 1) La elevación es una variable que sirve como proxy sobre límites para desplazarse a lo largo del paisaje, así como variaciones de temperatura (Wilson y Gallant, 2000). Esta variable se obtuvo directamente de modelos digitales de elevación (DEM) (resolución 90 m) de INEGI (2021); 2) el TWI es una variable que describe la distribución del agua en el paisaje e indica la tendencia de un píxel a acumular agua, la cual sirve como un indicador indirecto de las condiciones de humedad. Esta variable se calculó a partir del DEM con el paquete RSAGA y usando el método poly2zevenbergen (Brenning et al., 2018); 3) el NDVI se utiliza para estimar la cantidad, calidad y desarrollo de la vegetación y se calcula mediante la combinación algebraica de la intensidad de la radiación que refleja la vegetación en la región del espectro electromagnético correspondiente al rojo visible e infrarrojo cercano. El índice se obtuvo de imágenes RapidEye (resolución de 5 m) de 2013, calculado con el paquete terra (Hijmans, 2021). La imagen RapidEye fue corregida radiométricamente con el paquete RStoolbox (Leutner et al., 2019). Los valores del NDVI oscilan entre -1 y 1, donde los valores cercanos a -1 indican áreas sin vegetación y predominancia de suelo desnudo, mientras que aquellos cercanos a 1 corresponden a áreas con vegetación (a mayor sea el índice, mayor será el contenido de clorofila); 4) para los cuerpos de agua se utilizaron también las imágenes RapidEye (resolución 5 m; 2013), para construir una superficie que incluyó la ubicación discreta de cuerpos de agua, los cuales fueron identificados mediante un procedimiento de partición recursiva para árboles de clasificación de las imágenes remotas (Kamusoko, 2019). 5) la presencia de caminos y canales se realizó por medio de una clasificación binaria, se trazaron líneas sobre los caminos y canales en Google Earth y se salvaron en formato

kml; éstas fueron proyectadas posteriormente en una capa base. Todas las superficies de información fueron remuestradas a una resolución de 100 m.

Análisis de genética del paisaje

Para evaluar el efecto de las características del paisaje en el flujo génico utilizamos el marco analítico desarrollado por Peterman (2018), el cual permite determinar los valores de resistencia de las superficies ambientales que generamos. Así, la optimización de las superficies se realizó con en el paquete ResistanceGA v.4.0.0 (Peterman 2014, 2018), el cual determina los valores de resistencia de las superficies buscando maximizar la relación entre distancias pareadas del paisaje (de menor costo o de resistencia) y las genéticas (distancia genética de Nei), utilizando un algoritmo genético de optimización que no asume supuestos de modelos genéticos a través de funciones monomoleculares y de Ricker (lineal, monomolecular, monomolecular inversa, monomolecular inversa, monomolecular inverso-inverso, Ricker, Ricker inverso, Ricker inverso, inverso-inverso Ricker) para transformar superficies de resistencia (Bolker, 2008; Scrucca, 2013).

Asimismo, usa modelos lineales de efecto mixto ajustados por medio de parametrizaciones de máxima verosimilitud de efectos poblacionales (MLPE) (Clarke et al., 2002), con la paquetería lme4 en R. La variable de respuesta es la distancia genética y se realizaron los análisis a nivel de poblaciones (localidades de muestreo).

El soporte de las superficies de resistencia optimizadas se evaluó con el criterio de información de Akaike corregido para tamaño de muestra pequeño/finito (AICc; Akaike, 1974), obtenido de los modelos MLPE ajustados. A continuación, se realizó un remuestreo de datos con un bootstrap de 10,000 iteraciones para evaluar la robustez del modelo dadas diferentes combinaciones de los datos. Las superficies se optimizaron con la función commuteDistance en el programa gdistance (van Etten, 2014). Se realizaron tres réplicas independientes para probar la convergencia de los datos. Se optimizaron las superficies de cada variable ambiental de manera independiente y se realizó una prueba de correlación de Spearman ($\rho = \rho$) con stats 4.1.3 en R, para probar que las superficies no estuvieran correlacionadas.

RESULTADOS

Análisis genéticos

Se capturaron un total de 110 individuos en el área de estudio. Con base en los 12 loci de microsatélites polimórficos no se encontró evidencia significativa de presencia de alelos nulos, no se detectó desequilibrio de ligamiento, y se observó desviación del equilibrio de Hardy-Weinber en cuatro loci (Gmud51, GmuD70, Gmud121, TCTS2), sin embargo, no fue consistente entre localidades y años de muestreo. La distancia genética corregida de Nei (Nei, 1978) entre poblaciones tuvo valores entre 0.043 a 0.161 (Tabla S2).

Se identificaron dos ($k = 2$) grupos genéticos de acuerdo con la curva BIC y con base en el DAPC para el cual se retuvieron 64 PC (Figuras 2a, 2b). El diagrama de dispersión (Figuras 2c, 2d) mostró que las localidades de Churince (CH), Tierra Blanca (TB) y La Angostura (A) son más homogéneas genéticamente, grupo que se nombró Cluster Oeste, mientras que Charcos Prietos (CP), Los Gatos (LG) y La Pileta (LP) corresponden al segundo, llamado Cluster Este. Los dos grupos genéticos se separan tanto en el espacio genético, que se observa en el gráfico

de dispersión, como en el espacio físico divididos por la Sierra de San Marcos, en concordancia con lo reportado por Cortés-Rodríguez et al. (2021).

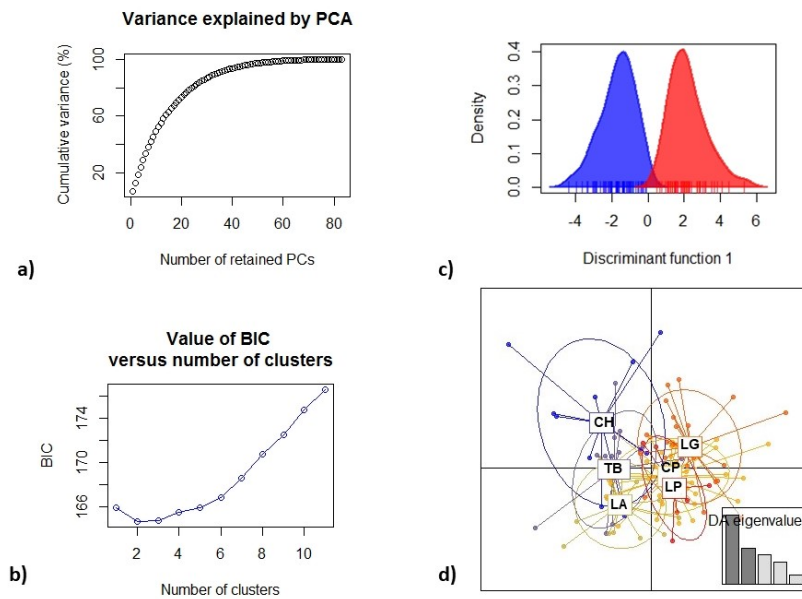


Figura 2. Análisis Discriminante de componentes principales (DAPC) para *Terrapene coahuila* en Cuatrociénegas, Coahuila, México. **a)** varianza explicada por los PCA retenidos, **b)** valores BIC, **c)** gráfico de dispersión de los clusters encontrados, **d)** diagrama de dispersión de las diferentes poblaciones.

La prueba de Mantel mostró una correlación positiva y significativa entre la distancia genética y la geográfica ($r = 0.8694$; $p = 0.001$) (Figura S6). Los correlogramas, que se realizaron para cada cluster genético por separado, no fueron significativos; el Cluster Este mostró una correlación positiva a distancias de 5.75 km ($r = 0.756$; $p = 0.676$) y para el Cluster Oeste fue negativa a distancias de 13.75 km ($r = -0.8273$; $p = 0.669$) (Figura S7).

Análisis de genética del paisaje

Los resultados de optimización y selección de modelos mostraron que las variables mejor soportadas fueron la elevación, el NDVI y el índice de TWI, las cuales explicaron el 73.31, 20.21 y 6.48% respectivamente (Tabla 1). En las curvas de optimización se observa que la elevación mostró una función Reverse Ricker, asignando alta resistencia en valores cercanos a 800 m, con una rápida disminución de la resistencia por abajo de los 800 m y por arriba de 1,000 m (Figura 2a, 3a). Las variables NDVI y TWI tuvieron resultados similares, mostrando una función Ricker e Inverse Ricker respectivamente, el NDVI con baja resistencia sólo en áreas con vegetación de escasa a media (0 - 0.2) y alta resistencia por abajo y por arriba de estos valores (Figura 2b3b), y el TWI con alta resistencia en valores de humedad de -20 y > 20 (Figura 2c3c).

Tabla 1. Resultados de la selección de los modelos de efectos mixtos lineales generalizados optimizados, con base en la distancia genética de Nei (Nei, 1978) a nivel poblacional de *Terrapene coahuila*. *k* indica el número de parámetros en la transformación de superficies continuas más el intercepto, o número de categorías en superficie binaria más el intercepto.

Superficie	<i>k</i>	Ecuación	AIC	Peso promedio	Rango promedio	Top model (%)
Elevación	4	Reverse	-	0.52272257	1.469	73.31
		Ricker	33.7671741			
TWI	4	Inverse	-32.492186	0.29567384	1.9352	6.48
		Ricker				
NDVI	4	Ricker	-	0.18160359	2.5958	20.21
			29.7885702			
Distancia Caminos y canales	2	NA	-	4.15E-13	4	0
			27.7056907			
Cuerpos de agua	3	NA	-	0	5	0
			29.4671675			
	3	NA	-	0	5	0
			23.1685868			

De acuerdo con los resultados de los análisis a nivel poblacional se realizaron correlaciones pareadas entre las superficies de NDVI, TWI y elevación, las cuales mostraron una nula y baja correlación (Tabla S3).

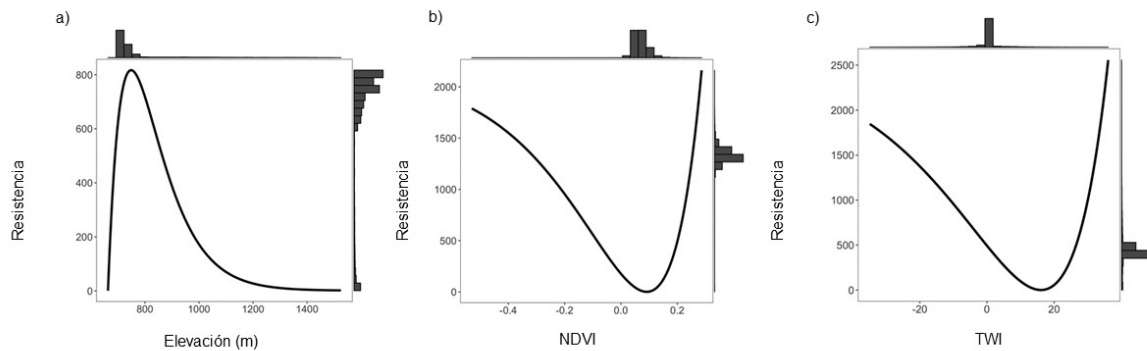


Figura 3. Curvas de respuesta de superficies univariadas optimizadas para a) elevación, b) índice de vegetación (NDVI), c) índice de humedad topográfica (TWI), respecto a la distancia genética de poblaciones de *Terrapene coahuila*.

DISCUSIÓN

Terrapene coahuila, a pesar de ser una especie muy carismática y catalogada en peligro de extinción, ha sido realmente poco estudiada a nivel genético y ecológico. Sólo existe un estudio genético previo de inicio de los años 2000 (Howet et al., 2008), y otro reciente sobre su filogeografía y diversificación (Cortés Rodríguez et al., 2021). En este trabajo realizamos una evaluación sobre la estructura genética de sus poblaciones a lo largo de su distribución en el valle de Cuatrociénegas y determinamos los elementos del paisaje que moldean dicha estructuración. En la naturaleza, diversas especies de tortugas con dispersión y movilidad limitada presentan patrones de aislamiento por distancia, donde los individuos que se encuentran más cerca geográficamente tienen distancias genéticas menores (Mockford et al., 2005, Shoemaker y Gibbs, 2013). Es el caso de *Terrapene coahuila* que presenta aislamiento por distancia significativo, donde la distancia genética fue mayor entre las localidades más lejanas geográficamente.

Esta tortuga se dispersa en el valle a través de la matriz del desierto y su sistema de canales y humedales, presenta mayor movimiento entre los cuerpos de agua más cercanos y continuos que entre los complejos de humedales lejanos (Howeth et al., 2008). Sin embargo, cabe resaltar que se han registrado valores diarios de ámbito hogareño de hasta 800 metros (Becerra-López, com. personal.), y con potencial de dispersión de algunos individuos a distancias mayores cuando se inundan los humedales (Howeth y Brown, 2011).

Se conoce que históricamente los humedales cubrían casi todo el valle (Minckley, 1969; Meyer, 1973; Souza et al., 2006), lo que favoreció la dispersión y flujo génico de ésta y otras especies de ecosistemas dulceacuícolas (Cortés Rodríguez et al., 2021). Nuestros resultados mostraron que *T. coahuila* está estructurada en dos grupos genéticos. Esto es consistente con lo encontrado por Cortés-Rodríguez y colaboradores en 2021, y se debe en gran medida a la presencia de la sierra de San Marcos. Esta sierra funcionó como una barrera a lo largo de su historia evolutiva, divergencia y expansión en el valle. Aunado a la barrera histórica, las características biológicas de la especie y las del paisaje actual, en conjunto han dado como resultado una dispersión limitada entre humedales debido a la fragmentación del hábitat. Estos resultados destacan la importancia de usar diferentes enfoques para corroborar y descifrar la estructura de las poblaciones, sobre todo en aquellas donde puede existir diferenciación en pocos kilómetros pero que no es tan evidente como en este caso (Flores- Manzanero et al., 2009)

Efectivamente, identificamos autocorrelación cuando se trató de distancias cortas, en el lado Este del valle. Ello es congruente con la dinámica de los humedales localizados en el centro del valle que están ampliamente extendidos, con formas alargadas y entre los cuales existe un alto potencial de migración resultado de los procesos naturales estacionales de contracción y expansión de los mismos (Carabias et al., 2009; Cortés Rodríguez et al., 2021). Por el contrario, del lado Oeste la correlación fue negativa, patrón asociado con el hecho de que los cuerpos de agua son pequeños y aislados con poca conectividad entre ellos.

El análisis de resistencia de curvas optimizadas indicó que la elevación, el índice de vegetación (NDVI) y el de humedad topográfica (TWI) fueron las variables de paisaje que mejor explican la conectividad. Esto evidencia la necesidad de ser cuidadosos al momento de elegir el nivel de unidad de estudio (poblaciones o individuos). Por ejemplo, las especies que no son gregarias, pero donde los individuos pueden formar grupos ('poblaciones') como resultado de la disponibilidad y el aislamiento de los cuerpos de agua que habitan, como es el caso de la tortuga bisagra. En los ambientes desérticos, las características de historia de vida de las especies, la

capacidad de dispersión, la especificidad de hábitat y la alimentación, entre otros, son factores clave a considerar cuando se evalúan los efectos del ambiente (Shirk et al., 2017; Flores Manzanero et al., 2019). La escala geográfica también es muy importante; en organismos de desierto con baja capacidad de dispersión se han identificado variables del paisaje que influyen en la conectividad funcional mayormente en escalas muy finas, con ejemplos en anfibios (Wang 2009), tortugas (Latch et al., 2011) y roedores (Flores-Manzanero et al., 2019). La escala de nuestro estudio, que abarcó la distribución completa de la tortuga bisagra en el valle, impone retos particulares para su evaluación genético-paisajística (Balkenhol et al., 2016).

La elevación es una característica clave del paisaje en términos el flujo génico de esta especie, ya que la sierra de San Marcos históricamente ha funcionado como una barrera para la dispersión, mientras que actualmente ha abonado, junto con la pérdida de los humedales, en la estructuración de sus poblaciones. En otras especies de desierto se ha reportado esta variable como una limitante no sólo por la ausencia de agua en las partes altas que propician condiciones áridas o cambios en los ensambles de vegetación, sino que también funcionan como una limitante mecánica por sus escarpadas laderas. Latch et al. (2011) y Sánchez-Ramírez et al. (2018) encontraron que las pendientes empinadas y la elevación fueron barreras efectivas para el flujo génico en *Gopherus agassizii*, otra especie de tortuga de desierto. Se tiene registro además de que las caídas accidentales de los individuos en laderas son un factor importante de mortalidad (Riedle et al., 2010).

La presencia de vegetación reflejada en el índice de NDVI es de gran importancia ya que las tortugas dependen de la escasa vegetación como un facilitador para su movimiento, sobre todo que funciona como corredor a través de la cual los individuos pueden moverse entre humedales. Ello se le ha observado de manera más activa en las asociaciones de plantas de ambientes salinos como *Distichlis spicata*, aunque también en zonas con vegetación más densa compuesta por *Eleocharis caribaea* y *Scirpus maritimus*; cabe resaltar que éstas también son fuente principal de alimento (Howeth et al., 2008, Cueto-Mares et al., 2017). Asimismo, utilizan la vegetación para esconderse de los depredadores y protegerse del sol (Howeth y Brown 2011). Es por ello que identificamos que bajos índices de NDVI asociados a áreas abiertas limitan el flujo génico de *T. coahuila*

Las tortugas terrestres tienen la capacidad de censar la humedad en los microhábitats y así guiarse a través del paisaje entre los cuerpos de agua. Un estudio controlado con *Chelydra serpentina* (Noble et al., 1938) mostró que la humedad es un factor determinante para la migración en fases de vida tempranas. En el caso de las tortugas bisagras las zonas de inundación o ciénegas son hábitats preferidos, que es donde encuentran las características adecuadas para poder cavar y enterrarse, ya sea para protegerse de depredadores, termoregular bajo el intenso sol del desierto o hibernar en el invierno, lo cual explica que el índice de humedad es una característica que favorece el flujo génico. Además, Rosell (2006) encontró que la humedad puede ser el atributo más importante que determina la ubicación de refugios en *Terrapene carolina*. Estos resultados apoyan lo sugerido por Reagan (1974) que postuló que las tortugas de caja construyen sus refugios en sitios con altos niveles de humedad independientemente del entorno circundante, y que esta especie tiene preferencia y facilidad para localizar áreas con alta humedad (Stickel, 1950; Dodd et al., 1994; Jennings, 2003).

Nuestro trabajo muestra que los cambios recientes en el paisaje pueden afectar significativamente el flujo génico aún en especies longevas de ambientes áridos, tanto a escala del microhábitat como de la distribución completa. Es importante enfatizar la importancia de

nuestros resultados para la conservación y el manejo de esta especie, que demuestran que es determinante que se favorezcan corredores de vegetación entre humedales, así como la restauración de canales de agua naturales. Es urgente también que se detenga la extracción de agua y el déficit que ello ocasiona en la región; por ejemplo, el terrible reporte en 2018 de que el valle reportó un déficit de 7.59 millones de metros cúbicos anuales con tendencia al alta (Pronatura 2018) sumado a la pérdida de los Gatos en el Churince en 2010. Si no se frena el uso desmedido de este recurso, que determina directamente la presencia de vegetación y de cuerpos de agua, significaría perder el hábitat de *Terrapene coahuila* y los procesos ecológicos que ésta regula en el valle de Cuatrociénegas.

LITERATURA CITADA

- Akaike, H. (1974). A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 19, 716–723. <https://doi.org/10.1109/TAC.1974.1100705>.
- Balkenhol, N., Cushman, S.A., Storfer, A.T., Waits, L.e P. (2016). *Landscape Genetics: Concepts, Methods, Applications*. First Edition. John Wiley and Sons Ltd.
- Bolker, B. (2008). *Ecological models and data in R*. Princeton, NJ: Princeton
- Brenning, A., Bangs, D. y Becker, M. (2018). RSAGA: SAGA Geoprocessing and Terrain AnalysisR package version 1.3.0. <https://CRAN.R-project.org/package=RSAGA>.
- Briggs, M. K., Lozano-Cavazos, E. A., Poulos, H. M., Ochoa-Espinoza, J., & Rodriguez-Pineda, J. A. (2019). The Chihuahuan Desert: A Binational Conservation Response to Protect a Global Treasure. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences.
- Brown, W.S. (1974). Ecology of the aquatic box turtle, *Terrapene coahuila* (Chelonia, Emydidae) in northern Mexico. *Bulletin of the Florida State Museum, Biological Sciences* 19,1–67.
- Carabias, L. J., Provencio, E., De la Maza, J., & Moncada, Y. S. (1999). Programa de manejo del área de protección de flora y fauna Cuatrociénegas. Instituto Nacional de Ecología SEMARNAP. DF, México, 167pp.
- Clarke, R.T., Rothery, P. & Raybould, A.F. (2002). Confidence limits for regression relationships between distance matrices: Estimating gene flow with distance. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics*, 7, 3, 361-372.
- Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES, 2022 December 27) <https://cites.org/sites/default/files/esp/com/ac/31/Documents/S-AC31-41-03.pdf>
- Cortés-Rodríguez, X., Borja-Martínez, G., & Vázquez-Domínguez, E. (2021). Striking habitat reduction, decreased genetic diversity, and imperilled conservation of natural populations of *Terrapene coahuila*. *Freshwater Biology*, 66, 5, 842-858.
- Cueto-Mares, M. A., Castañeda-Gaytán, G., Becerra, E., & Rubio-Rincón, A. (2017). Ecología espacial y direccionalidad de hembras de *Terrapene coahuila* en el valle de Cuatro Ciénegas, Coahuila, México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 88,4, 860-866.
- DODD JR., C. K., R. F. FRANZ, AND L. L. SMITH (1994). Activity patterns and habitat use of box turtles (*Terrapene carolina bauri*) on a Florida island, with recommendations for management. *Chelonian Conservation and Biology*, 1,97–106
- Dyer, R. J. (2014). *gstudio: An package for the spatial analysis of population genetic marker data*. Virginia Commonwealth University, Richmond.
- Evans, S. B. (2005). Using chemical data to define flow systems in Cuatro Cienegas, Coahuila, Mexico (Doctoral dissertation, University of Texas at Austin).
- Ewers RM, Didham RK (2006) Confounding factors in the detection of species responses to habitat fragmentation. *Biological Reviews*, 81,1,117–142

- Flores-Manzanero, A., Luna-Bárceñas, M. A., Dyer, R. J., & Vázquez-Domínguez, E. (2019). Functional connectivity and home range inferred at a microgeographic landscape genetics scale in a desert-dwelling rodent. *Ecology and Evolution*, 9,1, 437-453.
- Goslee, S. C., & Urban, D. L. (2007). The ecodist package for dissimilarity-based analysis of ecological data. *Journal of Statistical Software*, 22, 1–19.
- Grünberger, O. (2004). Características esenciales de la Reserva de la Biosfera. In O. Grünberger, V. M. Reyes-Gómez, & J. L. Janeau (Eds.), *Las playas del desierto chihuahuense (parte mexicana): Influencia de las sales en ambiente árido y semiárido* (41–55pp). Xalapa, México: IRD-INECOL.
- Haddad NM, Brudig LA, Clobert J, Davies KF, Gonzalez A, Holt RD, Lovejoy TE, Sexton JO, Austin MP, Collins CD, Cook WM, Damschen EI, Ewers RM, Foster BL, Jenkins CN, King AJ, Laurance WF, Levey DJ, Margules CR, Melbourne BA, Nicholls AO, Orrock JL, Song D, Townshend JR (2015) Habitat fragmentation and its lasting impact on earth's ecosystems. *Science Advance*, 1, 2, e1500052
- Hagerty, B. E., Nussear, K. E., Esque, T. C., & Tracy, C. R. (2011). Making molehills out of mountains: landscape genetics of the Mojave desert tortoise. *Landscape Ecology*, 26, 2, 267-280.
- Hand BK, Cushman SA, Landguth EL, Lucotch J (2014) Assessing multi-taxa sensitivity to the human footprint, habitat fragmentation and loss by exploring alternative scenarios of dispersal ability and population size: a simple approach. *Biodivers Conserv*, 23, 11, 2761–277.
- Hijmans, R. J. (2021). terra: Spatial Data Analysis, R package version 1.4-11. <https://CRAN.R-project.org/package=terra>
- Hijmans, R. J. (2022). raster: Geographic Data Analysis and Modeling. 2015. R package version 2.5-2.
- Holderegger, R., y Wagner, H. H. (2006). A brief guide to Landscape Genetics. *Landscape Ecology*, 21, 793-796.
- Howeth, J. G., & Brown, W. S. (2011). *Terrapene coahuila* Schmidt and Owens 1944-Coahuilan box turtle. *Chelonian Research Monographs*, 5.
- Howeth, J. G., McGaugh, S. E., & Hendrickson, D. A. (2008). Contrasting demographic and genetic estimates of dispersal in the endangered Coahuilan box turtle: a contemporary approach to conservation. *Molecular Ecology*, 17,19, 4209-4221.
- Howeth, J.G. and Brown, W.S. (2011). *Terrapene coahuila* Schmidt and Owens 1944 — Coahuilan box turtle. *Chelonian Research Monographs* 5. [doi:10.3854/crm.5.049.coahuila.v1.2011](https://doi.org/10.3854/crm.5.049.coahuila.v1.2011).
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). (2021). Continuo de elevaciones mexicano (Mexican Continuous Elevations) versión 3.0 (CEM 3.0) <https://www.inegi.org.mx/app/geo2/elevacionesmex/> Accessed: May 30 2019.
- Jenkins DG et al. (2010) A meta-analysis of isolation by distance: relic or reference standard for landscape genetics? *Ecography* 33, 315–320. [doi:10.1111/j.1600-0587.2010.06285.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2010.06285.x)
- Jennings, A. H. (2003). Daily and seasonal activity patterns and movements of juvenile box turtles (*Terrapene carolina bauri*) on Egmont Key, Florida. *Chelonian Conservation and Biology*, 4, 3, 578-587.
- Jombart, T. (2008). adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24,11, 1403–1405. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>
- Jombart, T., Kamvar, Z. N., Lustrik, R., Collins, C., Beugin, M. P., Knaus, B., & Calboli, F. (2016). adegenet: Exploratory analysis of genetic and genomic data (version 2.0. 1). Computer program and documentation distributed by the author. Website: <https://cran.r-project.org/web/packages/adegenet/index.html>.
- Kamusoko, C. (2019). Remote Sensing Image Classification in R. Springer Nature. Singapore. 189 Pp.

- King, T. L., & Julian, S. E. (2004). Conservation of microsatellite DNA flanking sequence across 13 emydid genera assayed with novel bog turtle (*Glyptemys muhlenbergii*) loci. *Conservation Genetics*, 5, 719–725. <https://doi.org/10.1007/s10592-004-1854-0>
- Lander, T. A., Harris, S. A., Cremona, P. J., & Boshier, D. H. (2019). Impact of habitat loss and fragmentation on reproduction, dispersal and species persistence for an endangered Chilean tree. *Conservation Genetics*, 20, 973–985. <https://doi.org/10.1007/s10592-019-01187-z>
- Latch, E. K., Boarman, W. I., Walde, A., & Fleischer, R. C. (2011). Fine-scale analysis reveals cryptic landscape genetic structure in desert tortoises. *PLoS one*, 6,11, e27794.
- Leutner, B., Horning, N. y Schwalb-Willmann, J. (2019). RStoolbox: Tools for Remote Sensing Data Analysis. R package version 0.2.6. <https://CRAN.R-project.org/package=RStoolbox>
- Lovich, J. E., Edwards, T., Berry, K. H., Puffer, S. R., Cummings, K. L., Ennen, J. R., ... & Murphy, R. W. (2020). Refining genetic boundaries for Agassiz's desert tortoise (*Gopherus agassizii*) in the western Sonoran Desert: the influence of the Coachella Valley on gene flow among populations in southern California. *Frontiers of Biogeography*, 12,3.
- Manel, S., Schwartz, M. K., Luikart, G., & Taberlet, P. (2003). Landscape genetics: Combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology & Evolution*, 4, 189–197.
- Matschiner, M., & Salzburger, W. (2009). TANDEM: Integrating automated allele binning into genetics and genomics workflows. *Bioinformatics*, 25, 1982–1983. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp303>
- McRae, B. H. (2006). Isolation by resistance. *Evolution*, 60, 1551–1561
- Meyer, E. R. (1973). Late-Quaternary Paleoeology of the Cuatro Ciénegas Basin, Coahuila, Mexico. *Ecology*, 54, 5, 982-995.
- Meyer, Edward R., (1973), Late-Quaternary paleoecology of the Cuatro Ciénegas Basin, Coahuila, Mexico: *Ecology*, v. 54, p. 982-995.
- Minckley, W. L. (1969). Environments of the Bolson of Cuatro Ciénegas, Coahuila, Mexico, with special reference to the aquatic biota. Texas Western Press, University of Texas El Paso Science Series 2,1-65.
- Minckley, W. L. (1969). Environments of the Bolsón of Cuatro Ciénegas, Coahuila, México. *Sci Ser*, 2, 1-65.
- Mockford, S. W., L. McEachern, T. B. Herman, M. Snyder, and J. M. Wright. 2005. Population genetic structure of a disjunct population of Blanding's turtle (*Emydoidea blandingii*) in Nova Scotia, Canada. *Biological Conservation* 123, 373–380.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89,3, 583-590.
- Nevill, P. G., Robinson, T. P., Di Virgilio, G., & Wardell-Johnson, G. (2019). Beyond isolation by distance: What best explains functional connectivity among populations of three sympatric plant species in an ancient terrestrial island system? *Diversity and Distributions*, 25,10,1551–1563. <https://doi.org/10.1111/ddi.12959>
- Noble, G. K., & Breslau, A. M. (1938). The senses involved in the migration of young fresh-water turtles after hatching. *Journal of Comparative Psychology*, 25,1, 175.
- Peterman, W. E. (2018). ResistanceGA: An R package for the optimization of resistance surfaces using genetic algorithms. *Methods in Ecology and Evolution*, 9,1638-1647.
- Peterman, W. E., Connette, G. M., Semlitsch, R. D., y Eggert, L. S. (2014). Ecological resistance surfaces predict fine-scale genetic differentiation in a terrestrial woodland salamander. *Molecular Ecology*, 23, 2402–2413.
- Peterman, W.E. (2014). ResistanceGA: An R package for the optimization of resistance surfaces using genetic algorithms. *Ecology*. <https://doi.org/10.1101/007575>
- Phillipsen, I. C., Kirk, E. H., Bogan, M. T., Mims, M. C., Olden, J. D., & Lytle, D. A. (2015). Dispersal ability and habitat requirements determine landscape-level genetic patterns in desert aquatic insects. *Molecular Ecology*, 24(1), 54-69.

- Pinkava, D. J. (1984). "Vegetation and flora of the Bolson of Cuatro Ciénegas region, Coahuila, Mexico: IV, Summary, endemism and corrected catalogue", pp. 23-48, en: Paul C. Marsh (ed). Biota of Cuatro Ciénegas, Coahuila, Mexico: Proceedings of a Special Symposium. Fourteenth Annual Meeting, Desert Fish Council, Tempe, Arizona USA, 18-20 November 1983. Journal of the Arizona-Nevada Academy of Science.
- PROFAUNA (Protección de la Fauna Mexicana, A.C.) and WWF (World Wildlife Foundation), (1999), Planeación del uso del agua en el valle de Cuatrociénegas: Final Report, Saltillo, Coahuila, México, January 1999.
- Pronatura Noreste A. C. 2018. Seguridad hídrica del valle de Cuatro Ciénegas. Agosto 2018. Pp. 29.
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Reagan, D. P. (1974). Habitat selection in the three-toed box turtle, *Terrapene carolina triunguis*. Copeia, 512-527.
- Rice, W. R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. Evolution, 43,1, 223-225.
- Richter, S. C., Jackson, J. A., Hinderliter, M., Epperson, D., Theodorakis, C. W., & Adams, S. M. (2011). Conservation genetics of the largest cluster of federally threatened gopher tortoise (*Gopherus polyphemus*) colonies with implications for species management. Herpetologica, 67, 4, 406-419.
- Riedle D, Averill-Murray RC, Grandmaison DD (2010) Seasonal variation in survivorship and mortality of desert tortoises in the Sonoran Desert, Arizona. J Herpetology 44: 164–167.
- Rossell, C. R., Rossell, I. M., & Patch, S. (2006). Microhabitat selection by eastern box turtles (*Terrapene c. carolina*) in a North Carolina mountain wetland. Journal of Herpetology, 40, 2, 280-284.
- Rousset, F. (2008). genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. Molecular ecology resources, 8, 1, 103-106.
- Sánchez-Ramírez, S., Rico, Y., Berry, K. H., Edwards, T., Karl, A. E., Hemen, B. T., & Murphy, R. W. (2018). Landscape limits gene flow and drives population structure in Agassiz's desert tortoise (*Gopherus agassizii*). Scientific reports, 8,1, 1-17.
- Scrucca, L. (2013). GA: A package for genetic algorithms in R.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), (2003), Diario Oficial de la Federación, Tomo DCII No. 1, nov. 3, 2003, 18 pp.
- Semarnat (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental, especies nativas de flora y fauna silvestres de México, categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio, y lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación, 30 de diciembre de 2010, Segunda Sección. Ciudad de México, México
- Shirk, A. J., Landguth, E. L., & Cushman, S. A. (2017). A comparison of individual-based genetic distance metrics for landscape genetics. Molecular Ecology Resources, 17, 1308–1317. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12684>.
- Souza, V., Espinosa-Asuar, L., Escalante, A. E., Eguiarte, L. E., Farmer, J., Forney, L., ... & Elser, J. J. (2006). An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahuan desert. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103 17, 6565-6570.
- Spear, S. F., Balkenhol, N., Fortin, M.-J., McRae, B. H., & Scribner, K. (2010). Use of resistance surfaces for landscape genetics studies: Considerations for parameterization and analysis. Molecular Ecology, 19,17, 3576–3591. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04657.x>
- Spear, S. F., Cushman, S. A., & McRae, B. H. (2015). Resistance surface modeling in landscape genetics. In N. Balkenhol, S. A. Cushman, A. T. Storfer, & L. P. Waits (Eds.), Landscape Genetics: Concepts, Methods, Applications (pp. 129–148). Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd.

- Stickel, L. F. (1950). Populations and home range relationships of the box turtle, *Terrapene c. carolina* (Linnaeus). *Ecological Monographs*, 20,4, 351-378.
- USFWS (U.S. Fish & Wildlife Service) (2011) Revised recovery plan for the mojave population of the desert tortoise (*Gopherus agassizii*). Pacific Southwest Region, Sacramento
- Van Dijk, P. P., Flores-Villela, O., & Howeth, J. (2017). *Terrapene coahuila* (errata version published in 2016) The IUCN Red List of Threatened Species 2007: e. T21642A97428806.
- Van Etten, J. (2017). R Package gdistance: Distances and Routes on Geographical Grids. *Journal of Statistical Software*, 76,13, 1–21. <https://doi.org/10.18637/jss.v076.i13>
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P., & Shipley, P. (2004). MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4, 535–538.<https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>
- Wang IJ (2009) Fine-scale population structure in a desert amphibian: landscape genetics of the black toad (*Bufo exsul*). *Molecular Ecology* 18, 3847–3856.
- Wang, I. J., & Bradburd, G. S. (2014). Isolation by environment. *Molecular ecology*, 23, 23, 5649-5662.
- Ward, D. (2016). *The biology of deserts*. Oxford University Press.
- Wilson, J. P. y Gallant, J. C. (2000). *Terrain analysis: principles and applications*. John Wiley & Sons. 520 pp.
- World Wildlife Fund. (2022, December 27). Deserts and xeric shrublands. Retrieved from <https://www.worldwildlife.org/biomes/deserts-and-xeric-shrublands>
- Wright S. (1943) Isolation by distance. *Genetics* 28, 114–138.
- Yengoh, G. T., Dent, D., Olsson, L., Tengberg, A. E. y Tucker III, C. J. (2015). Use of the Normalized Difference Vegetation Index (NDVI) to assess Land degradation at multiple scales: current status, future trends, and practical considerations. Springer. 110 pp.
- Zeller, K. A., McGarigal, K., y Whiteley, A. R. (2012). Estimating landscape resistance to movement: A review. *Landscape Ecology* 27, 777–797.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

TABLAS Y FIGURAS

Tabla S1. Características de los 12 loci de microsatélite utilizados

NOMBRE DE LA SECUENCIA	SECUENCIA
TCTR7F	TTCTGGCCCTGTTCTCTCG
TCTR7R	GGCAAATAAACTCCACCACC
TCTS2F	TGGGAGCAGTATTGGACACC
TCTS2R	AGCTTGTTGCTACCCCTTC
TCTG7F	GAAAGCCCTTGGGTGTGTG
TCTG7R	AGTGAACGATTTGCGTGTC
TCTQ17F	ACTGGCCACTCCACTCATC
TCTQ17R	GGGGTGCGCTCTCTCTC
TCTP11F	GAAAATGTGTCCCAGGGCG
TCTP11R	TGGTGGAAAGGGTTGGAGAC
TCTO11F	TAAAGGTGCCACAGGACCC
TCTO11R	CCCCAAAAGCCTTCAGCAC
TCTB2F	ACAAATTAGTGAGTGGCACCTG
TCTB2R	GGTCATTACCTACTTTGCCTTC
GmuB8F	CTCTGAGACCCTTATTCACGT C
GmuB8R	AGCCTTTGTCTGTAA GCTGTT C
GmuD16F	ATCCCTGAAATTTTGTGT GTT C
GmuD16R	TTT ACT CTA GAA GGG GCA ATC C
GmuD21F	GCAGTTAGGCATTACTCA ACA TC
GmuD21R	AGGGTATGAATACAGGGGTGT C
GmuD40F	TTT GTCATATCATCCACTCAC C
GmuD40R	TTTGTCACAGATGGGAATTAG C
GmuD51F	GTTGGGCACTAGATAGATTCG
GmuD51R	CATTCAAGTCAACGGAAAGAC
GmuD70F	AGTGTAGTCATGGCATAGAGAGG
GmuD70R	ATCAAATTCTTCCAACCCTACC
GmuD90F	ATAGCAGGACAATTACCACCAG
GmuD90R	CCTAGTTGCTGCTGACTCCAC
GmuD107F	GACAAACATGAACAGGAG AAG AG
GmuD107R	ATTAGAGAGACAGATAGATAGGACTTG
GmuD121F	GGC AAA TAT CCA ATA GAA ATC C
GmuD121R	CAA CTT CCT CGT GGG TTC AG

Tabla S2. Distancias genéticas de Nei (Nei, 1978) para las seis localidades de muestreo de *Terrapene coahuila*

	Charcos Prietos	Churince	La Angostura	La Pileta	Los Gatos
Charcos P	0				
Churince	0.0769	0			
La Angostura	0.0517	0.0862	0		
La Pileta	0.0540	0.1615	0.0934	0	
Los Gatos	0.0434	0.1240	0.0861	0.0736	0
Tierra Blanca	0.0458	0.0716	0.0537	0.0977	0.0801

Tabla S3. Correlación de Spearman (Coeficiente de Spearman ρ) entre las variables con alto porcentaje de contribución

Variable 1	Variable 2	ρ
NDVI	TWI	-0.0387036
NDVI	Elevación	0.3263082
TWI	Elevación	0.0221817

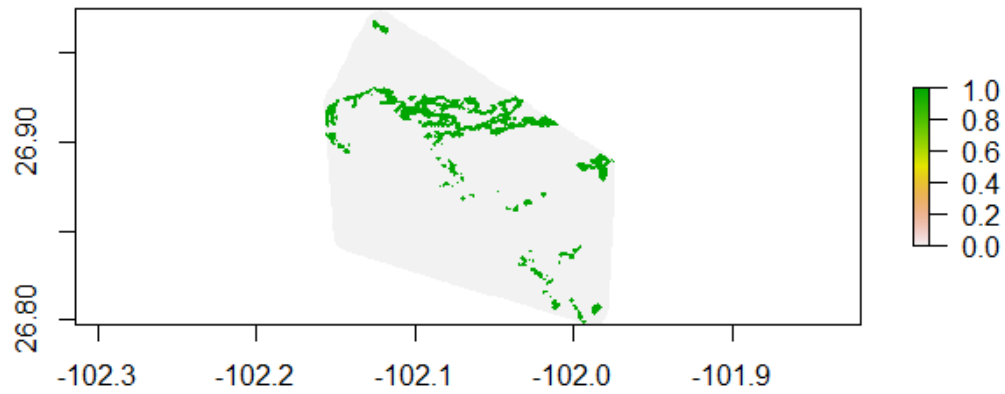


Figura S1. Capa de información de presencia de cuerpos de agua para el polígono de estudio en Cuatrociénegas, Coahuila, México.

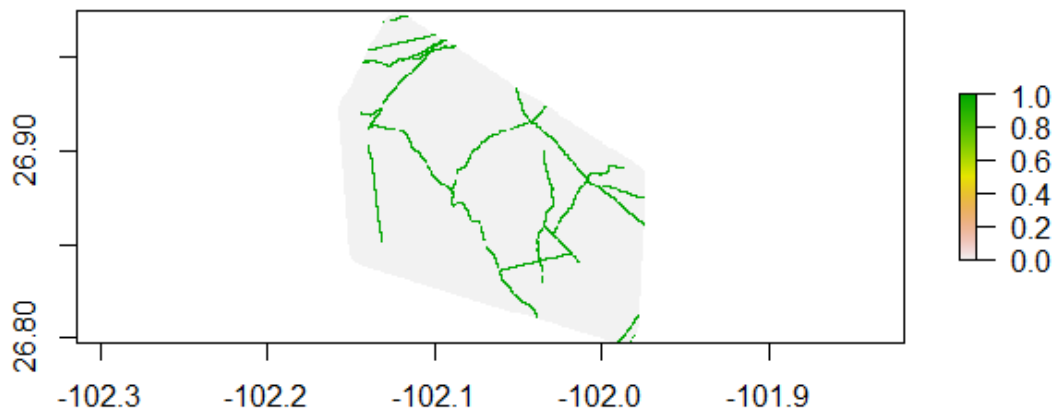


Figura S2. Capa de información de presencia de caminos y canales para el polígono de estudio en Cuatrociénegas, Coahuila, México.

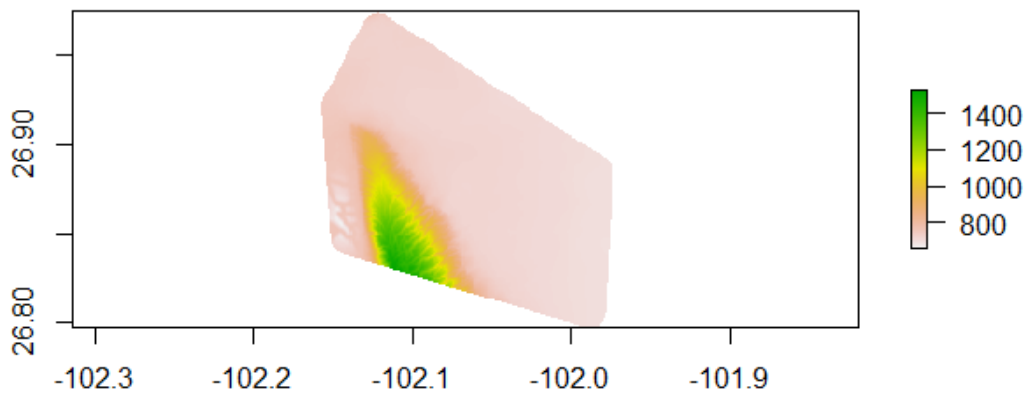


Figura S3. Capa de información de elevación para el polígono de estudio en Cuatrociénegas, Coahuila, México.

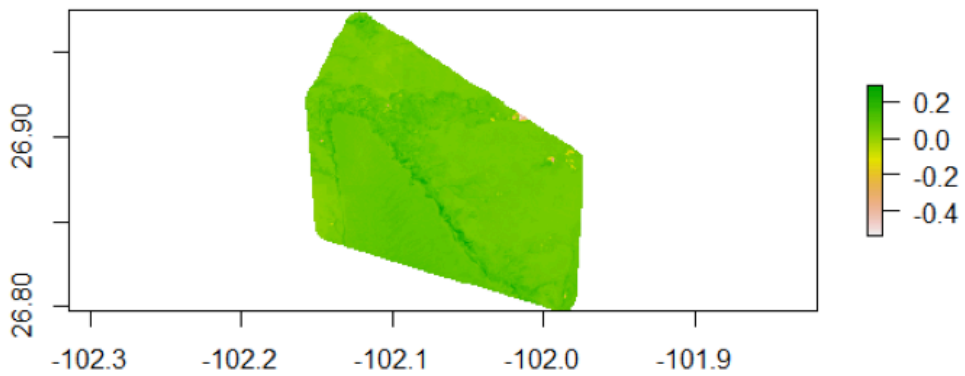


Figura S4. Capa de información del índice NDVI para el polígono de estudio en Cuatrociénegas, Coahuila, México.

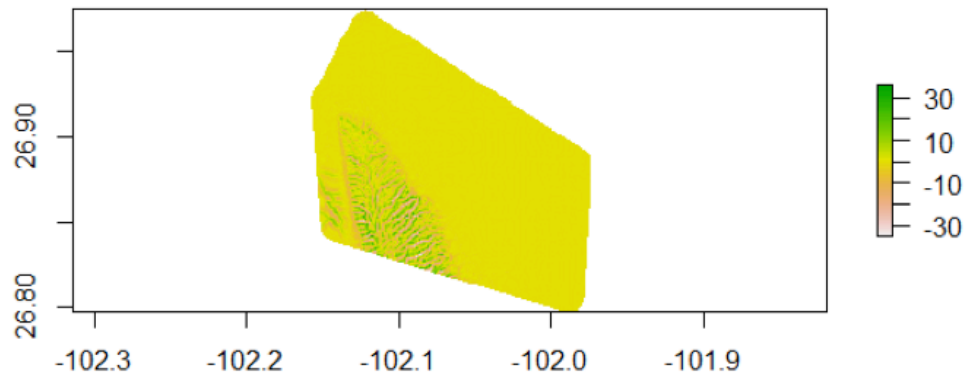


Figura S5. Capa de información del índice de TWI para el polígono de estudio en Cuatrociénegas, Coahuila, México.

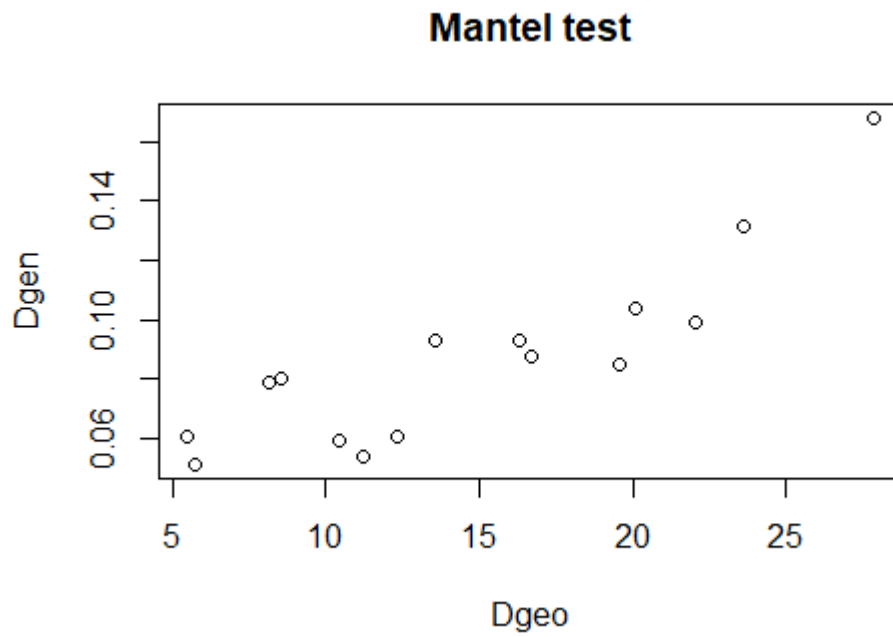
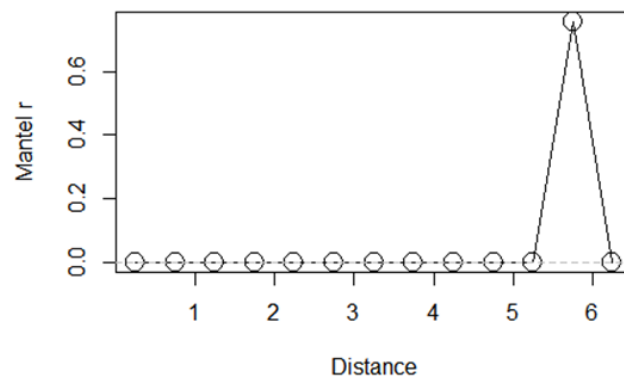


Figura S6 Prueba de Mantel de la distancia geográfica Euclidiana (Dgeo; km) y la distancia genética de Nei 1978 (Dgen).

a)



b)

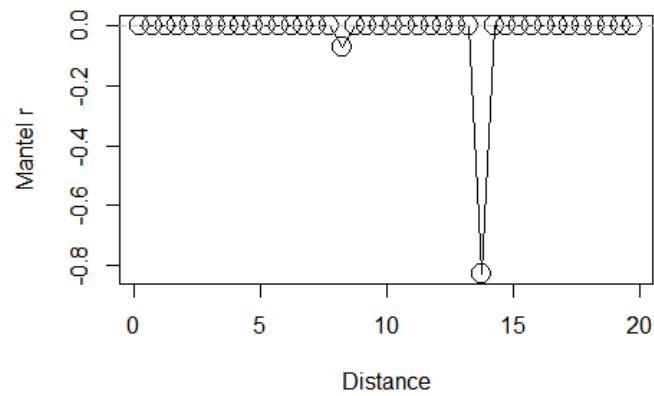


Figura S7 Correlograma para las poblaciones (a) del Cluster Este (La Pileta, Charcos Prietos y Los Gatos) y (b) del Cluster Oeste (Churince, Tierra Blanca y La Angostura). Distancia geográfica Euclidiana km, considerando clases de 500 metros.

DISCUSIÓN GENERAL

En este trabajo estudiamos a la tortuga bisagra *Terrapene coahuila* en el valle de Cuatrociénegas, Coahuila, México. Utilizamos herramientas de tres disciplinas, la genética de poblaciones, la filogeografía y la genética del paisaje, para evaluar la historia evolutiva histórica y contemporánea de la especie, así como la relación entre los elementos del paisaje y los patrones de diversidad y estructura genética de sus poblaciones. Estos procesos en conjunto dieron origen y moldearon la distribución a lo largo del valle de la tortuga bisagra.

La generación de información genética de *T. coahuila* y del paisaje en el que está inmersa, aunado al enfoque de análisis integral que utilizamos, hacen de este un estudio original. Con base en marcadores moleculares mitocondriales y de loci neutrales como los microsatélites, logramos conjuntar diferentes aproximaciones para, por primera vez para esta especie, esclarecer su historia filogeográfica y discernir los efectos de procesos evolutivos en diferente tiempo y espacio. Asimismo, describimos la estructura genética lo cual representa un reto en este sistema, ya que es un ambiente altamente fragmentado, de pocos kilómetros de extensión en combinación con una especie microendémica con alta capacidad de dispersión y con tiempos generacionales muy grandes. Dichas características dificultan la detección de diferenciación genética y de qué tanto ésta obedece a procesos históricos o contemporáneos. Cabe resaltar que demostramos la importancia de considerar diversos aspectos tanto biológicos (tiempos generacionales, migración capacidad de dispersión, comportamiento) como ecológicos (uso de hábitat, alimentación) en la evaluación de la estructura genética poblacional, así como en la determinación de cuándo utilizar análisis a nivel de individuos y de poblaciones en un estudio de genética del paisaje en un área geográficamente reducida.

Es importante destacar que *T. coahuila* presenta bajos niveles históricos de diversidad genética, lo cual es congruente con la baja tasa de mutación del ADN mitocondrial en tortugas (Avice et al., 1992). Sin embargo, aún con una baja variación genética fue posible descifrar su evolución histórica (Beheregaray et al., 2004; Spinks & Shaffer, 2009; Martín et al. 2013). En congruencia con lo reportado por otros autores encontramos que el ancestro común más reciente de *T. coahuila* se remonta a finales Mioceno (10.1 My) y que la diversificación de *T. coahuila* a lo largo del valle de Cuatrociénegas ocurrió durante el Pleistoceno, con su punto más alto durante el Holoceno (hace unos 11.000 años), asociado con los ciclos de expansión y contracción de los cuerpos de agua y la formación del sistema de humedales que caracteriza al valle. Ello contribuyó a su estructuración y favoreció una colonización de oeste a este a lo largo de la Sierra de San Marcos (Carson & Dowling, 2006; Chaves-Campos et al., 2011; Johnson, 2005). Además, nuestros resultados sugieren que la divergencia entre el oeste y el este ocurrió hace 47,500-110,950 años.

Dicha diferenciación se refleja en los dos grupos genéticos mitocondriales identificados, consistentes con las barreras históricas. Las poblaciones de *T. coahuila* presentan aislamiento por distancia, donde la distancia genética fue en general mayor entre las localidades más lejanas geográficamente. Aunado a lo anterior, también presentan estructuración contemporánea en dos grupos genéticos, Cuatrociénegas Este y Cuatrociénegas Oeste, consistente con la estructura histórica (Cortes-Rodríguez et al., 2021), separados por la Sierra de San Marcos. Estos resultados destacan la importancia de usar diferentes enfoques para evaluar la estructura de las poblaciones, sobre todo en aquellas donde puede existir diferenciación en pocos kilómetros y que no sea tan evidente como con esta tortuga (Flores- Manzanero et al., 2009). Esta estructuración entre el este y el oeste es un patrón repetidamente observado en otras especies como peces e

invertebrados del valle de Cuatrociénegas (Carson & Dowling, 2006; Chaves-Campos et al., 2011; Johnson, 2005).

Asociado con la pérdida del hábitat y fragmentación contemporánea del valle, *T. coahuila* exhibe una variabilidad genética disminuida, así como una mayor diferenciación genética y tamaños de población pequeños (respecto al único trabajo previo sobre genética poblacional de esta especie; Howeth et al., 2008). La diferenciación global (F_{st}) fue baja tanto entre localidades como entre grupos genéticos, mientras que a la par identificamos bajas tasas de migración; dichos patrones son frecuentes en especies caracterizadas por una dinámica de metapoblaciones (Sunny et al., 2019). El sistema de humedales del valle de Cuatrociénegas tiene una dinámica natural de inundaciones estacionales, lo que conecta intermitentemente amplias extensiones y favorece el movimiento de tortugas entre cuerpos de agua (Souza et al., 2006, 2018). La baja diferenciación también puede ser un reflejo de los altos niveles históricos de conectividad durante los ciclos más húmedos (Metcalf et al., 2002; Smith, 1984), lo que es apoyado por nuestros resultados de migraciones a larga distancia.

Los impactos negativos de la pérdida de hábitat y de las actividades antropogénicas sobre las poblaciones de *T. coahuila* también se ven reflejados en los tamaños efectivos estimados que son extremadamente bajos en ambos grupos genéticos (Este; $N_e=308.4$; Oeste; $N_e=139.8$), aunado a cierta señal de cuello de botella. Esto significa que las poblaciones de *T. coahuila* pueden estar experimentando las etapas iniciales de un cuello de botella que aún no es evidente en las firmas genéticas, especialmente en esta especie longeva. Debemos considerar que la perturbación del hábitat en el valle de Cuatrociénegas comenzó en 1950 y se estima que la población total de la especie pasó de tener un máximo histórico de 10,000 individuos a sólo 1,791 individuos (Gaytán et al., 2020). Las poblaciones, aunque exhiben cierto nivel de consanguinidad, predominan los individuos no relacionados (87%-100%), lo cual puede estar asociado a las altas tasas de mortalidad por la desecación de los humedales en el valle, lo que ha resultado en poblaciones compuestas por adultos y muy pocos juveniles.

La estacionalidad de los humedales y las alteraciones de éstos por actividades antropogénicas influyen directamente en el movimiento de los individuos. Así, identificamos autocorrelación a distancias cortas en la zona este del valle, lo cual es congruente con la dinámica de los humedales que están ampliamente extendidos en el centro del valle, con formas alargadas y entre los cuales existe un alto potencial de migración resultado de los procesos naturales estacionales de contracción y expansión de los mismos (Carabias et al., 2009; Cortés Rodríguez et al., 2021). Por el contrario, en la región oeste la correlación fue negativa, patrón asociado con el hecho de que los cuerpos de agua son pequeños y aislados con poca conectividad entre ellos.

A pesar de que la distancia geográfica es el factor más reportado asociado al flujo génico en organismos de ambientes desérticos y que además tienen dispersión limitada (Wang 2009; Hagerty et al. 2011; Phillipsen et al. 2015), la tortuga bisagra presenta patrones particulares de conectividad asociados con el paisaje. La elevación, la vegetación (medida como NDVI) y la humedad (TWI) fueron los mejores predictores de los patrones de flujo génico, íntimamente relacionado con la fragmentación actual del paisaje y la dinámica de los humedales, y con su capacidad de dispersión, alimentación y patrones de conducta de protección y estivaje (Brown 1974; Howeth y Brown 2011). Demostramos así que los cambios recientes en el paisaje pueden afectar significativamente los patrones de flujo génico aún en especies longevas y de ambientes áridos. Por ello, hay que resaltar cómo estas variables del paisaje pueden ser clave para la conectividad estructural y funcional en ambientes desérticos (Flores-Manzanero et al., 2019).

Nuestros resultados son relevantes en términos de la conservación de *T. coahuila*, especie microendémica que se encuentra confinada a un área natural protegida amenazada por la extracción desmedida de agua. La reducción del tamaño poblacional y el aislamiento entre las mismas contribuye a la pérdida de variabilidad y a la deriva génica, lo que tiene graves consecuencias que conducen a una disminución del potencial evolutivo para adaptarse al entorno cambiante y, en última instancia, a la extinción de poblaciones.

Esta amenaza a corto y largo plazo en una especie microendémica de la cual se tiene poca información ecológica y genética podría modificar las dinámicas naturales de la especie.

CONCLUSIONES

El valle de Cuatrociénegas, en Coahuila, México es un ambiente desértico que ha sido muy estudiado desde un enfoque mayormente microbiológico, pero poco estudiado en particular respecto a los anfibios y reptiles que lo habitan. Este estudio representa uno de los primeros trabajos de investigación que integra diferentes enfoques sobre la filogeografía y los patrones genéticos de la tortuga bisagra, donde describimos su diversidad y estructura genética y demografía histórica y contemporánea, así como la relación de características clave del paisaje y su conectividad y flujo génico.

Particularmente, encontramos baja diversidad genética histórica de *T. coahuila*, aunado a una pérdida en tiempos muy recientes. Aunque existe baja diferenciación genética global, sus poblaciones están claramente estructuradas en dos grupos genéticos, con señales de cuello de botella. Cabe señalar que la estructura tanto histórica como actual está asociada tanto a la Sierra de San Marcos como a la actual fragmentación de hábitat y es apoyada por la historia demográfica. La baja relación de parentesco puede ser resultado de la disminución de las poblaciones y la alta mortandad reflejada en los bajos números poblacionales encontrados.

La elevación, la vegetación y la humedad fueron las variables del paisaje significativamente asociadas con la conectividad funcional de los individuos de *T. coahuila*, que como muestran nuestros resultados estuvieron determinadas por ciertas características de historia de vida, así como su capacidad de dispersión, tipo de alimentación y patrones de conducta (protección y estivaje), aunado a la fragmentación actual del paisaje y la dinámica de los humedales.

La principal conclusión de este trabajo es que *Terrapene coahuila*, dada su distribución restringida, alta especificidad, hábitat altamente fragmentado, con poblaciones pequeñas aisladas que presentan disminución de diversidad genética, señal de cuellos de botella y predominancia de individuos no relacionados, tiene un muy alto riesgo de extinción. Por ello, enfatizamos la importancia de tomar en cuenta la información aquí presentada para los planes y las acciones para su conservación, sobre todo en el escenario actual del constante déficit de agua en el valle, el cual puede exacerbarse en un futuro cercano por el cambio climático global.

LITERATURA CITADA

- Allendorf, F.W. and Luikart, G. (2007). Conservation and the Genetics of Populations. Blackwell Publishing, Singapore.
- Avice, J. C. (2000). Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University press.
- Beheregaray, L. B., Gibbs, J. P., Havill, N., Fritts, T. H., Powell, J. R., Caccione, A. (2004). Giant tortoises are not so slow: Rapid diversification and biogeographic consensus in the Galápagos. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101,6514–6519
- Brown, S. and William, S. (1974). Ecology of the Aquatic Box Turtle, *Terrapene coahuila* (Chelonia, Emydidae), in Northern México. Bull. Florida State Mus., Biol. Sci., Vol. 19 No. 1, pp. 1-67.
- Brown, W. S. (1971). Morphometrics of *Terrapene coahuila* (Chelonia, Emydidae), with comments on its evolutionary status. The Southwestern Naturalist, 171-184.
- Carabias, L. J., Provencio, E., De la Maza, J., Moncada, Y. S. (1999). Programa de manejo del área de protección de flora y fauna Cuatrociénegas. Instituto Nacional de Ecología SEMARNAP. DF, México, 167pp.
- Carson, E. W., & Dowling, T. E. (2006). Influence of hydrogeographic history and hybridization on the distribution of genetic variation in the pupfishes *Cyprinodon atrorus* and *C. bifasciatus*. Molecular Ecology, 15,667. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02763.x>
- Chaves-Campos, J., Johnson, S. G., De León, F. J. G., Hulsey, C. D. (2011). Phylogeography, genetic structure, and gene flow in the endemic freshwater shrimp *Palaemonetes suttkusi* from Cuatro Ciénegas, Mexico. Conservation Genetics, 12, 557–567. <https://doi.org/10.1007/s10592-010-0163-z>.
- Cortés-Rodríguez X., G. Borja-Martínez, E. Vázquez-Domínguez. (2021). Striking habitat reduction, decreased genetic diversity, and imperilled conservation of natural populations of *Terrapene coahuila*. Freshwater Biology, 66, 5, 842-858.
- Diniz-Filho, J. A. F., de Campos Telles, M. P., Bonatto, S. L., Eizirik, E., De Freitas, T. R. O., de Marco Jr, P., Soares, T. N. (2008). Mapping the evolutionary twilight zone: molecular markers, populations and geography.
- Flores-Manzanero, A., Luna-Bárceñas, M. A., Dyer, R. J., & Vázquez-Domínguez, E. (2019). Functional connectivity and home range inferred at a microgeographic landscape genetics scale in a desert-dwelling rodent. Ecology and Evolution, 9,1, 437-453.
- Frankham, R., Ballou, S. E. J. D., Briscoe, D. A., & Ballou, J. D. (2002). Introduction to conservation genetics. Cambridge university press.
- Futuyma, D., & Kirkpatrick, M. (2017). Evolution. Sinauer. Sunderland, MA.
- Gaytán, G. C., Becerra-López, E., Valenzuela-Ceballos, S., Borja-Jiménez, M., Rodríguez-López, B., Castañeda, J., Stanford, C. B. (2020). Conservation status and sex ratios of the Coahuila box turtle (*Terrapene coahuila*) in the Cuatrociénegas Valley of Coahuila, Mexico, 2011–2018. Chelonian Conservation and Biology: Celebrating 25 Years as the World's Turtle and Tortoise Journal, 19,1, 14-21.
- Hagerty, B. E., Nussear, K. E., Esque, T. C., & Tracy, C. R. (2011). Making molehills out of mountains: landscape genetics of the Mojave desert tortoise. Landscape Ecology, 26, 2, 267-280. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syp005>
- Hendrickson, D. A., Marks, J. C., Moline, A. B., Dinger, E., & Cohen, A. E. (2008). Combining ecological research and conservation: a case study in Cuatro Ciénegas, Coahuila, Mexico. Aridland springs in North America: ecology and conservation. University of Arizona Press, Tucson, AZ, 127-157.

- Holderegger, R., & Wagner, H. (2006). A brief guide to landscape genetics. *Landscape ecology*, 21,6, 793-796.
- Howeth, J. G., & Brown, W. S. (2011). *Terrapene coahuila* Schmidt and Owens 1944—Coahuilan box turtle. *Chelonian Research Monographs*, 5.
- Howeth, J. G., McGaugh, S. E., & Hendrickson, D. A. (2008). Contrasting demographic and genetic estimates of dispersal in the endangered Coahuilan box turtle: a contemporary approach to conservation. *Molecular Ecology*, 17,19, 4209-4221.
- Johnson, S. G. (2005). Age, phylogeography and population structure of the microendemic banded spring snail, *Mexipyrghus churinceanus*. *Molecular Ecology*, 14,8, 2299-2311.
- Manel, S., Schwartz, M. K., Luikart, G., & Taberlet, P. (2003). Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in ecology & evolution*, 18,4, 189-197.
- Martin, B. T., Bernstein, N. P., Birkhead, R. D., Koukl, J. F., Musmann, S. M., & Placyk, J. S. Jr (2013). Sequence-based molecular phylogenetics and phylogeography of the American box turtles (*Terrapene* spp.) with support from DNA barcoding. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 68, 119–213. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.03.006>
- McGaugh, S. E. (2012). Comparative population genetics of aquatic turtles in the desert. *Conservation Genetics*, 13, 6, 1561-1576.
- Metcalfe, S., Say, A., Black, S., McCulloch, R., & O'Hara, S. (2002). Wet conditions during the last glaciation in the Chihuahuan Desert, Alta Babicora Basin, Mexico. *Quaternary Research*, 57, 91–101. <https://doi.org/10.1006/qres.2001.2292>
- Miller, J. K. (2001). Escaping senescence: demographic data from the three-toed box turtle (*Terrapene carolina triunguis*). *Experimental Gerontology*, 36,4-6, 829-832.
- Milstead, W. W., & Tinkle, D. W. (1967). *Terrapene* of western Mexico, with comments on the species groups in the genus. *Copeia*, 180-187.
- Minckley, W. L. (1969). Environments of the bolson of Cuatro Ciénegas, Coahuila, México, with special reference to the aquatic biota. *Sci. Ser. No. 2*, Texas Western Press, Univ. of Texas, El Paso. 65 pp.
- Minckley, W.L. (1992). Three decades near Cuatro Cienegas, Mexico: photographic documentation and a plea for area conservation. *Journal of the Arizona-Nevada Academy of Science*, 26, 89–118
- Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, protección ambiental especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo.
- Phillipsen, I. C., Kirk, E. H., Bogan, M. T., Mims, M. C., Olden, J. D., Lytle, D. A. (2015). Dispersal ability and habitat requirements determine landscape-level genetic patterns in desert aquatic insects. *Molecular Ecology*, 24,1, 54-69.
- Rhodin, A. G.J., Walde, A. D., Horne, B. D., van Dijk, P. P., Blank, T., & Hudson, R. (2011). *Turtles in trouble: The world's most endangered tortoises and freshwater turtles*. Lunenburg, MA: Turtle Conservation Coalition, IUCN Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group, Turtle Conservation Fund, Turtle Survival Alliance, Turtle Conservancy, Chelonian Research Foundation, Conservation International, Wildlife Conservation Society, and San Diego Zoo Global
- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. (1999). Programa del Manejo del Área de Protección de Flora y Fauna Cuatro Ciénegas México. Instituto Nacional de Ecología, Tlacopac, Mexico.
- Smith, G. I. (1984). Paleohydrologic regimes in the southwestern Great Basin, 0–3.2 my ago, compared with other long records of “gobal” climate. *Quaternary Research*, 22,1, 1-17.
- Souza, V., Espinosa-Asuar, L., Escalante, A. E., Eguiarte, L. E., Farmer, J., Forney, L., ... & Elser, J. J. (2006). An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahuan desert. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103,17, 6565-6570.

- Souza, V., Moreno-Letelier, A., Travisano, M., Alcaraz, L. D., Olmedo, G., Eguiarte, L. E. (2018). The lost world of Cuatro Ciénegas Basin, a relictual bacterial niche in a desert oasis. *eLife*, 7, e38278. <https://doi.org/10.7554/eLife.38278>
- Spiess, E. B. (1968). Experimental population genetics. *Annual review of genetics*, 2, 1, 165-208.
- Spinks, P. Q., & Shaffer, H. B. (2009). Conflicting mitochondrial and nuclear phylogenies for the widely disjunct *Emys* (Testudines: Emydidae) species complex, and what they tell us about biogeography and hybridization. *Systematic Biology*, 58, 1–20.
- Stickel, L. F., & Bunck, C. M. (1989). Growth and morphometrics of the box turtle, *Terrapene c. carolina*. *Journal of Herpetology*, 216-223.
- Storfer, A., Murphy, M. A., Evans, J. S., Goldberg, C. S., Robinson, S., Spear, S. F., Waits, L. P. (2007). Putting the 'landscape' in landscape genetics. *Heredity*, 98, 3, 128-142.
- Sunny, A., Duarte-deJesus, L., Aguilera-Hernández, A., Ramírez-Corona, F., Suárez-Atilano, M., Percino-Daniel, R., ... González-Fernández, A. (2019). Genetic diversity and demography of the critically endangered Roberts' false brook salamander (*Pseudoeurycea robertsi*) in Central Mexico. *Genetica*, 147, 149–164. <https://doi.org/10.1007/s10709-019-00058-2>
- Templeton, A. R. (2021). *Population genetics and microevolutionary theory*. John Wiley & Sons.
- Van Dijk, P. P.; Flores-Villela, O.; Howeth, J. (2007). *Terrapene coahuila*. In: 2007 IUCN Red List of Threatened Species
- Vázquez-Domínguez, E., Sánchez-Rojas, G., & Rojas-Martínez, A. E. (2007). ¿Cuál es el enfoque de la ecología molecular? Ejemplos con un ratón espinoso. *Tópicos en sistemática, biogeografía, ecología y conservación de mamíferos*, 59-70.
- Waits, L. P., & Storfer, A. (2015). Basics of population genetics: quantifying neutral and adaptive genetic variation for landscape genetic studies. *Landscape genetics*, 35-57.
- Wang IJ (2009) Fine-scale population structure in a desert amphibian: landscape genetics of the black toad (*Bufo exsul*). *Molecular Ecology* 18, 3847–3856.
- Webb, R. G., Minckley, W. L., & Craddock, J. E. (1963). Remarks on the Coahuilan box turtle, *Terrapene coahuila* (Testudines, Emydidae). *The Southwestern Naturalist*, 89-99.
- Wolaver, B. D. (2008). Hydrogeology of the Cuatrociénegas Basin, Coahuila, Mexico: an integrative approach to arid karst aquifer delineation. The University of Texas at Austin.
- Wolaver, B. D., Sharp Jr, J. M., Tidwell, V. C., Rodriguez-Martinez, J. M., & Hendrickson, D. A. (2008). An integrative approach to sustainable groundwater and associated groundwater-dependent system management in arid karst aquifers: Cuatrociénegas Basin, Mexico. *Mexico. International Association Hydrogeologists*.