

Universidad Nacional del Comahue

# Filogenia, reloj molecular y biogeografía del clado Chelidae (Testudines, Pleurodira)

Juan Alfredo Holley Reguilo

*Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctor en Biología*



Director: Dr. Néstor G. Basso  
Co-Directora: Dra. Juliana Sterli

2021

*Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad.*

*Albert Einstein*

*A Ceci y Facu, los motores de mi vida.*

# Índice general

Agradecimientos .....	4
Resumen.....	5
Abstract .....	6
Introducción general.....	7
Orden Testudines .....	7
Suborden Pleurodira .....	8
Clado Chelidae.....	10
Objetivos e hipótesis .....	11
Objetivo general .....	11
Objetivos específicos.....	11
Hipótesis.....	12
<i>Capítulo I</i> .....	13
Relaciones filogenéticas.....	13
Resumen .....	14
1.1. Introducción .....	15
1.1.1. Relaciones filogenéticas del clado Chelidae .....	15
1.1.2. Métodos de reconstrucción filogenética .....	15
1.2. Materiales y métodos.....	16
1.2.1. Extracción de ADN .....	16
1.2.2. Amplificación y secuenciación de ADN .....	18
1.2.3. Edición y alineamiento de secuencias .....	20
1.2.4. Set de datos.....	21
Procesamiento de datos moleculares .....	21
1.2.5. Análisis filogenéticos .....	22
Máxima Parsimonia (MP) .....	22
Inferencia Bayesiana (IB) .....	24
1.2.6. Test de congruencia metodológica.....	24
1.3. Resultados.....	25
1.3.1. Relaciones filogenéticas .....	26
1.3.1.1. Morfología.....	26
1.3.1.2. ARNr 12s-16s .....	28
1.3.1.3. COI.....	30

1.3.1.4. CytB-ND4 .....	32
1.3.1.5. RAG1-R35 .....	34
1.3.1.6. c-mos .....	35
1.3.1.7. Matriz Concatenada .....	37
1.3.1.8. Matriz de Evidencia Total .....	39
1.3.2. Test de congruencia metodológica .....	41
1.4. Discusión y conclusiones .....	43
1.4.1 Relaciones filogenéticas del clado Chelidae .....	43
1.4.1.1. Morfología .....	43
1.4.1.2. Moléculas .....	45
1.4.1.3. Evidencia Total .....	46
1.4.2 Congruencia metodológica .....	47
1.4.3 Consideraciones finales .....	47
<i>Capítulo II</i> .....	49
Tiempos de divergencia .....	49
Resumen .....	50
2.1. Introducción .....	51
2.1.1. El reloj molecular .....	51
2.1.2. Tiempos de divergencia del clado Chelidae .....	52
2.2. Materiales y métodos .....	52
2.2.1. Set de datos .....	52
2.2.2. Estimación de tiempos de divergencia .....	53
2.2.3. Comparaciones estadísticas .....	55
Comparaciones con estudios previos .....	55
Comparaciones entre análisis propios .....	55
2.3. Resultados .....	55
2.3.1. Tiempos de divergencia .....	55
2.3.1.1. Morfología .....	56
2.3.1.2. Moléculas .....	58
2.3.1.3. Evidencia Total .....	60
2.3.2. Comparaciones estadísticas .....	63
Comparaciones con estudios previos .....	63
Comparaciones entre análisis propios .....	64
2.4. Discusión y conclusiones .....	65

2.4.1 Origen y diversificación del clado Chelidae y nodos basales .....	65
2.4.2 Comparaciones estadísticas .....	69
<i>Capítulo III</i> .....	71
Descripción anatómica del cráneo y la lengua de quelidos actuales con distribución en Argentina .....	71
Resumen .....	72
3.1. Introducción .....	73
3.1.1. Osteología craneana.....	73
3.1.2. Histología y microanatomía lingual .....	74
3.2. Materiales y métodos.....	75
3.2.1. Abreviaturas .....	75
3.2.2. Osteología craneana.....	77
Protocolo básico de preparación.....	77
3.2.3. Histología y microanatomía lingual .....	78
Obtención de los tejidos.....	78
Microscopía Electrónica de Barrido.....	78
Microscopía óptica .....	79
3.3. Resultados.....	80
3.3.1. Osteología craneana.....	80
3.3.1.1. Láminas principales .....	80
3.3.1.2. Descripción comparativa .....	86
3.3.2. Histología y microanatomía lingual .....	105
3.4. Discusión y conclusiones .....	111
3.4.1 Osteología craneana y aportes de información cladística .....	111
3.4.2 Microanatomía e histología lingual .....	117
Discusión general .....	119
Consideraciones finales.....	119
Relaciones filogenéticas, marco temporal y la evolución del cuello largo .....	119
Interpretación paleobiogeográfica .....	121
Conclusiones .....	122
Literatura citada .....	123
Apéndices.....	137

## Agradecimientos

A mis directores, el Dr. Néstor Basso y la Dra. Juliana Sterli, por darme la posibilidad de seguir transitando el camino de la ciencia, por las enseñanzas y por el tiempo compartido.

Al Dr. Diego Baldo por permitirme el acceso al material de la colección del IBS-LGE, por su predisposición para ayudarme siempre, por los consejos y las charlas; al Lic. Juan Boeris, por recibirme en su casa, por su amabilidad y su ayuda de siempre; a toda la banda misionera en general.

Al Dr. Alejandro Giraudo, por darme acceso al material de la colección del INALI, por las charlas y las guitarreadas (que han de continuar).

Al Dr. Leandro Alcalde, por el material que me donó, por la buena onda y los consejos.

A la Dra. Adriana Manzano, por darme acceso al material de la colección del CICYTTP de Diamante y su hospitalidad al alojarme allí.

Al Dr. Pedro Romano, por darme acceso al material de la colección de la UFV y por el material que me donó, por las charlas sobre filogenia y morfogeno.

Al Dr. Paulo Passos, por darme acceso al material de la colección del MUF RJ, por las charlas durante mi estadía en Brasil.

Al Dr. Hussam Zaher, por darme acceso al material de la colección del MZUSP.

A todos los que de alguna manera compartieron información valiosa de materiales de colección: Dr. Marton Rabbi, Dra. María Pérez, Dr. Ignacio Maniel y Dr. Marcelo de la Fuente (a quien además agradezco por el tiempo compartido y las instructivas charlas que tuvimos).

A mis compañeros de laboratorio y amigos, el Lic. Leonardo Cotichelli y el Lic. Luciano Real, por todo el tiempo compartido, por el aguante, las charlas, los asados, etc.

A la Dra. Clara Volonteri por su valiosísimo aporte en las descripciones histológicas y por su amistad.

Al Oc. José Saravia y la Dra. María Eva Góngora, por su inagotable fuente de buena energía y por su amistad, que hacen del trabajo a su lado en la cátedra de Estadística un verdadero placer para mí.

A la Dra. Andrea Calvo por su ayuda, por compartir sensaciones y su buena onda de siempre.

A mi pequeña familia: Ceci y Facu, por el amor infinito, por la paciencia, por el apoyo, por ser mi fuente de energía, por darme día a día lo más hermoso que un ser humano puede sentir, por...uf, más fácil sería pensar por que no!

A mi familia más grande: a mi mamá, porque siempre está para apoyarme sin importar lo duras que sean las batallas que se encuentre peleando, a mis hermanos, por el amor, las charlas, las vivencias y el acompañamiento.

## Resumen

El orden Testudines está integrado por dos subórdenes: Cryptodira, tortugas que retraen el cuello en un plano vertical, y Pleurodira, tortugas que retraen el cuello en un plano horizontal. A su vez, Pleurodira está integrado por dos clados: la hiperfamilia Pelomedusoides y el clado Chelidae. Este último es un grupo con distribución actual restringida al hemisferio Sur, con presencia en Sudamérica y Australasia (Australia y Nueva Guinea). Ambos grupos geográficos de Chelidae presentan dos morfotipos característicos: los quelidos de cuello largo y los quelidos de cuello corto.

Actualmente las relaciones evolutivas del clado Chelidae se encuentran en debate, ya que históricamente los análisis basados en datos morfológicos han producido topologías que agrupan a los quelidos de cuello largo (tanto sudamericanos como australasiáticos) en un clado, en tanto que los análisis basados en datos moleculares recuperan como grupos monofiléticos al clado sudamericano y al clado australasiático, ambos compuestos por géneros de cuello corto y géneros de cuello largo.

En el presente trabajo de tesis se planteó afrontar este conflicto desde una perspectiva filogenética de evidencia total, integrando datos morfológicos y moleculares, incorporando a los análisis especies actuales y extintas, y complementando los mismos con un marco temporal a través de la estimación de tiempos de divergencia, así como la interpretación de toda la información en un contexto paleobiogeográfico, de modo de poder arribar a conclusiones integrales, soportadas por múltiples enfoques y fuentes de información.

A este afecto se produjeron nuevas secuencias de ADN, nuevos caracteres morfológicos y se realizaron nuevas descripciones anatómicas, que sirvieron de base para dar cuenta de posibles fuentes de variación con potencial cladístico. Las secuencias de ADN y los datos morfológicos fueron integrados en matrices de datos preexistentes, que se analizaron individualmente y de manera combinada bajo diferentes métodos de inferencia filogenética y de estimación de tiempos de divergencia. Además, todos los resultados obtenidos en diferentes etapas de análisis, se evaluaron estadísticamente a fin de corroborar la robustez de las conclusiones resultantes.

Los resultados en el contexto de evidencia total sugieren que: **i)** se soporta la estructura del clado Chelidae como un grupo monofilético, integrado por un clado sudamericano y un clado australasiático, el cual habría tenido su origen a mediados del Cretácico Temprano (123,2 millones de años antes del presente [maap]); **ii)** la presencia del grupo de quelidos sudamericanos extintos de cuello corto, en posición basal respecto del clado Chelidae y la mayor antigüedad del clado sudamericano (109,7 maap) respecto del australasiático (101,7 maap), sugieren que el grupo se habría originado en Sudamérica; **iii)** el cuello largo habría surgido independientemente en el clado sudamericano durante el Cretácico Tardío (93,2 maap) y en el clado australasiático a comienzos del Paleógeno (65,26 maap); **iv)** las diversificaciones más recientes que dieron origen a las especies que integran los géneros actuales, en ambos grupos geográficos, se habrían producido posteriormente a la ruptura final del sur de Gondwana (50—35 maap).

## Abstract

Currently, the order Testudines is composed by two suborders: Cryptodira, turtles that retract the neck in a vertical plane, and Pleurodira, turtles that retract the neck in a horizontal plane. In turn, Pleurodira is composed by two clades: the hyperfamily Pelomedusoides and the clade Chelidae. The latter is a group with current distribution restricted to the Southern Hemisphere, with presence in South America and Australasia (Australia and New Guinea). Both geographic groups of Chelidae count with two distinctive morphotypes: the long-necked and the short-necked chelids.

Up today, the evolutionary relationships of the clade Chelidae are still under debate: the analyses presented in the literature, based on morphological data produced topologies that group long-necked chelids (both South American and Australasian), while analyses based on molecular data retrieve both geographic clades, including their respective long-and-short-necked genera.

In the present thesis, this conflict was approached from a phylogenetic total-evidence perspective, integrating morphological and molecular data, incorporating extant and extinct species, and estimating the time of main evolutionary events through molecular clock analyses, in order to reach comprehensive conclusions, supported by multiple approaches and sources of information.

Therefore, in order to achieve this goal, new anatomical descriptions were produced, as well as new DNA sequences and morphological characters. The DNA sequences and morphological data were integrated into pre-existing data matrices, which were analyzed individually and in combination, under different methods of phylogenetic inference and divergence times estimation. In addition, the results from different stages of each analysis were statistically evaluated in order to test the robustness of the obtained conclusions.

The results based on the total-evidence context suggest the following: **i)** the clade Chelidae is a monophyletic group that emerged in the mid-Early Cretaceous (123.2 million years ago [mya]) and is currently composed by two geographic groups, the South American and the Australasian clade; **ii)** the origin of the clade Chelidae is inferred as South American in light of the presence of a basal clade composed by South American short-necked chelids as sister clade of Chelidae and the older age for the origin of the South American clade (109.7 mya) in comparison with the age for the origin of the Australasian clade (101.7 mya); **iii)** the long neck would have arisen independently in the South American clade during the Late Cretaceous (93.2 mya) and at the beginning of the Paleogene (65.26 mya) in the Australasian clade; **iv)** the most recent diversifications that produced the extant species would have occurred after the final break-up of southern Gondwana (50-35 mya).

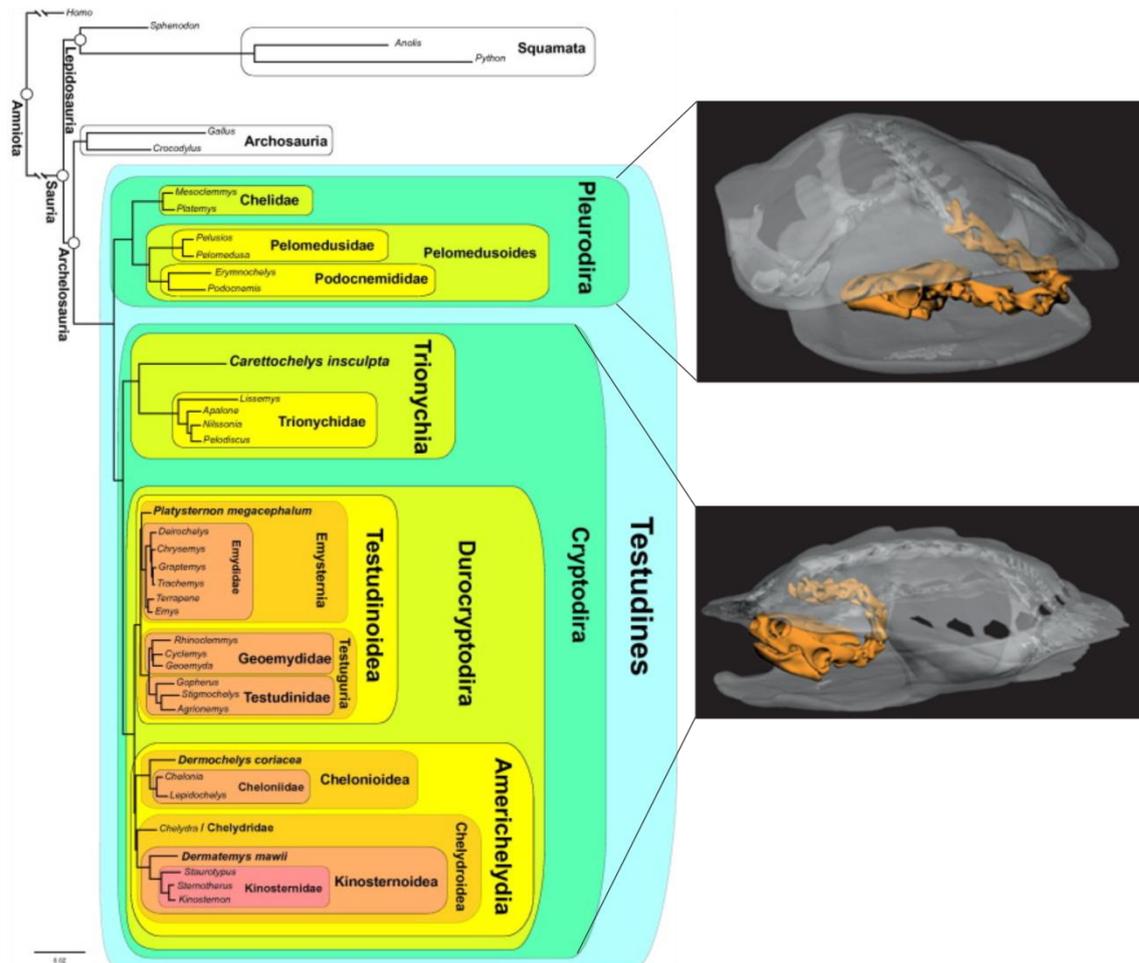
# Introducción general

## Orden Testudines

Las tortugas son un grupo de reptiles con un plan corporal único entre los vertebrados, el cual incluye una serie de adaptaciones morfológicas y fisiológicas, entre las que se puede nombrar: la presencia de una estructura ósea, que dorsalmente se encuentra fusionada a la columna vertebral y las costillas (espaldar), y ventralmente al esternón y las clavículas (plastrón), la cual cubre completamente a la cintura pectoral y a la cintura pélvica; el cráneo carece de fenestras temporales (condición por la cual fueron históricamente reconocidas como anápsidos [Williston, 1917]); el cuello compuesto de ocho vértebras cervicales, el cual es muy flexible y retráctil en más de un plano, permitiendo el resguardo de la cabeza dentro del caparazón (espaldar más plastrón); la mandíbula carece de dientes, cubierta por un pico córneo, y músculos abdominales vinculados a la respiración (dada la rigidez de la caja torácica), cuya función es análoga a la función del diafragma de los mamíferos (Kardong, 1998; Lyson & Joyce, 2012; Vitt & Caldwell, 2013).

Este grupo actualmente cuenta con 356 especies reconocidas (Turtle Taxonomy Working Group [TTWG], 2017) distribuidas a lo largo del mundo, y se ha diversificado de tal manera que ha sido capaz de colonizar ambientes marcadamente dispares, desde desiertos con extremas condiciones de temperatura y escaso acceso al agua, a ambientes dulceacuícolas y marinos. Las dietas son igualmente amplias, si bien gran parte de las especies son herbívoras, muchas son consumidoras de insectos o peces (en el caso de las especies acuáticas) y también muchas especies son generalistas. Al igual que otros reptiles las tortugas son ectotermos y ovíparos, sin embargo presentan tasas metabólicas marcadamente bajas, con generaciones extremadamente longevas y niveles de reproducción bajos en comparación con otros reptiles (Vitt & Caldwell, 2013).

Entre los conflictos en torno a la historia evolutiva de las tortugas, que aún hoy se mantienen activos entre los especialistas del grupo, se puede nombrar como los más importantes a los relacionados con: las relaciones filogenéticas de las tortugas y otros amniotas (*e.g.*, arcosaurios *versus* lepidosaurios [ver Crawford *et al.*, 2015]), el origen de los primeros taxones en los que se reconoce el plan corporal de las tortugas (taxones cercanamente relacionados con Testudinata *sensu* Joyce *et al.*, 2004) y su relación con formas más basales, el origen del caparazón, y el hábitat ecológico en el cual se desarrollaron las tortugas basales (ver Joyce, 2015 y estudios citados allí). Sin embargo, actualmente existe amplio consenso, tanto desde la evidencia morfológica como molecular (ver Sterli, 2010 y estudios citados allí y Crawford *et al.*, 2015), de que el orden Testudines es un grupo monofilético integrado por dos clados a nivel se suborden: **i)** Cryptodira, compuesto por tortugas terrestres, marinas y dulceacuícolas, que retraen el cuello de manera vertical (paralelamente el plano sagital del cuerpo) y **ii)** Pleurodira, compuesto por tortugas dulceacuícolas, que retraen el cuello de manera lateral (paralelamente al plano frontal del cuerpo) (Fig. I).



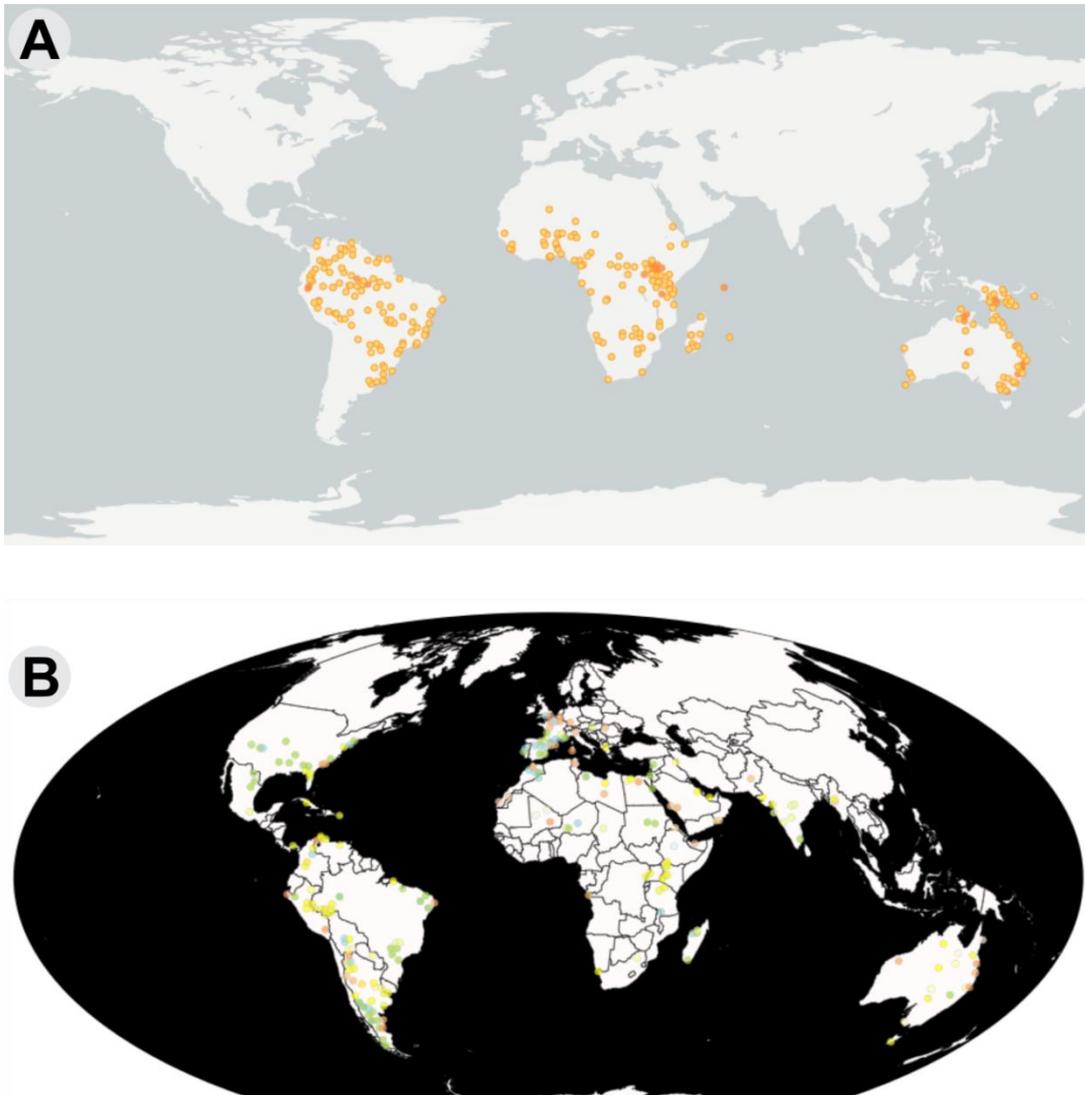
**Figura I.** Izquierda: Filogenia molecular de Crawford *et al.* (2015), donde se recuperan los dos subórdenes que integran el orden Testudines, con sus clados principales. Derecha: Modos de retracción del cuello en Pleurodira y Cryptodira (tomado de Werneburg *et al.*, 2015).

## Suborden Pleurodira

De las 356 especies de tortugas actuales reconocidas, sólo el 26,1% (93 especies) corresponden al suborden Pleurodira (TTWG, 2017). Esta disparidad, también se ve reflejada en la diversidad de formas morfológicas (*e.g.*, locomoción y alimentación en tierra [*e.g.*, *Chelonoidis niger*] versus locomoción y alimentación en el mar [*e.g.*, *Chelonia mydas*]), ambientes que ocupan (terrestre, dulceacuícola y marino) y los rangos de tamaños (de pequeño [*e.g.*, *Chelonoidis chilensis*] a gigante [*e.g.*, *Aldabrachelys gigantea*]) que presentan las especies criptodiras, en relación a las pleurodiras, que son en su totalidad dulceacuícolas y presentan tamaños de pequeño a mediano (Bonin *et al.*, 2006).

El rango de distribución actual de las especies pleurodiras se restringe al hemisferio sur, en particular Sudamérica, Australia, Nueva Guinea, África y Madagascar (TTWG, 2017) (Fig. IIA). Sin embargo, el registro fósil sugiere que este grupo presentaba una distribución mucho más amplia en el pasado, ocupando además de las regiones actuales, diferentes regiones del actual territorio de Eurasia, India y Norte América (Gaffney *et al.*, 2006) (Fig. IIB). Además, el registro fósil también indica que en el pasado Pleurodira contaba con integrantes de gran tamaño (gigantismo), como *Stupendemys* (Scheyer & Sánchez-Villagra, 2007) o *Mendozachelys* (de la Fuente *et al.*, 2017a).

Las especies actuales de Pleurodira, se encuentran formando parte de alguno de dos clados principales (Fig. I): Pelomedusoides, una hiperfamilia (*sensu* Gaffney *et al.*, 2006) que a su vez está integrada por dos familias (Pelomedusidae y Podocnemididae), y Chelidae, un clado también considerado al nivel taxonómico de familia (TTWG, 2017). Sin embargo, el registro fósil no sólo indica que Pleurodira fue en el pasado un grupo con mayor distribución global que la actual, sino que también demuestra que era un grupo con una diversidad taxonómica mucho más amplia, ya que se han presentado evidencias de la existencia de al menos tres familias más (Bothremydidae, Euraxemydidae y Araripemydidae), integradas exclusivamente por taxones extintos, cuyo representante más antiguo, *Atolchelys lepida*, data del Barremiano (130—126 millones de años antes del presente [maap]). Es decir que la evidencia fósil del *crown group* Pleurodira sugiere que durante el Cretácico Temprano (o antes) se produjeron radiaciones basales, que derivaron en riqueza de diversidad taxonómica y rangos de distribución globales, que posteriormente se fueron atenuando debido a los eventos de extinción que atravesó el grupo (Gaffney, 1977; Gaffney *et al.*, 2006; Gaffney *et al.*, 2011; Romano *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2018).



**Figura II.** Distribución actual (A) (GBIF.org) y pasada (B) (PaleoBiologyDataBase [PBDB]) de especies pertenecientes a Pleurodira. En B diferentes colores de ocurrencia indican diferentes tiempos geológicos.

## Clado Chelidae

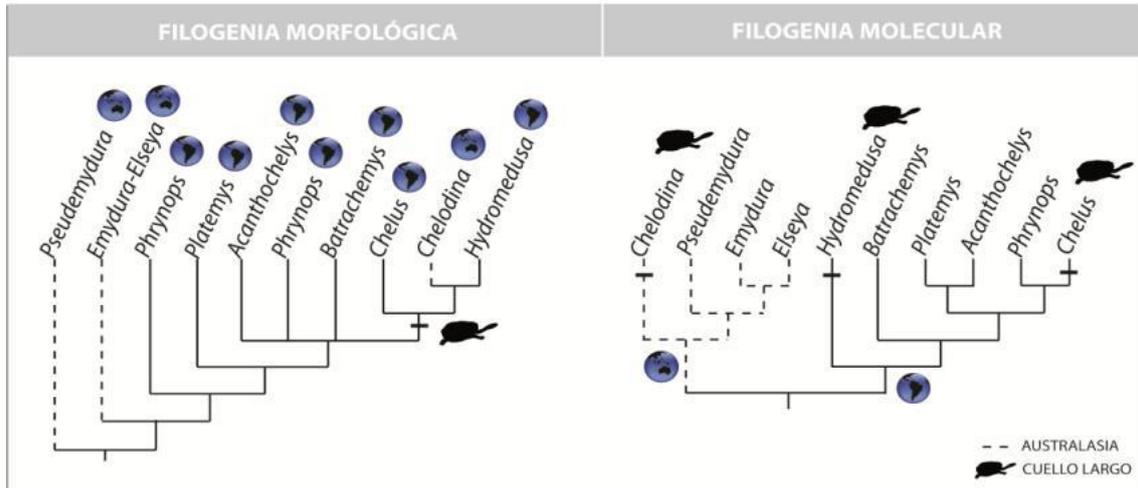
La definición de Chelidae (originalmente denominado “Chelydae” o “Chelydidae”) como grupo taxonómico a nivel de familia, surgió a partir del trabajo de Gray (1831), quien identificó a todas las especies pleurodiras conocidas entonces, como formas relacionadas con *Chelus fimbriata* (originalmente denominada “*Chelys fimbriatus*”). Esta denominación nomenclatural primaria se sostuvo a lo largo de casi cien años, hasta que Lindholm (1929) la modificó en Chelidae, el nombre que ha sido aceptado y usado hasta la fecha, para designar a las especies pleurodiras de Sudamérica y Australasia.

Entre los dos clados que integran el suborden Pleurodira, Chelidae es el grupo más diverso, contando con 58 de las 93 especies de tortugas pleurodiras actuales, y su distribución se restringe a Sudamérica y Australasia (Australia y Nueva Guinea). Las especies presentes en Sudamérica pertenecen a alguno de los siguientes géneros: *Acanthochelys*, *Chelus*, *Hydromedusa*, *Mesoclemmys*, *Phrynops* y *Rhinemys*; entre los cuales *Mesoclemmys* es el género más diverso (con diez especies reconocidas), en tanto que *Chelus* y *Rhinemys* son géneros monotípicos. Por su parte, las especies con distribución en Australasia, pertenecen a uno de los siguientes géneros: *Chelodina*, *Elseya*, *Elusor*, *Emydura*, *Myuchelys*, *Pseudemydura* y *Rheodytes*; donde *Chelodina* es el género más diverso (con 18 especies reconocidas), y tres de los demás géneros son monotípicos (*Elusor*, *Pseudemydura* y *Rheodytes*) (TTWG, 2017).

Hasta la actualidad, se han identificado alrededor de 25 especies extintas pertenecientes al clado Chelidae (*i.e.*, *crown group* Chelidae) o grupos basales relacionados (*i.e.*, *stem group* Chelidae) (Maniel & de la Fuente, 2016; Bona & de la Fuente, 2005; de la Fuente *et al.*, 2015, 2017a, b; Oriozabala *et al.*, 2019), cuyos representantes más antiguos datan del Cretácico Temprano (Albiano [110 maap]) de Argentina y Australia (Lapparent de Broin & de la Fuente, 2001; Lapparent de Broin & Molnar, 2001; Smith, 2010; de la Fuente *et al.*, 2011). La antigüedad de estos fósiles ha sido la base sobre la cual se apoyó la idea de un origen gondwánico del clado Chelidae o sus formas basales (Broin & de la Fuente, 1993).

Un aspecto icónico de este grupo es la presencia de morfotipos de “cuello largo” tanto en Sudamérica como Australasia, razón por la cual muchas veces los quelidos son referidos como “tortugas con cuello de serpiente” (Cogger, 1975; Cann, 1998; Bonin *et al.*, 2006). En las especies que exhiben esta condición, la longitud total del cuello supera la longitud total de las vértebras torácicas (Boulenger, 1889).

A partir de un enfoque ecológico y morfo-funcional, Pritchard (1984) sugirió que el cuello largo habría sido independientemente desarrollado por las especies que lo poseen, tanto en Sudamérica como en Australasia, como respuesta a diferentes estrategias de arponeo ejecutado durante la captura de peces, un movimiento que estas especies acompañan con una potente succión bucal. Esta postura, se contraponía con la idea de que el cuello largo había sido heredado tanto a las especies sudamericanas como a las australasiáticas a partir de un ancestro común, conclusión derivada de la primera hipótesis filogenética surgida a partir de un análisis morfológico, basado principalmente en caracteres craneanos, que años antes fuera presentada por Gaffney (1977). Posteriormente, los primeros análisis filogenéticos basados en datos moleculares (*e.g.*, Seddon *et al.*, 1997; Georges *et al.*, 1998), darían como resultado la monofilia de los dos grupos geográficos (sudamericano y australasiático), exponiendo el conflicto entre datos morfológicos y moleculares, el cual se ha extendido hasta la actualidad (Fig. III).



**Figura III.** Comparación de hipótesis filogenéticas simplificadas del clado Chelidae (modificado de de la Fuente *et al.*, 2013).

## Objetivos e hipótesis

### Objetivo general

Contribuir al conocimiento general sobre la evolución de las tortugas pleurodiras, un importante componente de la herpetofauna sudamericana, a partir del análisis de datos tanto morfológicos como moleculares, en un contexto de evidencia total.

### Objetivos específicos

1. Generar nuevas secuencias de ADN para Chelidae, que puedan ser integradas en matrices de datos moleculares, junto con otras secuencias disponibles en repositorios como GenBank.
2. Integrar nuevos caracteres morfológicos a matrices preexistentes de Chelidae.
3. Analizar tanto los datos morfológicos como los moleculares, individualmente y de manera combinada, a fin de evaluar las señales filogenéticas de cada tipo de dato, que hoy en día conducen a conclusiones contrapuestas sobre la evolución del grupo.
4. Proporcionar un marco temporal a las hipótesis evolutivas bajo evaluación, a partir de análisis de reloj molecular.
5. Extraer conclusiones integrales a partir de los datos analizados y las herramientas metodológicas aplicadas, que permitan reconocer los procesos y patrones paleobiogeográficos que condujeron a la actual distribución disjunta del clado Chelidae en Sudamérica y Australasia.
6. Realizar descripciones anatómicas, utilizando como modelo a los quelidos con distribución en Argentina, a fin de dar cuenta de las fuentes de variación que podrían ser exploradas en estudios posteriores y conducir hacia nuevos caracteres cladísticos.

## **Hipótesis**

1. Todas las especies sudamericanas forman un clado monofilético y todas las especies australasiáticas forman otro clado monofilético.
2. El cuello largo se originó independientemente en cada clado geográfico.
3. El clado Chelidae se habría originado en el Cretácico Temprano, en la región más austral de Gondwana.
4. La radiación basal en cada clado se produjo durante el Cretácico Tardío, y la diversificación principal, con surgimiento de géneros actuales, se habría producido en el Eoceno, en torno a la ruptura final del sur de Gondwana.

---

# *Capítulo I*

---

## **Relaciones filogenéticas**

## Resumen

Las relaciones filogenéticas del clado Chelidae representan un curioso y continuo debate, donde dependiendo de la fuente de información que sea analizada, los resultados sugieren historias evolutivas completamente contrapuestas para algunas de sus especies. En particular, en casi todos los análisis filogenéticos realizados hasta la fecha, a partir de datos morfológicos, las topologías obtenidas indican que el cuello largo es una novedad evolutiva compartida por las especies del género *Chelodina*, con distribución en Australasia, y los géneros *Chelus*, *Hydromedusa* y *Yaminuechelys* (este último extinto), con distribución en Sudamérica. Sin embargo, cuando las topologías son el resultado del análisis de datos moleculares, ambos grupos geográficos se recuperan consistentemente como monofiléticos, cada uno incluyendo a sus respectivos géneros de cuello largo.

A fin de indagar sobre esta contraposición de hipótesis evolutivas es que en esta sección de la presente tesis doctoral, se analizaron tanto datos morfológicos como moleculares, nuevos y preexistentes, de manera individual y de manera conjunta, provenientes de especies actuales y extintas, utilizándose dos criterios de búsqueda filogenética diferentes: Máxima Parsimonia (MP) e Inferencia Bayesiana (IB), los cuales fueron estadísticamente comparados, mediante un test de congruencia metodológica.

Los resultados aquí obtenidos sugieren: **i)** para los datos morfológicos, una estructura general de la topología obtenida que presenta similitudes con topologías moleculares, sin embargo las especies de cuello largo, a excepción de *Chelus fimbriata*, se recuperaron como un grupo monofilético; y **ii)** para datos moleculares la monofilia de ambos grupos geográficos, incluyendo especies extintas en posiciones “esperadas”, tanto dentro del clado Chelidae como por fuera de este. Además, del total de matrices de datos analizadas (ocho), solo en tres se comprobó que los métodos fueron estadísticamente congruentes en sus resultados, lo cual comprueba la importancia de la evaluación tanto de los datos que se analizan, como de los métodos que se aplican a fin de obtener conclusiones integralmente sustentadas.

## 1.1. Introducción

### 1.1.1. Relaciones filogenéticas del clado Chelidae

La estructura taxonómica del clado Chelidae fue establecida por primera vez hace más de un siglo, cuando Boulenger (1889) clasificó al grupo en géneros de cuello largo, cuyas especies presentan una longitud del cuello superior a la longitud de las vértebras torácicas, y géneros de cuello corto, cuyas especies presentan una longitud del cuello inferior a la longitud de las vértebras torácicas. Esta estructura fue corroborada posteriormente por el primer análisis filogenético realizado para el grupo, basado en datos morfológicos (Gaffney, 1977) y varios estudios posteriores, que además de incluir especies actuales incluyeron también especies extintas (Bona & de la Fuente, 2005; de la Fuente *et al.*, 2015, 2017b; Maniel *et al.*, 2018; Oriozabala *et al.*, 2019). Cada uno de estos estudios, recuperó a partir de sus análisis, consistentemente un clado que incluía a todas las especies de cuello largo. Sin embargo algunos de los últimos análisis realizados muestran determinadas excepciones: **i)** de la Fuente *et al.* (2017a) y Maniel *et al.* (2020) presentan topologías donde el clado de quelíidos de cuello largo, además incluye a especies extintas de cuello corto (*Mendozachelys wichmanni* y *Bonapartemys bajobarrealis*, respectivamente), y **ii)** Holley *et al.* (2020) recupera una topología morfológica donde *Chelus fimbriata* no está incluida en el clado de especies de cuello largo, sino en la base de un clado mucho más amplio. Es decir, que estos estudios representan casos donde la monofilia del clado de quelíidos de cuello largo no fue recuperada.

Por su parte, la señal filogenética (*i.e.* dependencia estadística entre especies debido a ancestralidad [Felsenstein 1985; Revell *et al.*, 2008]) recuperada desde la primera vez que se analizaron datos moleculares para este grupo, es completamente diferente. Las topologías que se han producido como resultado del análisis de esta fuente de información taxonómica (Seddon *et al.*, 1997; Shaffer *et al.*, 1997; Georges *et al.*, 1998; Guillon *et al.*, 2012; Rodrigues & Diniz-Filho, 2016; Pereira *et al.*, 2017), sugieren que las especies con distribución en Australasia y las especies con distribución en Sudamérica, forman en cada caso un grupo monofilético. Es decir que está implícito en esta hipótesis filogenética, que el cuello largo apareció independientemente en cada clado, posiblemente como una adaptación a la piscivoría (Pritchard, 1984), en lugar de representar esta característica una novedad evolutiva compartida y heredada a partir de un ancestro común.

### 1.1.2. Métodos de reconstrucción filogenética

La clasificación de los organismos en grupos, definidos bajo determinados criterios, ha sido una labor realizada por naturalistas desde hace más de dos mil años. Sin embargo, no fue hasta el surgimiento del concepto darwiniano de evolución con modificación, modelada por el ambiente (Darwin, 1909), que se aceptó en la comunidad científica, que los procesos (macro) evolutivos se construyen desde eventos poblacionales en los que surgen nuevas entidades biológicas a partir de ancestros comunes; un fenómeno que resulta en una estructura arborescente, con ramas que conducen hacia linajes derivados a partir de linajes ancestrales. Este sustento teórico fue la base fundamental sobre la que Willi Hennig desarrolló su obra *Phylogenetic Systematics* (Hennig, 1965), donde propuso un método cuantitativo a partir del cual se establecían relaciones jerárquicas entre los organismos a partir de novedades evolutivas compartidas (sinapomorfías). Luego del surgimiento de esta disciplina, no tardó en

desarrollarse un criterio de optimización *ad hoc*, el cual seleccionaría como la mejor hipótesis filogenética (para los datos analizados) a la que minimizara la cantidad de cambios evolutivos. Este método se conoce como Máxima Parsimonia (MP) (Camin & Sokal, 1965; Kluge & Farris, 1969; Farris, 1970).

Posteriormente, se desarrollaron otros métodos de inferencia filogenética, sobre la base de criterios filosóficamente distantes como pueden ser: los criterios probabilísticos (*e.g.*, Máxima Verosimilitud [MV] e Inferencia Bayesiana [IB]), los criterios basados en distancias (*e.g.*, Neighbor Joining) o criterios basados en similitud global (*e.g.*, Taxonomía Numérica [Fenética]) (Fisher, 1912; Sneath & Sokal, 1973; Felsenstein, 1981a, b, c; Saitou & Nei, 1987; Yang & Rannala, 1997; Mau & Newton, 1997; Huelsenbeck & Ronquist, 2001).

Dados los fundamentos teóricos que sustentan cada uno de los métodos, así como el avance en los recursos de software, hardware y algorítmia, que se han desarrollado paralelamente al avance en el tamaño y la complejidad de los *dataset* producidos en el estudio de la taxonomía y la biodiversidad, la inferencia mediante MP y mediante los métodos probabilísticos, se ha impuesto por sobre los demás métodos.

Estas dos vertientes metodológicas han estado en debate sobre su adecuación y rendimiento por más de treinta años. En general existe bastante aceptación entre sistemáticos en que MP es un método más adecuado para datos morfológicos que para datos moleculares, donde la principal crítica radica en la prescindencia de modelos de evolución molecular, los cuales son absolutamente necesarios para la aplicación de los métodos probabilísticos (ver Felsenstein, 2004). En contrapartida, se ha argumentado que el modelo evolutivo desarrollado para el análisis de datos morfológicos mediante IB o MV (Mkv [Lewis, 2001]) presenta un ajuste pobre a los datos, cuando los mismos son producidos empíricamente, resultando en topologías que presentan altos porcentajes de “nodos incorrectos” (Xu & Pol, 2013; Goloboff *et al.*, 2018).

En este contexto, los métodos MP e IB fueron aplicados en este capítulo de tesis para producir las topologías, correspondientes a cada uno de los *dataset* analizados y luego los resultados fueron explicados tanto desde una visión crítica vinculada al conocimiento y los antecedentes en cuanto a las relaciones filogenéticas del clado Chelidae, como mediante un test estadístico que informe acerca de la congruencia metodológica y estabilidad de los datos en cada caso.

## 1.2. Materiales y métodos

**Abreviaturas institucionales.** Las siguientes abreviaturas refieren a los especímenes nombrados posteriormente. **IBS-LGE:** Instituto de Biología Subtropical - Laboratorio de Genética Evolutiva, Posadas, Misiones, Argentina. **MZ-UFV:** Museu de Zoologia - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, Brasil. **MPL:** Museo de Ciencias Naturales de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

### 1.2.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de tejido muscular fresco obtenido de especímenes de las siete especies de quélidos con distribución en Argentina (incluyendo *Acanthochelys spixii* [ver breve discusión sobre la distribución de esta especie en el Capítulo

III]), más la especie endémica de Brasil *Hydromedusa maximiliani* (espécimen MZ UFV 0055-C). Los tejidos correspondientes a las especies de Argentina fueron cedidos por el Dr. Diego Baldo (Laboratorio de Genética Evolutiva, Instituto de Biología Subtropical - Universidad Nacional de Misiones, Argentina), en tanto que los tejidos de *H. maximiliani* fueron cedidos por el Dr. Pedro Romano (Departamento de Biología Animal, Universidade Federal de Viçosa, Brasil). Las especies con distribución en Argentina y los respectivos especímenes, fuente de las extracciones de ADN son: *Acanthochelys pallidipectoris* (LGE 8468), *Acanthochelys spixii* (LGE 01344), *Hydromedusa tectifera* (MLP DB 6183, MLP DB 6521, LGE 15749), *Mesoclemmys vanderhaegei* (LGE 219, MLP DB 5281, MLP DB 5282, MLP DB 6496, LGE 01343), *Phrynops geoffroanus* (LGE 15739, MLP DB 5283, MLP DB 5284, MLP DB 6495), *Phrynops hilarii* (LGE 15743, MLP DB 6182, MLP DB 6494, MLP DB 6527) y *Phrynops williamsi* (LGE 11730, A353 [cedido por el Dr. Alejandro Giraudo, INALI - CONICET]).

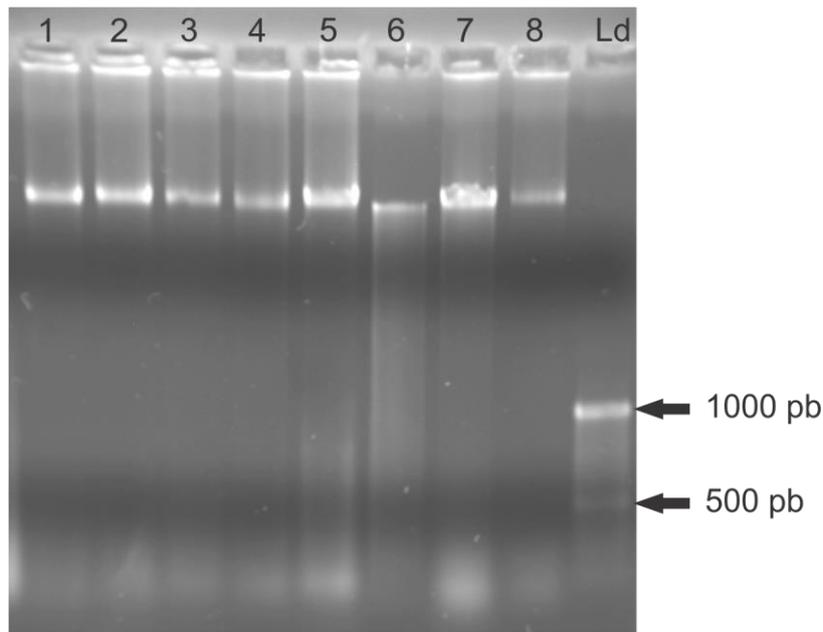
El procedimiento de extracción de ADN se realizó siguiendo uno de dos protocolos: **i)** extracción mediante fenol-cloroformo adaptada de Sambrook & Russell (2001), o **ii)** mediante una modificación del método de extracción con cloruro de sodio propuesto por Aljanabi & Martinez (1997) (Tabla 1.2.1). En el Apéndice I se detallan las soluciones de laboratorio nombradas en los protocolos de extracción y protocolos posteriores.

**Tabla 1.2.1.** Protocolos de extracción de ADN utilizados.

	<b>Extracción mediante Fenol-Cloroformo</b>	<b>Extracción mediante NaCl</b>
<b>1</b>	Colocar los trozos (2-3 mm <sup>2</sup> ) de tejido (hígado o músculo) en un tubo de 1,5 ml.	Colocar los trozos (2-3 mm <sup>2</sup> ) de tejido (hígado o músculo) en un tubo de 1,5 ml.
<b>2</b>	Agregar 500 µl de buffer de lisis y 15 µl de proteasa K.	Agregar 500 µl de buffer de lisis y 15 µl de proteasa K.
<b>3</b>	Incubar a 55 °C durante aproximadamente 3 Hs.	Incubar a 55 °C durante aproximadamente 3 Hs.
<b>4</b>	Agregar al tubo 500 µl de fenol, cloroformo, y alcohol isoamílico en proporciones 25:24:1.	Centrifugar 15 min a 13000 rpm.
<b>5</b>	Mezclar suavemente.	Pipetear 230 µl y poner en nuevo tubo
<b>6</b>	Centrifugar 15 minutos a 13.000 rpm.	Agregar 150 µl de NaCl (5M), agitar un poco y centrifugar 15 min a 13000 rpm.
<b>7</b>	Pipetear sobrenadante (400 µl) y pasar a un nuevo tubo.	Pipetear sobrenadante (340 µl) y descargar en un nuevo tubo.
<b>8</b>	Agregar el doble de volumen de Etanol absoluto frío.	Agregar el doble (640 µl) de etanol absoluto frío.
<b>9</b>	Centrifugar 15 minutos a 13.000 rpm.	Centrifugar 15 min a 13000 rpm.
<b>10</b>	Quitar el alcohol, secar a 37 °C.	Quitar el alcohol, secar a 37 °C.
<b>11</b>	Resuspender con 50 µl de buffer TE.	Resuspender en 50 µl de buffer TE.
<b>12</b>	Conservar a 4 °C durante 12 Hs.	Conservar a 4 °C durante 12 Hs.
<b>13</b>	Realizar diluciones 1:10 y 1:100 para pruebas posteriores.	Realizar diluciones 1:10 y 1:100 para pruebas posteriores.

Una vez finalizada la extracción, el ADN genómico extraído fue inspeccionado en corridas electroforéticas en geles de agarosa al 1% teñidos con Bromuro de Etidio o SYBR Green I (ThermoFisher Scientific). El procedimiento consiste en la carga de 2 µl de cada muestra (productos de la extracción de ADN o, posteriormente PCR) más 1 µl de buffer de carga

(*Loading Buffer*) en los “pocillos” (*wells*) del gel de agarosa, que se encuentra sumergido en una cuba con solución buffer TAE o TBE (ver Apéndice I). Además, las cargas de las muestras en los geles de agarosa se acompañan con la carga, de un marcador de peso molecular (Fig. 1.2.1). Posteriormente, se aplica a la cuba un voltaje de entre 80 y 100 VDC, que produce en el buffer una diferencia de potencial capaz de generar el desplazamiento de los productos de ADN a través del gel, durante 30-60 min. Por último el gel es analizado con luz ultravioleta en un transiluminador Vilber Lourmat y el ADN extraído (o amplificado) es evaluado en calidad y cuantificado mediante la comparación de la intensidad de las bandas de ADN obtenidas, contra las del marcador de peso molecular, que representan concentraciones conocidas. El marcador de peso molecular utilizado fue el Mass Ruler\* DNA Ladder Low Range-100 bp (Fermentas\*).



**Figura 1.2.1.** Gel de agarosa al 1% correspondiente a la extracción de ADN, experimento CHE-39 de la carpeta de registros de experimentos realizados en el presente trabajo de tesis. Las muestras sembradas en las calles 1-8 corresponden a las siguientes especies: *Acanthochelys pallidipectoris*, *Acanthochelys spixii*, *Hydromedusa maximiliani*, *Hydromedusa tectifera*, *Mesoclemmys vanderhaegei*, *Phrynops geoffroanus*, *Phrynops hilarii* y *Phrynops williamsi*. Las flechas indican bandas de referencia del marcador de peso molecular (Ld).

### 1.2.2. Amplificación y secuenciación de ADN

Una vez obtenido, evaluado y cuantificado el ADN genómico, se comenzó con el proceso de amplificación mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). En esta parte se buscó amplificar fragmentos de genes o genes completos (mitocondriales y nucleares) en función de iniciadores (*primers*) de genes previamente amplificados y secuenciados en tortugas, con validación de su valor taxonómico a través de publicaciones científicas (ver Tabla 1.2.2). Los genes mitocondriales seleccionados son: ARN ribosomal 12s (ARNr 12s), ARN ribosomal 16s (ARNr 16s), Citocromo b (CytB), Citocromo Oxidasa I (COI) y NADH dehidrogenasa 4 (ND4). Los genes nucleares seleccionados son: gen Activador de la Recombinación I (R-AG1), gen del ARN de la proteína 35 (R35 *fingerprint*) y el oncogen c-mos. La tabla 1.2.2 da detalle de los primers utilizados para las reacciones de PCR y de secuenciación, así como el largo de los fragmentos amplificados y la fuente a partir de la cual

se obtuvieron los mismos, y sus respectivos protocolos de amplificación (ver también Tabla 1.2.3).

**Tabla 1.2.2.** Primers utilizados en el proceso de amplificación y secuenciación de ADN.

Gen	Primers	Secuencia (5' → 3')	Largo total	Fuente
RAG1	RAGF1	CCWGAWGARATTCAGCAYCC	2790 pb	Krenz <i>et al.</i> (2005)
	RAGR1	GCAAGATCTCTTCATCRCATTC		
	RAGF2	GAGATCATTYGAAAAGGCACC		
	RAGR2	GATGTTTCAGGAAGGATTTCACT		
	RAGF3	AGAACCTGCATCCTRAAGTGC		
	RAGR3	CTCAGGATGGCTGTCAGAGTC		
	RAGR4	TGCAACACAGCTCTGAATTGG		
	RAGF5	GAGATGTCAGYGAGAAGCATG		
RAGR5	GACATCCTCCATTTTCATAGC			
ARNr 12s	L1091	AAAAAGCTTCAAACCTGGGATTAGATACCCCACTAT	386 pb	Kocher <i>et al.</i> (1989)
	H1478	TGACTGCAGAGGGTGACGGGCGGTGTGT		
R35*	R35Ex1	ACGATTCTCGCTGATTCTTGC	1200 pb	Fujita <i>et al.</i> (2004)
	R35Ex2	GCAGAAAACCTGAATGTCTCAAAGG		
c-mos*	G73	GCGGTAAAGCAGGTGAAGAAA	417 pb	Saint <i>et al.</i> (1998)
	G74	TGAGCATCAAAGTCTCCAATC		
ARNr 16s	M89 (L)	AGGAGTGATGCCTGCCAGTGAC	471 pb	Georges <i>et al.</i> (1998)
	M90 (H)	CCTTAATAGCGGCTGCACCATTAGGA		
COI	M72 (L)	TGATTCTTCGGTCACCCAGAAGTGTA	393 pb	
	M73 (H)	CCTATTGATAGGACGTAGTGAAGTG		
CytB	GLUDGL	TGA CTT GAA RAA CCA YCG TTG	900 pb	Palumbi (1996)
	CB3-3'	GGC AAA TAG GAA RTA TCA TTC		
ND4	ND4	CAC CTA TGA CTA CCA AAA GCT CAT GTA GAA GC	890 pb	Arevalo <i>et al.</i> (1994)
	Leu	CAT TAC TTT TAC TTG GAT TTG CAC CA		

\* genes para los cuales no se produjeron secuencias de buena calidad a pesar de lograrse productos de PCR con éxito.

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl, que consistió de: 17,25 µl de H<sub>2</sub>O, 2,5 µl de buffer (10x), 0,5 µl de dNTPs (50 nM), 1 µl de cada primer (1 µM), 1,5 µl de ClMg<sub>2</sub> (50 nM), 0,25 µl de Taq DNA polimerasa (Invitrogen) y 1 µl de ADN (con una concentración aproximada de 10 ng/µl).

Las reacciones de PCR se producen en tres etapas principales, que varían en tiempos y temperaturas: **1)** Desnaturalización, **2)** Amplificación (que a su vez consta de N ciclos de 3 etapas [desnaturalización, hibridación y extensión]) y **3)** Extensión final. Las condiciones de estas tres etapas, así como la cantidad de ciclos de amplificación varían entre los genes seleccionados. Dichas condiciones fueron tomadas (y en algunos casos modificadas respecto de las originales) de las publicaciones de referencia (Tabla 1.2.2), y se detallan en la tabla 1.2.3.

Los productos de PCR se inspeccionaron en corridas de electroforesis de geles de agarosa al 1% (Fig. 1.2.1), como se mencionó anteriormente para la visualización de las extracciones de ADN.

En los casos en los que se detectaron bandas inespecíficas y las mismas no pudieron eliminarse, en reacciones sucesivas, ajustando las condiciones de reacción y ciclado de PCR, las bandas de interés fueron extraídas de los geles de agarosa con bisturí bajo luz ultravioleta y se purificaron siguiendo el protocolo establecido en el kit Wizard SV Gel (Promega). Luego el ADN recuperado de dichas bandas fue resuspendido y utilizado como molde en nuevas reacciones de PCR para obtener la amplificación limpia de los fragmentos de interés.

**Tabla 1.2.3.** Condiciones de ciclado en las reacciones de PCR realizadas.

Gen	Desnaturalización	N	Amplificación			Extensión final
RAG1	5 min a 94 °C	30	30 seg a 94 °C	1 min a 55 °C	90 seg a 72 °C	5 min a 72 °C
ARNr 12s	5 min a 94 °C	35	1 min a 93 °C	1 min a 50 °C	3 min a 72 °C	6 min a 72 °C
R35	5 min a 94 °C	35	30 seg a 94 °C	90 seg a 60 °C	2 min a 72 °C	10 min a 72 °C
c-mos	3 min a 94 °C	35	45 seg a 94 °C	45 seg a 48-55 °C	1 min a 72 °C	6 min a 72 °C
ARNr 16s	3 min a 94 °C	36	45 seg a 94 °C	45 seg a 48 °C	1 min a 72 °C	6 min a 72 °C
COI	3 min a 94 °C	35	45 seg a 94 °C	45 seg a 48 °C	1 min a 72 °C	6 min a 72 °C
CytB	2 min a 94 °C	40	30 seg a 94 °C	45 seg a 43 °C	1 min a 72 °C	6 min a 72 °C
ND4	3 min a 94 °C	35	30 seg a 94 °C	1 min a 50 °C	2 min a 72 °C	6 min a 72 °C

N: Número de ciclos de amplificación.

Posteriormente, los productos de PCR fueron purificados con el Kit GeneClean III (MP Biomedicals) o con el sistema de vacío Millipore Montage 96-Well. Las reacciones de secuenciación fueron realizadas en placas de 96 celdas cada una, usando el protocolo estándar de Big Dye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Inc.) y las secuencias de cada fragmento de ADN fueron obtenidas en un Analizador Genético ABI 3130 (Applied Biosystems, Inc.). En todos los casos se secuenciaron las dos hebras de ADN (*forward* y *reverse*), con el fin de corroborar la calidad de las secuencias.

Cada etapa de este proceso se llevó a cabo en instalaciones del Laboratorio de Identificación Genética (IdeGen), dependiente del Instituto de Diversidad y Evolución Austral (IDEAus-CONICET).

### 1.2.3. Edición y alineamiento de secuencias

El ensamble de las dos hebras de ADN secuenciadas se llevó a cabo mediante el análisis de los cromatogramas utilizando el programa DNA Baser versión 3 (Heracle BioSoft, Pitesti, Romania).

El acoplamiento de las secuencias individuales y posterior confección de las matrices moleculares, así como su edición, se llevó a cabo usando el software BioEdit versión 7.1.3 (Hall, 1999). Este software se utilizó además para producir los alineamientos finales, mediante la aplicación del algoritmo ClustalX2 (Larkin *et al.*, 2007), que permite el alineamiento simultáneo de múltiples secuencias en función de la similitud global y local estimada, y su comparación con una topología de referencia. En una primera etapa se realizaron todos los alineamientos con los parámetros por default, luego estos alineamientos se inspeccionaron y en algunos casos se realizó el análisis nuevamente variando las condiciones de penalidad de inserción de gaps, a fin de reducir la tasa de introducción de gaps espurios. Finalmente, los alineamientos se editaron quitando gaps excesivos del inicio y final (*leading* y *trailing* gaps) de cada matriz.

### 1.2.4. Set de datos

Los datos utilizados para los análisis filogenéticos fueron tomados del estudio de Holley *et al.* (2020) y complementados con datos nuevos y provenientes de otros estudios o fuentes de información. Estos datos constan de dos bloques principales: **i)** la matriz morfológica y **ii)** la matriz molecular (compuesta por ocho genes).

La matriz morfológica de Holley *et al.* (2020) constaba de 33 taxones y 65 caracteres, la misma fue incrementada en un taxón (*Chelydra serpentina* [Outgroup]) y en 35 caracteres, de los cuales 23 fueron tomados del estudio de Oriozabala *et al.* (2020) y doce fueron codificados de manera original en esta tesis, a partir de información publicada (Bull & Legler, 1987; Reed *et al.*, 1991; Montiel *et al.*, 2016; Bista & Valenzuela, 2020; Mazzoleni *et al.*, 2020) sobre las características de los complejos cromosómicos (cariología) de 17 de los taxones incluidos en esta matriz (ver Apéndice II para detalle de los caracteres incluidos y sus estados). La matriz final de datos morfológicos, quedó integrada por 34 taxones y 100 caracteres; la misma fue completamente construida y editada usando el software Mesquite Versión 3.61 (Maddison & Maddison, 2007).

La matriz molecular concatenada de Holley *et al.* (2020) constaba de 51 taxones y 7815 caracteres, la misma fue incrementada en 2515 caracteres, en tanto que la cantidad de taxones se mantuvo. Entre los caracteres incorporados se encuentran todas las secuencias producidas en esta tesis para todas las especies con distribución en Argentina más *H. maximiliani*, junto a nuevas secuencias obtenidas de GenBank (ver Apéndice III). La matriz concatenada obtenida quedó integrada por 51 taxones y 10330 caracteres.

#### **Procesamiento de datos moleculares**

Una vez que se obtuvieron todas las matrices moleculares alineadas, las mismas se concatenaron en una única matriz molecular, usando el software SequenceMatrix 1.7.8 (Vaidya *et al.*, 2011). Dado que diferentes regiones del ADN pueden presentar tasas evolutivas compatibles y a los efectos de que los análisis posteriores se valen de las mismas para la adecuación de modelos probabilísticos que ajusten los algoritmos de búsqueda filogenética, la matriz concatenada fue re particionada en función del esquema óptimo de particiones hallado mediante el software PartitionFinder (Lanfear *et al.*, 2012), bajo el siguiente esquema paramétrico: largos de rama ligados entre particiones, *greedy* como algoritmo de búsqueda, selección de modelos evolutivos con esquema MrBayes y Criterio Bayesiano de Información (BIC) como criterio de selección de modelos y del esquema de particiones estadísticamente mejor soportado (ver Apéndice IV). Así, el esquema final de particiones moleculares resultante, con sus respectivos modelos evolutivos, y las constantes de concavidad (K) seleccionadas para cada partición en los análisis filogenéticos bajo Máxima Parsimonia (ver sección 1.2.5) se muestran en la tabla 1.2.4.

**Tabla 1.2.4.** Particiones moleculares halladas con PartitionFinder.

Partición	Inicio	Final	Largo	K	Me
ARNr12s-16s	1	2685	2684	2,25	GTR+G
COI	2686	4236	1550	2,15	GTR+I+G
CytB-ND4	4237	6054	1817	5,81	GTR+I+G
RAG1-R35	6055	9965	3910	0,42	HKY+G
c-mos	9966	10330	364	0,87	K80+I

**K:** constante de concavidad. **Me:** modelo evolutivo óptimo.



$$w = \frac{h}{(h + k)}$$

Mirande (2019) presenta un procedimiento en el cual se comparan mediante distancias de SPR, las topologías resultantes de cinco análisis, bajo cinco Ks diferentes. Estos cinco valores determinan que un carácter promedio tenga entre un 60% y un 80% del peso de un carácter jerárquico. Además, presenta las siguientes estrategias de pesado de caracteres: **SEP**: donde cada carácter es pesado individualmente en función de su propia homoplasia, **COD**: donde grupos de tres caracteres se pesan en función de la homoplasia promedio del triplete, **BLK**: donde cada carácter, de una determinada partición, es pesado en función de la homoplasia promedio de la partición, y **POS**: donde se considera la homoplasia promedio de cada posición de codón al estimar el peso asignado.

Este método fue seguido aquí, considerando algunas modificaciones: **i)** en lugar de comparar topologías mediante distancias de SPR, se compararon mediante distancias topológicas (distancias de Robinson-Foulds [Robinson & Foulds, 1981]); **ii)** se estimaron seis valores de K (en lugar de cinco) de manera que un carácter promedio tuviera entre el 50% y el 99% del peso de un carácter perfecto; **iii)** en lugar de aplicar las cuatro estrategias de pesado, sólo dos fueron seleccionadas: **SEP**, para la matriz morfológica y la matriz ribosomal ARNr 12s-16s, ya que es esperable que estas matrices tengan tasas de cambio independientes entre caracteres; y **POS**, para las demás matrices de genes, ya que se esperan tasas de cambio similares entre posiciones de codones para matrices de genes codificantes; **iv)** la matriz Concatenada y la matriz de Evidencia Total fueron pesadas usando en cada partición el K que resultó “más estable” (o el promedio en caso de que haya más de uno) en cada proceso individual, en lugar de aplicar las nombradas estrategias de pesado.

Las comparaciones topológicas se realizaron entre cada MPT obtenido bajo un K determinado y todos los MPTs obtenidos bajo las demás constantes de concavidad, seleccionando como la condición analítica “más estable” la que minimizó la media de las distancias topológicas (Fig. 1.3.1, Tabla 1.3.1).

En los casos en los que más de una topología resultó seleccionada, se calculó el consenso estricto (comando: `nelson*`;) y se retuvo esa topología como el árbol final de todo el proceso. Por último si la resolución del consenso estricto resultó muy pobre, mostrando grandes politomías, los taxones inestables se identificaron mediante la función PCR internamente implementada en TNT (comando: `pcr.> 0; nelson//{0};`), luego dichos taxones fueron excluidos y los análisis se repitieron.

Para cada topología óptima finalmente seleccionada, se estimaron valores de soporte de ramas mediante de 1000 réplicas de Bootstrap con frecuencias absolutas (comando: `resample= boot freq no gc re 1000 from 0;`).

La mayoría de estos procedimientos se automatizaron mediante scripts *ad hoc* en lenguaje macro de TNT (para la implementación de pesos implicados y las búsquedas filogenéticas) y en lenguaje R (R core team, 2020) para la comparación de resultados mediante distancias topológicas (Apéndice IV).

### ***Inferencia Bayesiana (IB)***

Los análisis filogenéticos basados en IB se realizaron usando el software MrBayes versión 3.2 (Ronquist *et al.*, 2012). Así, cada matriz se analizó mediante dos corridas independientes de cuatro Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC, una cadena fría y tres cadenas calientes) cada una, a lo largo de 30 millones de generaciones, muestreando árboles y valores de Log Likelihood de los parámetro cada 1000 generaciones. En cada análisis se descartó el 10% de muestras iniciales (*burnin*) y se fijó, en el caso de las matrices moleculares, el modelo evolutivo óptimo hallado con PartitionFinder (Tabla 1.2.4), en tanto que la matriz morfológica se analizó bajo el modelo Mkv (Lewis, 2001), con tasa de variación morfológica ajustada a una distribución gamma discreta. Tanto para el análisis de la matriz concatenada, como para la matriz de evidencia total, los mismos se llevaron a cabo definiendo los modelos de evolución para cada partición (ver Apéndice IV). Por último, para cada matriz analizada, los resultados (distribuciones de estimaciones paramétricas y soportes de ramas) fueron resumidos en un árbol consenso de mayoría (*Majority Rule Tree*), cuyos soportes de ramas son definidos según el valor de la probabilidad posterior de cada nodo.

La convergencia de las corridas (en cuanto a sus parámetros), así como la estabilidad de la fase estacionaria y el registro del tamaño muestral efectivo (*ESS: Effective sample size*), el cual debe ser superior a 100 para que los resultados de los análisis sean confiables, fueron inspeccionados mediante el software Tracer versión 1.7 (Rambaut *et al.*, 2018) y la estabilidad topológica de los árboles generados a través de las cadenas MCMC fue inspeccionada con la librería RWTY (Warren *et al.*, 2017), desarrollada en lenguaje R.

Todos los árboles fueron salvados en formato parentético de TNT (comandos TNT: `tsave* "nombre_arbol.tre"; save #; tsave/;`), así como en formato nexus (comandos TNT: `export- "nombre_arbol.tre";` comandos MrBayes: `sumt;`) para su uso en análisis posteriores y su procesamiento gráfico mediante el software FigTree versión 1.4 (Rambaut, 2012).

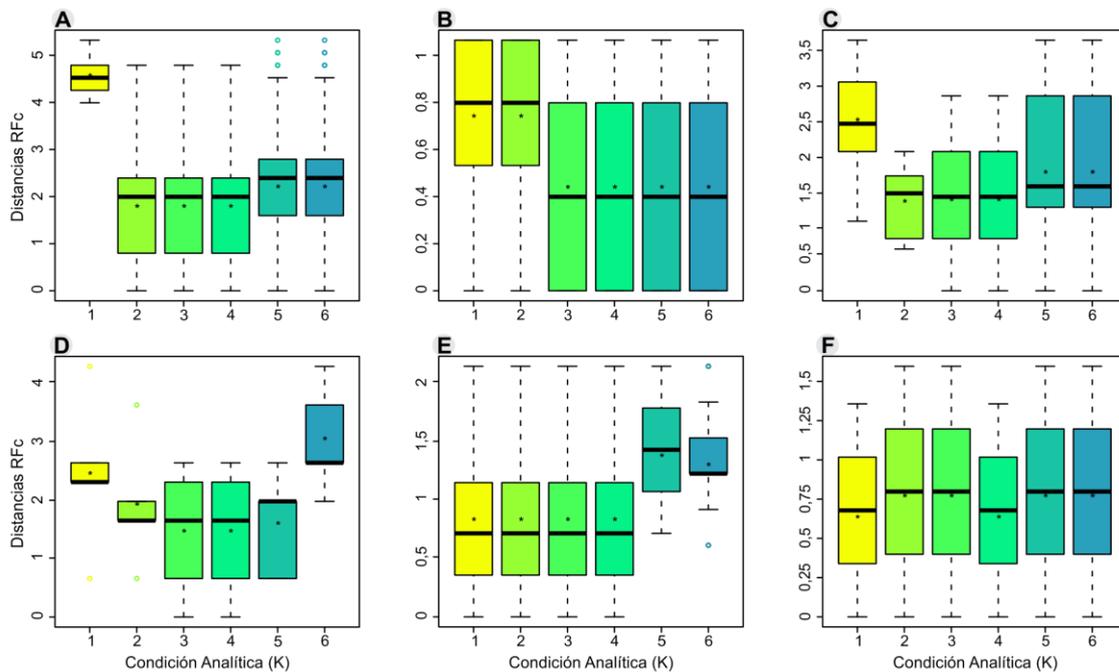
#### **1.2.6. Test de congruencia metodológica**

A fin de explorar la congruencia en los resultados de los análisis filogenéticos en función de los métodos aplicados, se diseñó un test estadístico que evalúa la probabilidad de que un nodo cualquiera del “árbol óptimo” bajo uno de los métodos, sea recuperado en una muestra de cien árboles correspondientes al otro método. En este procedimiento se producen dos distribuciones de valores de distancias topológicas (Robinson-Foulds [RF]), que luego son comparadas mediante una prueba *t* paramétrica independiente, reportándose el valor *p* de la prueba, el valor del estadístico asociado y el valor del error estándar; así como un gráfico de barras comparadas, con barras de error de 2 errores estándar de longitud, correspondientes a la mitad de los intervalos de confianza del 95% para la media de dichas distribuciones. Brevemente, el script desarrollado para realizar este análisis (Apéndice IV) lee el árbol óptimo bajo MP (*AOMP*), luego muestrea 100 árboles de la fase estacionaria de las cadenas MCMC (*AMCMCs*) del análisis bayesiano, y calcula las distancias RF del *AOMP* con cada árbol de la muestra *AMCMCs*, guardando su valor en un vector, hasta conformar la distribución de valores RF de *AOMP versus AMCMCs*. Posteriormente el proceso se repite con el árbol óptimo del análisis bayesiano (*AOIB*) y una muestra de cien árboles de bootstrap producidos bajo MP (*ABOOTs*) y se conforma la distribución de valores RF de *AOIB versus ABOOTs*. Una vez

obtenidas las dos distribuciones de valores de distancias RF, se aplica la prueba *t* y se reportan los resultados de la prueba en una tabla y un gráfico (Tabla 1.3.2, Fig. 1.3.10).

### 1.3. Resultados

La figura 1.3.1 muestra la distribución de valores de distancias topológicas corregidas (RFc) calculadas para cada matriz de datos y cada condición analítica explorada durante los análisis filogenéticos bajo MP. Las seis constantes de concavidad (K) calculadas para cada matriz (Tabla 1.3.1), se corresponden con la asignación del peso en caracteres homoplásicos en proporciones que van del 50% al 99% del peso de un carácter perfecto.



**Figura 1.3.1.** Distribución de distancias RFc para cada una de las seis condiciones analíticas ensayadas en los análisis filogenéticos realizados sobre cada matriz individual bajo MP. El asterisco indica la media de cada distribución. **A:** Morfología, **B:** ARNr 12s-16s, **C:** COI, **D:** CytB-ND4, **E:** RAG1-R35, **F:** c-mos.

Es interesante inspeccionar estas distribuciones, ya que muestran de forma global como responde cada matriz de datos a la variación del peso de caracteres. Así, por ejemplo, puede observarse que para la matriz morfológica (Fig. 1.3.1 A) se obtuvo, para el  $K_1$ , una distribución con muy poca dispersión, cuyos valores son superiores al cuartil III de cada una de las demás distribuciones. Es decir, todos los MPTs recuperados bajo esta condición presentan grandes diferencias topológicas con el resto de los MPTs de las restantes condiciones (restantes  $K_s$ ) pero son muy parecidos entre sí, equivalentemente, el peso de caracteres homoplásicos al 50% es estadísticamente diferente al resto de las opciones de peso. Las tres siguientes condiciones analíticas ( $K_{2-4}$ ) resultaron en idénticas distribuciones, las cuales presentan una dispersión de aproximadamente el triple que la dispersión de la distribución en  $K_1$  y algo menor que la de las últimas dos distribuciones ( $K_{5-6}$ ). Estas tres distribuciones centrales (pesos de 65%, 75% y 85%) muestran las menores medias (Tabla 1.3.1) de todo el set de análisis para esta matriz, por lo tanto los MPTs producidos bajo estas condiciones, serían seleccionados para estimar el consenso estricto que será presentado como el árbol óptimo bajo MP.

Por otro lado, en la tabla 1.3.1 se presentan de manera cuantitativa los resultados de este procedimiento, donde se destaca para cada matriz de datos, el peso promedio de un carácter sin homoplasia (E) (que es la base del cálculo de cada K), la cantidad de MPTs recuperados y la media de las distancias RFc bajo cada condición, donde se muestran en negrita las medias mínimas, que definirán las condiciones analíticas seleccionadas como “las más estables”.

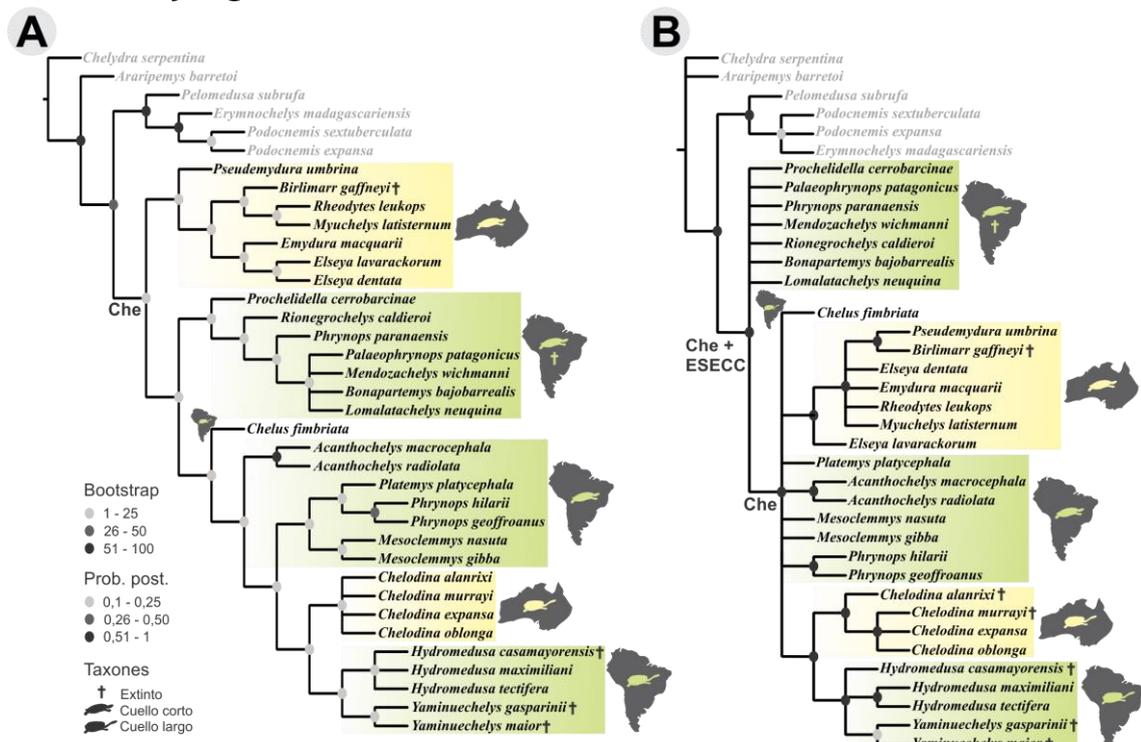
**Tabla 1.3.1.** Esquema de condiciones analíticas exploradas durante los análisis filogenéticos bajo MP. En negrita se muestran las medias mínimas de las distancias RF de cada análisis.

Matriz	E	F = 50%			F = 65%			F = 75%			F = 85%			F = 95%			F = 99%		
		K1	MPTs	μ <sub>RFc</sub>	K2	MPTs	μ <sub>RFc</sub>	K3	MPTs	μ <sub>RFc</sub>	K4	MPTs	μ <sub>RFc</sub>	K5	MPTs	μ <sub>RFc</sub>	K6	MPTs	μ <sub>RFc</sub>
Morfología	1,14	1,14	3	4,27	2,12	9	<b>1,66</b>	3,43	9	<b>1,66</b>	6,48	9	<b>1,66</b>	21,73	9	2,05	113,2	9	2,05
ARNr12s-16s	0,52	0,52	1	0,79	0,97	1	0,79	1,56	3	<b>0,47</b>	2,95	3	<b>0,47</b>	9,9	3	<b>0,47</b>	51,6	3	<b>0,47</b>
COI	1,16	1,16	5	2,44	2,15	3	<b>1,27</b>	3,48	3	1,29	6,58	3	1,29	22,1	3	1,68	115,1	3	1,68
CytB-ND4	1,34	1,34	1	2,46	2,48	1	1,93	4,02	1	<b>1,47</b>	7,6	1	<b>1,47</b>	25,5	1	1,6	132,7	1	3,06
RAG1-R35	0,14	0,14	7	<b>0,81</b>	0,27	7	<b>0,81</b>	0,43	7	<b>0,81</b>	0,82	7	<b>0,81</b>	2,74	7	1,34	14,26	5	1,27
c-mos	0,26	0,26	7	<b>0,58</b>	0,48	10	0,71	0,78	10	0,71	1,47	7	<b>0,58</b>	4,94	10	0,71	25,76	10	0,71

E: peso promedio de un carácter sin homoplasia, F: peso porcentual de un carácter homoplásico respecto de un carácter perfecto, K: constante de concavidad, MPTs: arboles de máxima parsimonia recuperados, μ<sub>RFc</sub>: media de las distancias topológicas.

### 1.3.1. Relaciones filogenéticas

#### 1.3.1.1. Morfología



**Figura 1.3.2.** Topología óptima hallada a partir de la matriz morfológica mediante MP (A) e IB (B). En amarillo se destacan las especies con distribución en Australasia y en verde se destacan las especies con distribución en Sudamérica.

**Máxima Parsimonia:** Los análisis filogenéticos realizados sobre la matriz morfológica, mediante MP, resultaron en 48 MPTs, tres bajo K<sub>1</sub> = 1,14 y nueve MPTs bajo cada uno de los

restantes Ks ( $K_2 = 2,12$ ,  $K_3 = 3,43$ ,  $K_4 = 6,48$ ,  $K_5 = 21,73$ ,  $K_6 = 113,2$ ). El largo de estos MPTs fue de entre 324 y 313 pasos, y la media de las distancias RfC ( $\mu_{RfC} = 1,66$ ) fue minimizada en tres de las condiciones analíticas exploradas ( $K_{2-4}$ ), por lo tanto el consenso estricto del set de los MPTs hallados bajo estas tres condiciones analíticas, se presenta como la hipótesis filogenética óptima para estos datos (Tabla 1.3.1). En esta topología se recuperó al clado Chelidae como un grupo monofilético, integrado por un clado basal que contiene a todas las especies australasiáticas actuales de cuello corto más la especie extinta *Birlimarr gaffneyi*. La configuración general de este clado es (*Pseudemydura*("Grupo *Emydura*")), donde el "Grupo *Emydura*" (sensu Lapparent de Broin & Molnar, 2001) está compuesto de la siguiente manera: (*Birlimarr gaffneyi*(*Rheodytes leukops* + *Myuchelys latisternum*)) + (*Emydura*(*Elseya*)). Los soportes de Bootstrap de todos los nodos que integran este clado, así como los de casi toda la topología son bajos (entre 1 y 25) (Fig. 1.3.2 A).

El grupo hermano del clado de especies australasiáticas de cuello corto es un clado que contiene al grupo de especies sudamericanas de cuello corto extintas y todas las especies sudamericanas actuales de cuello corto más todas las especies de cuello largo (tanto actuales como extintas y sudamericanas como australianas). El clado de especies extintas sudamericanas de cuello corto, presenta una estructura jerárquica integrada por: *Prochelidella cerrobarcinae*(*Rionegrochelys caldieroi*(*Phrynops paranaensis*(*Palaeophrynops patagonicus* + *Mendozachelys wichmanni* + *Bonapartemys bajobarrealis* + *Lomalatachelys neuquina*))). En tanto que su grupo hermano contiene a *Chelus fimbriata* en posición basal de un clado con la siguiente conformación: *Acanthochelys*((*Platemys* + *Phrynops*) (*Mesoclemmys*) (*Chelodina*) (*Hydromedusa* + *Yaminuechelys*)). Es decir, que este último clado contiene a todas las especies de cuello largo (actuales y extintas) en la posición más derivada del árbol (Fig. 1.3.2 A). Además, contiene los dos únicos nodos de todo el árbol con soportes de Bootstrap altos (de 51 a 100), el nodo que relaciona las especies de *Acanthochelys* y el que relaciona las especies actuales de *Phrynops*.

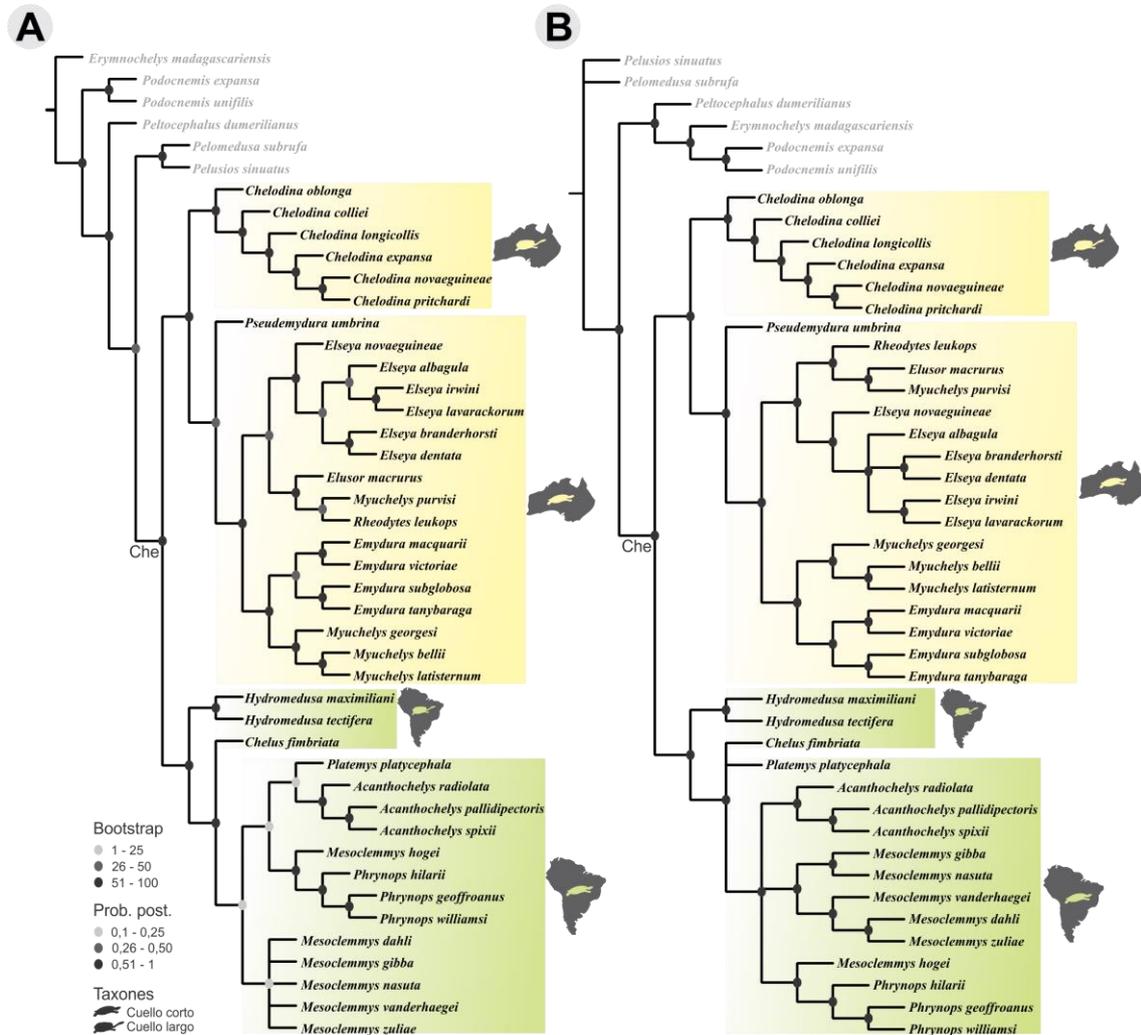
**Inferencia Bayesiana:** El árbol de máxima probabilidad posterior obtenido luego del análisis bayesiano realizado sobre la matriz morfológica (Fig. 1.3.2 B), muestra un grado de resolución topológica mucho menor que el recuperado bajo MP, sin embargo los valores de soporte (Probabilidades Posteriores) son mayormente altos en casi todos los nodos del árbol, lo cual es una condición ampliamente reconocida en los algoritmos bayesianos como un artefacto, ya que los valores de soporte suelen estar "inflados" con respecto a lo esperado en comparación con diferentes técnicas de soporte basadas en remuestreo (Simmons & Norton, 2013).

La base del árbol obtenido presenta una politomía de grado siete, que contiene a todas las especies sudamericanas extintas de cuello corto, la cual se recuperó como grupo hermano del clado Chelidae. Por su parte este clado, también politomizado, está integrado por *Chelus fimbriata* + las especies sudamericanas de cuello corto actuales + el clado de especies australasiáticas de cuello corto (incluyendo a *Birlimarr gaffneyi*) + el clado de todas las especies de cuello largo.

Son múltiples las diferencias entre esta topología y la obtenida mediante MP en torno al clado Chelidae, sin embargo lo más destacable es que se recupera el clado de especies australasiáticas de cuello corto con una estructura notoriamente diferente, donde

*Pseudemydura* se ubica en una posición derivada, como el taxón hermano de *Birlimarr gaffneyi* y la especie basal del clado es *Elseya lavarackorum*. Además, en esta topología tampoco se recupera a *Hydromedusa* como un grupo monofilético, ya que *H. casamayorensis* se ubica en una politomía, como taxón hermano de las otras dos especies de *Hydromedusa* + *Yaminuechelys* (Fig. 1.3.2 B).

1.3.1.2. ARNr 12s-16s



**Figura 1.3.3.** Topología óptima hallada a partir de la matriz ribosomal ARNr 12s-16s mediante MP (A) e IB (B). En amarillo se destacan las especies con distribución en Australasia y en verde se destacan las especies con distribución en Sudamérica.

**Máxima Parsimonia:** Los análisis filogenéticos realizados sobre la matriz ARNr 12s-16s, mediante MP, resultaron en 14 MPTs, uno bajo  $K_1 = 0,52$ , uno bajo  $K_2 = 0,97$  y tres MPTs bajo cada uno de los restantes  $K_s$  ( $K_3 = 1,56$ ,  $K_4 = 2,95$ ,  $K_5 = 9,9$ ,  $K_6 = 51,6$ ). El largo de estos MPTs fue de entre 2986 y 2982 pasos, y la media de las distancias RFc ( $\mu_{RFc} = 0,47$ ) fue minimizada en las últimas cuatro condiciones analíticas exploradas ( $K_{4-6}$ ), por lo tanto el consenso estricto del set de los MPTs hallados bajo estas condiciones analíticas, se presenta como la hipótesis filogenética óptima para estos datos (Tabla 1.3.1). En esta topología se recuperó al clado Chelidae como un grupo monofilético, integrado por la clásica estructura descrita para datos moleculares en estudios previos, es decir un clado conteniendo a todas las especies

australasiáticas como grupo hermano de un clado conteniendo a todas las especies sudamericanas.

El clado australasiático presenta al género *Chelodina* (un clado completamente jerárquico), como grupo hermano de un clado con la estructura (*Pseudemydura* (“Grupo *Emydura*”)), donde en el “Grupo *Emydura*” se recuperan como grupos monofiléticos los géneros *Elseya* y *Emydura*, en tanto que *Myuchelys* se recupera como grupo parafilético debido al agrupamiento de *M. purvisi* con *Rheodytes leukops*, en un clado que es grupo hermano de *Elusor macrurus*. A su vez todo este clado resultó grupo hermano del género *Elseya* (Fig. 1.3.3 A).

El clado sudamericano se recuperó con una estructura que ubica al género *Hydromedusa* en posición basal de un clado que tiene a *Chelus* como taxón hermano de todas las especies sudamericanas de cuello corto. Este último clado recupera como monofiléticos a los géneros *Acanthochelys* (que es grupo hermano de *Platemys platycephala*) y *Phrynops* (que es grupo hermano de *Mesoclemmys hoguei*). Consecuentemente, *Mesoclemmys* se recuperó como un grupo parafilético, donde las demás especies del género se ubicaron en una politomía de grado 5 (Fig. 1.3.3 A).

Ambos grupos geográficos resultaron con buenos soportes de Bootstrap (de 51 a 100), a excepción de cuatro nodos del clado sudamericano, que tuvieron soportes bajos (de 1 a 25) (Fig. 1.3.3 A).

**Inferencia Bayesiana:** El árbol resultante del análisis mediante IB de la matriz ARNr 12s-16s (Fig. 1.3.3 B), muestra grandes similitudes con respecto al recuperado a partir del análisis con MP.

El clado australasiático presentó la misma estructura general que el mismo bajo MP, es decir *Chelodina*(*Pseudemydura* (“Grupo *Emydura*”))), donde el clado del género *Chelodina* tiene una resolución idéntica, los géneros *Elseya* y *Emydura* se recuperan como grupos monofiléticos y *Myuchelys* es parafilético. Sin embargo, *Elseya* presenta, en esta topología, una politomía de grado 3, en tanto que en el árbol de MP este clado está completamente resuelto (Fig. 1.3.3 B).

En este análisis, el clado sudamericano también se recuperó con el género *Hydromedusa* en posición basal, sin embargo, el mismo es grupo hermano de una politomía que contiene a *Chelus*, *Platemys* y las demás especies sudamericanas de cuello corto. También se recuperaron como monofiléticos los géneros *Acanthochelys* y *Phrynops*, en tanto que *Mesoclemmys* continuó recuperándose como grupo parafilético (Fig. 1.3.3 B).

Todos los nodos de esta topología se recuperaron con valores de soporte altos (Probabilidad Posterior entre 0,51 y 1).

1.3.1.3. COI

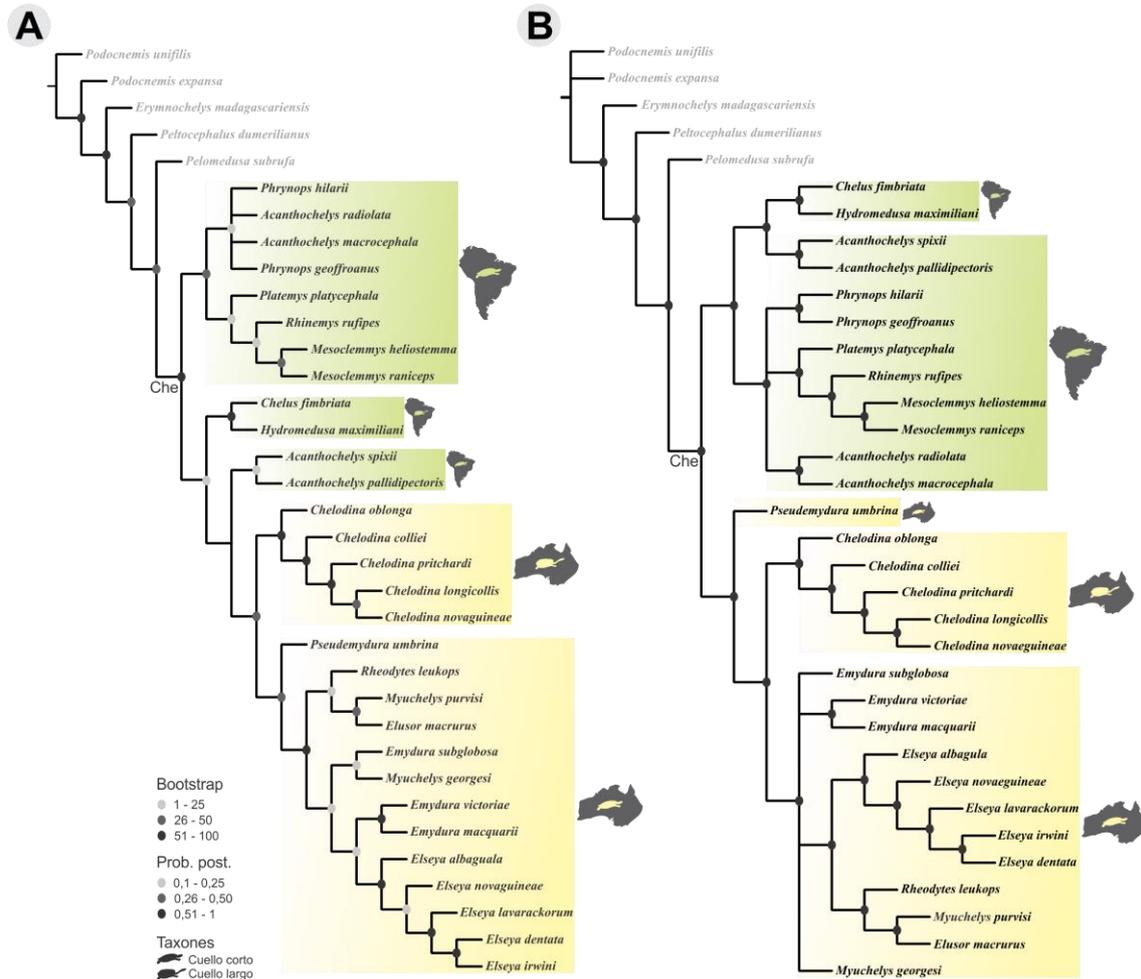


Figura 1.3.4. Topología óptima hallada a partir de la matriz COI mediante MP (A) e IB (B). En amarillo se destacan las especies con distribución en Australasia y en verde se destacan las especies con distribución en Sudamérica.

**Máxima Parsimonia:** Los análisis filogenéticos realizados sobre la matriz COI, mediante MP, resultaron en 20 MPTs, cinco bajo  $K_1 = 1,16$  y tres en cada uno de los siguientes análisis ( $K_2 = 2,15$ ,  $K_3 = 3,48$ ,  $K_4 = 6,58$ ,  $K_5 = 22,1$ ,  $K_6 = 115,1$ ). El largo de estos MPTs fue de entre 1954 y 1915 pasos, y la media de las distancias RFC ( $\mu_{RFC} = 1,27$ ) fue minimizada bajo el  $K_2$ , por lo tanto el consenso estricto de los cinco MPTs hallados bajo estas condiciones analíticas, se presenta como la hipótesis filogenética óptima para estos datos (Tabla 1.3.1). En esta topología se recuperó al clado Chelidae como un grupo monofilético, sin embargo entre los grupos geográficos, solo el clado australasiático presentó esta condición (Fig. 1.3.4 A).

En la estructura general del clado Chelidae, se ubican en posición basal las especies sudamericanas de cuello corto (a excepción de *Acanthochelys pallidipectoris* y *Acanthochelys spixii*), en un clado en el que ningún género fue recuperado como monofilético. El resto del árbol tiene la siguiente estructura: (*Chelus fimbriata* + *Hydromedusa maximiliani* (*Acanthochelys pallidipectoris* + *Acanthochelys spixii* (clado australasiático))). El clado australasiático presenta una estructura similar a la recuperada para la matriz ARNr 12s-16s, con diferencia en que el género *Emydura* no fue recuperado como monofilético, debido a que *Emydura subglobosa* fue recuperada como taxón hermano de *Myuchelys georgesii* (Fig. 1.3.4 A).

A pesar de ser esta una topología “no esperada” para el grupo, los nodos poco soportados (Bootstrap entre 1 y 25) fueron relativamente pocos (diez en total), en comparación con los nodos con soporte moderado o alto (Frecuencias de Bootstrap entre 26 y 100), los cuales fueron 16 en total (Fig. 1.3.4 A).

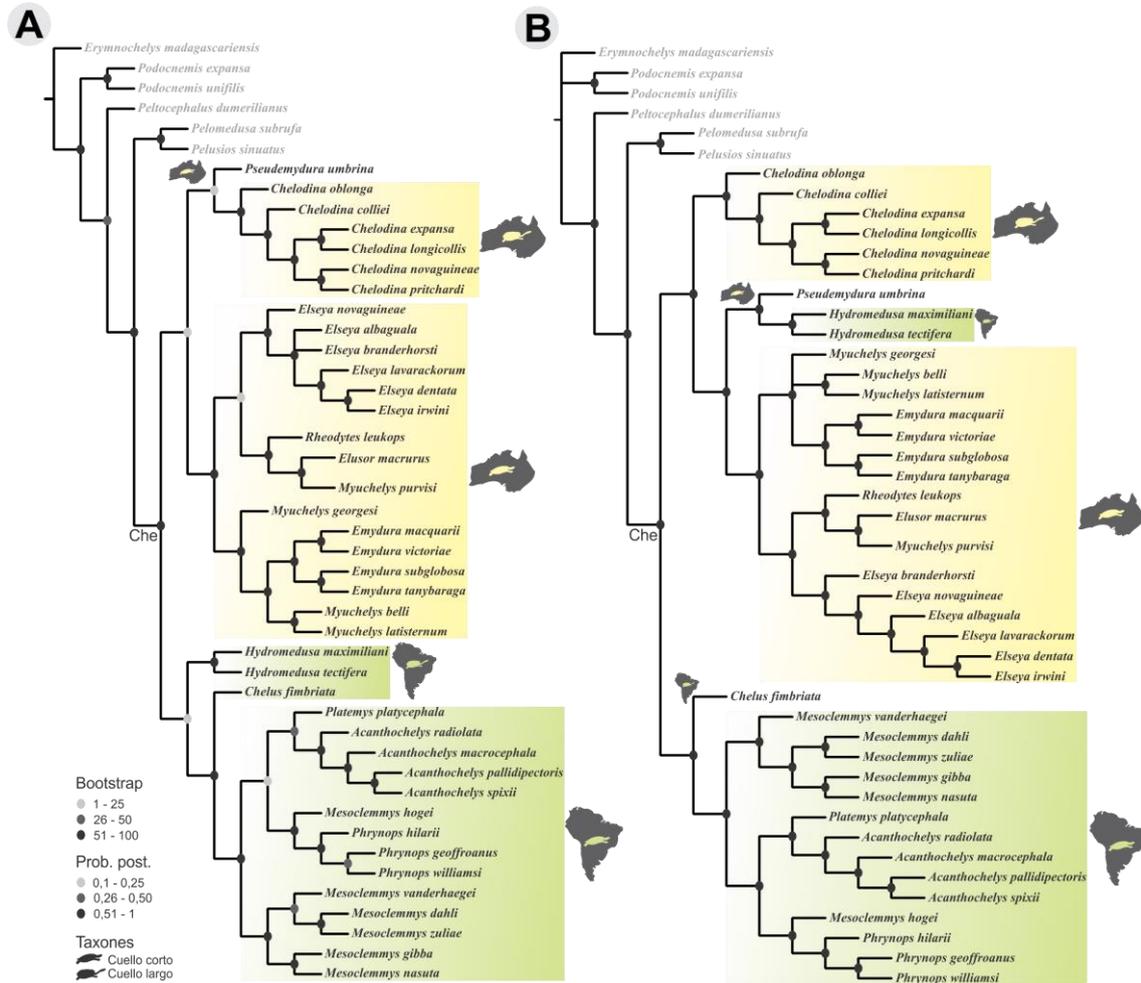
**Inferencia Bayesiana:** El árbol resultante del análisis mediante IB de la matriz COI, presenta una resolución más acorde a la esperada para este grupo, ya que en el mismo se recupera al clado Chelidae y ambos grupos geográficos como monofiléticos, no obstante existen algunas incongruencias respecto del “árbol esperado” para datos moleculares (Fig. 1.3.4 B).

El clado australasiático presentó una estructura en la que *Pseudemydura* es basal con respecto al resto del clado, que está conformado por *Chelodina* y el “Grupo *Emydura*”, el cual presenta una politomía de grado 4. En esta politomía nuevamente se recupera como monofilético solo el género *Elseya*, sin embargo *Emydura subglobosa* no fue recuperada como taxón hermano de *Myuchelys georgesii* como en el árbol de MP, sino que ambos se ubican en ramas individuales (Fig. 1.3.4 B).

El clado sudamericano está representado por un clado que contiene a ((*Chelus fimbriata* + *Hydromedusa maximiliani*) (*Acanthochelys pallidipectoris* + *Acanthochelys spixii*)), como grupo hermano de una politomía que contiene al resto de las especies sudamericanas de cuello corto. En este clado se recuperan como grupos monofiléticos a los géneros *Phrynops* y *Mesoclemmys* (Fig. 1.3.4 B).

En esta topología, nuevamente, todos los nodos presentaron valores de soporte altos (Probabilidad Posterior entre 0,51 y 1).

1.3.1.4. *CytB-ND4*



**Figura 1.3.5.** Topología óptima hallada a partir de la matriz *CytB-ND4* mediante MP (A) e IB (B). En amarillo se destacan las especies con distribución en Australasia y en verde se destacan las especies con distribución en Sudamérica.

**Máxima Parsimonia:** Los análisis filogenéticos realizados sobre la matriz *CytB-ND4*, bajo MP, resultaron en 6 MPTs, uno por cada condición analítica ( $K_1 = 1,34$ ,  $K_2 = 2,48$ ,  $K_3 = 4,02$ ,  $K_4 = 7,6$ ,  $K_5 = 25,5$ ,  $K_6 = 132,27$ ). El largo de estos MPTs fue de entre 3742 y 3719 pasos, y la media de las distancias RfC ( $\mu_{RfC} = 1,47$ ) fue minimizada en los análisis bajo los  $k_3$  y  $k_4$ , por lo tanto el consenso estricto de MPTs hallados bajo estas condiciones analíticas, se presenta como la hipótesis filogenética óptima para estos datos (Tabla 1.3.1). En esta topología se recuperó al clado Chelidae y ambos grupos geográficos como grupos monofiléticos (Fig. 1.3.5 A).

El clado australasiático fue recuperado con la siguiente estructura general: ((*Pseudemadura* + *Chelodina*) (“Grupo *Emydura*”). En el “Grupo *Emydura*” todos los géneros politípicos, a excepción de *Myuchelys* fueron recuperados como grupos monofiléticos. La mayoría de los nodos del clado australasiático están bien soportados (Bootstrap entre 51 y 100), en tanto que tres nodos presentan bajos soportes (Frecuencias Bootstrap entre 1 y 25), donde uno de ellos es el nodo que inusualmente relaciona a *Pseudemadura* y *Chelodina* (Fig. 1.3.5 A).

El clado sudamericano presenta una estructura similar a la que se recupera en los análisis filogenéticos de la matriz ARNr 12s-16s, donde aparecen de forma anidada *Hydromedusa*, *Chelus* y las especies sudamericanas de cuello corto. Además, en este último clado se muestra

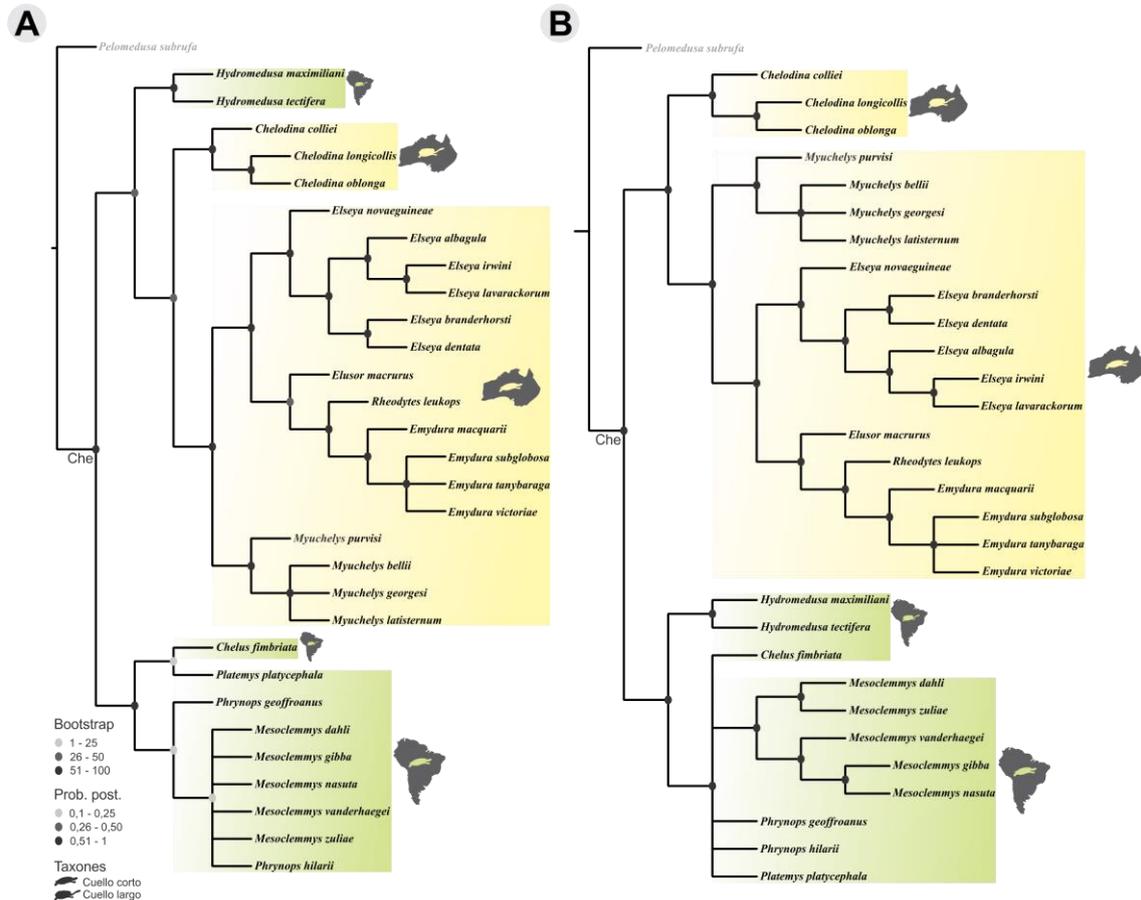
que *Platemys* está cercanamente relacionada con *Acanthochelys* y *Phrynops* con *Mesoclemmys*, y tanto el género *Acanthochelys* como *Phrynops* se recuperan como grupos monofiléticos, en tanto que *Mesoclemmys* sigue apareciendo como un grupo parafilético (Fig. 1.3.5 A).

**Inferencia Bayesiana:** El árbol resultante del análisis mediante IB de la matriz CytB-ND4, presenta una inesperada parafilia del clado australasiático, ya que el mismo incluye al género sudamericano *Hydromedusa*. La estructura general de este clado es entonces: (*Chelodina* (*Pseudemydura* + *Hydromedusa* (“Grupo *Emydura*”))). Igual que en el análisis bajo MP, en el “Grupo *Emydura*” se recuperó a los géneros *Elseya* y *Emydura* como grupos monofiléticos, en tanto que *Myuchelys* se recuperó como grupo parafilético debido al agrupamiento de *M. purvisi* con *Elusor macrurus* y a la posición de *M. georgesii* dentro de una politomía con las restantes especies de *Myuchelys* y el clado del género *Emydura* (Fig. 1.3.5 B).

El clado sudamericano recuperado en este análisis, es casi exactamente igual al que se recuperó mediante MP, si se toma en cuenta el mismo desde la posición de *Chelus fimbriata* en adelante. Es decir, se respeta la estrecha relación entre *Platemys* y *Acanthochelys*, y entre *Phrynops* y *Mesoclemmys*, así como la monofilia de *Acanthochelys* y *Phrynops*, y la parafilia de *Mesoclemmys* (Fig. 1.3.5 B).

En esta topología, nuevamente, todos los nodos presentaron valores de soporte altos (Probabilidad Posterior entre 0,51 y 1), aún el nodo que relaciona a *Hydromedusa* con *Pseudemydura*.

1.3.1.5. RAG1-R35



**Figura 1.3.6.** Topología óptima hallada a partir de la matriz RAG1-R35 mediante MP (A) e IB (B). En amarillo se destacan las especies con distribución en Australasia y en verde se destacan las especies con distribución en Sudamérica.

**Máxima Parsimonia:** Los análisis filogenéticos realizados sobre la matriz RAG1-R35, bajo MP, resultaron en 7 MPTs, en los primeros cinco análisis ( $K_1 = 0,14$ ,  $K_2 = 0,27$ ,  $K_3 = 0,43$ ,  $K_4 = 0,82$ ,  $K_5 = 2,74$ ) y cinco MPTs en el último ( $K_6 = 14,26$ ). El largo de estos MPTs fue de entre 729 y 727 pasos, y la media de las distancias RfC ( $\mu_{RfC} = 0,81$ ) fue minimizada en las cuatro primeras condiciones analíticas ( $k_{1-4}$ ) por lo tanto el consenso estricto del set de MPTs hallados bajo las mismas se presenta como la hipótesis filogenética óptima para estos datos (Tabla 1.3.1). En esta topología se recuperó al clado Chelidae y al clado australasiático como grupos monofiléticos, sin embargo el clado sudamericano resultó parafilético debido a la asociación entre *Hydromedusa* y el clado australasiático (Fig. 1.3.6 A). A su vez, este clado se recuperó con la clásica configuración descrita para datos moleculares (considerando la ausencia de *Pseudemydura* en el set de datos), es decir *Chelodina* + “Grupo *Emydura*”, donde este último presentó los tres géneros politípicos (*Elseya*, *Emydura* y *Myuchelys*) como grupos monofiléticos, *Rheodytes leukops* como taxón hermano de *Emydura* y *Elusor macrurus* como taxón hermano de estos dos (Fig. 1.3.6 A).

El clado sudamericano (a excepción de *Hydromedusa*) resultó en una estructura poco resuelta que tiene al clado (*Chelus* + *Platemys*) como grupo hermano *Phrynops geoffroanus* y una politomía de grado 6, que contiene a todas las especies de *Mesoclemmys* y *Phrynops hilarii* (Fig. 1.3.6 A).

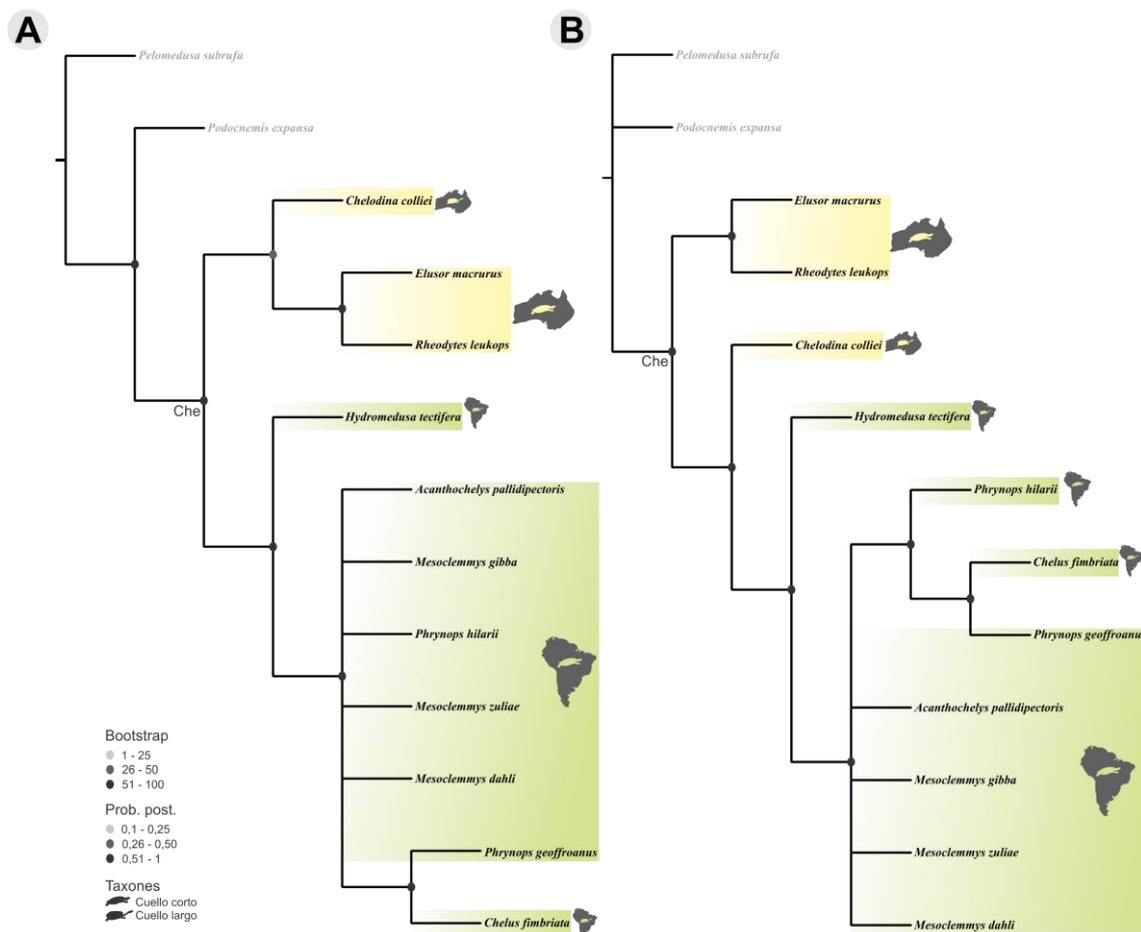
Los soportes de rama en esta topología son en general altos o moderados en el clado australasiático (Frecuencias de Bootstrap entre 26 y 100), y bajos en el clado sudamericano (sin considerar a *Hydromedusa*) (Frecuencias de Bootstrap entre 1 y 25).

**Inferencia Bayesiana:** La topología resultante de este análisis, sobre la matriz RAG1-R35, recupera al clado Chelidae y ambos grupos geográficos como monofiléticos (Fig. 1.3.6 B).

El clado australasiático quedó conformado de manera idéntica al recuperado bajo MP, es decir: *Chelodina* + “Grupo *Emydura*”, donde los nodos internos de cada clado presentaron también idéntica resolución con respecto al análisis mediante MP (Fig. 1.3.6 B).

El clado sudamericano fue recuperado con *Hydromedusa* como grupo hermano de un clado politomizado, que contiene a *Chelus fimbriata*, *Phrynops geoffroanus*, *Phrynops hilarii*, *Platemys platycephala* y un clado resuelto con todas las especies de *Mesoclemmys*, formando un grupo monofilético. Todos los nodos de este clado, así como los del clado australasiático fueron recuperados con altos valores de soporte (Probabilidad Posterior entre 0,51 y 1) (Fig. 1.3.6 B).

**1.3.1.6. c-mos**



**Figura 1.3.7.** Topología óptima hallada a partir de la matriz c-mos mediante MP (A) e IB (B). En amarillo se destacan las especies con distribución en Australasia y en verde se destacan las especies con distribución en Sudamérica.

**Máxima Parsimonia:** Los análisis filogenéticos realizados sobre la matriz c-mos, bajo MP, resultaron en un total de 7 MPTs, en los análisis 1 y 4 ( $K_1 = 0,26$ ,  $K_4 = 1,47$ ), en tanto que en los

demás análisis se recuperaron 10 MPTs en cada uno ( $K_2 = 0,48$ ,  $K_3 = 0,78$ ,  $K_5 = 4,94$ ,  $K_6 = 25,76$ ). El largo de todos los MPTs obtenidos fue de 92 pasos, y la media de las distancias RFC ( $\mu_{RFC} = 0,58$ ) fue minimizada en los análisis 1 y 4, por lo tanto el consenso estricto del set de MPTs hallados en estos análisis se presenta como la hipótesis filogenética óptima para estos datos (Tabla 1.3.1). En esta topología se recuperó al clado Chelidae y ambos grupos geográficos como monofiléticos (Fig. 1.3.7 A).

El clado australasiático está compuesto solo por tres taxones y tiene la siguiente estructura (*Chelodina colliei*(*Elusor macrurus* + *Rheodytes leukops*)), es decir que a pesar del bajísimo muestreo taxonómico de esta matriz, los quelidos de australianos de cuello corto se mantienen formando un grupo monofilético y como grupo hermano de los quelidos de cuello largo (Fig. 1.3.7 A).

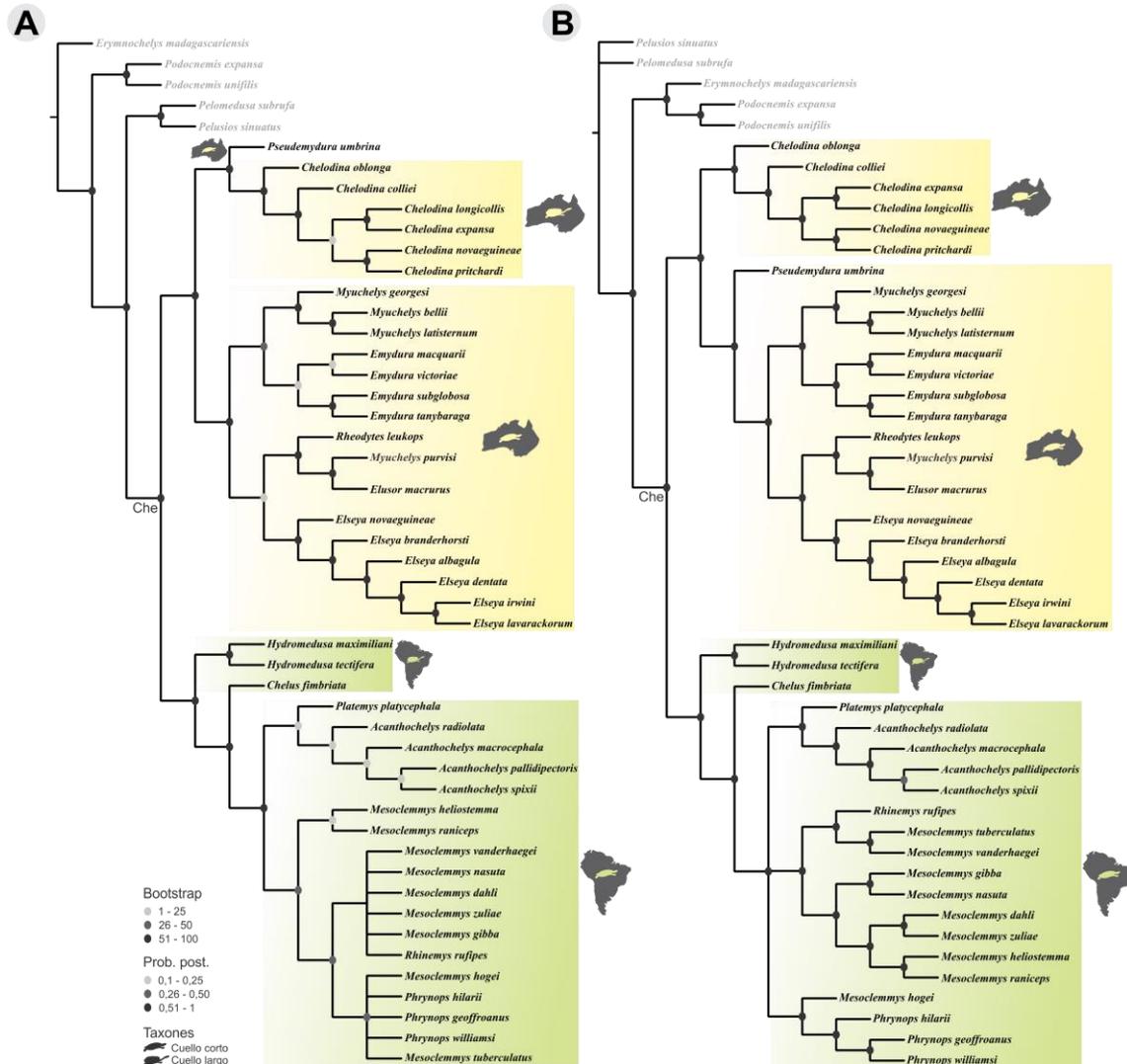
El clado sudamericano presenta un muestreo taxonómico más numeroso al del clado australasiático, aunque la resolución del mismo es pobre. Este se recuperó con una estructura donde *Hydromedusa tectifera* es el taxón hermano de una politomía que contiene a *Acanthochelys pallidipectoris*, *Mesoclemmys gibba*, *Phrynops hilarii*, *Mesoclemmys zuliae*, *Mesoclemmys dahli* y un clado que contiene a *Phrynops geoffroanus* y *Chelus fimbriata* (Fig. 1.3.7 A). Consecuentemente, este resultado no muestra la estructura “esperada” para este clado, con las especies de cuello largo ubicadas basalmente respecto del clado de especies de cuello corto.

Los soportes de rama en esta topología son todos altos (Frecuencias de Bootstrap entre 51 y 100).

**Inferencia Bayesiana:** La topología resultante de este análisis, no recuperó a los dos grupos geográficos como monofiléticos, sino que presenta una estructura general como sigue: (*Elusor macrurus* + *Rheodytes leukops*) (*Chelodina colliei*(*Hydromedusa tectifera*(especies sudamericanas de cuello corto))). Es decir que el clado sudamericano si es recuperado como un grupo monofilético, anidado dentro de una estructura que tiene a las especies australasiáticas hacia la base del clado Chelidae (Fig. 1.3.7 B).

El clado sudamericano presenta alguna diferencia en su estructura respecto del recuperado bajo MP, en la misma *Hydromedusa tectifera* se ubica en la base del clado, como grupo hermano de una politomía compuesta por *Acanthochelys pallidipectoris*, *Mesoclemmys gibba*, *Mesoclemmys zuliae*, *Mesoclemmys dahli* y un clado con la siguiente estructura: (*Phrynops hilarii*(*Phrynops geoffroanus* + *Chelus fimbriata*)) (Fig. 1.3.7 B). Todos los nodos de este clado, así como los del clado australasiático fueron recuperados con altos valores de soporte (Probabilidad Posterior entre 0,51 y 1) (Fig. 1.3.7 B).

1.3.1.7. Matriz Concatenada



**Figura 1.3.8.** Topología óptima hallada a partir de la matriz molecular Concatenada mediante MP (A) e IB (B). En amarillo se destacan las especies con distribución en Australasia y en verde se destacan las especies con distribución en Sudamérica.

**Máxima Parsimonia:** El análisis filogenético realizado sobre la matriz molecular Concatenada, mediante MP, resultó en 35 MPTs, de 8987 pasos. Para este análisis se definieron bloques correspondientes a cada partición y se asignó a cada bloque el K óptimo hallado en cada análisis individual (Tabla 1.2.4). El consenso estricto de los 35 MPTs hallados se presenta como la hipótesis filogenética óptima para estos datos. En esta topología se recuperó al clado Chelidae y ambos grupos geográficos como monofiléticos (Fig. 1.3.8 A).

El clado australasiático presentó a *Pseudemydura* como taxón hermano del género *Chelodina*, una posición novedosa, respecto de resultados previos obtenidos a partir de datos moleculares. A su vez este clado aparece como grupo hermano del “Grupo *Emydura*”. En este último clado los géneros *Elseya* y *Emydura* fueron recuperados como monofiléticos, en tanto que *Myuchelys* resultó parafilético, debido al agrupamiento de *M. purvisi* con *Elusor macrurus*, en un clado que es grupo hermano de *Rheodytes leukops*. Coincidentemente con resultados anteriores, todo este clado resultó grupo hermano del clado del género *Elseya*, el cual presenta una configuración completamente jerárquica (Fig. 1.3.8 A).

Las ramas del clado australasiático estuvieron en general fuertemente soportadas, ya que solo cuatro nodos se recuperaron con valores de soporte bajo (Frecuencias de Bootstrap entre 1 y 25), en tanto que los demás presentaron altos valores de soporte (Frecuencias de Bootstrap entre 51 y 100) (Fig. 1.3.8 A).

El clado sudamericano se recuperó con una estructura que ubica al género *Hydromedusa* en posición basal de un clado que consecutivamente tiene a *Chelus* como taxón hermano de todas las especies sudamericanas de cuello corto. Este último clado recupera como grupo monofilético al clado del género *Acanthochelys*, el cual es grupo hermano de *Platemys platycephala*. A su vez, todo este clado es grupo hermano de un clado compuesto por especies pertenecientes a los géneros *Phrynops*, *Mesoclemmys* y *Rhinemys* (*R. rufipes*). Este último clado presenta dos grandes politomías, la primera es de grado 6 y está compuesta por las siguientes especies: *M. vanderhaegei*, *M. nasuta*, *M. dahli*, *M. zuliae*, *M. gibba* y *R. rufipes*; y la segunda es de grado 5 y está compuesta por tres especies del género *Phrynops* (*P. geoffroanus*, *P. hilarii* y *P. williamsi*), *M. tuberculatus* y *M. hogei*. A su vez, todo este clado que contiene las politomías es grupo hermano de un clado que contiene a las dos especies restantes pertenecientes al género *Mesoclemmys* (*M. heliostemma* y *M. raniceps*) (Fig. 1.3.8 A).

Los soportes del clado sudamericano fueron en general altos en nodos basales (Frecuencias de Bootstrap entre 51 y 100) y moderados (Frecuencias de Bootstrap entre 26 y 50) o bajos (Frecuencias de Bootstrap entre 1 y 25) en nodos más terminales (Fig. 1.3.8 A).

**Inferencia Bayesiana:** El árbol resultante del análisis mediante IB recupera al clado Chelidae y ambos grupos geográficos como monofiléticos, sin embargo, a diferencia del árbol producido a partir del análisis de MP, el clado australasiático tiene una estructura que ubica al género *Chelodina* como grupo hermano del clado (*Pseudemydura* ("Grupo *Emydura*")), donde el "Grupo *Emydura*" presenta una configuración idéntica a la del árbol recuperado mediante MP (Fi. 1.3.8 B).

En el caso del clado sudamericano, éste también fue recuperado con el género *Hydromedusa* en posición basal, como grupo hermano del clado (*Chelus* + especies de cuello corto). A su vez, este último clado está representado por una politomía de grado 3, donde una rama contiene al clado (*Platemys* + *Acanthochelys*), otra rama contiene al clado (*Mesoclemmys hogei* + *Phrynops*) y la tercer rama contiene un clado con las restantes especies de *Mesoclemmys* y *Rhinemys rufipes*, el cual es taxón hermano del clado (*M. tuberculatus* + *M. vanderhaegei*). Los tres clados de la topología están completamente resueltos (Fi. 1.3.8 B).

Todos los nodos de esta topología se recuperaron con valores de soporte altos (Probabilidad Posterior entre 0,51 y 1).

1.3.1.8. Matriz de Evidencia Total

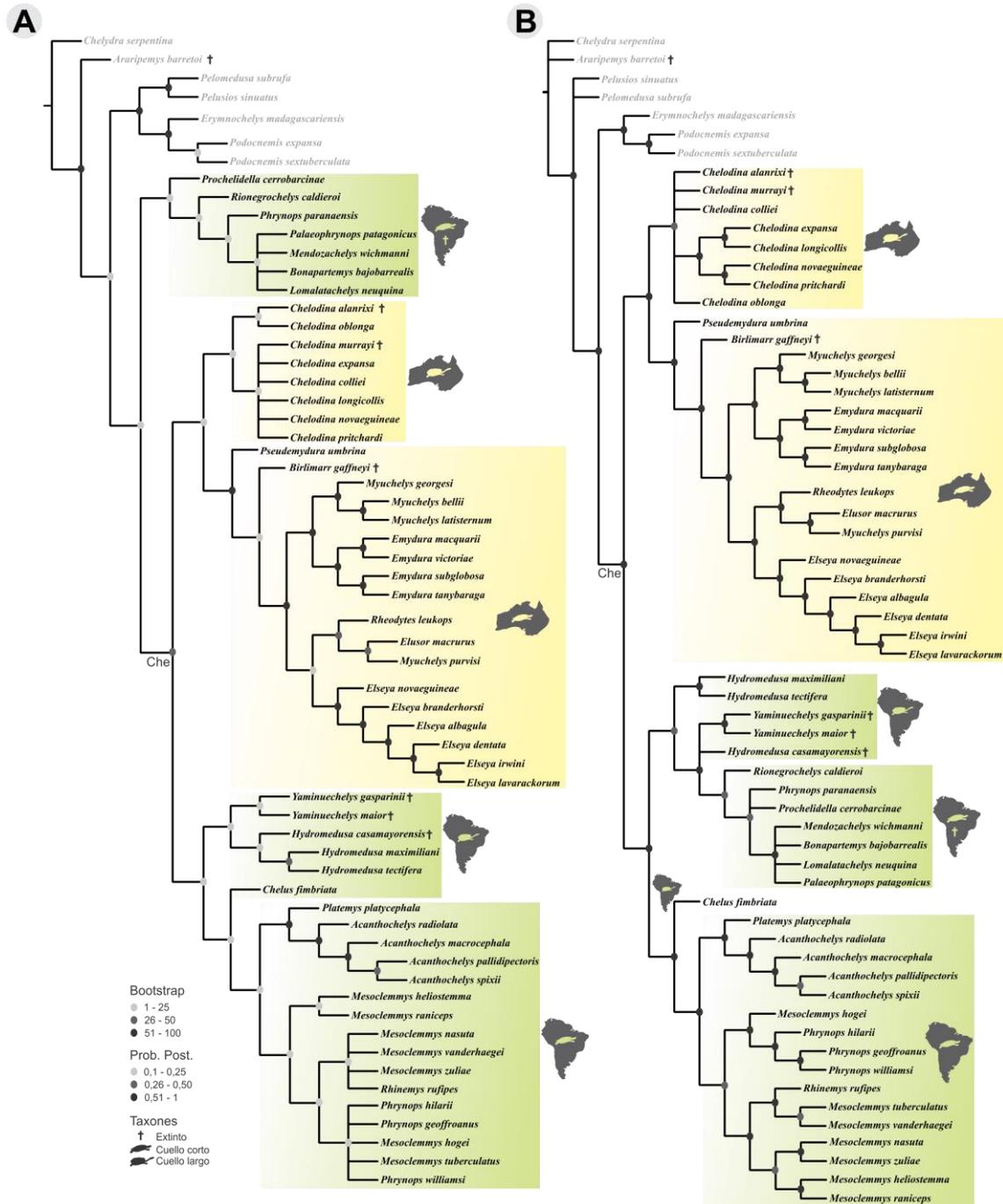


Figura 1.3.9. Topología óptima hallada a partir de la matriz de Evidencia Total mediante MP (A) e IB (B). En amarillo se destacan las especies con distribución en Australasia y en verde se destacan las especies con distribución en Sudamérica.

**Máxima Parsimonia:** El análisis filogenético realizado sobre la matriz de Evidencia Total se llevó a cabo definiendo bloques correspondientes a cada partición, donde se le asignó a cada bloque el K óptimo hallado en cada análisis individual (Tabla 1.2.4, más K óptimo para la matriz morfológica = 4,01). En una primera etapa de análisis, se buscaron los MPTs (700) y se calculó el consenso estricto a partir de éstos, detectando grandes politomías, por lo cual se buscaron los taxones inestables mediante la función PCR de TNT (ver sección 1.2.5), que tomaban posiciones alternativas en los distintos MPTs, los mismos son: *Mesoclemmys gibba*, *Mesoclemmys dahli* y *Podocnemis unifilis*. Luego de ser estos taxones excluidos, el análisis se

repitió hallando 255 MPTs, de 8475 pasos, cuyo consenso estricto se presenta como la hipótesis filogenética óptima para estos datos. En esta topología se recuperó al clado Chelidae y ambos grupos geográficos, incluyendo especies extintas en ambos casos, como monofiléticos. Como grupo hermano del clado Chelidae se recuperó un clado con todas las especies sudamericanas extintas de cuello corto (Fig. 1.3.9 A).

El clado australasiático fue recuperado con una estructura general acorde a una hipótesis molecular, más la presencia de especies extintas, integrando el clado del género *Chelodina* (*C. alanrxi* y *C. murrayi*) y como taxón hermano del clado correspondiente al “Grupo *Emydura*” (*Birlimarr gaffneyi*). En este último clado los géneros *Elseya* y *Emydura* fueron recuperados como monofiléticos, en tanto que *Myuchelys* resultó parafilético, debido al agrupamiento de *M. purvisi* con *Elusor macrurus*, en un clado que es grupo hermano de *Rheodytes leukops*. Coincidentemente con resultados anteriores, todo este clado resultó grupo hermano del clado del género *Elseya*, el cual presenta una configuración completamente jerárquica. *Pseudemydura* se recuperó como taxón hermano del clado (*Birlimarr gaffneyi* + “Grupo *Emydura*”). A su vez, todo este clado de especies australasiáticas de cuello corto se recuperó como grupo hermano del clado *Chelodina*, el cual presenta un clado integrado por *C. alanrxi* y *C. oblonga* como grupo hermano de una politomía que contiene a las demás especies del género (Fig. 1.3.9 A).

Las ramas del clado australasiático correspondientes al clado del género *Chelodina* están pobremente soportadas (Frecuencias de Bootstrap entre 1 y 25), en tanto que las correspondientes al clado de las especies de cuello corto presentan soportes moderados (Frecuencias de Bootstrap entre 26 y 50) y altos (Frecuencias de Bootstrap entre 51 y 100), con excepción de la rama que conecta a *Birlimarr gaffneyi* con el “Grupo *Emydura*” y la que conduce al clado (*Elseya* + (*Rheodytes leukops*(*Elusor macrurus* + *Myuchelys purvisi*))) (Fig. 1.3.9 A).

El clado sudamericano se recuperó con una estructura que ubica al clado (*Hydromedusa* + *Yaminuechelys*) en posición basal de un clado que consecutivamente tiene a *Chelus* como taxón hermano de todas las especies sudamericanas de cuello corto. Este último clado recupera como grupo monofilético al clado del género *Acanthochelys*, el cual es grupo hermano de *Platemys platycephala*. A su vez, todo este clado es grupo hermano de un clado compuesto por especies pertenecientes a los géneros *Phrynops*, *Mesoclemmys* y *Rhinemys* (*R. rufipes*). Este último clado presenta dos grandes politomías, la primera es de grado 4 y está compuesta por las siguientes especies: *M. vanderhaegei*, *M. nasuta*, *M. zuliae* y *R. rufipes*; y la segunda es de grado 5 y está compuesta por tres especies del género *Phrynops* (*P. geoffroanus*, *P. hilarii* y *P. williamsi*), *M. tuberculatus* y *M. hogei*. A su vez, todo este clado que contiene las politomías es grupo hermano de un clado que contiene a las dos especies restantes pertenecientes al género *Mesoclemmys* (*M. heliostemma* y *M. raniceps*) (Fig. 1.3.9 A). La estructura de todo el clado de especies sudamericanas actuales de cuello corto es idéntico al recuperado en el análisis de la matriz Concatenada (Fig. 1.3.8 A), a excepción de las especies excluidas luego de la inspección mediante la función PCR de TNT.

Los soportes del clado sudamericano fueron en general altos en nodos basales (Frecuencias de Bootstrap entre 51 y 100) y moderados (Frecuencias de Bootstrap entre 26 y 50) o bajos (Frecuencias de Bootstrap entre 1 y 25) en nodos más terminales (Fig. 1.3.8 A).

**Inferencia Bayesiana:** El árbol resultante del análisis mediante IB recupera al clado Chelidae y ambos grupos geográficos como monofiléticos, sin embargo, existen notables diferencias con respecto a la topología producida en el análisis de MP.

El clado australasiático presenta una estructura idéntica a la del árbol de MP en cuanto a las especies de cuello corto. No así el clado correspondiente al género *Chelodina*, el cual está compuesto por una politomía de grado 5, donde cuatro ramas corresponden a las especies: *C. alanrivi*, *C. murrayi*, *C. colliei*, *C. oblonga* y una última rama conforma un clado resuelto con las demás especies del género (Fi. 1.3.9 B).

En el caso del clado sudamericano, en la base del mismo, el clado de especies actuales del género *Hydromedusa* se recuperó como grupo hermano de una tricotomía que contiene exclusivamente especies sudamericanas extintas, tanto de cuello largo como de cuello corto. Así, una rama contiene a *H. casamayorensis*, otra rama contiene a el clado Yaminuechelys y la tercer rama contiene al clado de todas las especies extintas de cuello corto. A su vez, todo este clado de especies extintas es grupo hermano del clado (*Chelus* + especies actuales de cuello corto), donde este último clado recupera como grupos monofiléticos a los géneros *Acanthochelys* y *Phrynops*. Por su parte, el género *Mesoclemmys* se recupera como un grupo parafilético, debido al agrupamiento de *M. hoguei* con el clado *Phrynops*, y *Rhinemys rufipes* con el clado (*M. tuberculatus* + *M. vanderhaegei*) (Fi. 1.3.9 B).

Todas las ramas de esta topología estuvieron moderada o fuertemente soportadas (Probabilidad Posterior entre 0,26 y 1) (Fig. 1.3.9 B).

### 1.3.2. Test de congruencia metodológica

Dado que los métodos de resolución filogenética utilizados aquí se basan en criterios, algoritmos y software diferentes, y para cada matriz analizada se obtuvieron, bajo cada uno de los mismos, resultados que pueden ser comparables en algunos casos y muy poco equivalentes en otros, es que en esta tesis se desarrolló un método comparativo (explicado en la sección 1.2.6) que permite inspeccionar, con un respaldo estadístico, la sensibilidad de los métodos a cada set de datos, los cuales presentan características intrínsecamente diferentes.

**Tabla 1.3.2.** Test de congruencia metodológica.

Matriz	Estadístico t	Error Estándar	Valor p
Morfología	52	0,257	1,43E-92**
ARNr12s-16s	0,252	0,239	0,802
COI	-11,7	0,225	3,57E-24**
CytB-ND4	-2,27	0,262	0,0243*
RAG1-R35	-0,737	0,183	0,462
c-mos	7,18	0,104	2,26E-11**
Concatenada	-0,826	0,248	0,41
Evidencia total	-25,8	0,44	5,5E-62**

\* Rechazo significativo de la congruencia. \*\* Rechazo altamente significativo de la congruencia.

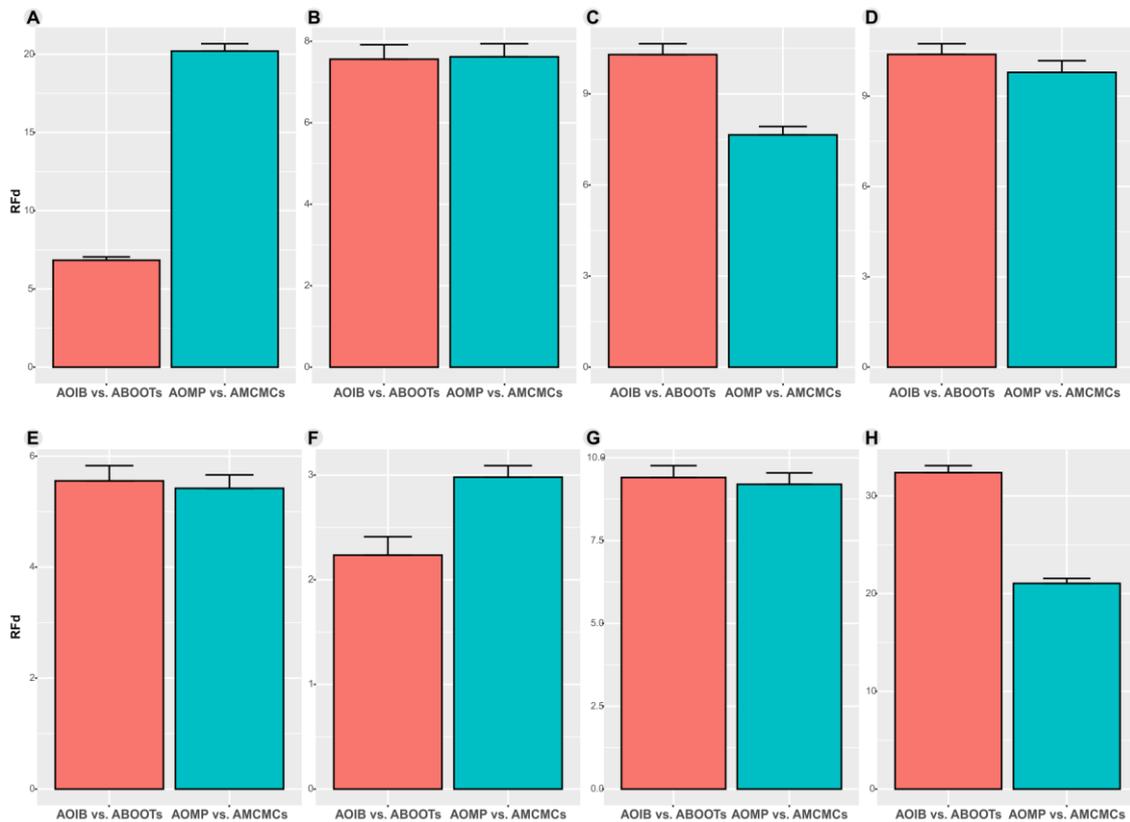
A partir de los resultados de este test, puede observarse que solo en tres de los ocho *dataset* examinados, no se rechazó la hipótesis nula de congruencia metodológica (Valor  $p > 0,05$ ), es decir que ambos métodos hallaron topologías estadísticamente equivalentes. Estas matrices son: ARNr 12s-16s, RAG1-R35 y la matriz Molecular Concatenada (Tabla 1.3.2, Fig. 1.3.10 B, E, G). En otras palabras, estas matrices presentan cierta solidez en sus datos, de manera que sin importar el método de reconstrucción filogenética, los resultados serán (de algún modo) “confiables”. Este resultado es interesante, ya que tanto la matriz ARNr 12s-16s como la matriz RAG1-R35 presentan altos niveles de entradas faltantes (56% y 43% respectivamente) si se los compara, con las proporciones correspondientes a las demás matrices individuales (Fig. 1.2.2).

Además, de las matrices mencionadas, la matriz CytB-ND4 presenta un Valor  $p$  (0,0243, Tabla 1.3.2) muy cercano al no rechazo de la hipótesis nula, de hecho, la misma no se rechazaría si se trabajara con un nivel de significancia del 1%, lo cual no es raro para tamaños muestrales grandes (como en este caso [ $n = 100$ ]). Por lo cual, *a priori* estos marcadores moleculares son dignos de seguir explorándose en cuanto a su nivel de información taxonómica en este grupo, completando tanto el muestreo taxonómico como de caracteres (entradas faltantes = 26% [Fig. 1.2.2]).

De las restantes matrices, para las cuales se rechazó rotundamente la congruencia metodológica (Tabla 1.3.2, Valor  $p \approx 0$ ), parecería que la matriz COI es ciertamente errática en cuanto a su calidad de información filogenética, al menos a este nivel taxonómico, ya que tanto su muestreo taxonómico como su porcentaje de entradas faltantes (35 taxones y 48% respectivamente), son comparables a los de la matriz ARNr 12s-16s.

Por último, las claras diferencias en cuanto a la resolución filogenética del algoritmo Bayesiano respecto de MP cuando se analizan datos morfológicos, está evidenciado en el nivel de rechazo de la hipótesis nula de congruencia metodológica tanto para la matriz Morfológica como para la matriz de Evidencia Total (Tabla 1.3.2). Es muy probable que esto tenga que ver con la pobre adecuación del modelo evolutivo Mk, cuando los datos siguen una distribución empírica de estados de caracteres, como se ha sugerido en la literatura (Goloboff *et al.*, 2018).

Otra interpretación que resulta interesante de analizar en este test, es la de desglosar la probabilidad de recuperar el árbol óptimo de un método, en el muestreo de árboles del otro método y viceversa (Fig. 1.3.10). Es decir, el test puede indicar un rechazo de la hipótesis nula por diferencias significativas en las distancias RF en un sentido, en el sentido opuesto o en ambos. Por ejemplo, puede observarse para la matriz morfológica (Fig. 1.3.10 A), que el árbol óptimo de la inferencia Bayesiana (AOIB) es más recuperado entre los árboles de Bootstrap (media de las distancias RF = 6,835) que el árbol óptimo de Máxima Parsimonia (AOMP) entre los árboles Bayesianos (media de las distancias RF = 16,46), es decir el rechazo en este caso se da en un sentido. En otras palabras, el resultado obtenido bajo IB es más aceptado bajo MP que al revés.



**Figura 1.3.10.** Gráfico de barras de distancias topológicas (RFd) entre: el árbol óptimo bajo IB (AOIB) y 100 árboles de Bootstrap bajo MP muestrados al azar (ABOOTs) (rojo); y el árbol óptimo bajo MP (AOMP) y 100 árboles de la fase estacionaria del análisis Bayesiano muestrados al azar (AMCMCs) (azul). **A:** Morfología, **B:** ARNr 12s-16s, **C:** COI, **D:** CytB-ND4, **E:** RAG1-R35, **F:** c-mos, **G:** Matriz Concatenada, **H:** Matriz de Evidencia Total.

## 1.4. Discusión y conclusiones

### 1.4.1 Relaciones filogenéticas del clado Chelidae

#### 1.4.1.1. Morfología

Históricamente se ha asumido que los análisis filogenéticos basados en caracteres morfológicos resultan consistentemente en filogenias que agrupan en un mismo clado a todas las especies de cuello largo, ya fueran éstas con distribución en Australasia (género *Chelodina*) o con distribución en Sudamérica (géneros *Hydromedusa*, *Chelus* y *Yaminuechelys*), donde todos estos géneros cuentan con representantes actuales y representantes en el registro fósil, o exclusivamente en el registro fósil (*Yaminuechelys*) (Maniel & de la Fuente, 2016). Sin embargo, al revisar los trabajos más relevantes en filogenia morfológica de Chelidae, desde el estudio presentado por Gaffney (1977) hasta la actualidad, en un 30% de éstos no se recupera un clado monofilético de especies de cuello largo (Tabla 1.4.1).

La filogenia morfológica producida en esta tesis mediante MP (Fig. 1.3.2) presenta una estructura general bastante más resuelta e informativa que la misma producida bajo IB, sin embargo ambas son consistentes en que no se recupera un clado monofilético conteniendo a todas las especies de cuello largo. En esta topología *Chelus fimbriata* es recuperado en una posición basal de un clado que contiene a las demás especies de cuello largo, más las especies actuales sudamericanas de cuello corto. En el estudio de Holley *et al.* (2020) esta especie se

recupera en la base de un clado que contiene a todas las especies del árbol, a excepción de las que forman el clado de especies sudamericanas de cuello corto extintas. Los otros dos estudios incluidos en la tabla 1.4.1 que no recuperan un clado de quélidos de cuello largo (de la Fuente *et al.*, 2017a; Maniel *et al.*, 2020), presentan topologías con configuraciones diferentes a las recién mencionadas, donde en caso de que se definiera un “clado de quélidos de cuello largo”, el mismo sería polifilético en vez de parafilético (como en los casos anteriores), ya que el mismo incluiría (además de las especies de cuello largo) a las especies de cuello corto *Mendozachelys wichmanni*, en el caso de de la Fuente *et al.* (2017a), y *Bonapartemys bajarrealis* en el caso de Maniel *et al.* (2020).

**Tabla 1.4.1.** Principales estudios filogenéticos de Chelidae, basados en datos morfológicos.

Estudios	N° Tax.	N° Chs.	EF (%)	MCL
Gaffney (1977)	7	33	0	Sí
Bona & de la Fuente (2005)	13	37	3	Sí
de la Fuente <i>et al.</i> (2015)	14	40	7,7	Sí
de la Fuente <i>et al.</i> (2017)a	18	61	12,1	No
de la Fuente <i>et al.</i> (2017)b	22	62	20,6	Sí
Maniel <i>et al.</i> (2018)	26	76	12	Sí
Oriozabala <i>et al.</i> (2019)	27	80	15	Sí
Holley <i>et al.</i> (2020)	33	65	30	No
Maniel <i>et al.</i> (2020)	31	104	20,8	No
<b>Presente Contribución</b>	<b>37</b>	<b>100</b>	<b>29</b>	<b>No</b>

**N° Tax.:** N° de taxones incluidos. **N° Chs.:** N° de caracteres incluidos. **EF (%):** % de entradas faltantes. **MCL:** Monofilia de especies de cuello largo.

Por otro lado, es interesante observar que si se toma en cuenta el supuesto de que la estructura filogenética más soportada por los datos moleculares, donde ambos grupos geográficos son recuperados como monofiléticos, representa más fielmente la “verdadera” historia evolutiva del clado Chelidae, y a partir de este, se estima la cantidad de movimientos de SPR (comando TNT: sprdiff 0 1) que transformarían el árbol aquí obtenido (mediante MP) en un árbol con esas características, este análisis resulta en un movimiento (índice de similitud = 0,9706). Es decir que el árbol obtenido en esta tesis a partir de los datos morfológicos, que presenta una estructura no tan acorde con la clásica topología morfológica (Fig. 1.3.2 A), en tan solo un movimiento de SPR pasaría a mostrar una estructura compatible con la de un “árbol molecular”, con una diferencia en el largo de los árboles de 15 pasos (de 337 a 352 pasos).

En la literatura existen pocos estudios que utilicen datos morfológicos y cuenten con enfoques analíticos para tratar este tema de manera objetiva, mediante la utilización de herramientas metodológicas independientes y perspectivas más integrales que el simple análisis filogenético de un set de datos. Entre estos, se encuentran tres publicaciones cuyos objetivos principales se centraron en la inspección de nuevas fuentes de variación morfológica, así como la evaluación de la información obtenida, contrastando su adecuación tanto a la hipótesis morfológica como la hipótesis molecular. El primero de estos estudios, en orden cronológico, (Winkler, 2006) utilizó doce especies de pleurodiras para indagar sobre la información filogenética implícita en la histología y ultraestructura de la cubierta de sus huevos, el segundo (Sánchez-Villagra *et al.*, 2007) estudia, de similar manera, la información

contenida en autopodios de 25 especies pleurodiras, y el tercero (Wilson & Sánchez-Villagra, 2011) utiliza la variación observada en las trayectorias de crecimiento en los cráneos de nueve especies de quélidos (141 especímenes) para testear ambas hipótesis filogenéticas propuestas para el grupo. En los dos primeros estudios se produjeron nuevos caracteres cladísticos discretos, en tanto que en el último se generaron una serie de medidas morfométricas que podrían analizarse como caracteres continuos. La evaluación de la información que se realizó en cada trabajo, terminó aportando soporte de los datos a una estructura más acorde a la “filogenia molecular”.

#### 1.4.1.2. Moléculas

En este capítulo se analizaron un total de seis matrices moleculares, las cinco particiones individuales (ARNr 12s-16s, COI, CytB-ND4, RAG1-R35 y c-mos), más la matriz concatenada que reúne toda la información molecular disponible en este trabajo de tesis.

Sumado a las diferencias propias que puedan existir entre diferentes secuencias de ADN, que pueden corresponder inclusive a diferentes genomas (nuclear o mitocondrial), cada uno de estos *dataset* presentó diferente muestreo taxonómico, diferente cantidad de caracteres y diferente porcentaje de entradas faltantes, además de ser todos ellos analizados mediante dos métodos de inferencia filogenética basados en criterios de optimización filosóficamente distintos. Todo este contexto hace que sea imposible pensar en una estabilidad en los resultados, por lo tanto es esperable que no siempre se recupere una topología coincidente con la estructura general de la “hipótesis molecular”. Tal es así que, sin contar la topología resultante a partir de la matriz concatenada, solo la matriz ARNr 12s-16s produjo una topología (Fig. 1.3.3) donde se recuperaron ambos grupos geográficos como monofiléticos (Tabla 1.4.2), congruentemente mediante ambos métodos filogenéticos (Valor p Test de congruencia = 0,802 [Tabla 1.3.2]; Fig. 1.3.10).

La tabla 1.4.2 muestra además, que el clado australasiático fue recuperado como un grupo monofilético solo una vez más que el clado sudamericano y que el método Bayesiano de inferencia filogenética rompió la monofilia de alguno de los dos clados, una vez más que MP. Sin embargo ambos métodos fallaron dos veces (no coincidentes) en recuperar ambos grupos geográficos como monofiléticos.

**Tabla 1.4.2.** Comportamiento de los métodos de inferencia filogenética aplicados a las distintas matrices moleculares, en relación a la monofilia de los grupos geográficos.

	MCA		MCS		MACG	
	MP	IB	MP	IB	MP	IB
ARNr12s-ARNr16s	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
COI	Sí	Sí	No	Sí	No	Sí
CytB-ND4	Sí	No	Sí	No	Sí	No
RAG1-R35	Sí	Sí	No	Sí	No	Sí
c-mos	Sí	No	Sí	Sí	Sí	No
<b>Concatenada</b>	<b>Sí</b>	<b>Sí</b>	<b>Sí</b>	<b>Sí</b>	<b>Sí</b>	<b>Sí</b>

**MCA:** Monofilia del clado australasiático. **MCS:** Monofilia del clado sudamericano. **MACG:** Monofilia de ambos grupos geográficos.

En general la información presente en el clado australasiático es mayor que la que se ha compilado para el clado sudamericano, producto de varios estudios recientes destinados a resolver cuestiones taxonómicas. Algunas de estas cuestiones tienen que ver con la validación o no de nuevos géneros propuestos, como por ejemplo el género *Flaviemys*, propuesto por Le *et al.* (2013) y posteriormente refutado por Spinks *et al.* (2015), quien revalidó el género *Myuchelys*. Por otro lado, en estudios recientes se realizaron análisis filogenéticos sobre el orden Testudines (Pereira *et al.*, 2017), usando 13 genes (entre mitocondriales y nucleares), y sobre el clado australasiático (Kehlmaier *et al.*, 2019), usando genomas mitocondriales completos, en los que se recuperó consistentemente a *Pseudemydura* en la base del clado, como taxón hermano del resto de las especies australasiáticas. Este resultado se obtuvo en uno solo de los análisis aquí realizados (matriz COI bajo IB [Fig. 1.3.4]), en tanto que más frecuentemente esta especie fue recuperada como taxón hermano de *Chelodina* (comparable con Guillon *et al.*, 2012) o en una posición más clásica como grupo hermano del “grupo *Emydura*” (*e.g.*, Georges *et al.*, 1998).

En relación al clado sudamericano, la estructura general “esperada”, con las especies de cuello largo en la base del clado, seguidas por un clado incluyendo a *Platemys* + *Acanthochelys* y luego (o como grupo hermano) un clado en el que al menos el género *Phrynops* sea recuperado como monofilético, ya que (debido a sus altos porcentajes de entradas faltantes) las diferentes especies de *Mesoclemmys* y *Rhinemys rufipes* suelen aparecer en posiciones alternativas, fue recuperado en dos de las matrices individuales (ARNr 12s-16s, CytB-ND4) mediante MP y nunca mediante IB. Esta estructura ha sido en general recuperada en la mayoría de los análisis a gran escala, donde las posiciones más estables son las de las especies de cuello largo en la base del clado, en tanto que la monofilia de los demás géneros a excepción de *Mesoclemmys* + *Rhinemys rufipes* se puede mantener (*e.g.*, Guillon *et al.*, 2012) o no (*e.g.*, Pereira *et al.*, 2017).

#### **1.4.1.3. Evidencia Total**

A la fecha, el único estudio realizado que específicamente trata las relaciones filogenéticas del clado Chelidae, desde una perspectiva de evidencia total, es el presentado por Holley *et al.* (2020). Dado que los datos, tanto morfológicos como moleculares, utilizados en dicho estudio representan la base de los datos utilizados para los análisis filogenéticos en este capítulo, es esperable que los resultados obtenidos sean similares. En este sentido, el árbol obtenido mediante MP es ciertamente (Fig. 1.3.9 A) muy similar al obtenido en dicho estudio, el mismo consta de un clado conteniendo a las especies sudamericanas de cuello corto extintas como grupo hermano del clado Chelidae, que está integrado por ambos grupos geográficos, donde el clado australasiático incluye tres taxones extintos (*Chelodina alanrixii*, *Chelodina murrayi* y *Birlimarr gaffneyi*) y el clado sudamericano incluye otros tres taxones extintos (*Hydromedusa casamayorensis*, *Yaminuechelys gasparinii* y *Yaminuechelys maior*). Las diferencias esenciales entre ambos árboles tienen que ver principalmente con el género *Hydromedusa*, antes recuperado como un grupo parafilético, aquí recuperado como monofilético, y el grado de resolución de politomías, como la que presenta el clado australasiático con todas las especies del género *Chelodina* en ramas individuales y la gran politomía que incluye a varias especies del género *Mesoclemmys* más las del género *Phrynops* y *Rhinemys rufipes*, en ambos casos el árbol aquí obtenido mediante MP presenta algo más resueltos estos clados. Sin embargo el árbol de evidencia total producido mediante IB (Fig. 1.3.9 B) presenta una diferencia más

notoria, en este árbol el clado de especies sudamericanas extintas de cuello corto, se ubica en la base del clado sudamericano, como grupo hermano *Yaminuechelys* + *Hydromedusa casamayorensis*, que a su vez está asociado a las otras dos especies de *Hydromedusa*. Este resultado es interesante si se lo compara con la posición del clado de especies extintas de cuello corto en la filogenia morfológica de MP (Fig. 1.3.2 A), donde es basal al clado de especies sudamericanas + *Chelodina*. Es decir, que la presencia de datos moleculares parece haber tenido un efecto en la resolución de la topología de evidencia total, de manera que el clado de especies sudamericanas de cuello corto extintas fue recuperado como grupo hermano del clado Chelidae.

### 1.4.2 Congruencia metodológica

Múltiples test de congruencia (o incongruencia) filogenética, con soporte estadístico, se desarrollaron e implementaron, acompañando la vertiginosa generación sostenida de *dataset* de crecientes tamaños y complejidades, así como el desarrollo de métodos de inferencia filogenética, con su algoritmia y software relacionados (ver Leigh *et al.*, 2011). La mayoría de estos test pueden ser encuadrados en uno de dos grupos: **i)** los que evalúan directamente diferencias entre topologías (normalmente producidas bajo el mismo criterio de inferencia), o **ii)** los que evalúan el ajuste de una topología (normalmente el resultado de toda la evidencia) a cada partición o bloque individual de datos (Planet, 2006). Los que se encuentran en el primer grupo suelen utilizarse para testear fenómenos de co-evolución, como puede ocurrir con grupos que presenten relación de tipo parásito-hospedador, o en estudios de filogeografía, donde dos (o más) poblaciones pueden presentar, paralelamente, historias evolutivas afines (Lapointe & Rissler, 2005; de Vienne *et al.* 2007). Por su parte, los test que se encuentran en el segundo grupo, son muy similares entre sí, y están en su mayoría orientados a testear el ajuste de los datos a una topología global, donde uno de los pioneros es el test ILD (Incongruence Length Difference) desarrollado por Farris *et al.* (1994) y posteriormente implementado en PAUP\* (Swofford, 1999).

En este contexto, el test de congruencia metodológica aquí implementado, es una herramienta estadística interesante, ya que sus resultados pueden ser interpretados bajo las dos perspectivas recién mencionadas, pero además es una implementación que permite comparar resultados filogenéticos provenientes de distintos criterios de optimización (alternativa que no es contemplada en los demás test) e indirectamente testear la estabilidad de los datos que dieron origen a las topologías comparadas. Así, en cada una de las particiones en las que se rechazó la hipótesis nula de congruencia (Tabla 1.3.2, Fig. 1.3.10), no solo se proporciona soporte estadístico para inferir que las topologías resultantes mediante los dos métodos usados son significativamente diferentes, sino que además puede inferirse que esas particiones son sensibles al método de inferencia que se aplique, por lo tanto pueden asumirse como “inestables”, respecto de la estructura global de los datos y su topología asociada.

### 1.4.3 Consideraciones finales

Las relaciones filogenéticas dentro del clado Chelidae, representan un tema de debate aún latente. Esta situación se ha establecido no solo por la disparidad de resultados en función de la fuente de información que fuera analizada en cada estudio, sino que además la mayoría de los estudios que han tratado este tema, carecen de un enfoque integral y una evaluación cuantitativa de sus resultados.

En este contexto, los resultados presentados en este capítulo exponen un avance significativo respecto de aportes anteriores. Aquí, gran parte de los esfuerzos realizados estuvieron dirigidos a: **i)** generación de datos nuevos, a partir de fuentes morfológicas (tanto caracteres clásicos como cariológicos) y moleculares, a fin de poder obtener estimaciones en un contexto de evidencia total; **ii)** inclusión en las matrices de datos, tanto de especies actuales como de especies extintas, ya que contar con formas previas a las presentes en la actualidad es un aspecto muy importante a la hora de interpretar la historia evolutiva de un grupo; **iii)** detección de particiones verdaderas en los datos moleculares (*i.e.*, regiones del ADN con tasas evolutivas homogéneas), a fin de poder tratar cada partición como una matriz de datos individual y evaluar su aporte a la filogenia global; **iv)** inferencia filogenética, sobre todas las fuentes de información disponibles (de manera individual y en combinación) a través de dos criterios de búsqueda diferentes, permitiendo así considerar distintos enfoques metodológicos y las posibles implicancias evolutivas de los resultados obtenidos en cada caso; y **v)** evaluación de la congruencia de los resultados obtenidos con cada método, así como la estabilidad de los datos, mediante la aplicación de un test estadístico específicamente desarrollado en esta tesis, para evaluar estos aspectos.

Las perspectivas a futuro en este tema seguramente estarán dirigidas a corroborar y/o ampliar los resultados presentados aquí, a partir de la búsqueda de mejorías en los muestreos taxonómicos y de caracteres, tratando de producir nuevos datos a partir de fuentes de información aún poco exploradas (*e.g.*, caracteres morfológicos: continuos, morfogeométricos, de anatomía blanda y cariológicos, y moleculares como mitogenomas completos), e incluyendo correlaciones con otros aspectos (*e.g.*, ecológicos, fenómenos de co-evolución, modelado de masa corporal, etc.) que aporten a una conclusión integral y robusta sobre el patrón de relaciones filogenéticas y la historia evolutiva del clado Chelidae.

---

## *Capítulo II*

---

### **Tiempos de divergencia**

## Resumen

Proporcionar un marco temporal a un árbol filogenético, es una tarea que debería ser parte de cualquier estudio que pretenda contar la historia evolutiva de un grupo. En este sentido el clado Chelidae, es un interesante grupo de estudio, debido a los conflictos que existen entre las contrastantes hipótesis filogenéticas obtenidas al analizar datos morfológicos o moleculares.

Recientemente, el estudio de Holley *et al.* (2020) presenta estimaciones para los tiempos de divergencia de los principales nodos del clado Chelidae y nodos más basales, incluyendo la raíz del árbol que se corresponde con el suborden Pleurodira. En este capítulo se re estiman estos nodos a partir de un set de datos ampliado y se emplea un nuevo conjunto de análisis en los que no solo se estiman las edades de los nodos usando datos morfológicos, moleculares y ambos en combinación, sino que además los resultados son estadísticamente evaluados.

Las conclusiones finales basadas en la topología de Evidencia Total, sugieren que el suborden Pleurodira habría surgido a fines del Jurásico temprano (180,74 maap [millones de años antes del presente]), donde a partir de su diversificación, surgiría en el Jurásico tardío (155,07 maap) un clado que estaría integrado por Chelidae más un clado de especies de cuello corto, cuyos integrantes comenzarían a extinguirse hacia fines del Cretácico temprano. Por su parte, Chelidae tendría su origen a mediados del Cretácico temprano (123,18 maap), bifurcando en ambos grupos geográficos, donde el clado sudamericano habría surgido un poco antes que el clado australasiático (109,77 maap y 101,75 maap respectivamente). De igual manera, el cuello largo habría aparecido antes en el clado sudamericano que en el australasiático (93,22 maap y 65,26 maap respectivamente).

## 2.1. Introducción

### 2.1.1. El reloj molecular

El concepto de reloj molecular fue inicialmente introducido por Zuckerkandl & Pauling (1962, 1965), quienes observaron que la cantidad de cambio acumulado en secuencias de aminoácidos de hemoglobinas entre especies de mamíferos relacionados, era proporcional al tiempo transcurrido desde que estas divergieron a partir de un ancestro común, presente en el registro fósil, cuya edad era conocida. Rápidamente, esta idea fue trasladada a secuencias de ADN, a partir de los trabajos de investigación en las tasas de error de la polimerasa, que llevaron adelante Sarich & Wilson (1967). Estos novedosos avances, inferían cierta estacionalidad o constancia de las tasas de cambio de las macro moléculas, lo cual fue un punto de apoyo en la emergente teoría neutral de la evolución molecular de Kimura, con la que se completaría el marco teórico que se comenzaba a desarrollar en este campo de la ciencia (Kimura, 1968; 1983; Kimura & Ohta, 1974). Siguiendo esta línea conceptual, los primeros métodos estadísticos para estimar tiempos de divergencia, basados en distancias o máxima verosimilitud, asumían esta tasa constante de cambio nucleotídico entre especies de una filogenia, término denominado “reloj estricto” y usaban la edad de los fósiles (como valores puntuales) para calibrar (“puntos de calibración”) las estimaciones de los tiempos de divergencia (*e.g.*, Read, 1975; Romero-Herrera *et al.*, 1979; Vawter *et al.*, 1980).

En orden cronológico, los primeros avances condujeron a abandonar el supuesto de constancia en las tasas de cambio del ADN entre linajes, lo cual condujo al desarrollo de algoritmos que pudieran estimar los tiempos de divergencia contemplando esta disparidad (Britten, 1986; Kishino & Hasegawa, 1990; Avise, 1994; Li, 1997; Sanderson, 1997). Posteriormente, la inferencia mediante estadística Bayesiana se convirtió en el método de análisis más utilizado en el campo de los relojes moleculares. Entre otras ventajas esta nueva metodología permitía: **i)** contemplar diferentes tasas evolutivas en diferentes ramas de un árbol filogenético, en un modelo que se conoció como “reloj relajado”, **ii)** inferir los tiempos de divergencia y la topología simultáneamente, **iii)** aplicar modelos estadísticos complejos, que proporcionaran un “mejor ajuste” a los procesos evolutivos bajo estudio, **iv)** asignar distribuciones de probabilidad *a priori* en nodos de referencia, calibrados en función de la edad de fósiles relacionados, un método conocido como “node-dating” (*e.g.*, Sanderson, 1997; Huelsenbeck & Ronquist, 2001; Sanderson, 2003; Drummond *et al.*, 2006; Drummond & Rambaut, 2007; Yang, 2007; Drummond *et al.*, 2012).

En el último tiempo los esfuerzos fueron dirigidos a abordar un nuevo método de calibración, en el que la edad de los taxones extintos pudiera ser automáticamente ingresada en el análisis, a la vez que su posición filogenética era estimada, este método se conoce hoy como “tip-dating”, el cual pudo desarrollarse a partir de la incursión inicial de Lewis (2001), donde desarrolló el modelo Mk para la evolución de caracteres morfológicos y posteriores aplicaciones en un contexto bayesiano (Pyron, 2011; Ronquist *et al.*, 2012).

Finalmente, los últimos avances de este campo, en particular en lo referido a procesos macroevolutivos, están relacionados con la implementación de modelos de ajuste a procesos de diversificación que tengan en cuenta no sólo los sucesos de especiación (*Pure Birth model* [Yule, 1925; Gernhard, 2008]), sino también los de extinción (*Birth Death model* [Gernhard,

2008]) y las dinámicas de los procesos de fosilización (*Fossilized Birth-Death model* [Heath *et al.*, 2014]).

### 2.1.2. Tiempos de divergencia del clado Chelidae

Dada la actual distribución disjunta del clado Chelidae en Australasia (Australia, Nueva Guinea) y Sudamérica (TTWG, 2017), las contrastantes señales filogenéticas que se obtienen al analizar datos morfológicos (Gaffney, 1977; Bona & de la Fuente, 2005; de la Fuente *et al.*, 2015; 2017a; 2017b; Maniel *et al.*, 2018; Oriozabala *et al.*, 2018; Maniel *et al.*, 2020; Holley *et al.*, 2020) o moleculares (Seddon *et al.*, 1997; Shaffer *et al.*, 1997; Georges *et al.*, 1998; Guillon *et al.*, 2012; Rodrigues & Diniz-Filho, 2016; Pereira *et al.*, 2017; Holley *et al.*, 2020), así como sus morfotipos (cuello corto y cuello largo), con sus particularidades ecológicas, y su notable presencia en el registro fósil (Maniel & de la Fuente, 2016) desde el Cretácico a la actualidad (244 registros [PBDB]); la estimación de tiempos de divergencia se impone como un tipo de análisis central al abordar el objetivo de estudiar la historia evolutiva de este grupo. De hecho, este tipo de estudios se han realizado repetidas veces aportando datos sobre los tiempos en que pudieron haber ocurrido sucesos claves en la diversificación del clado Chelidae, sin embargo estas estimaciones en la mayoría de dichos estudios fueron el resultado de análisis cuyo objetivo principal era el de datar los nodos más relevantes del orden Testudines (Near *et al.*, 2005; Dornburg *et al.*, 2011; Joyce *et al.*, 2013; Rodrigues & Diniz-Filho, 2016; Pereira *et al.*, 2017).

No obstante el aporte de información de estos estudios, en algunos casos el muestreo de caracteres y taxonómico para Chelidae es escaso (Near *et al.*, 2005; Dornburg *et al.*, 2011; Joyce *et al.*, 2013) y por otro lado, todos estos aportes presentan análisis de tipo *node-dating*, bajo diferentes estrategias de calibración, sin modelos de árbol o con modelos poco adecuados (*e.g.*, Pure Birth model), utilizando diferentes programas (MrBayes, BEAST, MCMCTREE y PAML) y solo considerando la hipótesis filogenética molecular.

Recientemente, Holley *et al.* (2020) presentaron un análisis de reloj molecular y morfológico específicamente diseñado para datar los nodos internos del clado Chelidae y nodos más basales, bajo modelos de reloj relajado, modelos de árbol como el *BD* o el *FBD*, aplicando tanto estrategias de *node-dating* como *tip-dating*, usando datos morfológicos, moleculares y ambos en combinación y contrastando cada uno de sus resultados con los de los estudios previamente nombrados. Este estudio es tomado como base en este capítulo, en el que se aborda el mismo set de análisis, sobre un set de datos ampliado respecto del mismo y se realizan nuevas comparaciones de los resultados obtenidos aquí y en estudios previos, en un marco estadístico.

## 2.2. Materiales y métodos

### 2.2.1. Set de datos

Los análisis realizados en este capítulo, se llevaron a cabo sobre la base de las matrices de datos presentadas en la sección de materiales y métodos del capítulo I, es decir cinco particiones de datos moleculares (ARNr 12s-16s, COI, CytB-ND4, RAG1-R35 y c-mos) más la matriz Concatenada Molecular, una partición de datos morfológicos y una matriz de Evidencia Total.

### 2.2.2. Estimación de tiempos de divergencia

Todos los análisis de estimación de tiempos de divergencia se llevaron a cabo con el software BEAST versión 2.4.3 (Bouckaert *et al.*, 2014), donde las configuraciones de los parámetros definidos en cada caso y posteriormente salvados en archivos *.xml*, fueron definidas usando la plataforma BEAUti (Drummond *et al.*, 2012) que forma parte del paquete BEAST.

A fin de obtener resultados integrales, cada matriz de datos se utilizó como input en sucesivos análisis de reloj molecular (o morfológico), usando en cada caso diferentes modelos de árbol y estrategias de calibración de las topologías (Tabla 2.2.1). En total, dos tipos de análisis de tiempos de divergencia fueron aplicados a los datos: **i)** calibración de nodos (*node dating*) y **ii)** calibración de terminales (*tip dating*). En el primer caso, determinados nodos son calibrados mediante la información temporal contenida en especies extintas relacionadas a cada clado en cuestión, pero el árbol solo contiene especies actuales. En el segundo caso, toda la calibración del árbol es el resultado de la estimación de largos de rama a partir de las edades (con su incertidumbre asociada) de taxones extintos que integran el árbol como terminales.

En este contexto, se corrieron análisis para las tres matrices principales (Morfología, Concatenada Molecular y Evidencia Total), cuyos resultados se presentan como troncales de cada tipo de dato, más la conjunción de los mismos. Además, se corrieron análisis de todas las particiones, cuyos resultados se compararon estadísticamente, mediante regresiones lineales simples, con los resultados obtenidos de la matriz de Evidencia Total, a fin de evaluar la incidencia de cada partición con respecto a la estimación global de tiempos de divergencia. Los tres análisis principales se corrieron forzando la monofilia de los nodos principales, usando como guía los árboles obtenidos mediante MP (presentados en el capítulo anterior). Los análisis de las particiones moleculares se corrieron forzando la monofilia de nodos principales basados en la topología molecular de la matriz Concatenada, luego de quitar los terminales necesarios hasta igualar el número de taxones de la partición en cuestión. La decisión de forzar la monofilia de algunos nodos, en base a topologías previamente estimadas, se fundamenta en el hecho que BEAST es un software poco eficiente en cuanto a búsquedas filogenéticas y puede producir topologías incorrectas si no se le proporciona estructura, como uno más de sus parámetros *a priori* (Springer *et al.*, 2018).

Los análisis de *tip dating* se llevaron a cabo bajo el modelo de árbol FBD (por su sigla en inglés *Fossilized Birth-Death*), el cual fue implementado en BEAST mediante el paquete “Sampled Ancestor” (Gavryushkina *et al.*, 2014, 2016), en tanto que los análisis de *node dating* se llevaron a cabo bajo el modelo BD (por su sigla en inglés *Birth-Death*), que forma parte del código nativo de BEAST. Estos últimos análisis se realizaron calibrando los nodos correspondientes a los clados australasiático y sudamericano con el fósil más antiguo de cada clado presente en los datos (*Chelodina alanixi* y *Yaminuechelys gasparinii*, respectivamente). Además, estas calibraciones se realizaron siguiendo el método “Clade Age” (Matschiner *et al.*, 2016), el cual asigna una distribución de probabilidad a cada nodo basada en los límites estratigráficos de la edad del fósil más antiguo y un gap en la aparición del clado de 2 millones de años, el cual es un estándar recomendado en la documentación del paquete.

En cada análisis se asignó a cada partición el modelo de sustitución previamente hallado con PartitionFinder (ver la sección de materiales y métodos del capítulo I) en el caso de matrices moleculares, o el modelo Mkv (Lewis, 2001) en el caso de la matriz morfológica (Tabla 2.2.1), en tanto que se fijó el modelo de reloj relajado no correlacionado, con distribución Log Normal (Drummond *et al.*, 2006) para todas las matrices en todos los análisis. También en todos los casos, la raíz del árbol se calibró mediante una distribución uniforme suavizada, cuya extensión va desde el límite más antiguo de la edad del taxón fósil *Proterochersis robusta* (228,4 maap [millones de años antes del presente], Noriano) hasta el límite más reciente de la edad del taxón fósil *Araripemys barretoii* (100,5 mmay, Albiano). Este periodo fue seleccionado por que el mismo cubre desde el surgimiento del taxón más antiguo asignado al “stem group” Testudines, hasta el taxón más antiguo asignado al “crown group” Pleurodira.

Los parámetros del modelo FBD fueron estimados proporcionándole al algoritmo bayesiano información *a priori*, obtenida tanto desde el registro fósil como de especies actuales, así como herramientas metodológicas *ad hoc*. Las tasas de especiación ( $\lambda$ ) y extinción ( $\mu$ ) fueron estimadas usando el software PyRate (Silvestro *et al.*, 2014) y la tasa de muestreo de fósiles fue estimada con el método TRiPS desarrollado por Starrfelt & Liow (2015). Ambos métodos utilizan como input, datos de ocurrencia de fósiles (de Pleurodira en este caso) obtenidos a partir de la base de datos PBDB (*Paleobiology DataBase* [<https://paleobiodb.org>]), los cuales se ingresan a cada algoritmo de diferente manera y en diferente formato (ver Apéndice V). La probabilidad de muestreo de especies actuales fue estimada mediante el cociente entre el N° de especies presentes en la muestra (los datos) y el N° de especies pleurodiras actuales reconocidas.

Los análisis se llevaron a cabo mediante corridas dobles de cuatro cadenas de Markov-Monte Carlo (MCMC), las cuales se corrieron durante 100 millones de generaciones, muestreando los estados de los parámetros cada 1000 generaciones, e inspeccionando la estabilidad de las corridas a lo largo de las cadenas MCMC mediante el software Tracer versión 1.7 (Rambaut *et al.*, 2018). Por último, la incertidumbre asociada a las edades de los fósiles fue incorporada en cada análisis mediante la edición manual de los archivos *.xml* generados con BEAUti, como se recomienda en el sitio web soporte de BEAST 2 (<http://beast2.org/divergence-dating-with-sampled-ancestors-fbd-model/>).

**Tabla 2.2.1.** Matrices analizadas, con detalle de los modelos aplicados y paquetes de BEAST2 cargados en cada caso.

Matriz	Ms	Ma	Mr	Paquete de BEAST2
Morfología	Mkv	FBD	RNCLN	SA, MM
ARNr12s-16s	GTR+G	BD	RNCLN	CladeAge
COI	GTR+I+G	BD	RNCLN	CladeAge
CytB-ND4	GTR+I+G	BD	RNCLN	CladeAge
RAG1-R35	HKY+G	BD	RNCLN	CladeAge
c-mos	K80+I	BD	RNCLN	CladeAge
Concatenada	-	BD	RNCLN	CladeAge
Evidencia total	-	FBD	RNCLN	SA, MM

**Ms:** Modelo de sustitución. **Ma:** Modelo de árbol. **MM:** Morphological Models (paquete). **Mr:** Modelo de reloj. **RNCLN:** Relajado, no correlacionado, Log Normal. **SA:** Sampled Ancestor (paquete).

### 2.2.3. Comparaciones estadísticas

#### *Comparaciones con estudios previos*

En esta sección se retoma y amplía la comparación presentada por Holley *et al.* (2020), donde se seleccionaron los resultados obtenidos en cuatro estudios previos de reloj molecular (ver Tabla 2.3.1), desde los cuales se extrajeron las estimaciones de las edades de nodos comunes a los recuperados en el estudio de Holley *et al.* (2020) y los mismos se compararon cualitativamente. En este caso, se retoman estas estimaciones más las producidas por los análisis de Evidencia Total de Holley *et al.* (2020) y el que se presenta en este capítulo, y las mismas se comparan estadísticamente en un procedimiento iterativo que aplica, nodo a nodo, una prueba ANOVA de un factor no paramétrica (test *Kruskal-Wallis* [Kruskal & Wallis, 1952]), si se trata de una comparación múltiple, o un test de suma de rangos signados de Wilcoxon (Wilcoxon, 1992), si se trata de una comparación pareada, sobre las estimaciones medias (media o mediana) y los respectivos límites de sus 95%HPDs (ver Apéndice V). Este procedimiento permite detectar cuantitativamente para cada nodo la existencia o no de diferencias significativas entre los diferentes análisis, y además, en los casos de comparaciones múltiples, se aplica un test post hoc (Dunn, 1961) del test *Kruskal-Wallis*, el cual detecta estructuración entre los análisis, por lo tanto permite identificar cuáles análisis resultaron en estimaciones estadísticamente homogéneas.

#### *Comparaciones entre análisis propios*

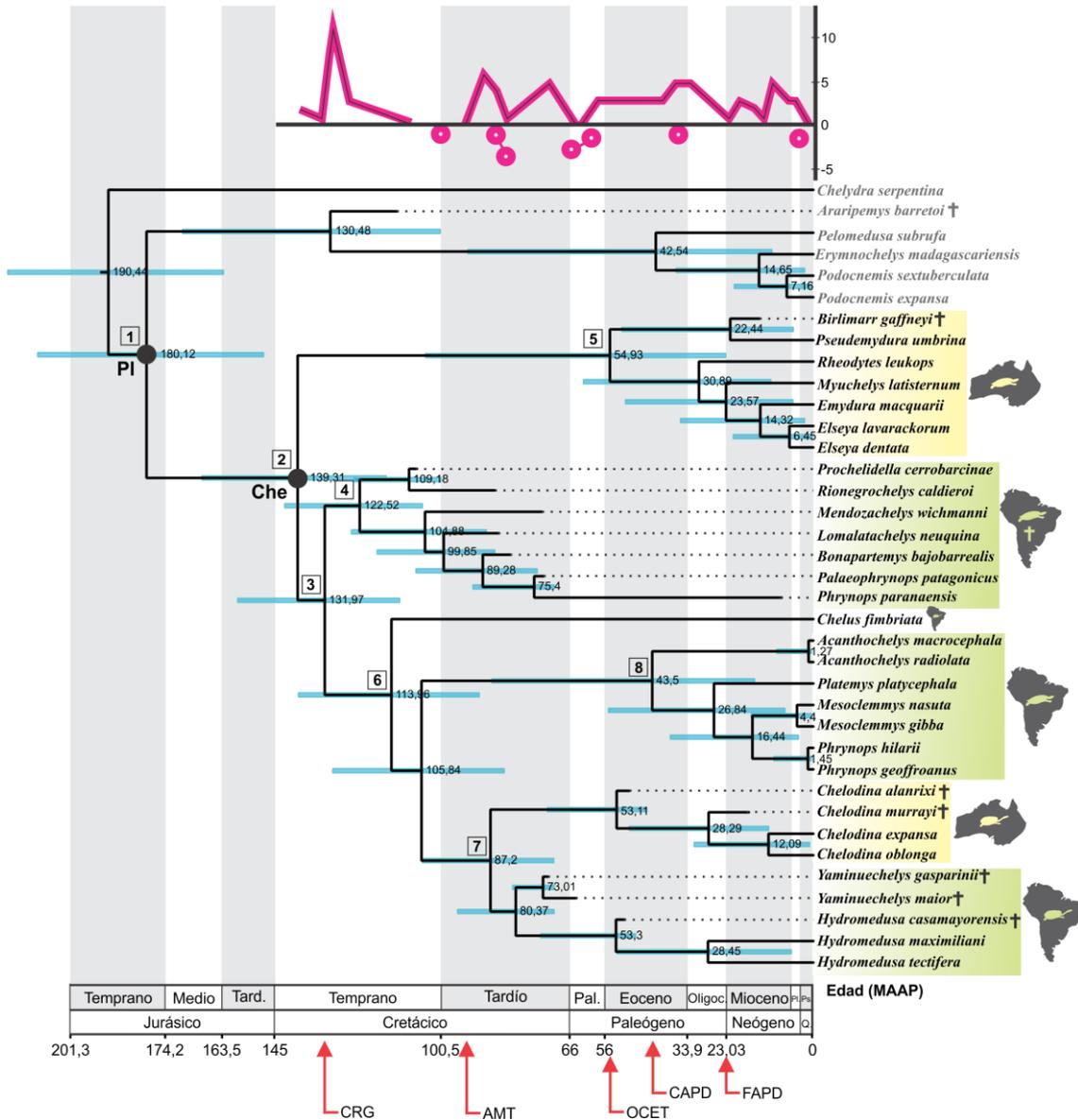
A fin de comparar estadísticamente los tiempos de divergencia estimados en cada partición de datos *versus* los resultados obtenidos mediante la estimación de las edades de nodos en el árbol de Evidencia Total, se corrieron regresiones lineales simples, que permitieron verificar el peso que cada set de datos tiene sobre la estimación global de las edades. Este procedimiento se llevó a cabo mediante un script desarrollado en lenguaje R (ver Apéndice V), el cual lee el árbol de Evidencia Total, luego lee el árbol de la partición a comparar y “poda” el árbol de Evidencia Total hasta igualar el número de terminales del árbol de la partición a comparar. Luego busca nodos en común entre estos dos árboles y extrae las edades, para conformar dos vectores que serán el input final de la regresión lineal simple. Finalmente, el script entrega el diagrama de dispersión de la regresión, con su recta de mínimos cuadrados ajustada (función *lm* de R), su coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el valor p de la prueba de hipótesis sobre la pendiente ( $\beta_1$ ). En este sentido, un mayor  $R^2$  indica un mayor peso de esa partición en la estimación global de tiempos de divergencia.

## 2.3. Resultados

### 2.3.1. Tiempos de divergencia

Los resultados de los tiempos de divergencia estimados para cada matriz de datos se presentan individualmente, indicando en cada caso las edades de los nodos principales, que representan clados reconocidos (Figs. 2.3.1-3). Dado que las edades estimadas representan las medianas resultantes de un procedimiento estadístico que genera una distribución de valores para cada nodo, las mismas se informan con su 95% de confianza asociado (95% HPD [*High Posterior Density*]). Luego, las estimaciones de las edades obtenidas del árbol de Evidencia Total, son comparadas con estudios previos, en una extensión de la comparación presentada por Holley *et al.* (2020) (Fig. 2.3.4, Tabla 2.3.1).

2.3.1.1. Morfología



**Figura 2.3.1.** Árbol Bayesiano datado, basado en el análisis de la matriz Morfológica, con detalle (arriba) de la curva de diversidad en el tiempo para Chelidae en Sudamérica, estimada por Vlachos *et al.* (2018). Los valores en los nodos representan edades. **PI:** Pleurodira, **Che:** Chelidae, **CRG:** comienzo de la ruptura de Gondwana, **AMT:** apertura del mar de Tasmania, **OCET:** óptimo climático del Eoceno Temprano, **CAPD:** comienzo de apertura del pasaje de Drake, **FAPD:** final de apertura del pasaje de Drake. **Pal.:** Paleoceno. **Oligoc.:** Oligoceno. **Pl.:** Plioceno. **Ps:** Pleistoceno. **Q:** Cuaternario.

La topología resultante para esta matriz tras el análisis con BEAST, presenta ocho nodos principales integrados por especies de tortugas pleurodiras.

**Nodo 1:** Este nodo representa el origen del suborden Pleurodira y su edad estimada es de 180,12 maap (95% HPD = 148,5—209,5 maap).

**Nodo 2:** Este nodo representa al clado Chelidae, cuyo origen fue estimado en 139,31 maap (95% HPD = 115,36—165,15 maap).

**Nodo 3:** Este nodo incluye a todas las especies sudamericanas actuales y extintas, más las especies del género *Chelodina*. La edad estimada para el origen de este clado es de 131,97 maap (95% HPD = 117,73—155,5 maap).

**Nodo 4:** Este nodo incluye a todas las especies sudamericanas extintas de cuello corto, cuyo origen fue estimado en 122,52 maap (95% HPD = 105,6—142,8 maap).

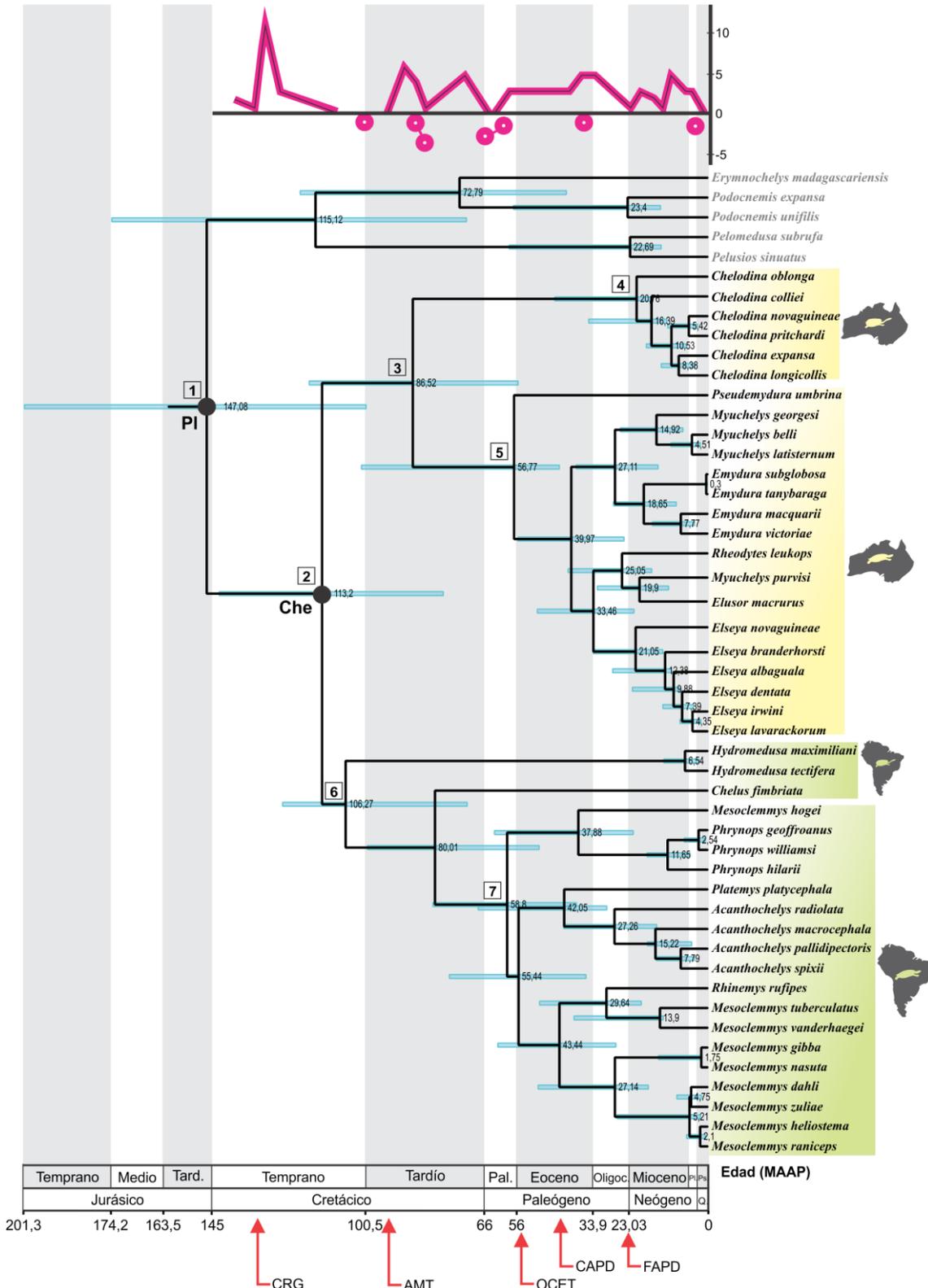
**Nodo 5:** Este nodo incluye a todas las especies australasiáticas de cuello corto y su edad fue estimada en 54,93 maap (95% HPD = 23,65—104,76 maap).

**Nodo 6:** Este nodo incluye a *Chelus fimbriata* más todas las especies sudamericanas actuales de cuello corto y el clado que contiene a los géneros de cuello largo tanto sudamericanos (*Hydromedusa* y *Yaminuechelys*) como el género australasiático *Chelodina*. La edad estimada para el origen de este clado es 113,96 maap (95% HPD = 90,25—139,07 maap).

**Nodo 7:** Este nodo incluye a todos los géneros de cuello largo (*Chelodina*, *Hydromedusa* y *Yaminuechelys*) y su edad fue estimada en 87,2 maap (95% HPD = 70,12—105,64 maap).

**Nodo 8:** Este nodo incluye a todas las especies sudamericanas actuales de cuello corto (*Acanthochelys*, *Platemys*, *Mesoclemmys* y *Phrynops*) y su edad fue estimada en 43,5 maap (95% HPD = 15,85—86,82 maap).

2.3.1.2. Moléculas



**Figura 2.3.2.** Árbol Bayesiano datado, basado en el análisis de la matriz Concatenada molecular, con detalle (arriba) de la curva de diversidad en el tiempo para Chelidae en Sudamérica, estimada por Vlachos *et al.* (2018). Los valores en los nodos representan edades. **PI:** Pleurodira, **Che:** Chelidae, **CRG:** comienzo de la ruptura de Gondwana, **AMT:** apertura del mar de Tasmania, **OCET:** óptimo climático del Eoceno Temprano, **CAPD:** comienzo de apertura del pasaje de Drake, **FAPD:** final de apertura del pasaje de Drake. **Pal.:** Paleoceno. **Oligoc.:** Oligoceno. **PI.:** Plioceno. **Ps:** Pleistoceno. **Q:** Cuaternario.

La topología resultante para esta matriz tras el análisis con BEAST, presenta siete nodos principales integrados por especies de tortugas pleurodiras.

**Nodo 1:** Este nodo representa el origen del suborden Pleurodira y su edad estimada es de 147,08 maap (95% HPD = 100,26—200,62 maap).

**Nodo 2:** Este nodo representa al clado Chelidae, cuyo origen fue estimado en 113,2 maap (95% HPD = 77,6—143,4 maap).

**Nodo 3:** Este nodo representa al clado australasiático, cuyo origen fue estimado en 86,52 maap (95% HPD = 55,57—116,98 maap).

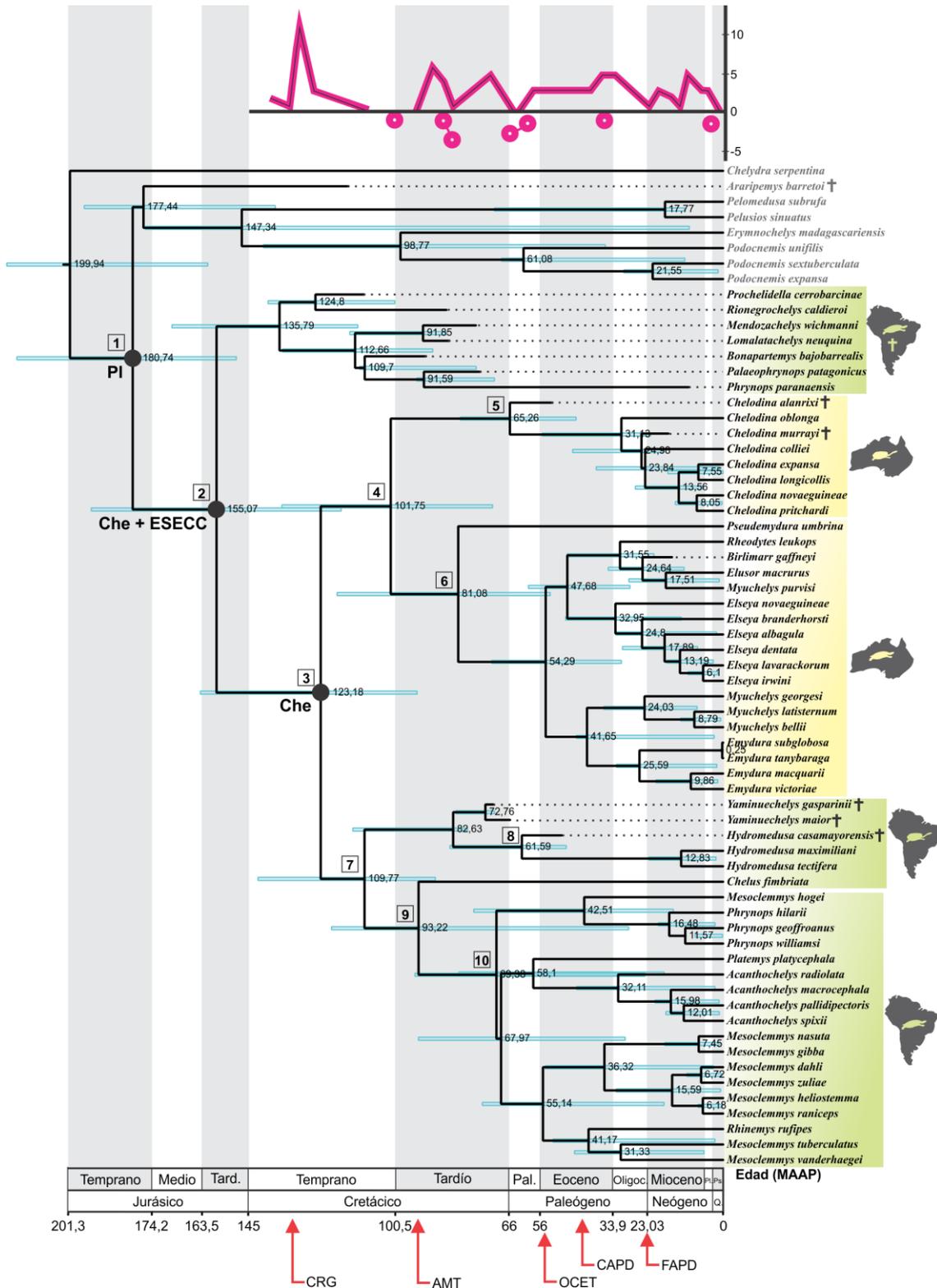
**Nodo 4:** Este nodo representa al género *Chelodina* y su origen fue estimado en 20,75 maap (95% HPD = 16,16—44,8 maap).

**Nodo 5:** Este nodo incluye a todas las especies australasiáticas de cuello corto y su edad fue estimada en 56,77 maap (95% HPD = 43,48—101,64 maap).

**Nodo 6:** Este nodo representa al clado sudamericano, cuyo origen fue estimado en 106,27 maap (95% HPD = 70,56—124,8 maap).

**Nodo 7:** Este nodo incluye al clado de las especies sudamericanas de cuello corto y su edad de origen fue estimada en 58,8 maap (95% HPD = 38,47—80,61 maap).

2.3.1.3. Evidencia Total



**Figura 2.3.3.** Árbol Bayesiano datado, basado en el análisis de la matriz de Evidencia Total, con detalle (arriba) de la curva de diversidad en el tiempo para Chelidae en Sudamérica, estimada por Vlachos *et al.* (2018). Los valores en los nodos representan edades. **PI**: Pleurodira, **Che**: Chelidae, **ESECC**: Especies Sudamericanas extintas de cuello corto, **CRG**: comienzo de la ruptura de Gondwana, **AMT**: apertura del mar de Tasmania, **OCET**: óptimo climático del Eoceno Temprano, **CAPD**: comienzo de apertura del pasaje de Drake, **FAPD**: final de apertura del pasaje de Drake. **Pal.:** Paleoceno. **Oligoc.:** Oligoceno. **Pl.:** Plioceno. **Ps.:** Pleistoceno. **Q.:** Cuaternario.

La topología resultante para esta matriz tras el análisis con BEAST, es similar a la presentada por Holley *et al.* (2020), por lo tanto se enumeran los nodos principales allí nombrados y utilizados para comparar con estudios previos (Tabla 2.3.1).

**Tabla 2.3.1.** Extensión de la comparación de edades presentada por Holley *et al.* (2020), incluyendo las estimaciones aquí obtenidas sobre el árbol de Evidencia Total.

Nodo	Clado	PC - ET	Hea (2020) - ET	Dea (2011)	Jea (2013)	R&DF (2016)	Pea (2017)
		Mediana (95%HPD)	Mediana (95%HPD)	Media (95%HPD)	Media (95%HPD)	Media (95%HPD)	Media (95%HPD)
1	PI	180,74 (149,01-216,2)	193,7 (165,62-217,21)	147,3 (133,5-162,8)	164,09 (155,6-171,35)	129,06 (112,38-149,23)	161,74 (149,25-168,9)
2	Che + ESECC	155,07 (116,9-193,4)	146,82 (121,67-177,12)	NA	NA	NA	NA
3	Chelidae	123,18 (93,7-160)	112,08 (92,03-134,04)	80,4 (73,2-90,2)	116,01 (99,35-133,19)	77,22 (66,46-92)	117,46 (99,45-135,3)
4	Caus	101,75 (70,6-135,06)	85,26 (65,43-108)	61,5 (38,1-79,7)	94,62 (76,31-113,52)	60,04 (46,01-75,8)	104,41 (85,86-122,5)
5	Chel	65,26 (45-80,4)	53,61 (45-74,09)	NA	NA	21,46 (12,58-32,1)	40,12 (27,23-57,14)
6	EACC	81,08 (52,9-118,6)	65,16 (45,66-87,52)	NA	NA	50,58 (36,5-66,6)	90,08 (68,86-108,61)
7	Csud	109,77 (88,07-142,4)	101,86 (85,36-122,18)	44,4 (25,9-63)	71,98 (54,32-90,92)	67,87 (54,88-83,38)	99,3 (81,51-117,62)
8	Hyd	61,6 (48-83,6)	86,65 (73,75-103,72)	NA	NA	NA	NA
9	Chelus + ESCC	93,2 (28,9-119,86)	60,38 (48-83,88)	NA	NA	NA	NA
10	ESCC	69,4 (23,9-94,3)	50,98 (37,12-65,65)	NA	NA	40,56 (31,01-50,64)	57,13 (47,08-68,74)

PC – ET: presente contribución - Evidencia Total, **Hea (2020) – ET:** Holley *et al.* (2020) - Evidencia Total, **Dea (2011):** Dornburg *et al.* (2011), **Jea (2013):** Joyce *et al.* (2013), **R&DF (2016):** Rodrigues & Diniz-Filho (2016) y **Pea (2017):** Pereira *et al.* (2017). **PI:** Pleurodira, **Che+ESECC:** Chelidae + especies sudamericanas extintas de cuello corto, **Caus:** clado australasiático, **Chel:** *Chelodina*, **EACC:** especies australasiáticas de cuello corto, **Csud:** clado sudamericano, **Hyd:** *Hydromedusa*, **ESCC:** especies sudamericanas de cuello corto.

**Nodo 1:** Este nodo representa el origen del sub orden Pleurodira y su edad estimada es de 180,74 maap (95% HPD = 149,01—216,2 maap). Este nodo fue recuperado y datado en los siguientes estudios previos: Dornburg *et al.* (2011) (Media = 147,3 maap; 95% HPD = 133,5—162,8 maap), Joyce *et al.* (2013) (Media = 164,09 maap; 95% HPD = 155,6—171,35 maap), Rodrigues & Diniz-Filho (2016) (Media = 129,06 maap; 95% HPD = 112,38—149,23 maap), Pereira *et al.* (2017) (Media = 161,7 maap; 95% HPD = 149,25—168,9 maap) y Holley *et al.* TE-TD (2020) (Mediana = 193,7 maap; 95% HPD = 165,62—217,21 maap) (Tabla 2.3.1, Fig. 2.3.4).

**Nodo 2:** Este nodo incluye a las especies sudamericanas de cuello corto extintas más el clado Chelidae completo y su edad estimada es de 155,07 maap (95% HPD = 116,92—193,38 maap). Este nodo fue recuperado y datado previamente sólo en el estudio de Holley *et al.*, tanto en su análisis *tip dating* sobre la matriz Morfológica como sobre la matriz de Evidencia Total, este último produjo las siguiente estimación: Mediana = 146,8 maap (95% HPD = 121,67—177,12 maap) (Tabla 2.3.1, Fig. 2.3.4).

**Nodo 3:** Este nodo representa el clado Chelidae, cuyo origen fue datado en 123,18 maap (95% HPD = 93,68—160,02 maap). Este nodo fue recuperado y datado en los siguientes estudios previos: Dornburg *et al.* (2011) (Media = 80,4 maap; 95% HPD = 73,2—90,2 maap), Joyce *et al.* (2013) (Media = 116,01 maap; 95% HPD = 99,35—133,19 maap), Rodrigues & Diniz-Filho (2016) (Media = 77,22 maap; 95% HPD = 66,46—92 maap), Pereira *et al.* (2017) (Media =

117,46 maap; 95% HPD = 99,45—135,3 maap) y Holley *et al.* TE-TD (2020) (Mediana = 112,08 maap; 95% HPD = 92,03—134,04 maap) (Tabla 2.3.1, Fig. 2.3.4).

**Nodo 4:** Este nodo representa el clado australasiático, cuya edad de origen fue estimada en 101,75 maap (95% HPD = 70,57—135,06 maap). Este nodo fue recuperado y datado en los siguientes estudios previos: Dornburg *et al.* (2011) (Media = 61,5 maap; 95% HPD = 38,1—79,7 maap), Joyce *et al.* (2013) (Media = 94,62 maap; 95% HPD = 76,31—113,52 maap), Rodrigues & Diniz-Filho (2016) (Media = 60,04 maap; 95% HPD = 46,01—75,8 maap), Pereira *et al.* (2017) (Media = 104,41 maap; 95% HPD = 85,86—122,5 maap) y Holley *et al.* TE-TD (2020) (Mediana = 85,26 maap; 95% HPD = 65,43—108 maap) (Tabla 2.3.1, Fig. 2.3.4).

**Nodo 5:** Este nodo representa el clado correspondiente al género *Chelodina* y su edad estimada es 65,26 maap (95% HPD = 45—80,42 maap). Este nodo fue recuperado y datado en los siguientes estudios previos: Rodrigues & Diniz-Filho (2016) (Media = 21,46 maap; 95% HPD = 12,58—32,07 maap), Pereira *et al.* (2017) (Media = 40,12 maap; 95% HPD = 27,23—57,14 maap) y Holley *et al.* TE-TD (2020) (Mediana = 53,61 maap; 95% HPD = 45—74,09 maap) (Tabla 2.3.1, Fig. 2.3.4).

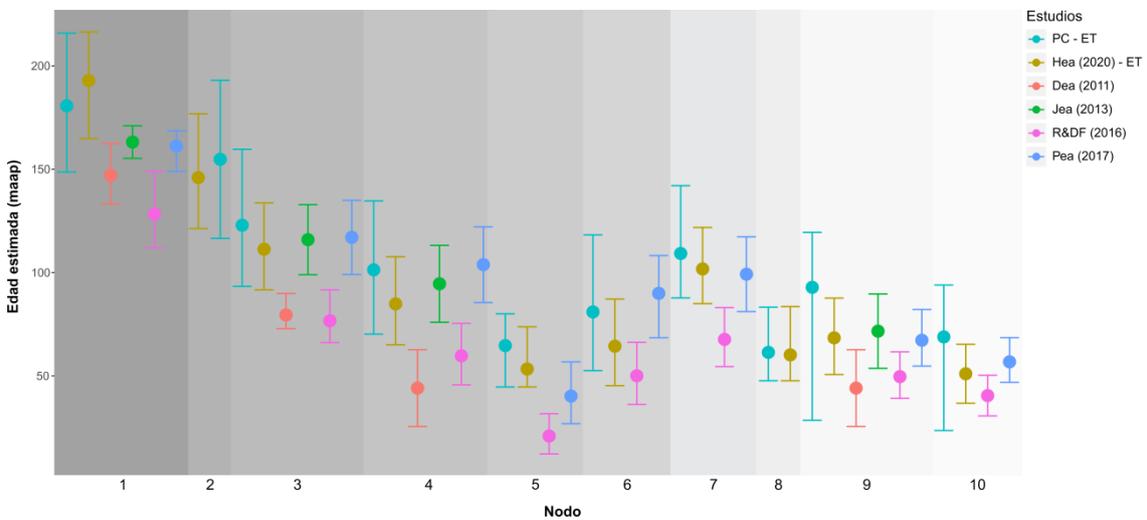
**Nodo 6:** Este nodo representa el clado de especies australasiáticas de cuello corto, cuya edad de origen fue estimada en 81,08 maap (95% HPD = 52,9—118,6 maap). Este nodo fue recuperado y datado en los siguientes estudios previos: Rodrigues & Diniz-Filho (2016) (Media = 50,58 maap; 95% HPD = 36,53—66,6 maap), Pereira *et al.* (2017) (Media = 90,08 maap; 95% HPD = 68,86—108,61 maap) y Holley *et al.* TE-TD (2020) (Mediana = 65,16 maap; 95% HPD = 45,66—87,52 maap) (Tabla 2.3.1, Fig. 2.3.4).

**Nodo 7:** Este nodo representa el clado sudamericano, cuya edad de origen fue estimada en 109,77 maap (95% HPD = 88,07—142,4 maap). Este nodo fue recuperado y datado en los siguientes estudios previos: Rodrigues & Diniz-Filho (2016) (Media = 67,87 maap; 95% HPD = 54,88—83,38 maap), Pereira *et al.* (2017) (Media = 99,3 maap; 95% HPD = 81,51—117,62 maap) y Holley *et al.* TE-TD (2020) (Mediana = 101,86 maap; 95% HPD = 85,36—122,18 maap) (Tabla 2.3.1, Fig. 2.3.4).

**Nodo 8:** Este nodo incluye a las especies pertenecientes al género *Hydromedusa* y su edad de origen fue estimada en 61,6 maap (95% HPD = 48—83,6 maap). Este nodo fue previamente recuperado y datado previamente sólo en el estudio de Holley *et al.* (2020), en sus tres análisis. La estimación de la edad de este nodo en su análisis TE-TD fue: Mediana = 35,56 maap; 95% HPD = 11,53—72,7 maap) (Tabla 2.3.1, Fig. 2.3.4).

**Nodo 9:** Este nodo incluye a *Chelus fimbriata*, más las especies sudamericanas de cuello corto y su edad de origen fue estimada en 93,22 maap (95% HPD = 28,9—119,86 maap). Este nodo fue recuperado y datado en los siguientes estudios previos: Dornburg *et al.* (2011) (Media = 44,4 maap; 95% HPD = 25,9—63 maap), Joyce *et al.* (2013) (Media = 71,98 maap; 95% HPD = 54,32—90,92 maap), Rodrigues & Diniz-Filho (2016) (Media = 50,01 maap; 95% HPD = 39,46—61,94 maap), Pereira *et al.* (2017) (Media = 67,62 maap; 95% HPD = 55,13—82,5 maap) y Holley *et al.* TE-TD (2020) (Mediana = 68,74 maap; 95% HPD = 51,01—88,08 maap) (Tabla 2.3.1, Fig. 2.3.4).

**Nodo 10:** Este nodo representa el clado de especies sudamericanas de cuello corto y su edad de origen fue estimada en 69,38 maap (95% HPD = 23,91–94,3 maap). Este nodo fue recuperado y datado en los siguientes estudios previos: Rodrigues & Diniz-Filho (2016) (Media = 40,56 maap; 95% HPD = 31,01–50,64 maap), Pereira *et al.* (2017) (Media = 57,13 maap; 95% HPD = 47,08–68,74 maap) y Holley *et al.* TE-TD (2020) (Mediana = 50,98 maap; 95% HPD = 37,12–65,65 maap) (Tabla 2.3.1, Fig. 2.3.4).



**Figura 2.3.4.** Comparación de las edades estimadas de diez nodos (ver Tabla 2.3.1), entre los resultados aquí obtenidos y cinco estudios previos de reloj molecular. **Dea (2011):** Dornburg *et al.* (2011), **Jea (2013):** Joyce *et al.* (2013), **R&DF (2016):** Rodrigues & Diniz-Filho (2016), **Pea (2017):** Pereira *et al.* (2017), **Hea (2020) – ET:** Holley *et al.* (2020) - Evidencia Total y **PC – ET:** presente contribución - Evidencia Total. Números de nodos en referencia a tabla 2.3.1.

### 2.3.2. Comparaciones estadísticas

En esta sección se llevaron a cabo dos tipos de comparaciones estadísticas. La primera, representa una continuidad de las comparaciones con estudios previos, antes nombradas, donde se buscó, mediante un test ANOVA no paramétrico (Kruskal & Wallis, 1952) o una prueba de suma de rangos con signo (Wilcoxon, 1992), según se trate de una comparación múltiple o pareada respectivamente, la detección de diferencias estadísticamente detectables, nodo a nodo, entre los estudios en cuestión (Tabla 2.3.2, Fig. 2.3.4).

En el segundo tipo de comparación, sólo se contrastaron los resultados obtenidos en este estudio al estimar los tiempos de divergencia a partir de las diferentes matrices de datos y relacionarlos mediante regresiones lineales simples con los resultados obtenidos a partir de la matriz de Evidencia Total. La salida de este análisis muestra diagramas de dispersión con sus respectivos valores p, respecto de la prueba de hipótesis sobre la pendiente, y el valor del coeficiente de determinación de cada regresión (Fig. 2.3.2).

#### **Comparaciones con estudios previos**

La tabla 2.3.2 muestra los resultados de los test estadísticos aplicados a las estimaciones de todos los análisis comparados nodo por nodo. Estos resultados sugieren lo siguiente: **i)** en el caso de los nodos que fueron datados por todos los análisis (nodos 1, 3, 4 y 9), dos de ellos (1 y 9) no presentaron diferencias significativas detectables por el test Kruskal-

Wallis entre las estimaciones (valor  $p > 0,05$ ), en tanto que en los otros dos nodos (3 y 4) se detectaron diferencias significativas en las estimaciones, y el test *post hoc* arrojó una estructura de grupos donde Dornburg *et al.* (2011) y Rodrigues & Diniz-Filho (2016) forman un grupo y los demás análisis forman el otro grupo (Tabla 2.3.2); **ii**) en el caso de los nodos que fueron datados por cuatro de los análisis (nodos 5, 6, 7 y 10), dos de ellos (6 y 10) no presentaron diferencias significativas entre las estimaciones (valor  $p > 0,05$ ), en tanto que en los otros dos nodos (5 y 7) se detectaron diferencias significativas, y el test *post hoc* arrojó una estructura de grupos donde el estudio de Rodrigues & Diniz-Filho (2016) produjo estimaciones estadísticamente diferentes a las de Pereira *et al.* (2017), Holley *et al.* (2020) y las obtenidas en la presente contribución, considerando en los dos últimos casos las estimaciones del árbol de Evidencia Total; **iii**) en el caso en que los nodos fueron datados sólo por dos análisis (nodos 2 y 8), se verificó mediante el test Wilcoxon que ambos análisis (Holley *et al.* [2020] ET y PC - ET) no presentaron diferencias significativas en las estimaciones, es decir son estimaciones estadísticamente homogéneas (Tabla 2.3.2).

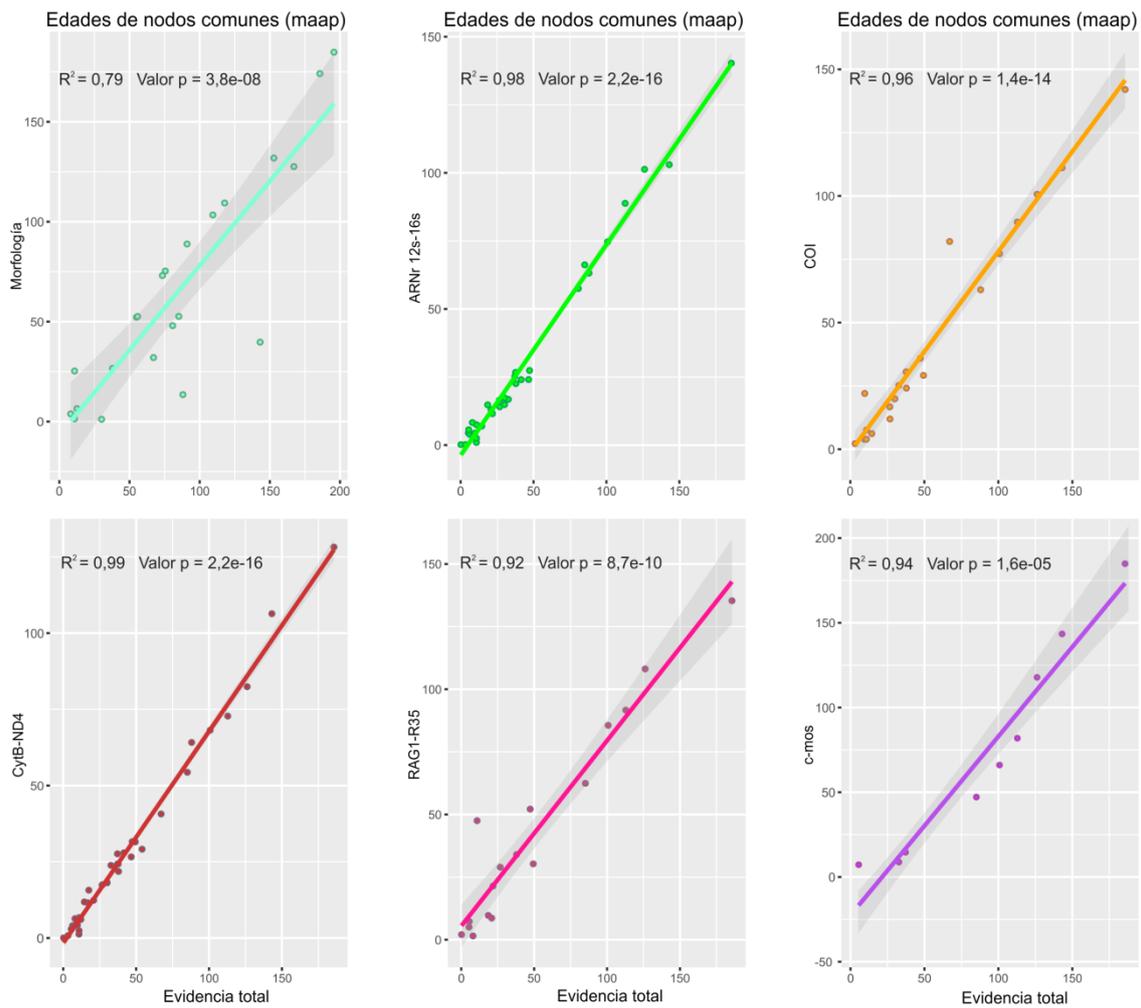
**Tabla 2.3.2.** Pruebas estadísticas para comparaciones múltiples y pareadas.

	Test	Valor p	Grupos
<b>Nodo 1</b>	KW	> 0,05	1
<b>Nodo 2</b>	Wil	> 0,05	NA
<b>Nodo 3</b>	KW + D	< 0,05*	2: [Dea (2011), R&DF (2016)] y [PC – ET, Hea (2020) – ET, Jea (2013), Pea (2017)]
<b>Nodo 4</b>	KW + D	< 0,05*	2: [Dea (2011), R&DF (2016)] y [PC – ET, Hea (2020) – ET, Jea (2013), Pea (2017)]
<b>Nodo 5</b>	KW + D	< 0,05*	2: [R&DF (2016)] y [PC – ET, Hea (2020) – ET, Pea (2017)]
<b>Nodo 6</b>	KW	> 0,05	1
<b>Nodo 7</b>	KW + D	< 0,05*	2: [R&DF (2016)] y [PC – ET, Hea (2020) – ET, Pea (2017)]
<b>Nodo 8</b>	Wil	> 0,05	NA
<b>Nodo 9</b>	KW	> 0,05	1
<b>Nodo 10</b>	KW	> 0,05	1

**KW:** Kruskal-Wallis, **Wil:** Wilcoxon, **D:** Dunn. \* diferencias significativas entre los análisis. Abreviaturas de los estudios previos como en la tabla 2.3.1 y la figura 2.3.4.

### **Comparaciones entre análisis propios**

Los resultados obtenidos a partir del set de regresiones lineales simples realizadas sobre las estimaciones obtenidas desde cada matriz de datos *versus* las estimaciones obtenidas a partir de la matriz de Evidencia Total, muestran que existe una fuerte relación entre ambas variables en todas las comparaciones, ya que en todos los casos se rechazó la hipótesis nula de pendiente igual a 0 ( $\beta_1 = 0$ ) y el valor mínimo observado para el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) fue 0,79, para las estimaciones producidas a partir de la matriz Morfológica. Es decir que el 79% de las estimaciones obtenidas en el árbol de Evidencia Total pueden ser explicadas por estimaciones del árbol morfológico. El poder de predicción de las estimaciones del árbol de Evidencia Total, a partir de las demás particiones presenta el siguiente orden creciente: RAG1-R35 ( $R^2 = 0,92$ ), c-mos ( $R^2 = 0,94$ ), COI ( $R^2 = 0,96$ ), ARNr 12s-16s ( $R^2 = 0,98$ ), CytB-ND4 ( $R^2 = 0,99$ ) (Fig. 2.3.5).



**Figura 2.3.5.** Regresiones lineales simples entre las estimaciones de las edades obtenidas de los análisis de cada partición *versus* las estimaciones obtenidas a partir del análisis de la matriz de Evidencia Total. **maap**: millones de años antes del presente.

## 2.4. Discusión y conclusiones

El objetivo principal de este capítulo se centra en proporcionar un marco temporal a las hipótesis evolutivas sustentadas por el amplio repertorio de datos que fueron analizados en el capítulo anterior. Este objetivo se abordó mediante la estimación de los tiempos de divergencia de los nodos internos de los árboles filogenéticos resultantes, a partir de la utilización de una serie de herramientas analíticas y metodológicas, cuyos resultados fueron estadísticamente evaluados. Además, este procedimiento fue complementado mediante la comparación cuantitativa con resultados obtenidos en estudios previos. De esta manera, se cubrió un amplio espectro de los aspectos que deben ser tenidos en cuenta a la hora extraer conclusiones sobre la historia evolutiva de un grupo.

### 2.4.1 Origen y diversificación del clado Chelidae y nodos basales

No obstante la búsqueda central de proporcionar estimaciones “confiables” de las edades de los nodos basales e internos del clado Chelidae, que permitan dilucidar los tiempos en que

ocurrieron los principales eventos de diversificación y extinción en este grupo, dada la naturaleza de los datos y el muestreo taxonómico para el árbol de Evidencia Total, los análisis realizados aquí, para esta matriz de datos, proporcionan inferencias también sobre nodos más basales e igualmente importantes, como el nodo que representa al suborden Pleurodira (nodo 1) y el nodo que representa al clado Chelidae + las especies sudamericanas extintas de cuello corto (nodo 2) (Figs. 2.3.3 y 2.3.4.).

***Pleurodira.*** La edad aquí estimada para este nodo (180,74 maap), sugiere que el *crown group* Pleurodira habría tenido su origen durante el periodo Toarciano (182,7—174,2 maap), al final del Jurásico Temprano. Este periodo estuvo marcado principalmente por dos eventos globales, que modificaron en gran medida las condiciones ambientales reinantes hasta ese momento: **i)** el evento anóxico oceánico del Toarciano (*Toarcian Oceanic Anoxic Event* [T-OAE]), que produjo un fuerte cambio en los ciclos del Carbono a nivel global; y **ii)** el comienzo de la actividad volcánica por parte de la gran provincia ígnea de Karoo-Ferrar (*large igneous province* [LIP]), que inyectó grandes cantidades de Carbono liviano en la atmósfera (Fantasia *et al.*, 2018 y papers allí citados). Ambos sucesos presumiblemente generaron un efecto invernadero global, que culminó con una extinción masiva al final de este periodo, principalmente de organismos marinos, a causa de una fuerte crisis en la biocalcificación, sin embargo efectos adyacentes como la deposición de materia orgánica y el aumento de la temperatura global, pudieron haber propiciado las condiciones que favorecieran la diversificación de tetrápodos marinos y terrestres, y en particular reptiles (Stumpf, 2017). En este contexto, y dada la edad aquí estimada para el origen de este clado, los linajes basales de los dos clados que forman parte de Pleurodira (Chelidae y Pelomedusoides) sobrevivieron a dicha extinción masiva, al tiempo que representantes de otros linajes de tortugas, tanto gondwánicos como laurásicos se extinguieron (*e.g.*, *Condorchelys antiqua*, *Kayentachelys aprix*, *Indochelys spatulata*, *Eileanchelys waldmani*, *Heckerochelys romani*, *Sichuanchelys palatodentata* [Sterli *et al.*, 2018 y papers allí citados]).

***Chelidae + especies sudamericanas extintas de cuello corto.*** La edad aquí estimada para este nodo (155,07 maap), sugiere que el *stem group* Chelidae, con un clado basal integrado por especies de cuello corto que posteriormente se extinguieron y un linaje que dio lugar al *crown group* Chelidae, habría tenido su origen durante el periodo Kimmeridgiano (157,3—152,1 maap), mediando el Jurásico Tardío. Este, fue un periodo donde hubo grandes cambios en la biodiversidad global, con muchos grupos animales volviéndose más diversos, ganando nuevos nichos ecológicos y distribuyéndose ampliamente por el planeta, un proceso que se mantuvo a lo largo de la parte final del Jurásico. En este tiempo algunos dinosaurios como los saurópodos, los plesiosaurios e ictiosaurios crecieron en tamaño, y muchos otros grupos de reptiles marinos y terrestres se diversificaron, entre ellos los linajes basales del *crown group* Testudines (Bardet *et al.*, 2014; Madzia *et al.*, 2021), cuya edad de origen ha sido estimada en múltiples estudios, con resultados que van del Triásico Medio (242 maap [Dornburg *et al.*, 2011]) al Jurásico Tardío (151,7 maap [Pereira *et al.*, 2017]).

***Chelidae.*** El origen del clado Chelidae y la consecuente diversificación en los clados australasiático y sudamericano, fue datado aquí en 123,18 maap. Este resultado sugiere que el grupo habría comenzado a diversificarse en el Aptiano (126,3—113 maap).

El Cretácico Temprano, fue un periodo caracterizado por eventos que modificaron la fisonomía de Gondwana, como la separación de India respecto del resto del supercontinente, alrededor de los 130 maap (Powell *et al.*, 1988; Brown *et al.*, 2006), y el comienzo de la separación entre África y Sudamérica, cuya conexión se pierde por completo alrededor de los 100 maap (Nürnberg & Müller, 1991; Granot & Dymont, 2015). Estas reestructuraciones continentales, fueron acompañadas por la aparición de las plantas con flores (Dilcher, 2000), un suceso revolucionario que propició un contexto ambiental en el que todos los grandes grupos de animales radiaron y se diversificaron rápidamente, en lo que se conoció como la revolución terrestre del Cretácico (Lloyd *et al.*, 2008).

Dado que el tiempo estimado aquí (y en estudios previos) para la divergencia del linaje basal del clado Chelidae, que dio lugar a ambos grupos geográficos, es ampliamente anterior a la ruptura final de Gondwana (50—35 maap [Woodburne & Case, 1996; Lawver *et al.*, 2011]) y dado que la distribución original del grupo se restringía al sur de este supercontinente (Sudamérica, Antártida y Australia), es esperable que ambos clados se separaran a causa de diversos sucesos vicariantes, como barreras intracontinentales, probablemente emergidos sobre la masa de tierra que hoy ocupa la Antártida (Joyce *et al.*, 2016).

Por otro lado, de acuerdo con el estudio de Vlachos *et al.* (2018), para este tiempo (Aptiano), las especies sudamericanas del clado Chelidae ya habrían atravesado su primer pico de diversidad y entraban en un periodo en el que comenzaba a declinar su tasa de diversificación, conduciendo a los primeros eventos de extinción del grupo en Sudamérica hacia fines del Cretácico Temprano.

**Clado australasiático.** El origen de este clado y la diversificación del mismo en un linaje de especies de cuello largo (género *Chelodina*) y un linaje de especies de cuello corto (“grupo *Emydura*” *sensu lato*), fue datado en 101,75 maap. Es decir que esta divergencia se habría producido apenas comenzado el Cretácico Tardío, aunque más probablemente la misma ocurrió durante la transición entre el Cretácico Temprano y el Tardío (Albiano—Cenomaniano). El posterior desarrollo natural de los linajes surgidos a partir de la bifurcación del clado australasiático, estuvo acompañado por el comienzo de la ruptura del sur de Gondwana, debido a un evento tectónico que modificó la configuración de las placas en torno a Australia hace aproximadamente 95 maap (Müller *et al.*, 1997), y que posteriormente (en torno a los 90 maap) dio lugar al surgimiento del Mar de Tasmania, separando Sudamérica—Antártida y Australia—Nueva Guinea (Gaina *et al.*, 1998).

Si bien la curva de diversidad presentada por Vlachos *et al.* (2018) se basa en el análisis de los fósiles sudamericanos parece interesante destacar que existe una correlación temporal entre el comienzo de la diversificación del clado australasiático y el primer evento de extinción registrado para una de las especies del *stem group* Chelidae (*Prochelidella cerrobarcinae*), ya que este proceso continuó en el Cretácico Tardío con la extinción de las demás especies de este clado basal (a excepción de *Phrynops paranaensis*).

**Chelodina.** La edad de origen de este clado de quelidos australasiáticos de cuello largo fue estimada en 65,26 maap, apenas comenzado el Paleógeno. Es decir que tanto estas tortugas como las que integran el resto del clado australasiático, más las del clado sudamericano, superaron con éxito la extinción masiva del límite K—Pg. En este momento clave, se acentúa la

dinámica por la cual las especies del *stem group* (aquí representadas por el clado de especies sudamericanas de cuello corto extintas) siguen extinguiéndose, en tanto que los taxones basales de los grupos geográficos ya establecidos, siguen diversificándose. Esto se evidencia en la curva de diversidad de Vlachos *et al.* (2018), donde luego de dos picos de diversidad acompañados de algunos eventos de extinción y una posterior caída de la curva, a lo largo del Cretácico Tardío, la diversidad en Sudamérica comienza a reponerse en el Paleógeno.

**Clado sudamericano.** La edad de origen estimada para el clado sudamericano (109,77) es algo más antigua que la estimada para el clado australasiático, la misma data del Cretácico Tardío, más precisamente en el Albiano (113–100,5). Como se mencionó antes, previo a este periodo, a principios del Cretácico, se había producido una revolución a partir de la cual, las condiciones ambientales posibilitaron rápidas radiaciones en muchos grupos animales, incluyendo las tortugas. Sin embargo, para el momento en que se estima que surge el clado sudamericano, la diversidad de los quélidos sudamericanos estaba en franco descenso, luego de un primer pico inicial a mediados del Cretácico Temprano (Vlachos *et al.*, 2018).

La divergencia basal de este clado dio origen a sus representantes de cuello largo a partir del Cretácico Tardío. El género *Chelus*, aunque posicionado en una ubicación derivada respecto del clado (*Hydromedusa*, *Yaminuechelys*), fue datado como más antiguo (93,22 maap) que este último (82,63 maap). El rango de tiempo que cubre el surgimiento de estos géneros de cuello largo, coincide plenamente con los dos picos de diversidad y los eventos de extinción del Cretácico Tardío, documentados por Vlachos *et al.* (2018). Nuevamente parece existir una clara correlación entre los eventos tectónicos que fueron aislando paulatinamente a ambos grupos geográficos, la evolución de cada uno de estos y la extinción de taxones más basales, probablemente como consecuencia de una baja capacidad adaptativa respecto de los cambios estructurales de Gondwana.

**Surgimiento de géneros actuales.** Los géneros actuales del clado Chelidae, han ido surgiendo a lo largo de su historia evolutiva con una tasa de aparición que fue incrementándose a medida que ambos grupos geográficos se desarrollaban a partir de su aislamiento continental definitivo (Eoceno) y su dispersión hacia diferentes latitudes, tanto por el movimiento de masas de continentales, como por migraciones producidas en respuesta a cambios climáticos ocurridos a partir de eventos tectónicos que modificaron principalmente la temperatura y la humedad en cada continente (McGowran, 1991). En este sentido, los géneros actuales más antiguos de ambos grupos geográficos son *Pseudemydura* y *Chelus*, ambos surgidos durante el Cretácico Tardío, sin embargo casi todos los demás géneros surgieron durante el Eoceno y el Oligoceno, en particular se observa un notorio aumento en la tasa de diversificación a partir del óptimo climático del Eoceno temprano (Vlachos *et al.*, 2018).

El último tramo del proceso evolutivo del clado Chelidae, que comienza a delinear la estructura taxonómica y geográfica actual, está determinado por un gradual enfriamiento y un descenso global de las precipitaciones, a partir de la apertura del pasaje de Drake en el límite Eoceno—Oligoceno (33,9 maap) y el establecimiento de la corriente circumpolar antártica. Estos cambios impactarían la flora y la fauna en el sur de Sudamérica, que, al igual que la región central de Australia, comenzaría a aridizarse, aunque el impacto en este último sería atenuado por el desplazamiento hacia latitudes menores (Zachos *et al.*, 2001; McGowran *et*

*al.*, 2004; Livermore *et al.*, 2005; Merico *et al.*, 2008). Consecuentemente, el patrón de distribución que presentan las especies actuales del clado Chelidae, es el resultado de procesos migratorios de Sur a Norte, en Sudamérica y de Oeste a Este/Noreste en Australia, lo cual se evidencia en el registro fósil más reciente de ambos continentes (Iverson, 1992; Broin & de la Fuente, 1993; Kennett *et al.*, 2009; de la Fuente *et al.*, 2013; Vlachos *et al.*, 2018).

#### 2.4.2 Comparaciones estadísticas

En este capítulo se abordaron dos tipos de comparaciones estadísticas, haciendo uso de los resultados obtenidos aquí y resultados compilados a partir de estudios previos.

En la primera de estas comparaciones se contrastaron las estimaciones obtenidas en el análisis de Evidencia Total con las estimaciones obtenidas en cinco estudios previos (Dornburg *et al.*, 2011; Joyce *et al.*, 2013; Rodrigues & Diniz-Filho, 2016; Pereira *et al.*, 2017 y Holley *et al.*, 2020 [análisis de Evidencia Total]), mediante el uso de pruebas estadísticas como el ANOVA no paramétrico Kruskal-Wallis, con su comparación múltiple *a posteriori* (el test de Dunn), o la prueba de suma de rangos signados de Wilcoxon, en caso de comparaciones pareadas. A partir de estas pruebas pudo obtenerse una estructura en los resultados, que indica cuáles análisis son estadísticamente homogéneos. En este sentido, no es sorprendente que en ninguno de los nodos analizados se hayan encontrado diferencias significativas en las estimaciones entre el presente análisis de Evidencia Total y el presentado por Holley *et al.* (2020), ya que son análisis muy similares realizados sobre set de datos comparables. Sin embargo, parece interesante destacar que en los resultados aquí obtenidos, casi siempre se obtuvieron estimaciones cuyos rangos de 95%HPDs fueron más amplios que los obtenidos por Holley *et al.* (2020), lo que sugiere que el incremento en la cantidad de caracteres (incremento total del 32,4 % respecto de la matriz inicial), en este caso en lugar de aportar precisión genera un efecto contrario, aunque el mismo debería ser perfectamente corregible si se incrementa el tiempo de análisis con BEAST, de manera que se afinen las estimaciones de los parámetros. Asimismo, para todos los nodos comparados existe homogeneidad de los resultados aquí obtenidos, respecto de las estimaciones realizadas por Joyce *et al.* (2013) y Pereira *et al.* (2017), donde las medidas centrales (medias o medianas) son perfectamente comparables, no así los rangos de sus 95% HPDs. Esta similitud estadística es llamativa, ya que el presente análisis es de tipo *tip-dating*, fue diseñado específicamente para datar el clado Chelidae y se usó el software BEAST 2, con el modelo de árbol FBD; en tanto que los otros dos análisis son de tipo *node-dating*, y ambos dataron nodos para Testudines, usando el software MCMC tree (Yang, 2007), el cual no incorpora modelo de árbol.

Es decir que, las estimaciones aquí obtenidas mediante el análisis de Evidencia Total, fueron validadas por estudios completamente independientes, desde los set de datos a los tipos de análisis, programas empleados y estrategias de calibración aplicadas.

En el segundo tipo de comparación, se utilizaron regresiones lineales simples para evaluar la incidencia que cada partición de datos tuvo sobre las estimaciones globales de los tiempos de divergencia en el análisis de Evidencia Total. En este sentido, el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), calculado a partir de la suma de cuadrados de la regresión *versus* la suma de cuadrados totales en la recta de mejor ajuste, representa (por su poder predictivo) una medida adecuada para alcanzar el objetivo buscado en estos análisis.

Los resultados obtenidos en estas comparaciones muestran que las estimaciones de las edades obtenidas en cada una de las particiones de datos, explican un gran porcentaje de las edades estimadas en el análisis de Evidencia Total. Sin embargo, haciendo un examen fino, puede observarse que el análisis sobre la matriz Morfológica entregó el menor  $R^2$  (0,79), es decir que sus estimaciones explican en menor medida, en comparación con las demás particiones, los resultados globales. Este resultado es esperable debido a varios factores que pueden afectar la congruencia entre la información contenida en datos morfológicos y la información contenida en datos moleculares (*e.g.*, diferencias en las estructuras filogenéticas, ajuste de modelos de sustitución a datos moleculares *versus* ajuste del modelo MKv a los datos morfológicos, desbalance entre la cantidad de caracteres morfológicos y moleculares).

La partición que obtuvo el coeficiente de determinación más alto, y por tanto se asume como la que más incide en los tiempos de divergencia finalmente obtenidos en el árbol de Evidencia Total, fue CytB-ND4 ( $R^2 = 0,99$ ). No obstante, a pesar de diferencias en el muestreo taxonómico y de caracteres entre las particiones moleculares, todas son excelentes predictores, ya que la que condujo al  $R^2$  mínimo (RAG1-R35), aun así explica el 92% de las estimaciones finales.

---

## ***Capítulo III***

---

### **Descripción anatómica del cráneo y la lengua de quélidos actuales con distribución en Argentina**

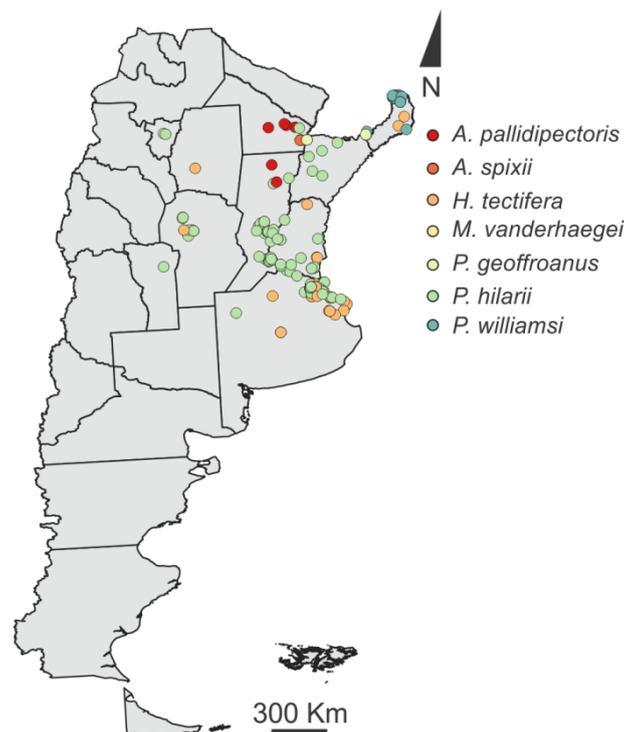
## Resumen

Las descripciones anatómicas han sido utilizadas históricamente a la hora de introducirse en el estudio de un grupo animal. En este sentido, Las tortugas no son la excepción y la bibliografía muestra múltiples estudios que se han enfocado en diversos aspectos de la morfología de diferentes grupos de tortugas e inclusive algunos abordan un amplio muestreo taxonómico a nivel del Orden Testudines.

En este capítulo del presente trabajo de tesis, dos aspectos de la morfología de las especies actuales pertenecientes al clado Chelidae, con distribución en Argentina, son abordados a través de diferentes descripciones: la osteología craneana y la histología y microanatomía de la lengua. El primero de estos aspectos incluye una descripción general del cráneo y un detalle comparativo de cada hueso, en tanto que el segundo surge como resultado de la aplicación de tecnología de microscopía electrónica y óptica, y la aplicación de técnicas histológicas. Los resultados son discutidos en un contexto de evidencias previas y posibles aportes de información cladística, proveniente de fuentes de variación interespecíficas detectadas en cada tipo de descripción.

### 3.1. Introducción

Históricamente las especies actuales, pertenecientes al clado Chelidae, con distribución en Argentina son siete (Fig. 3.1.1): dos de ellas pertenecientes al género *Acanthochelys* (*A. pallidipectoris* y *A. spixii*), tres pertenecientes al género *Phrynops* (*P. geoffroanus*, *P. hilarii* y *P. williamsi*), una perteneciente al género *Hydromedusa* (*H. tectifera*) y una perteneciente al género *Mesoclemmys* (*M. vanderhaegei*). Sin embargo en la octava edición del Turtle of The World Check List (TTWG, 2017), se restringe la distribución de *A. spixii* a Brasil y Uruguay, aunque en este trabajo no se brindan detalles de la exclusión de esta especie de su distribución en Argentina. No obstante, en esta tesis se sigue considerando a *A. spixii* como una especie con distribución en Argentina, ya que se han conocido por parte de diferentes grupos de trabajo en herpetología (*e.g.*, comunicación personal con el Dr. Rodrigo Cajade [Univ. Nac. del Nordeste/Fac. de Cs. Exactas Naturales y Agrimensura]; año 2015), nuevos registros en la provincia de Corrientes, aunque los mismos no han sido oficializados mediante publicaciones o registros en colecciones científicas.



**Figura 3.1.1.** Mapa de Argentina con detalle de los registros de las especies de quelidos actuales. Fuente: GBIF.org data base, Baldo *et al.* (2007), Prado *et al.* (2012), Cajade *et al.* (2014). Datos de ocurrencias y mapa procesados con el software QGIS v 3.14.

#### 3.1.1. Osteología craneana

Desde los primeros estudios taxonómicos en tortugas hasta la actualidad, las descripciones detalladas de la osteología craneana son escasas. En general, por ejemplo, cuando se describe una especie nueva, suelen darse detalles de su morfología externa, medidas morfométricas que puedan utilizarse para discernir la existencia de dimorfismo sexual y estadios de desarrollo, patrones de coloración, rango de distribución, hábitat y otros aspectos (en general referidos a la ecología) que caracterizan a la nueva especie (*e.g.*, Bour & Zaher, 2005). Así, en el caso de las siete especies que ocupan esta sección de la tesis, se verá que en sus descripciones

originales (Tabla 3.1.1) sólo *P. williamsi* fue presentada incluyendo una descripción de su osteología craneana (Rhodin & Mittermeier, 1983).

**Tabla 3.1.1.** Descripciones originales de las siete especies actuales con distribución en Argentina.

<b>Especie</b>	<b>Descripción original</b>	<b>Osteología craneana</b>
<i>A. pallidipectoris</i>	Freiberg (1945)	No
<i>A. spixii</i>	Duméril & Bibron (1835)	No
<i>H. tectifera</i>	Cope (1869)	No
<i>M. vanderhaegei</i>	Bour (1973)	No
<i>P. geoffroanus</i>	Schweigger (1812)	No
<i>P. hilarii</i>	Duméril & Bibron (1835)	No
<i>P. williamsi</i>	Rhodin & Mittermeier (1983)	Sí

No obstante, existen varias contribuciones que presentan descripciones anatómicas detalladas de los cráneos de quelidos actuales, algunas de ellas son: Boulenger (1889) [*Chelus fimbriata*, *Mesoclemmys nasuta*, *P. geoffroanus*, *Elseya dentata*], Burbidge *et al.* (1974) [*Pseudemydura umbrina*, *Myuchelys latisternum*, *Emydura macquarii*, *Chelodina oblonga*], Gaffney (1977) [*Emydura macquarii*, *Pseudemydura umbrina*, *Platemys platycephala*, *P. geoffroanus*, *H. tectifera*, *Mesoclemmys gibba*, *Chelodina expansa*, *Chelus fimbriata*], Rhodin *et al.* (1984) [*Acanthochelys macrocephala*], Cann & Legler (1994) [*Elusur macrurus*], McCord & Thomson (2002) [*Chelodina canni*]. Seguramente el más importante de estos trabajos es el de Gaffney (1977) ya que además de proporcionar descripciones craneanas de los quelidos de casi todos los géneros reconocidos en ese momento, su estudio derivó en la primera matriz morfológica y la primera filogenia construida a partir del método cladista desarrollado por Hennig (1966). Además, Gaffney (1979) redescrive algunas especies de quelidos en un trabajo más amplio, donde aborda especies pertenecientes a varias familias de tortugas actuales y extintas. Dicho trabajo presenta las descripciones con énfasis en la comparación entre huesos, estructuras y forámenes entre los grandes grupos de tortugas.

### 3.1.2. Histología y microanatomía lingual

La lengua de los reptiles es un órgano con inmensa capacidad de adaptación en función de las condiciones ambientales y del acceso a diferentes tipos de alimento (Halpern, 1980). Esto se ve reflejado en un amplio espectro de variaciones morfológicas e histológicas, que van desde órganos con enorme capacidad de elongación y superficie adherente, como lo es la lengua del camaleón, a órganos muy ágiles y con funciones de orientación y caza como la lengua de lagartos y serpientes (*e.g.*, Gillingham & Clark, 1981; Iwasaki & Miyata, 1985; Iwasaki, 1990; Delheusy *et al.*, 1994; Iwasaki *et al.*, 1996; Beisser *et al.*, 1998; Alibardi, 1999; Filoramo & Schwenk, 2000; Iwasaki, 2002; Abbate *et al.*, 2008). En el caso de las tortugas, así como en cocodrilos, la lengua se convierte en un órgano con poca movilidad, que presenta una notable reducción de su musculatura (Ferguson, 1981).

Los estudios enfocados en la histología y microanatomía lingual de tortugas han demostrado que, en general, las especies que habitan ambientes dulceacuícolas presentan un epitelio no queratinizado, con células llenas de gránulos de secreción, en tanto que las especies que habitan ambientes terrestres o marinos presentan lenguas con epitelios

queratinizados y ausencia de dichas células secretoras; éstas características se han relacionado con el grado de participación de este órgano en el proceso de alimentación (Iwasaki, 2002). Sin embargo, se ha visto que si se analizan en detalle sólo especies dulceacuícolas, existen evidentes diferencias de la cavidad bucofaríngea entre representantes de los dos subórdenes de tortugas actuales. Las tortugas criptodiras dulceacuícolas (*e.g.*, familia Emydidae) retienen una estructura bucal y lingual similar a la de sus clados terrestres relacionados (*e.g.*, familias Geoemydidae+Testudinidae [Lourenço *et al.*, 2012]), a pesar de poseer una dieta con un considerable grado de coincidencia con respecto a las especies de tortugas pleurodiras (*e.g.*, familia Chelidae) con las que, en muchos casos, comparten el mismo hábitat (Alcalde *et al.*, 2010; Hahn *et al.*, 2014; Silveira *et al.*, 2019). Estas diferencias que se centran principalmente en el grado de desarrollo epitelial, presencia/ausencia de papilas apicales y desarrollo de musculatura intrínseca de la lengua (Winokur, 1988; Beisser *et al.*, 1998), probablemente da cuenta de importantes diferencias en el proceso de ingestión, con movimiento del alimento dentro de la boca y transporte hasta la faringe en criptodiras (Bels *et al.*, 1997) y alimentación principalmente por succión en pleurodiras (Lemell *et al.*, 2000; Gumpenberger *et al.*, 2010). A su vez, dentro de Pleurodira, las especies pertenecientes al clado Chelidae presentan el menor grado de desarrollo lingual, donde esta estructura es pequeña, plana y generalmente con presencia de algunos pliegues apicales (Fig. 3.2.1), comparable a simple vista con la elevación de la mucosa del piso de la boca observada en peces (Winokur, 1988; Beisser *et al.*, 1995; Beisser *et al.*, 2001; Iwasaki, 2002).

A fin de explorar las estructuras morfológicas mencionadas y producir nueva información acerca de las especies actuales de tortugas pertenecientes al clado Chelidae que se distribuyen en Argentina, en este capítulo, se presentan por primera vez descripciones detalladas de la osteología craneana y la histología y microanatomía lingual de las mismas en su conjunto.

## 3.2. Materiales y métodos

### 3.2.1. Abreviaturas

Las abreviaturas de la osteología craneana, así como los términos empleados para describir estructuras y forámenes fueron tomados principalmente del glosario ilustrado para la nomenclatura de cráneos de tortugas establecido por Gaffney (1972), en conjunto con las contribuciones de Albrecht (1967 y 1976), Gaffney (1977 y 1979) y Bour & Pauler (1987), que incluyen comentarios sobre especies pertenecientes al clado Chelidae.

***Abreviaturas anatómicas***

<b>acst:</b> aditus canalis stapedio-temporalis	<b>ica:</b> incisura columella auris
<b>ane:</b> apertura narium externa	<b>ju:</b> yugal
<b>ani:</b> apertura narium interna	<b>mx:</b> maxilar
<b>bo:</b> basioccipital	<b>na:</b> nasal
<b>bs:</b> basiesfenoides	<b>op:</b> opistótico
<b>cm:</b> condylus mandibularis	<b>orb:</b> órbita
<b>co:</b> condylus occipitalis	<b>pa:</b> parietal
<b>col:</b> columella auris	<b>pal:</b> palatino
<b>exo:</b> exoccipital	<b>pf:</b> prefrontal
<b>fm:</b> foramen magnum	<b>pm:</b> premaxilar
<b>fmt:</b> foramen nervi trigemini (nervio craneano V)	<b>po:</b> postorbital
<b>fo:</b> fenestra ovalis	<b>pr:</b> proótico
<b>fpcci:</b> foramen posterius canalis carotici interni	<b>pt:</b> pterigoides
<b>fpp:</b> foramen palatinum posterius	<b>ptp:</b> processus trochlearis pterygoidei
<b>fprp:</b> foramen praepalatinum	<b>qu:</b> cuadrado
<b>fr:</b> frontal	<b>so:</b> supraoccipital
<b>frp:</b> foramen retropterygoideum	<b>sq:</b> escamoso
<b>fst:</b> foramen stapedio-temporale	<b>vo:</b> vómer

***Abreviaturas institucionales***

**AMNH:** American Museum of Natural History, Nueva York, Estados Unidos de América.

**BMNH:** British Museum of Natural History, Londres, Inglaterra.

**CICyTTP:** Centro de Investigación Científica y de Transferencia de Tecnológica a la Producción - Laboratorio de Herpetología, Diamante, Entre Ríos, Argentina.

**FMNH:** Field Museum of Natural History, Chicago, Estados Unidos de América

**IBS-LGE:** Instituto de Biología Subtropical - Laboratorio de Genética Evolutiva, Posadas, Misiones, Argentina.

**MNHN:** Muséum National d'Histoire Naturelle, París, Francia.

**MTKD:** Museum für Tierkunde, Dresden, Alemania.

**MZ-UFV:** Museu de Zoologia - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, Brasil.

**NMBA:** Naturhistorisches Museum, Basilea, Suiza.

**NMW:** Naturhistorisches Museum Wien, Viena, Austria.

**SMF:** Forschungsinstitut und Naturmuseum Senckenberg, Frankfurt am Main, Alemania.

**UFRJ-MNRJ:** Museu Nacional do Rio de Janeiro - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

**USNM:** National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington DC, Estados Unidos de América.

**ZSM:** Zoologische Staatssammlung, Munich, Alemania.

### 3.2.2. Osteología craneana

A fin de reunir la información necesaria para realizar nuevas descripciones se analizaron especímenes previamente preparados, con la estructura ósea de sus cráneos expuesta, depositados en diferentes colecciones biológicas del mundo (Tabla 3.2.1), así como material preparado durante esta tesis, según el protocolo detallado más abajo. Dicho material corresponde a especímenes depositados en la colección del Laboratorio de Genética Evolutiva perteneciente al Instituto de Biología Subtropical (LGE-IBS-CONICET), que actualmente se encuentra en préstamo en la colección herpetológica del Instituto de Diversidad y Evolución Austral (IDEAus-CONICET).

**Tabla 3.2.1.** Especies incluidas en las descripciones de la osteología craneana, con los especímenes analizados y las instituciones donde los mismos se encuentran depositados.

ESPECIE	ESPECIMEN	INSTITUCIÓN	UBICACIÓN
<i>A. pallidipectoris</i>	MTKD D 42978	MTKD	Dresden, Alemania
	MTKD D 42979		
	MTKD D 42980		
	MTKD D 42981		
	IBS LGE 8468**	IBS-LGE	Posadas, Misiones, Argentina
<i>A. spixii</i>	NMW 1829	NMW	Viena, Austria
	IBS LGE 01344**	IBS-LGE	Posadas, Misiones, Argentina
<i>H. tectifera</i>	AMNH 133629	AMNH	New York, US
	MNHN AC 1870-9	MNHN	París, Francia
	NMBA C 2024	NMBA	Basilea, Suiza
	NMW 1826	NMW	Viena, Austria
	NMW 1827		
	SMF 7992	SMF	Frankfurt am Main, Alemania
	SMF 7996		
	SMF 50238		
	IBS LGE 15749**	IBS-LGE	Posadas, Misiones, Argentina
<i>M. vanderhaegei</i>	IBS LGE 00219**	IBS-LGE	Posadas, Misiones, Argentina
<i>P. geoffroanus</i>	IBS LGE 15739**	IBS-LGE	Posadas, Misiones, Argentina
	MZ-UFV 063 V C*	MZ-UFV	Viçosa - MG, Brasil
	SMF 45471	SMF	Frankfurt am Main, Alemania
	AMNH 79048	AMNH	New York, US
	NMW 1833	NMW	Viena, Austria
<i>P. hilarii</i>	FMNH 22481	FMNH	Chicago, US
	MTKD D 43345	MTKD	Dresden, Alemania
	SMF 33058	SMF	Frankfurt am Main, Alemania
	SMF 33670		
		CICyTTP_R-269*	CICyTTP
	CICyTTP_R-352*		
<i>P. williamsi</i>	IBS LGE 11730**	IBS-LGE	Posadas, Misiones, Argentina
	BMNH 1884.2.5.3	BMNH	Londres, Inglaterra

\*Material fotografiado por el autor de esta tesis en persona; \*\*Material preparado y fotografiado por el autor de esta tesis en persona. Especímenes denotados sin \* fueron preparados por las instituciones depositarias y el material fotográfico fue cedido con autorización por los siguientes investigadores: Dra. Juliana Sterli, Dra. María Encarnación Pérez, Dr. Ignacio Maniel y Dr. Marton Rabi. Nombres institucionales referidos según lista de abreviaturas antes presentada.

#### **Protocolo básico de preparación**

El siguiente protocolo representa un procedimiento estándar utilizado comúnmente por el personal técnico de la colección herpetológica del IDEAus-CONICET.

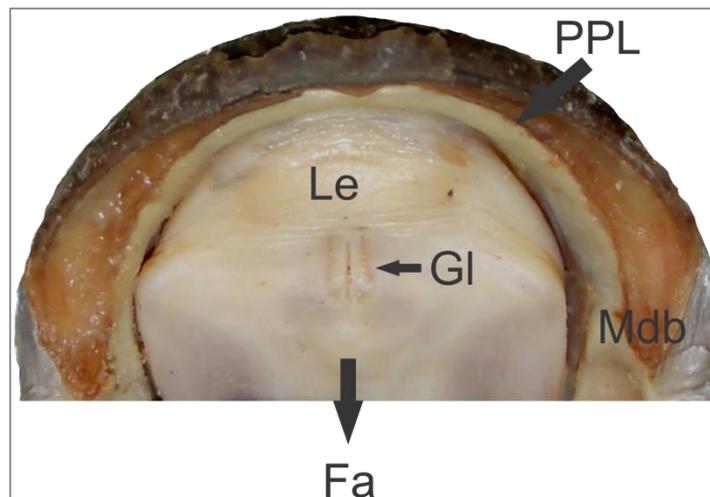
Una vez removidos los cráneos de los especímenes seleccionados para su estudio, los mismos fueron sometidos a un proceso de hidratación progresiva durante 2 días, ya que habían sido inicialmente fijados en formol al 10% y posteriormente conservados en Etanol al 70%. Pasados los dos días de hidratación, se constató que los tejidos blandos perdieron rigidez y los cráneos fueron sometidos a 4 inclusiones en agua hirviendo de una hora cada una y posteriormente a cada inclusión se verificó el grado de adhesión que los tejidos blandos tenían respecto del hueso. Una vez que los tejidos blandos mostraron baja adhesión a los huesos y los mismos se conservaban en buen estado (sin desarticulación ni pérdida de elementos óseos a causa de la temperatura), los tejidos blandos se retiraron haciendo uso de herramientas quirúrgicas (principalmente bisturí, pinzas y punzones).

### 3.2.3. Histología y microanatomía lingual

#### ***Obtención de los tejidos***

Dado que el procedimiento que se realiza para estudiar la histología y la microanatomía de cualquier órgano o estructura de un animal es altamente destructivo y por el hecho de ser éste un trabajo exploratorio, que busca aportar conocimiento y detectar posibles nuevas fuentes de variación en el grupo, se utilizó para estas descripciones un ejemplar por especie: *A. pallidipectoris* (IBS LGE 8468), *A. spixii* (IBS LGE 1344), *H. tectifera* (IBS LGE 15749), *M. vanderhaegei* (IBS LGE 219), *P. geoffroanus* (IBS LGE 15739), *P. hilarii* (IBS LGE 15743), *P. williamsi* (IBS LGE 11730).

A cada ejemplar utilizado se le diseccionó la región ventral completa de la cavidad bucal, llegando, posteriormente, hasta la glotis (Fig. 3.2.1). Luego, cada muestra se dividió en dos hemi-secciones, una de ellas se procesó para microscopía electrónica de barrido (MEB) y la otra se procesó para microscopía óptica (MO), según se detalla a continuación.



**Figura. 3.2.1:** Vista dorsal de la lengua de *H. tectifera* (especimen IBS LGE 15749). **Fa:** Faringe; **Gl:** Glotis; **Mdb:** Mandíbula; **Le:** Lengua; **PPL:** Pliegue pre lingual.

#### ***Microscopía Electrónica de Barrido***

Las secciones destinadas a Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) fueron procesadas por el personal técnico del centro de microscopía del Museo de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia (MACN-CONICET), donde fueron gradualmente deshidratadas mediante sucesivos pasajes por alcoholes de gradación creciente, y posteriormente se secaron bajo la técnica de

“punto crítico” en un equipo EMS 850 (Electron Microscopia Science, Montgomery, Pensilvania, US). Luego estas muestras fueron procesadas en el servicio de MEB a cargo de la empresa ALUAR, a fin de acondicionarlas previo a su inspección. En este proceso, las mismas se fijaron mediante exposición a un baño de oro en un metalizador Denton Vacuum Desk IV durante 5 minutos. Luego las muestras fueron inspeccionadas en un microscopio JEOL 6460 Low Vacuum a diferentes aumentos y las imágenes fueron procesadas en tiempo real mediante el software IR Camera.

### ***Microscopía óptica***

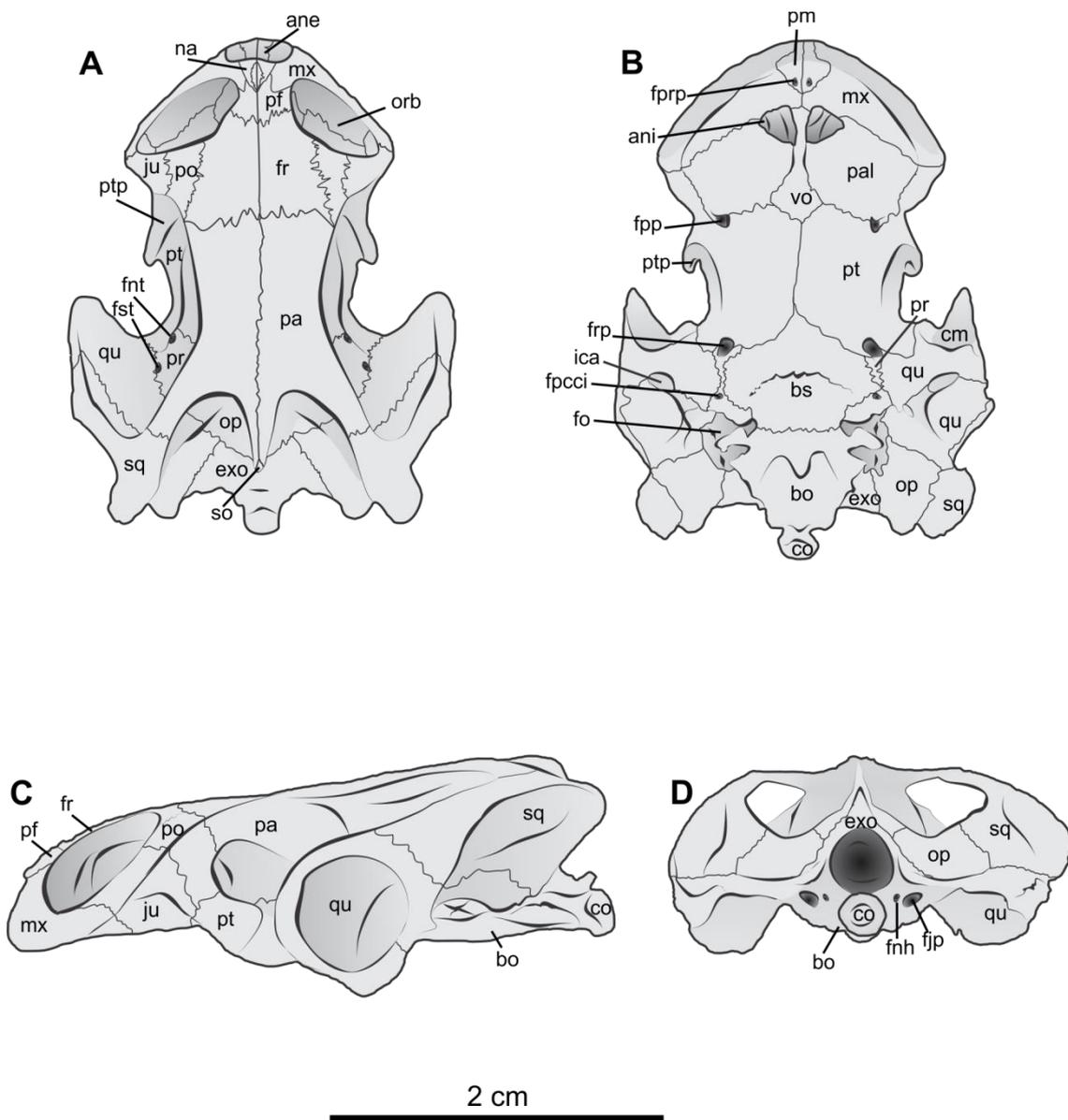
Las secciones destinadas a microscopía óptica se sometieron a un protocolo, en el que las mismas se deshidrataron gradualmente mediante sucesivos pasajes por alcoholes de gradación creciente, partiendo de agua destilada y pasando por etanol 15%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90% y 96% (2x45 minutos cada pasaje). Luego se las dejó el mismo tiempo en una mezcla 1:1 de alcohol al 96% y alcohol butílico, y por último se las dejó una noche en alcohol butílico. Posteriormente, los fragmentos se colocaron en estufa a 60°C, en una mezcla 1:1 de butilparafina durante 2 horas, donde se solidificaron luego de 2 cambios de parafina líquida de 2 horas cada uno. Una vez finalizado este proceso y obtenidos los tacos correspondientes a cada muestra, los mismos se cortaron longitudinalmente al eje del cuerpo, en secciones de 6 µm de espesor mediante el uso de un micrótopo de rotación Leica RM 2255, que se encuentra disponible en el servicio de Histología del CCT CENPAT-CONICET. Luego, estos cortes fueron teñidos mediante las siguientes técnicas de coloración: Tricrómico de Masson modificado (TMM), cuya diferencia fundamental con el tricrómico original es que la solución de fucsina ácida también contiene los colorantes Orange G y Ponceau de Xilidina, como coloración topográfica; técnica de Ácido Periódico-Reactivo de Schiff (PAS) para identificar glicoconjugados neutros; Alcian Blue (AB) para identificar glucosaminoglicanos ácidos y Coomassie Blue (Coom) para identificar proteínas (Kiernan, 1999). Las observaciones se realizaron en un microscopio Leica DM750 y las fotografías se tomaron con una cámara Leica IC50, incorporada al microscopio, utilizando el software Leica Application Suite (LAS EZ versión 3.4).

### 3.3. Resultados

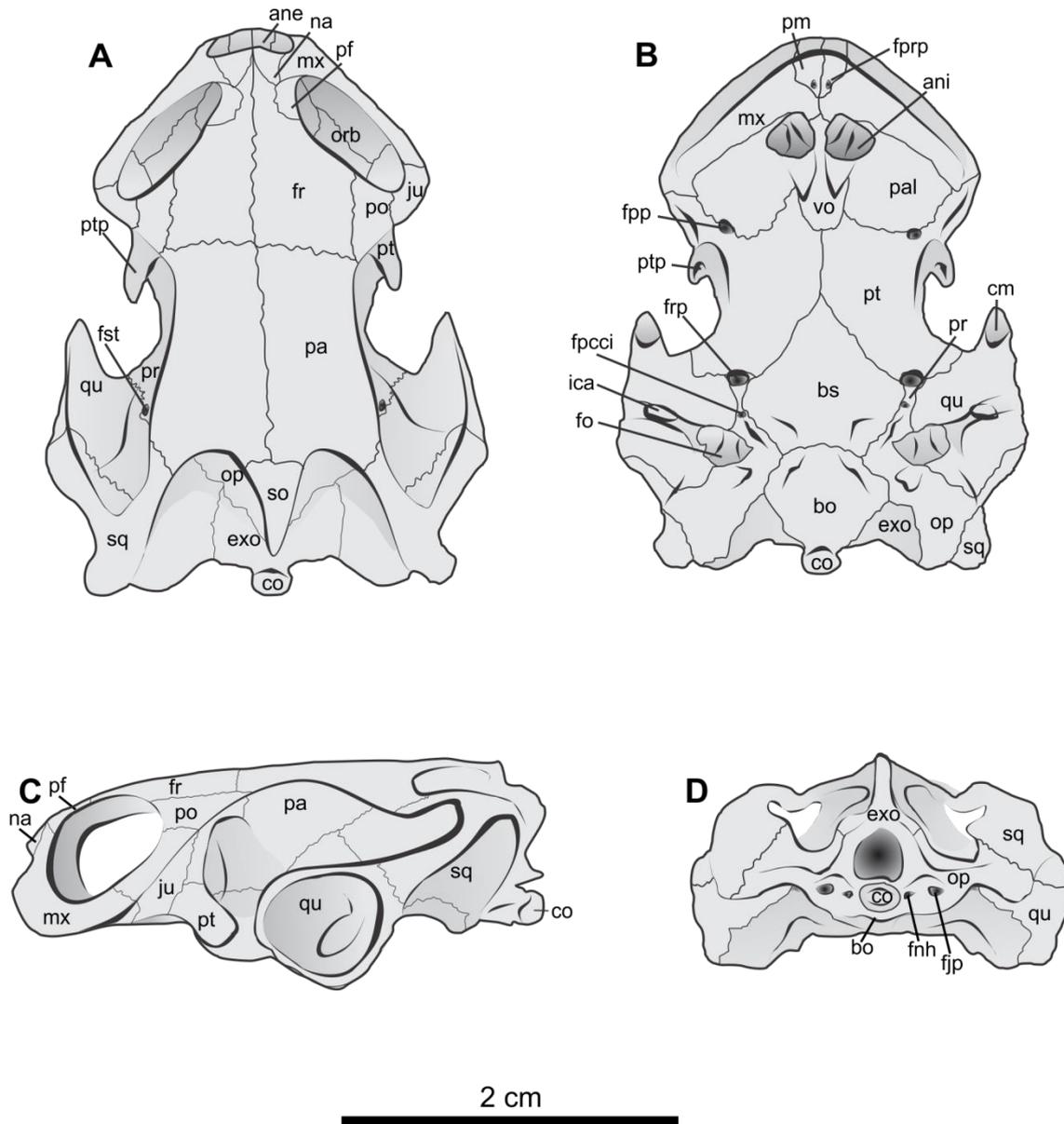
#### 3.3.1. Osteología craneana

##### 3.3.1.1. Láminas principales

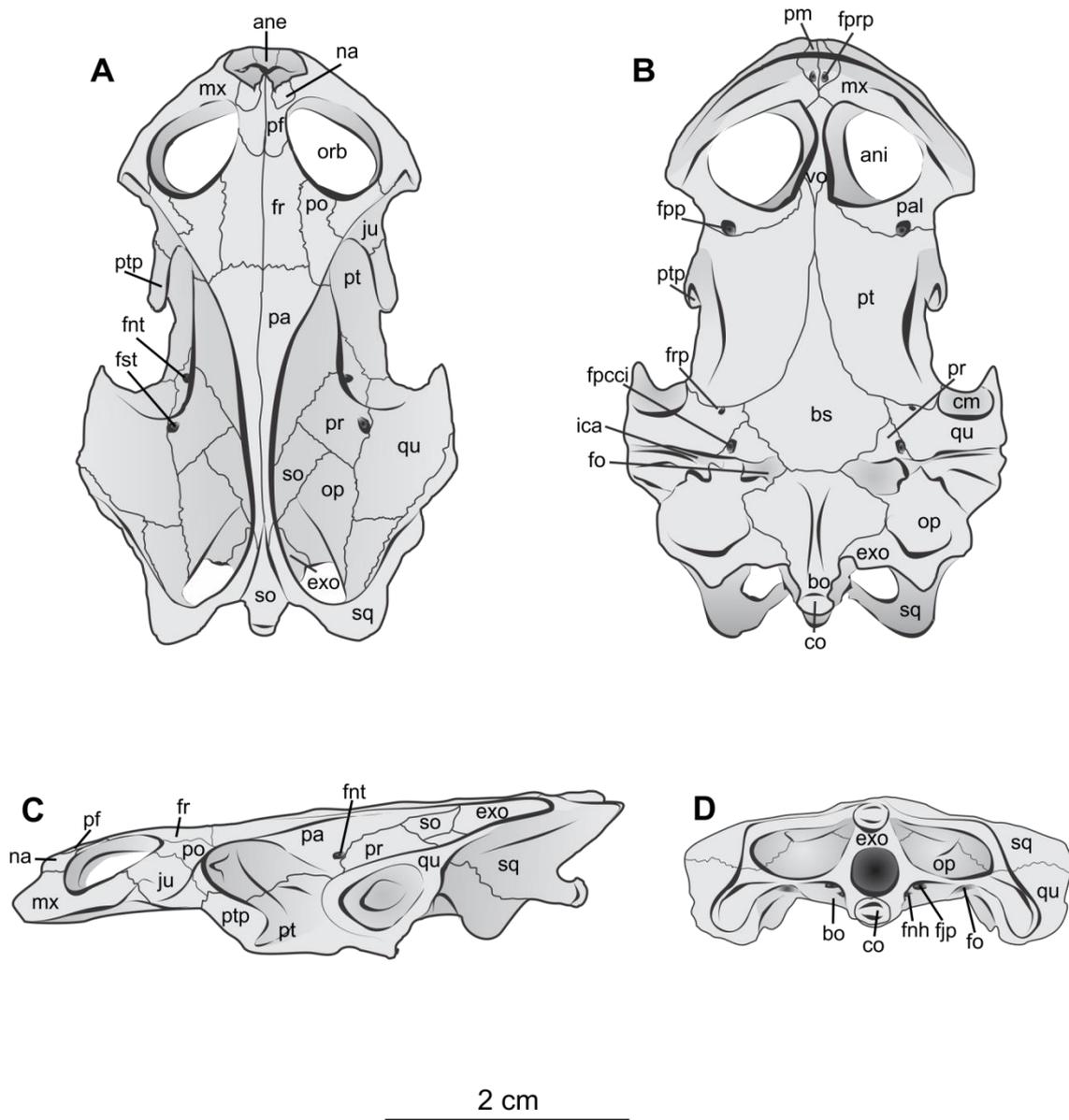
A fin de llevar adelante el objetivo de producir nuevas descripciones de la osteología craneana de las especies de quélidos con distribución en Argentina (Figs. 3.3.1-7), se realizaron, para cada especie, figuras detalladas de los cráneos en vista dorsal, ventral, lateral y posterior, siguiendo la estructura de las figuras presentadas por Gaffney (1979). A continuación se muestran dichas figuras.



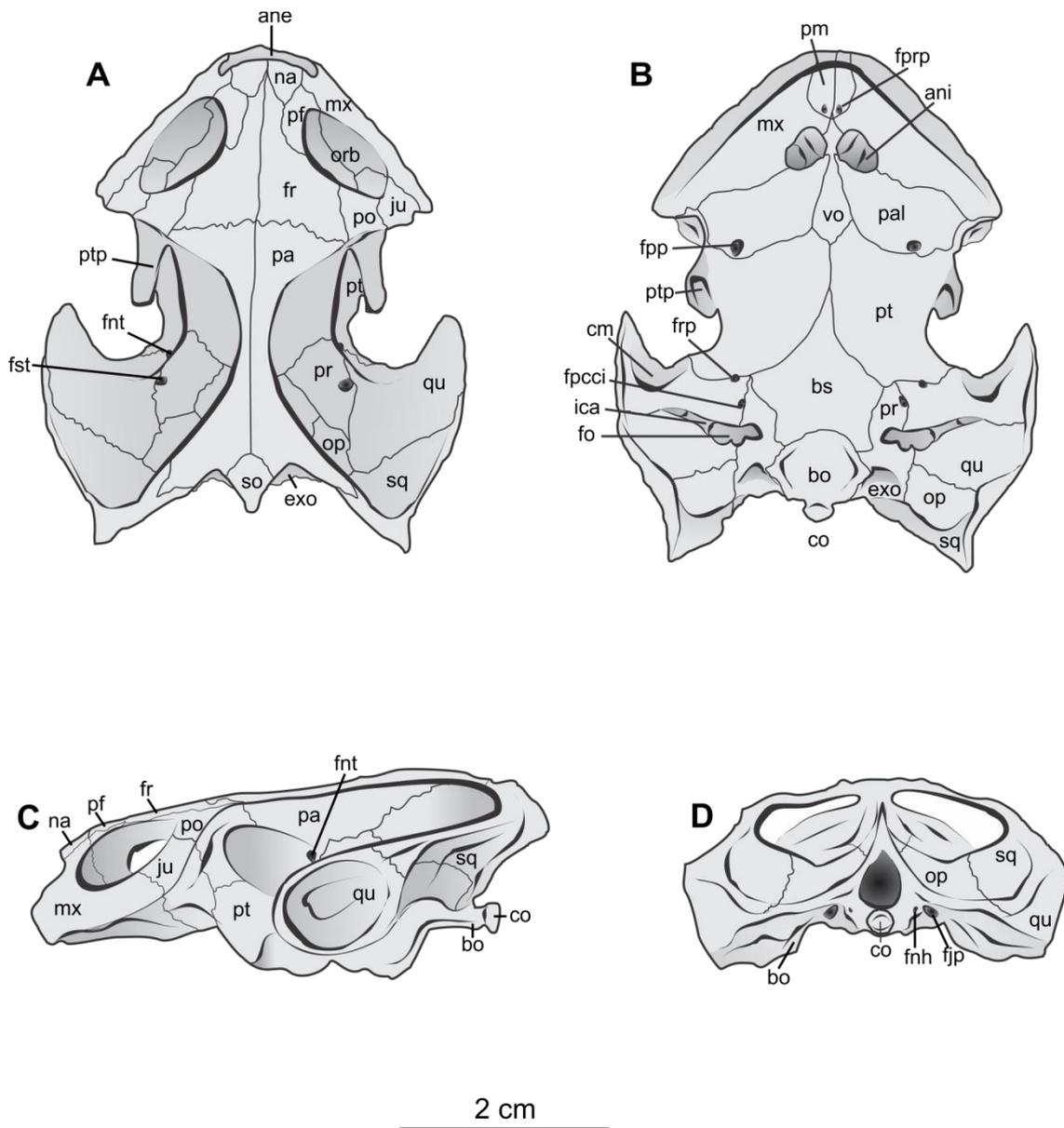
**Figura 3.3.1.** Cráneo de *Acanthochelys pallidipectoris* (especimen MTKD D 42979) en vista dorsal (A), ventral (B), lateral (C) y posterior (D).



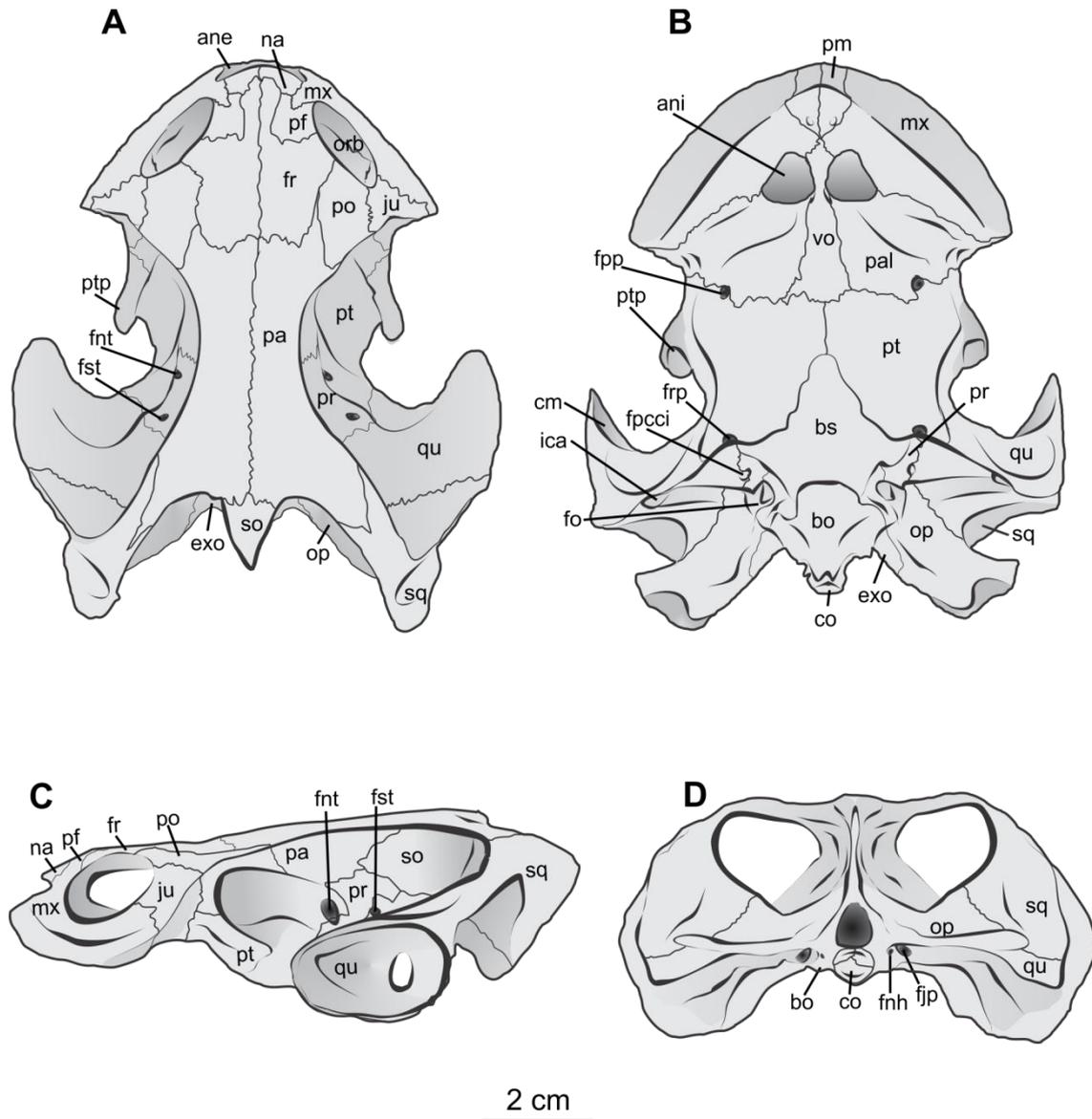
**Figura 3.3.2.** Cráneo de *Acanthochelys spixii* (especimen IBS LGE 01344) en vista dorsal (A), ventral (B), lateral (C) y posterior (D).



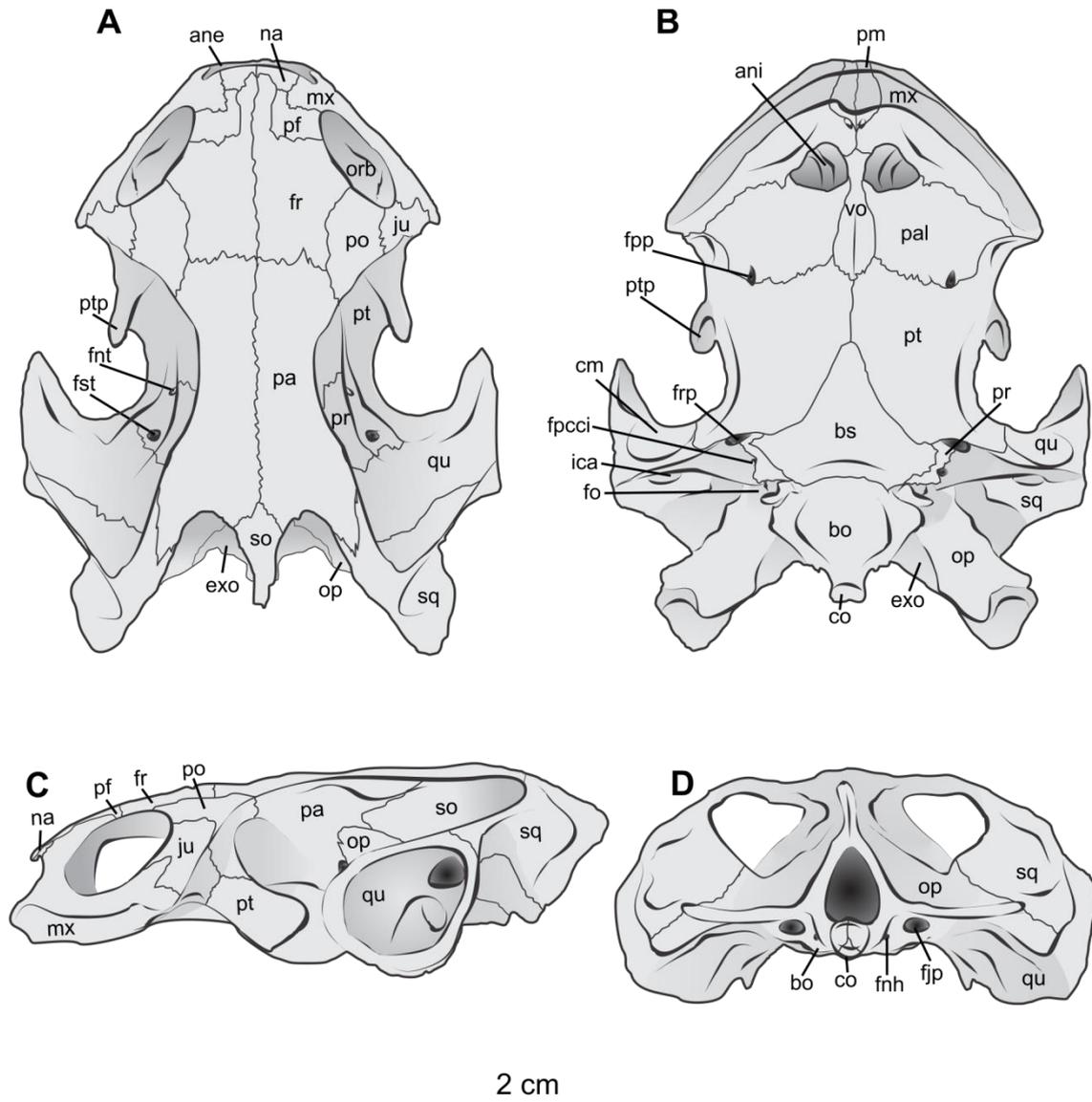
**Figura 3.3.3.** Cráneo de *Hydromedusa tectifera* (especimen IBS LGE 15749) en vista dorsal (A), ventral (B), lateral (C) y posterior (D).



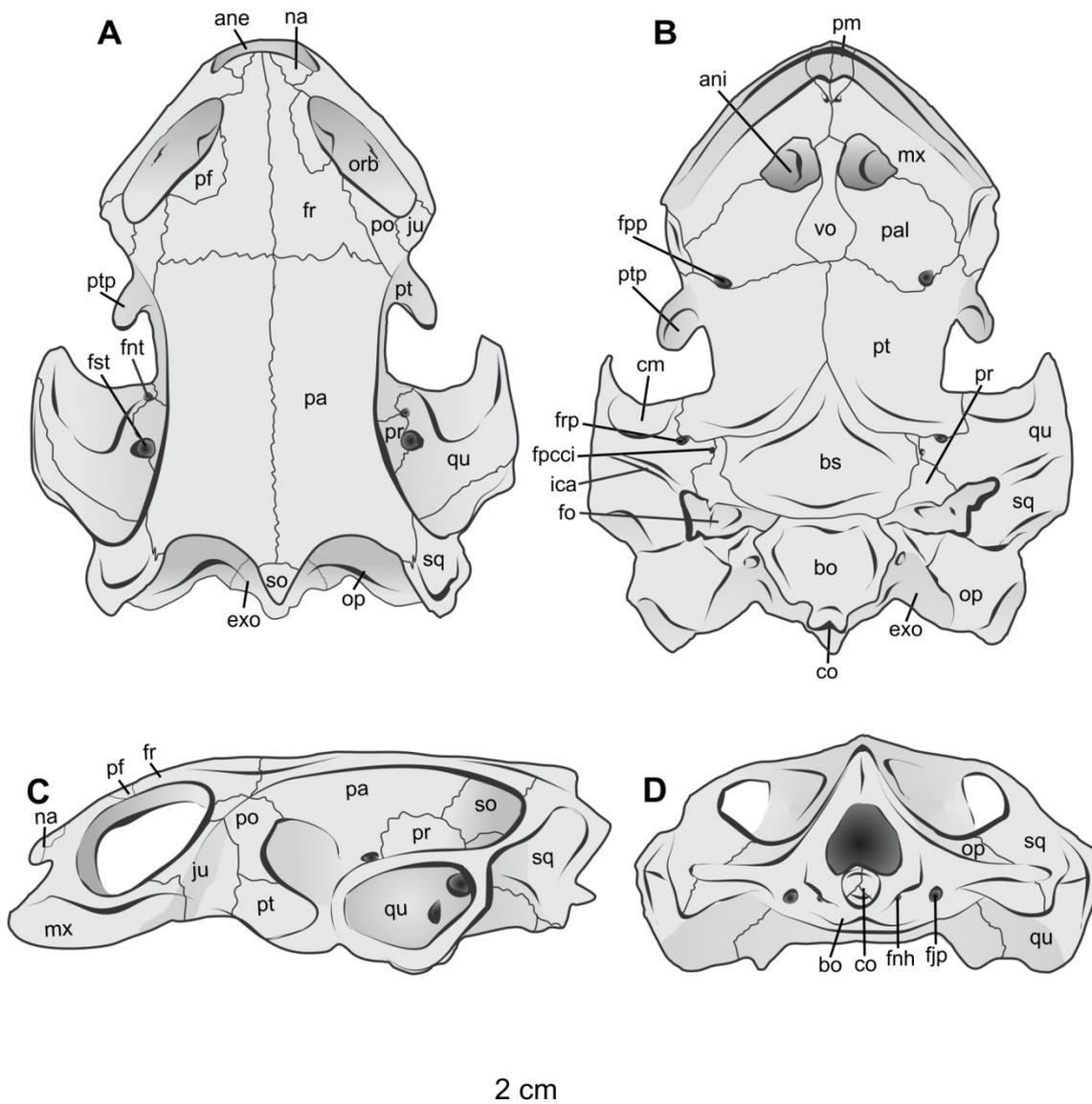
**Figura 3.3.4.** Cráneo de *Mesoclemmys vanderhaegei* (especimen IBS LGE 00219) en vista dorsal (A), ventral (B), lateral (C) y posterior (D).



**Figura 3.3.5.** Cráneo de *Phrynops geoffroanus* (especimen BMNH 91.3.16.1) en vista dorsal (A), ventral (B), lateral (C) y posterior (D).



**Figura 3.3.6.** Cráneo de *Phrynops hilarii* (especimen FMNH 22481) en vista dorsal (A), ventral (B), lateral (C) y posterior (D).



**Figura 3.3.7.** Cráneo de *Phrynops williamsi* (especimen IBS LGE 11730) en vista dorsal (A), ventral (B), lateral (C) y posterior (D).

### 3.3.1.2. Descripción comparativa

Además de las láminas principales, donde se muestra para cada especie el cráneo en cuatro vistas, se realizaron figuras adicionales para cada hueso de manera comparativa, a fin de poder observar y detectar en una misma figura posibles diferencias o similitudes interespecíficas. A continuación se presentan dichas figuras siguiendo un orden de organización, en cuanto a las regiones craneanas, basado en las descripciones de Gaffney (1979).

#### Elementos del techo craneano

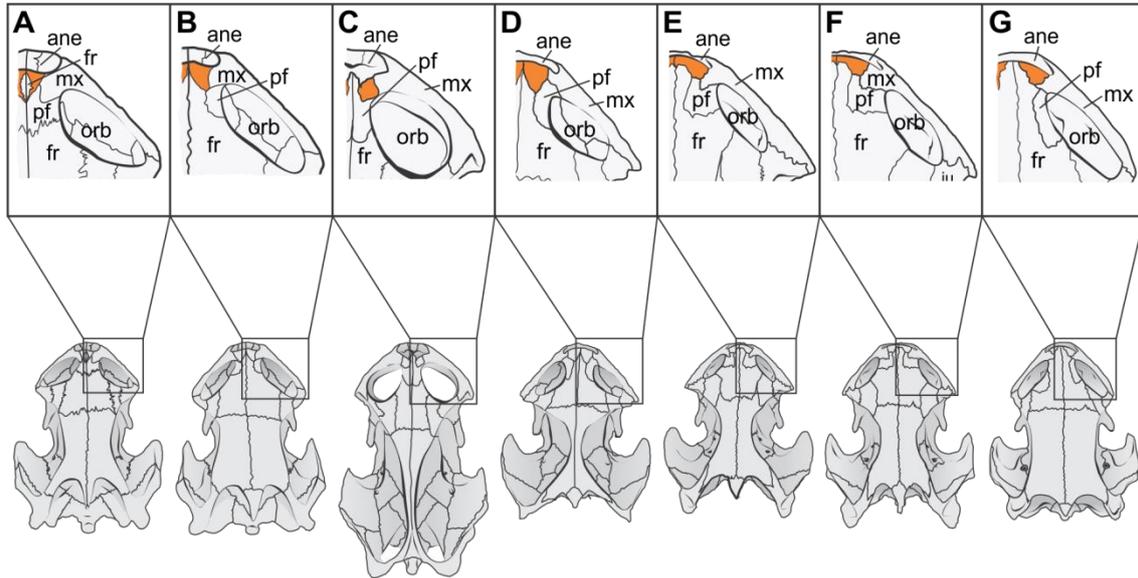
##### Nasal

El nasal es un hueso par ubicado en el borde anterior del techo craneano. En *A. pallidipectoris*, *A. spixii*, *M. vanderhaegei* y *P. williamsi* (Fig. 3.3.8 A, B, D y G) se observa como un elemento de forma más o menos triangular, con una base ancha sobre el borde dorsal de la apertura narium externa y un aguzamiento progresivo hacia posterior, mientras que en *H.*

*tectifera*, *P. geoffroanus* y *P. hilarii* (Fig. 3.3.8 C, E y F) su forma es un poco más irregular, variando entre rectangular y cuadrada.

**Contactos:** En general, contacta lateralmente al maxilar, posteriormente al prefrontal (excepto en *P. williamsi*) y medialmente a su contraparte. Sin embargo, un proceso anterior del hueso frontal separa parcialmente los nasales en *A. pallidipectoris* (Fig. 3.3.8 A) y totalmente en *P. williamsi* (Fig. 3.3.8 G); además se observa también una separación total de los nasales mediada por un proceso anterior de los prefrontales en *H. tectifera* (Fig. 3.3.8 C).

**Estructuras:** en todos los especímenes estudiados, este hueso forma parte de la porción dorsal de la apertura narium externa, aunque su contribución varía entre especies (Fig. 3.3.8).



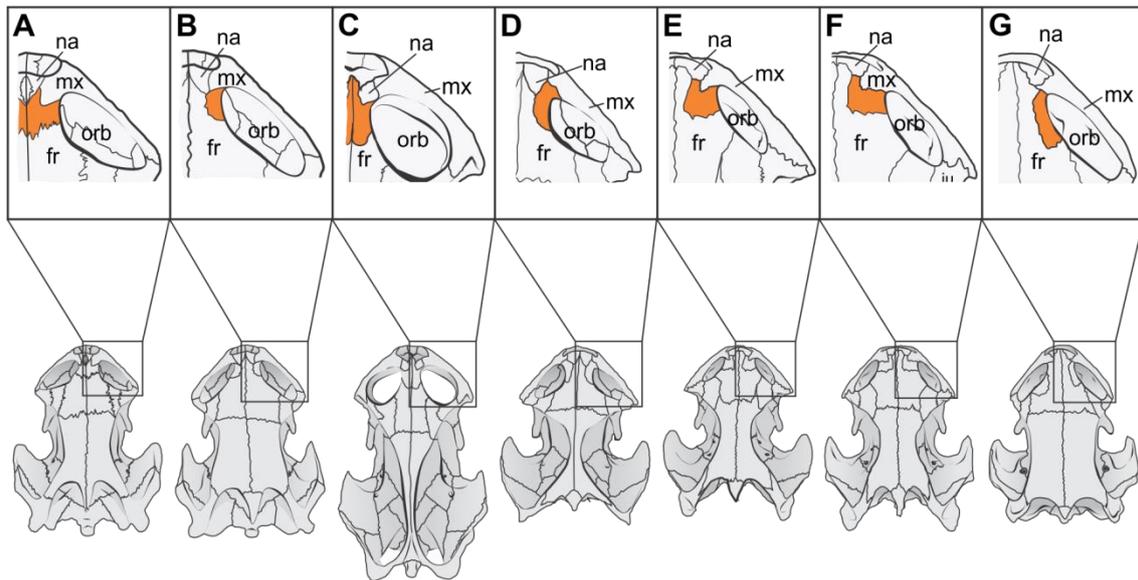
**Figura 3.3.8.** Vista dorsal del cráneo de todas las especies con distribución en Argentina, con detalle del hueso nasal. **A:** *Acanthochelys pallidipectoris*, **B:** *Acanthochelys spixii*, **C:** *Hydromedusa tectifera*, **D:** *Mesoclemmys vanderhaegei*, **E:** *Phrynops geoffroanus*, **F:** *Phrynops hilarii*, **G:** *Phrynops williamsi*.

### Prefrontal

El prefrontal es un hueso par ubicado en la parte anterior del techo craneano. Su forma y tamaño, en relación a huesos cercanos, varían entre las especies estudiadas. En *A. pallidipectoris*, *H. tectifera*, *P. geoffroanus* y *P. hilarii* (Fig. 3.3.9 A, C, E y F) este hueso tiene forma de "L", en tanto que en las demás especies (Fig. 3.3.9 B, D y G) presenta una forma más bien semicircular en torno a la órbita.

**Contactos:** Anteromedialmente el prefrontal contacta al nasal, anterolateralmente al maxilar, posteriormente al frontal y medialmente a su contraparte. Sin embargo, no se observa este contacto con el nasal en *P. williamsi* (Fig. 3.3.9 G) y se encuentra separado medialmente de su contraparte por un proceso anterior del hueso frontal en *A. spixii*, *M. vanderhaegei*, *P. geoffroanus*, *P. hilarii* y *P. williamsi* (Fig. 3.3.9 B, D, E, F y G).

**Estructuras:** En todas las especies estudiadas el prefrontal forma parte del borde anterodorsal de la órbita, además en *H. tectifera* parece contribuir muy levemente al borde anterodorsal de la apertura narium externa (Fig. 3.3.9).



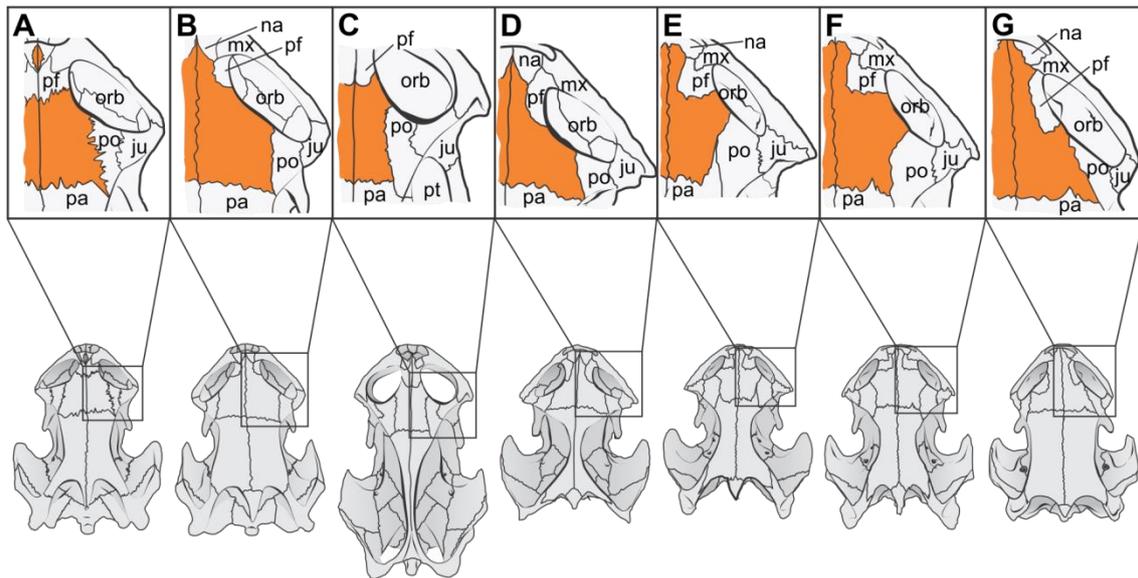
**Figura 3.3.9.** Vista dorsal del cráneo de todas las especies con distribución en Argentina, con detalle del hueso prefrontal. **A:** *Acanthochelys pallidipectoris*, **B:** *Acanthochelys spixii*, **C:** *Hydromedusa tectifera*, **D:** *Mesoclemmys vanderhaegei*, **E:** *Phrynops geoffroanus*, **F:** *Phrynops hilarii*, **G:** *Phrynops williamsi*.

### Frontal

El frontal es un hueso par con forma mayormente rectangular, con su lado más elongado en sentido parasagital, que contribuye a una gran parte del techo craneano en la región anterior. Este hueso presenta una leve proyección anterior en *A. spixii* y más marcada en *M. vanderhaegei*, *P. geoffroanus*, *P. hilarii* y *P. williamsi* (Fig. 3.3.10 B, E, F, y G), que separa los prefrontales en los cuatro primeros casos y los prefrontales y los nasales en el último. Además, en *A. pallidipectoris* este hueso emerge nuevamente de manera aislada, separando parcialmente los nasales (Fig. 3.3.10 A). Esta característica ya había sido mencionada para *H. tectifera* por Gaffney (1977), sin embargo no fue observada para dicha especie en el espécimen aquí esquematizado (Fig. 3.3.3), pero sí en otros de los especímenes analizados (e.g., espécimen AMNH 133629).

**Contactos:** Anteriormente el frontal contacta al prefrontal en *A. pallidipectoris* y *H. tectifera* (Fig. 3.3.10 A y C) o a los nasales en las demás especies, excepto *P. williamsi* (Fig. 3.3.10 B, D, E y F). En estos casos el contacto con el prefrontal se da anterolateralmente, en tanto que lateralmente contacta al postorbital y posteriormente contacta al parietal.

**Estructuras:** El frontal forma la parte posterodorsal de la órbita y del ductus olfactorius.

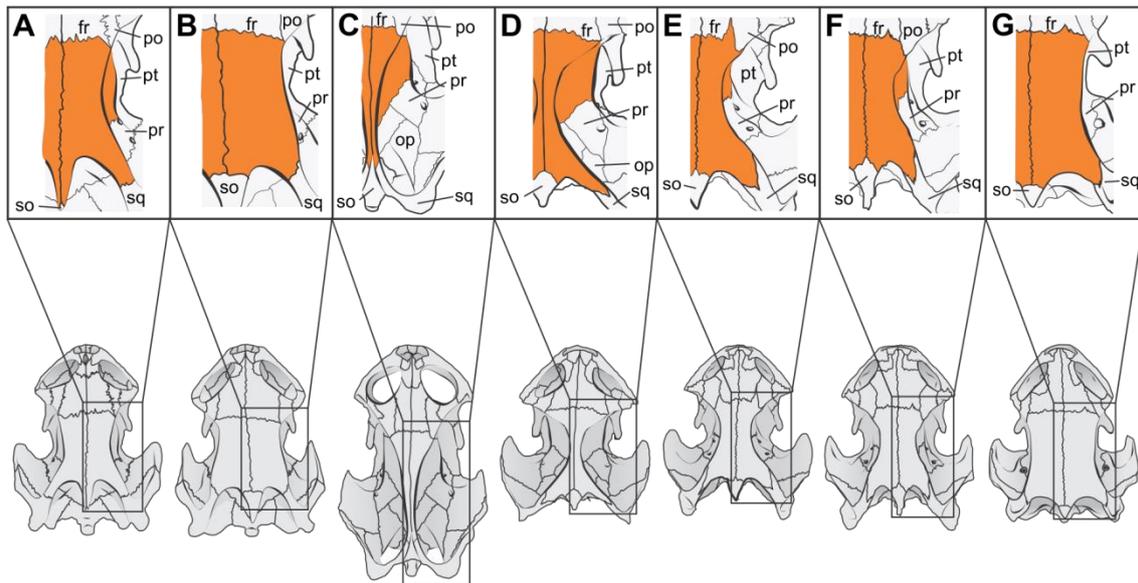


**Figura 3.3.10.** Vista dorsal del cráneo de todas las especies con distribución en Argentina, con detalle del hueso frontal. **A:** *Acanthochelys pallidipectoris*, **B:** *Acanthochelys spixii*, **C:** *Hydromedusa tectifera*, **D:** *Mesoclemmys vanderhaegei*, **E:** *Phrynops geoffroanus*, **F:** *Phrynops hilarii*, **G:** *Phrynops williamsi*.

### *Parietal*

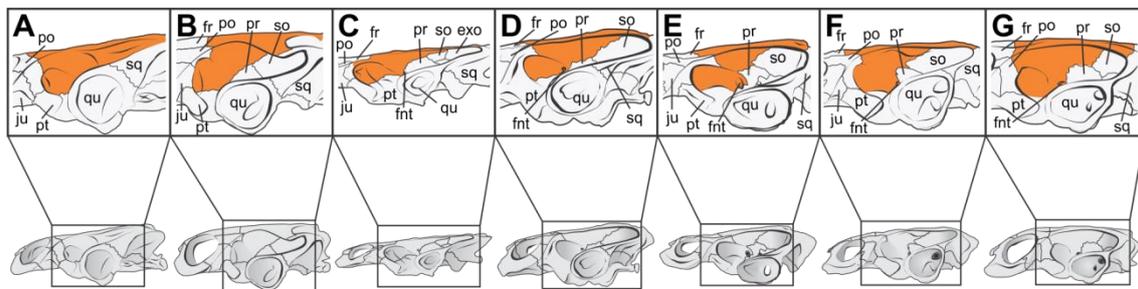
El parietal es un hueso par que cubre la mayor parte del techo y la pared lateral del cráneo. En *A. pallidipectoris*, *A. spixii* y *P. williamsi*, en vista dorsal el parietal presenta una forma más o menos rectangular, con diferentes grados de curvatura del proceso latero-posterior que termina contactando al hueso escamoso (Fig. 3.3.11 A, B y G). En tanto que en las restantes especies estudiadas presenta una forma más bien triangular, como en *H. tectifera*, con un aguzamiento progresivo hacia posterior; o una forma bicóncava (también llamada “reloj de arena” o “cintura de avispa”), con un aguzamiento medio del hueso y una expansión hacia anterior y hacia posterior, como en *A. pallidipectoris*, *M. vanderhaegei*, *P. geoffroanus* y *P. hilarii* (Fig. 3.3.11 A, C, D, E y F).

**Contactos:** En el techo craneano, el parietal contacta anteriormente al frontal, medialmente a su contraparte y posteriormente al escamoso y al supraoccipital. Este último contacto se encuentra muy reducido en *H. tectifera* (Fig. 3.3.11 C). Además, el parietal contacta anterolateralmente al postorbital, aunque este contacto parece muy reducido en las dos especies de *Acanthochelys*, *H. tectifera*, *M. vanderhaegei* y *P. williamsi*, en tanto que en *P. geoffroanus* y *P. hilarii* el contacto es claramente más amplio. En la pared lateral del cráneo, contacta al pterigoides ventroanteriormente, al proótico ventroposteriormente y al supraoccipital posteriormente.



**Figura 3.3.11.** Vista dorsal del cráneo de todas las especies con distribución en Argentina, con detalle del hueso parietal. **A:** *Acanthochelys pallidipectoris*, **B:** *Acanthochelys spixii*, **C:** *Hydromedusa tectifera*, **D:** *Mesoclemmys vanderhaegei*, **E:** *Phrynops geoffroanus*, **F:** *Phrynops hilarii*, **G:** *Phrynops williamsi*.

**Estructuras:** El parietal tiene un proceso ventral elongado en sentido antero-posterior que forma la parte lateral de la caja craneana (Fig. 3.3.12). Forma parte del borde del foramen nervi trigemini (nervio craneano V) junto al proótico (lateral) y pterigoides (ventral).



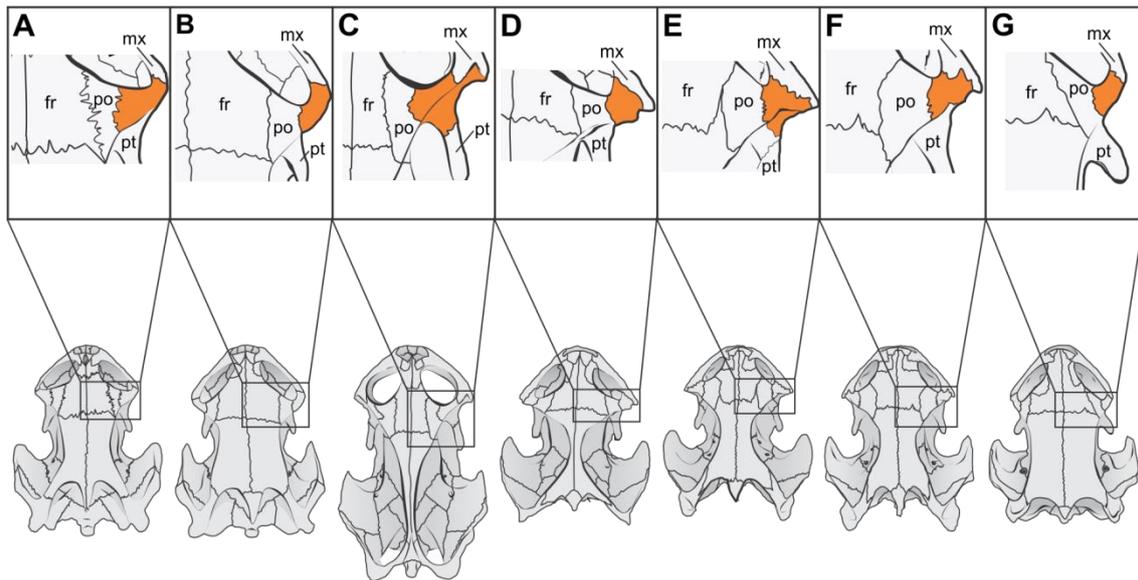
**Figura 3.3.12.** Vista lateral del cráneo de todas las especies con distribución en Argentina, con detalle del hueso parietal. **A:** *Acanthochelys pallidipectoris*, **B:** *Acanthochelys spixii*, **C:** *Hydromedusa tectifera*, **D:** *Mesoclemmys vanderhaegei*, **E:** *Phrynops geoffroanus*, **F:** *Phrynops hilarii*, **G:** *Phrynops williamsi*.

### Yugal

El yugal es un hueso par, bastante reducido, que se encuentra en la parte posteroventral de la órbita. En todas las especies estudiadas presenta mayormente forma de barra rectangular, con una leve curvatura que se ajusta al recorrido posterior de la órbita (Fig. 3.3.13).

**Contactos:** El yugal contacta al maxilar anteriormente, al postorbital medialmente y al pterigoides posteriormente. Además, en vista ventral se observa un reducido contacto posteroventral con el palatino (ver también Figs. 3.3.1B-7B).

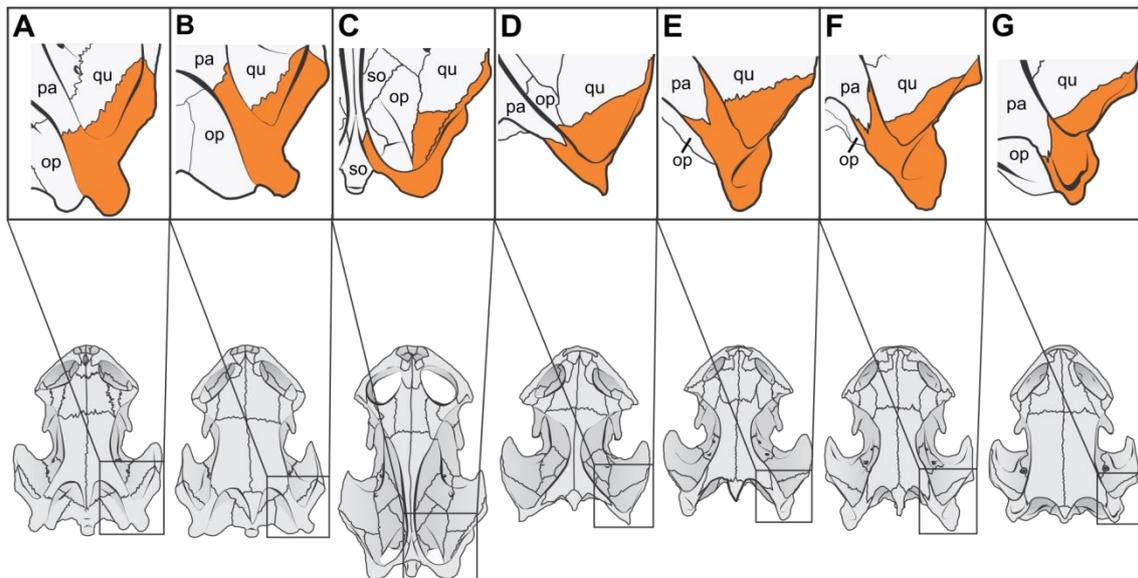
**Estructuras:** Forma la parte posteroventral de la órbita y ventralmente se observa en todas las especies estudiadas, en mayor o menor medida, alguna contribución del yugal al borde lateral del paladar.



**Figura 3.3.13.** Vista dorsal del cráneo de todas las especies con distribución en Argentina, con detalle del hueso yugal. **A:** *Acanthochelys pallidipectoris*, **B:** *Acanthochelys spixii*, **C:** *Hydromedusa tectifera*, **D:** *Mesoclemmys vanderhaegei*, **E:** *Phrynops geoffroanus*, **F:** *Phrynops hilarii*, **G:** *Phrynops williamsi*.

### Escamoso

El escamoso es un hueso par ubicado en la parte posterior del cráneo. Su contribución al techo craneano es reducida. En vista dorsal presenta forma de puente que se extiende como un arco curvo entre el parietal y el cuadrado. La curvatura así como el ancho de esta estructura parece variar entre las especies estudiadas, así por ejemplo en *H. tectifera* la misma es tiene forma de U, es extremadamente fina en su origen y se ensancha hacia posterior, en tanto que en *M. vanderhaegei* parece tener forma de V, ser más ancha en el origen y afinarse hacia posterior (Fig. 3.3.14).

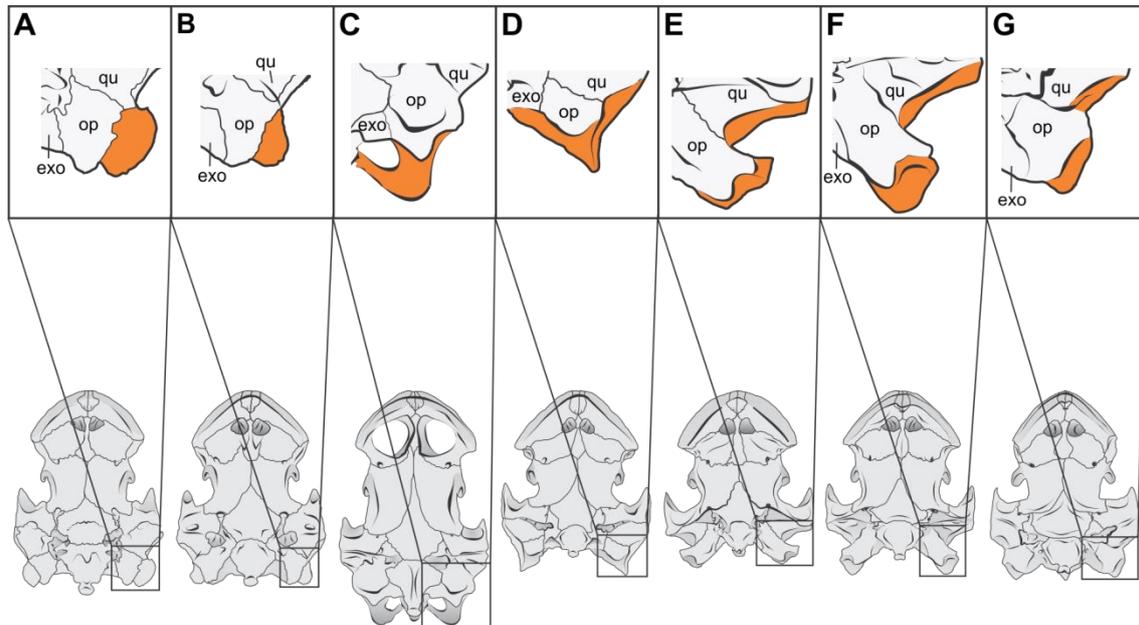


**Figura 3.3.14.** Vista dorsal del cráneo de todas las especies con distribución en Argentina, con detalle del hueso escamoso. **A:** *Acanthochelys pallidipectoris*, **B:** *Acanthochelys spixii*, **C:** *Hydromedusa tectifera*, **D:** *Mesoclemmys vanderhaegei*, **E:** *Phrynops geoffroanus*, **F:** *Phrynops hilarii*, **G:** *Phrynops williamsi*.

**Contactos:** En *H. tectifera* el escamoso contacta anteriormente al parietal y medialmente al supraoccipital, en las demás especies estudiadas el contacto con el supraoccipital está ausente

(Fig. 3.3.14). En vista ventral se observa en todas las especies estudiadas que el escamoso contacta al cuadrado anteriormente y al opistótico medialmente (Fig. 3.3.15).

**Estructuras:** El escamoso forma el capuchón dorsal del antrum postoticum y forma la barra posterior del techo craneano.

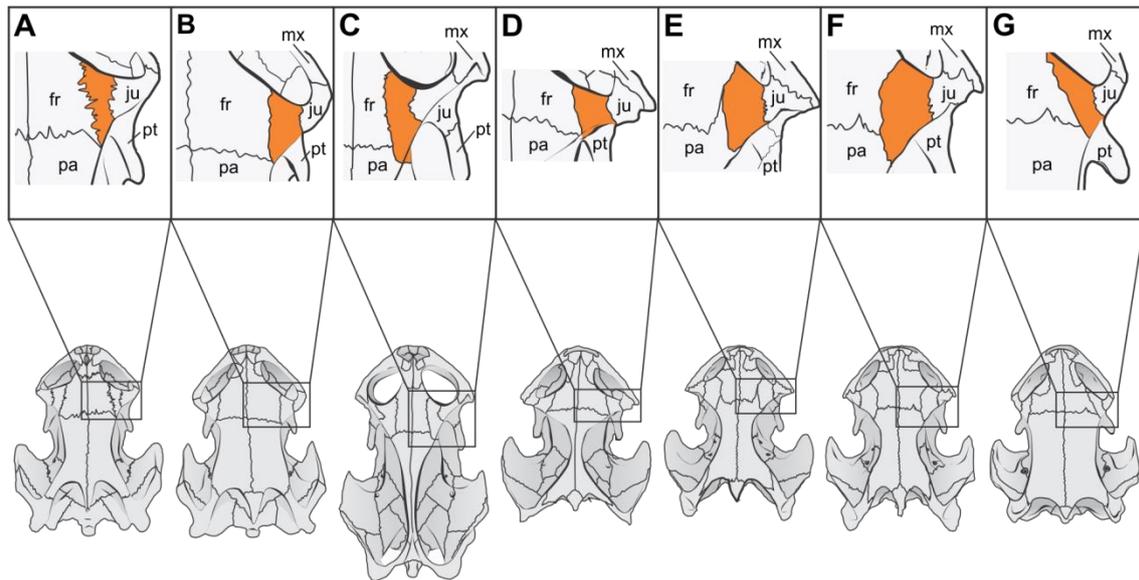


**Figura 3.3.15.** Vista dorsal del cráneo de todas las especies con distribución en Argentina, con detalle del hueso escamoso. **A:** *Acanthochelys pallidipectoris*, **B:** *Acanthochelys spixii*, **C:** *Hydromedusa tectifera*, **D:** *Mesoclemmys vanderhaegei*, **E:** *Phrynops geoffroanus*, **F:** *Phrynops hilarii*, **G:** *Phrynops williamsi*.

### *Postorbital*

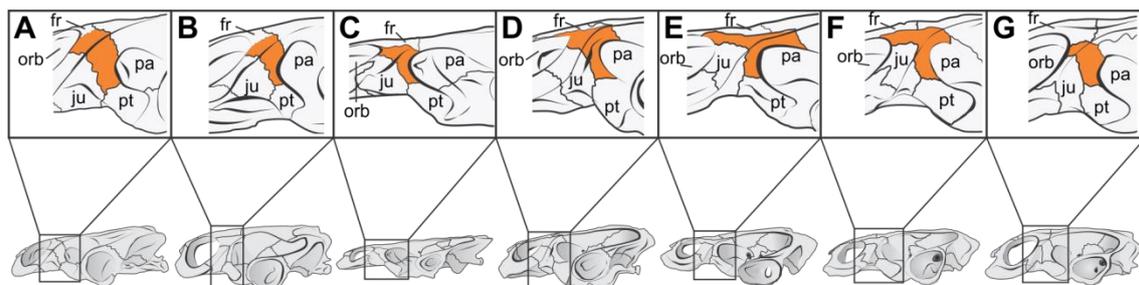
El postorbital es un hueso par, ubicado en la parte posterodorsal de la órbita. En vista dorsal, presenta una forma más o menos rectangular, con el lado más largo en sentido anterior-posterior.

**Contactos:** En todas las especies estudiadas el postorbital contacta medialmente al frontal, lateralmente al yugal y posteriormente al parietal, aunque este contacto se observa muy reducido en las dos especies de *Acanthochelys*, *H. tectifera*, *M. vanderhaegei* y *P. williamsi*, en tanto que es más evidente en *P. geoffroanus* y *P. hilarii* (Fig. 3.3.16). Además, presenta un proceso ventral que contacta al pterigoides (en el processus trochlearis pterygoidei) y al palatino (Fig. 3.3.16).



**Figura 3.3.16.** Vista dorsal del cráneo de todas las especies con distribución en Argentina, con detalle del hueso postorbital. **A:** *Acanthochelys pallidipectoris*, **B:** *Acanthochelys spixii*, **C:** *Hydromedusa tectifera*, **D:** *Mesoclemmys vanderhaegei*, **E:** *Phrynops geoffroanus*, **F:** *Phrynops hilarii*, **G:** *Phrynops williamsi*.

**Estructuras:** El postorbital forma parte del techo craneano en la región frontal, pero su contribución parece variar entre las especies estudiadas. Además, forma parte del borde posterior de la órbita, y su proceso ventral, que termina en un contacto con el palatino y el pterigoides, contribuye a la pared posterior de la misma (Fig. 3.3.17).



**Figura 3.3.17.** Vista lateral del cráneo de todas las especies con distribución en Argentina, con detalle del hueso postorbital. **A:** *Acanthochelys pallidipectoris*, **B:** *Acanthochelys spixii*, **C:** *Hydromedusa tectifera*, **D:** *Mesoclemmys vanderhaegei*, **E:** *Phrynops geoffroanus*, **F:** *Phrynops hilarii*, **G:** *Phrynops williamsi*.

### Elementos del paladar

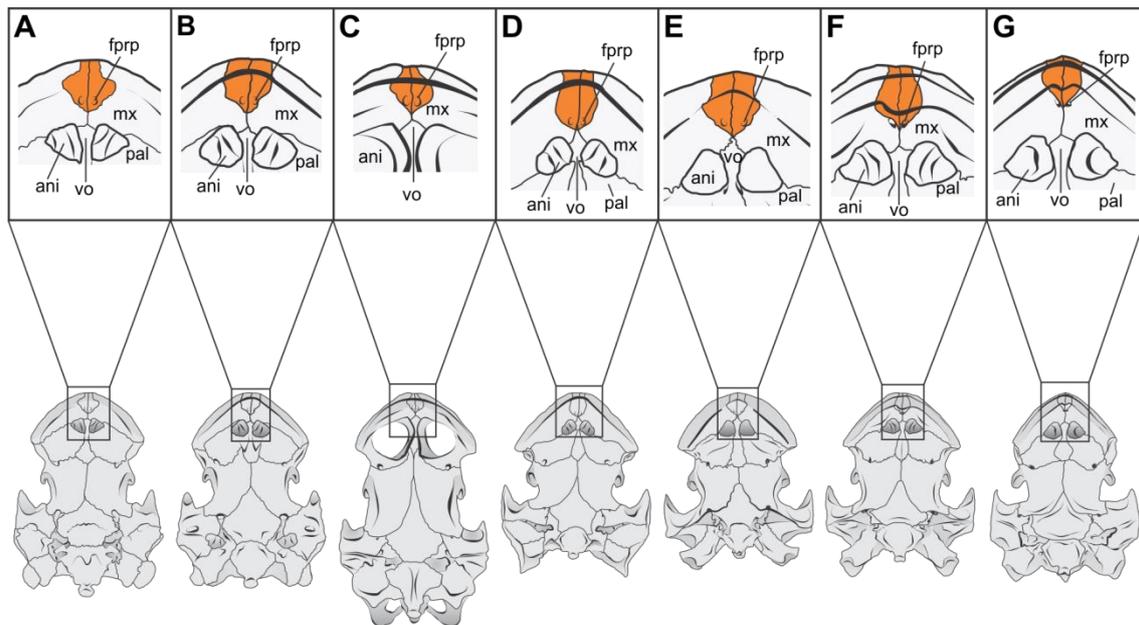
#### *Premaxilar*

El premaxilar es un hueso par muy reducido ubicado en la región anteroventral del cráneo. Su forma en vista ventral asemeja a un trapecio, aunque puede presentar un ensanchamiento de la parte media, que en general parece tener alguna relación con el grado de curvatura de la cresta labial. Así, por ejemplo en *A. pallidipectoris* y *H. tectifera* su forma se hace más acorazonada (Fig. 3.3.18 A y C).

**Contactos:** En todas las especies estudiadas este hueso contacta al maxilar lateralmente y al otro premaxilar en la línea media. Sin embargo, en *M. vanderhaegei* y *P. geoffroanus* se observa también un contacto posterior muy reducido con el vómer.

**Estructuras:** Contribuye escasamente al borde anterior y ventro-medial de la apertura narium externa. Ventralmente, forma parte de la superficie triturante y de la cresta labial. El foramen

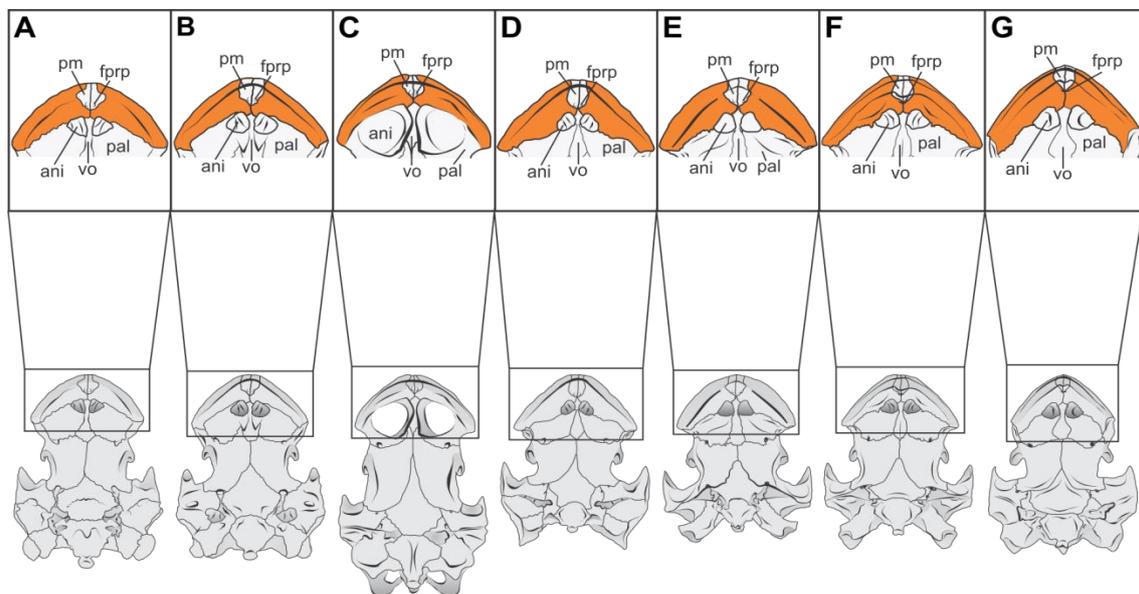
praepalatinum se observa cerca de la línea media y de la cresta labial, interno a la sutura con el maxilar en todas las especies estudiadas, excepto en *P. hilarii* y *P. williamsi*, donde su posición se observa más yuxtapuesta a dicha sutura (Fig. 3.3.18 F y G).



**Figura 3.3.18.** Vista ventral del cráneo de todas las especies con distribución en Argentina, con detalle del hueso premaxilar. **A:** *Acanthochelys pallidipectoris*, **B:** *Acanthochelys spixii*, **C:** *Hydromedusa tectifera*, **D:** *Mesoclemmys vanderhaegei*, **E:** *Phrynops geoffroanus*, **F:** *Phrynops hilarii*, **G:** *Phrynops williamsi*.

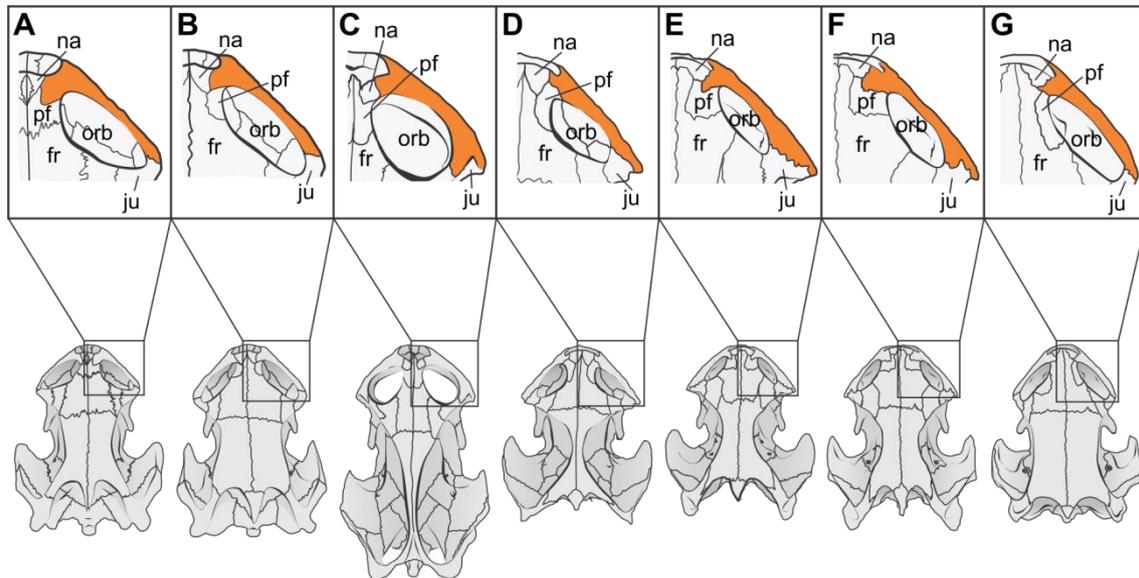
### Maxilar

El maxilar es un hueso par ubicado en la región anterior del cráneo que, en vista ventral, presenta forma de barra semicircular (Fig. 3.3.19), aunque en algunos casos (como por ejemplo *P. williamsi*) su forma asemeja más a una V invertida con un ángulo notablemente cerrado.



**Figura 3.3.19.** Vista ventral del cráneo de todas las especies con distribución en Argentina, con detalle del hueso maxilar. **A:** *Acanthochelys pallidipectoris*, **B:** *Acanthochelys spixii*, **C:** *Hydromedusa tectifera*, **D:** *Mesoclemmys vanderhaegei*, **E:** *Phrynops geoffroanus*, **F:** *Phrynops hilarii*, **G:** *Phrynops williamsi*.

**Contactos:** En vista ventral (Fig. 3.3.19), el maxilar contacta al premaxilar anteromedialmente, a su contraparte medialmente, al vómer posteromedialmente y al palatino posterolateralmente. Dorsalmente, contacta al nasal y al prefrontal anteriormente y al yugal posteriormente (Fig. 3.3.20).



**Figura 3.3.20.** Vista dorsal del cráneo de todas las especies con distribución en Argentina, con detalle del hueso maxilar. **A:** *Acanthochelys pallidipectoris*, **B:** *Acanthochelys spixii*, **C:** *Hydromedusa tectifera*, **D:** *Mesoclemmys vanderhaegei*, **E:** *Phrynops geoffroanus*, **F:** *Phrynops hilarii*, **G:** *Phrynops williamsi*.

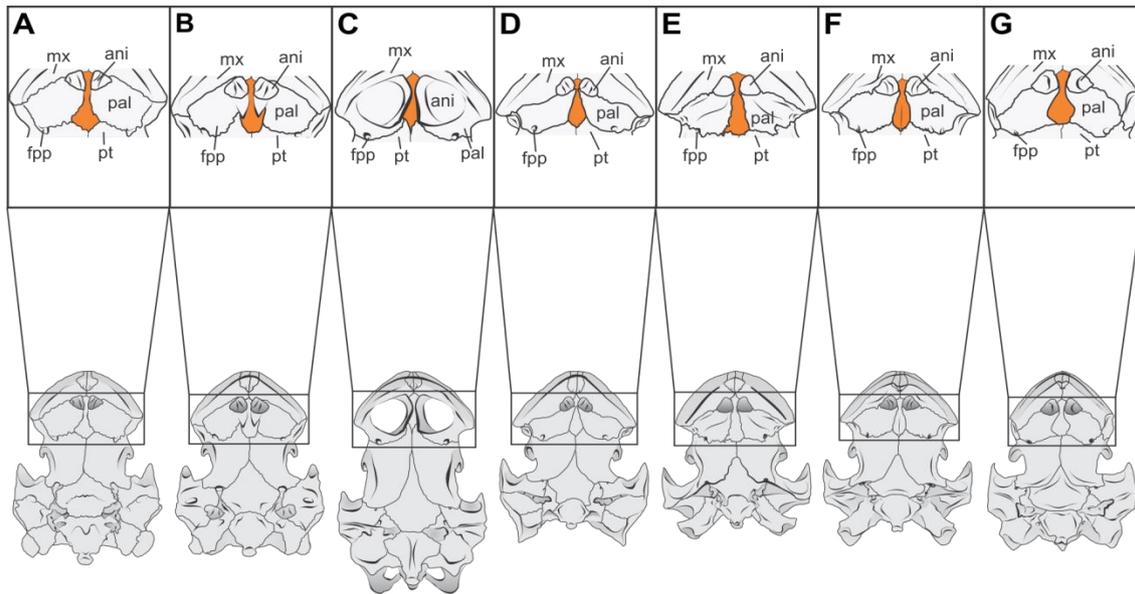
**Estructuras:** En todas las especies estudiadas, el maxilar forma gran parte del borde de la apertura narium externa y el borde anterolateral de la apertura narium interna. También ventralmente forma la mayor parte de la superficie triturante, la cual está rodeada sólo lateralmente por la cresta labial. Dorsalmente el maxilar forma el borde anterior y ventral de la órbita (Figs. 3.3.19 y 3.3.20).

### Vómer

El vómer es un hueso impar ubicado en la región anteroventral del cráneo. En general presenta forma de botella, con su cuello apuntando hacia anterior y su base hacia posterior (Fig. 3.3.21).

**Contactos:** En todas las especies estudiadas, el vómer contacta anteriormente al maxilar, lateralmente al palatino y posteriormente al pterigoides. Sin embargo, estos contactos pueden presentarse con diferente grado de reducción. Así, por ejemplo *H. tectifera* (Fig. 3.3.21 C), presenta escaso contacto entre estos tres huesos, debido a la amplitud de su apertura narium interna. También se observa un contacto bastante reducido entre el vómer y el pterigoides en *P. williamsi* (Fig. 3.3.21 G). Además, este hueso presenta un contacto anterior muy reducido con el premaxilar en *M. vanderhaegei* y *P. geoffroanus*.

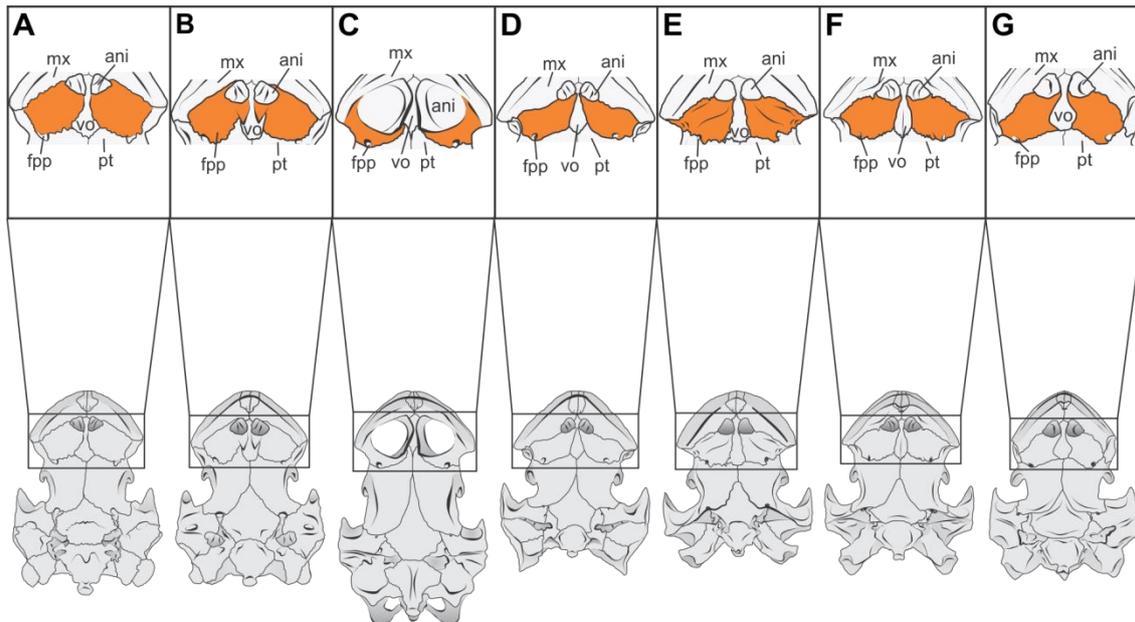
**Estructuras:** Forma el borde medial de la apertura narium interna.



**Figura 3.3.21.** Vista ventral del cráneo de todas las especies con distribución en Argentina, con detalle del hueso vómer. **A:** *Acanthochelys pallidipectoris*, **B:** *Acanthochelys spixii*, **C:** *Hydromedusa tectifera*, **D:** *Mesoclemmys vanderhaegei*, **E:** *Phrynops geoffroanus*, **F:** *Phrynops hilarii*, **G:** *Phrynops williamsi*.

### Palatino

El palatino es un hueso par ubicado en la región anteroventral del cráneo. En su forma se aprecia cierta variabilidad entre las especies estudiadas. Puede mostrarse ligeramente romboidal en las dos especies de *Acanthochelys* (Fig. 3.3.22 A y B), con forma de U en *H. tectifera* (Fig. 3.3.22 C), de forma más o menos triangular en *M. vanderhaegei*, *P. geoffroanus* y *P. hilarii* (Fig. 3.3.22 D, E y F) y más bien rectangular en *P. williamsi* (Fig. 3.3.22 G).



**Figura 3.3.22.** Vista ventral del cráneo de todas las especies con distribución en Argentina, con detalle del hueso palatino. **A:** *Acanthochelys pallidipectoris*, **B:** *Acanthochelys spixii*, **C:** *Hydromedusa tectifera*, **D:** *Mesoclemmys vanderhaegei*, **E:** *Phrynops geoffroanus*, **F:** *Phrynops hilarii*, **G:** *Phrynops williamsi*.

**Contactos:** En vista ventral contacta al vómer anteromedialmente, al maxilar anterolateralmente y al pterigoides posteriormente. Dorsalmente, el palatino contacta al postorbital. Además, en todas las especies estudiadas este hueso presenta un contacto

reducido con el yugal en la pared lateral del paladar, que es casi indistinguible en vista ventral en *H. tectifera* (Fig. 3.3.22).

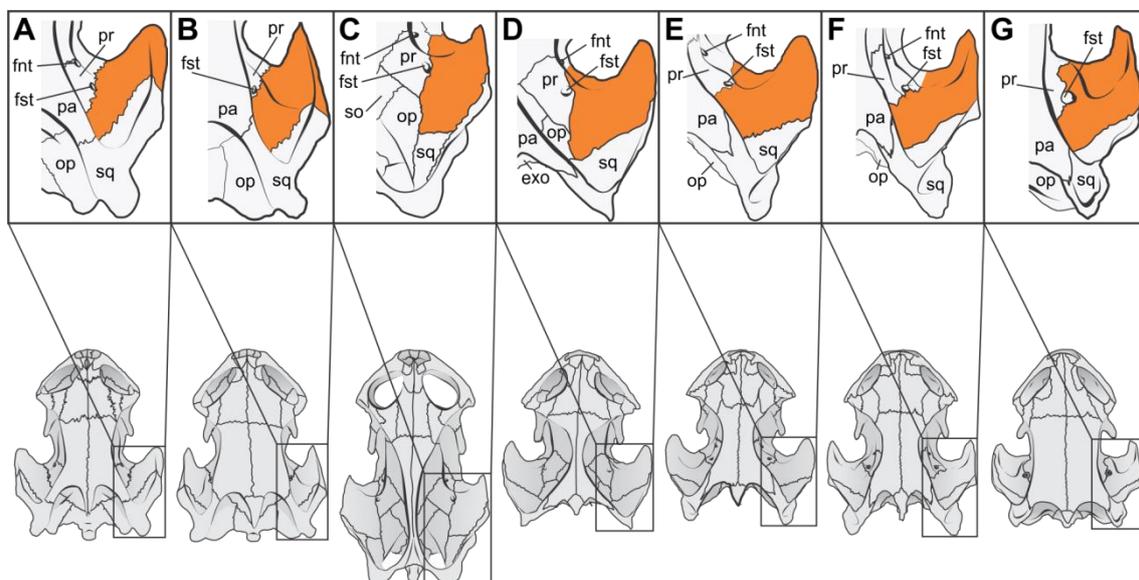
**Estructuras:** Forma el borde posteromedial de la apertura narium interna. Junto al pterigoides forman el foramen palatinum posterius.

### Elementos del palatoc cuadrado

#### Cuadrado

El cuadrado, como en la mayoría de las tortugas, tiene forma de embudo y se ubica en la parte posterior y lateral del cráneo.

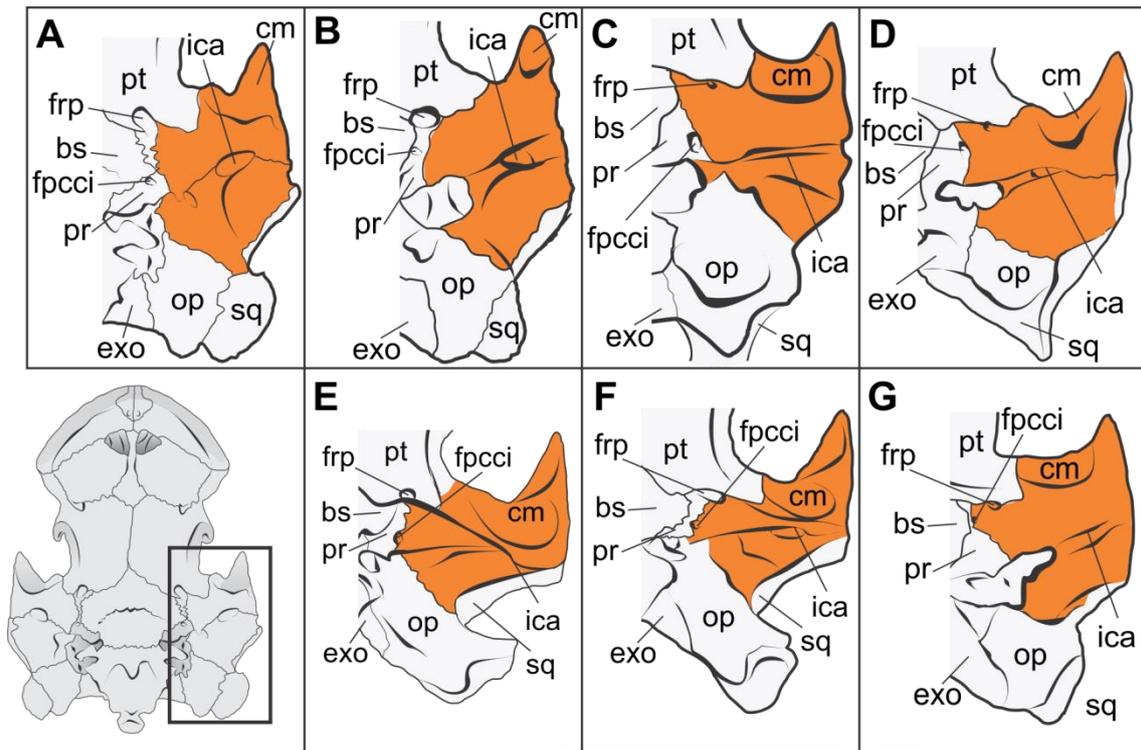
**Contactos:** En vista dorsal el cuadrado contacta al proótico medialmente, al opistótico posteromedialmente y al escamoso posterolateralmente (Fig. 3.3.23). En vista ventral, el cuadrado contacta al pterigoides anteriormente, al proótico medialmente, al opistótico posteromedialmente y al escamoso posterolateralmente. Además, se observa un contacto muy reducido del cuadrado con el basiesfenoides en *A. pallidipectoris* y *P. williamsi* y algo más notorio en *H. tectifera* (Fig. 3.3.24).



**Figura 3.3.23.** Vista dorsal del cráneo de todas las especies con distribución en Argentina, con detalle del hueso cuadrado. **A:** *Acanthochelys pallidipectoris*, **B:** *Acanthochelys spixii*, **C:** *Hydromedusa tectifera*, **D:** *Mesoclemmys vanderhaegei*, **E:** *Phrynops geoffroanus*, **F:** *Phrynops hilarii*, **G:** *Phrynops williamsi*.

**Estructuras:** El cuadrado forma parte del cavum tympani, el cual es profundo y forma la parte más anterior del antrum postoticum. En vista dorsal, se observa foramen stapedio-temporale en la sutura entre el cuadrado y el proótico. Aunque su posición parece estar más relacionada al proótico que al cuadrado en todas las especies estudiadas excepto *P. williamsi*, incluso en algunos casos como *M. vanderhaegei* y *P. geoffroanus* la contribución del cuadrado al borde del foramen parece escasa o nula. En vista ventral (Fig. 3.3.24), el cuadrado forma también la incisura columella auris la cual se encuentra cerrada en la parte medial. Medialmente a la parte cerrada de la incisura columella auris se encuentra el aditus canalis stapedio-temporalis. En la sutura entre el cuadrado y el pterigoides lateroanteriormente respecto al foramen posterius canalis carotici interni se encuentra el foramen retropterygoideum (Bour & Pauler,

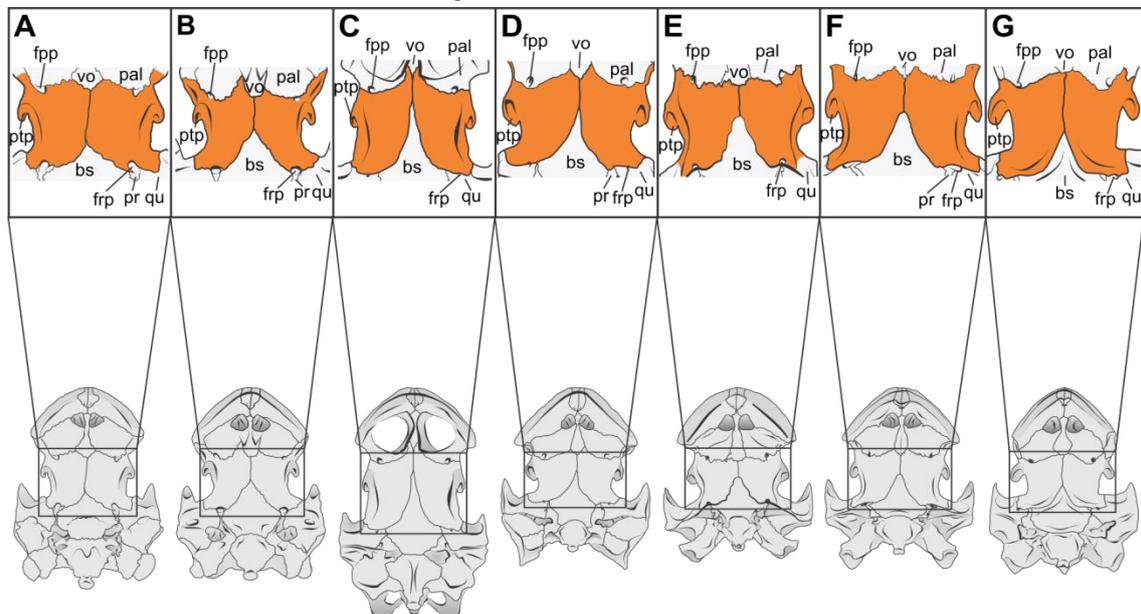
1987). Además, en este hueso se encuentra el condylus mandibularis, el cual presenta diferentes tamaños y grados de curvatura entre las especies estudiadas.



**Figura 3.3.24.** Vista ventral del cráneo de *A. pallidipectoris*, con recuadro en la región posterolateral. A-G esquema de la región mencionada, con detalle del hueso cuadrado en todas las especies con distribución en Argentina. **A:** *Acanthochelys pallidipectoris*, **B:** *Acanthochelys spixii*, **C:** *Hydromedusa tectifera*, **D:** *Mesoclemmys vanderhaegei*, **E:** *Phrynosoma geoffroanus*, **F:** *Phrynosoma hilarii*, **G:** *Phrynosoma williamsi*.

**Pterigoides**

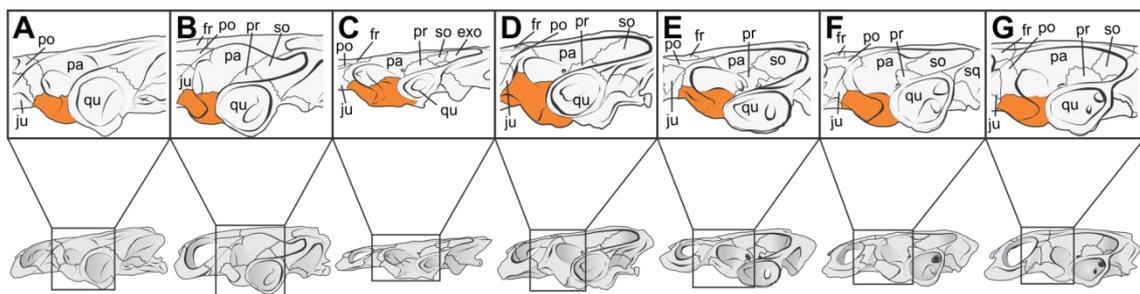
El pterigoides es un hueso par, con forma de rectángulo laminar, ubicado en la parte media ventral del cráneo en vista ventral (Fig. 3.3.25).



**Figura 3.3.25.** Vista ventral del cráneo de todas las especies con distribución en Argentina, con detalle del hueso pterigoides. **A:** *Acanthochelys pallidipectoris*, **B:** *Acanthochelys spixii*, **C:** *Hydromedusa tectifera*, **D:** *Mesoclemmys vanderhaegei*, **E:** *Phrynosoma geoffroanus*, **F:** *Phrynosoma hilarii*, **G:** *Phrynosoma williamsi*.

**Contactos:** Ventralmente, el pterigoides contacta anteromedialmente al vómer, anterolateralmente al palatino, medioanteriormente a su contraparte, medioposteriormente al basiesfenoides y posteriormente al cuadrado. Estos contactos se observan en todas las especies estudiadas, no obstante su dimensión varía entre las mismas. Así, por ejemplo el contacto medial entre contrapartes se encuentra notoriamente reducido en *H. tectifera*, *M. vanderhaegei*, *P. geoffroanus* y *P. hilarii* (Fig. 3.3.25 C, D, E y F). Dorsalmente, el pterigoides contacta anteriormente al yugal, al postorbital y tiene un contacto extenso con el parietal (Fig. 3.3.26).

**Estructuras:** El pterigoides forma el processus trochlearis pterygoidei (por donde corre el músculo aductor de la mandíbula) característico de las pleurodiras. El pterigoides contiene el borde ventral del foramen nervi trigemini, el borde anterior del foramen retropterygoideum y el borde posterior del foramen palatinum posterius.



**Figura 3.3.26.** Vista lateral del cráneo de todas las especies con distribución en Argentina, con detalle del hueso pterigoides. **A:** *Acanthochelys pallidipectoris*, **B:** *Acanthochelys spixii*, **C:** *Hydromedusa tectifera*, **D:** *Mesoclemmys vanderhaegei*, **E:** *Phrynops geoffroanus*, **F:** *Phrynops hilarii*, **G:** *Phrynops williamsi*.

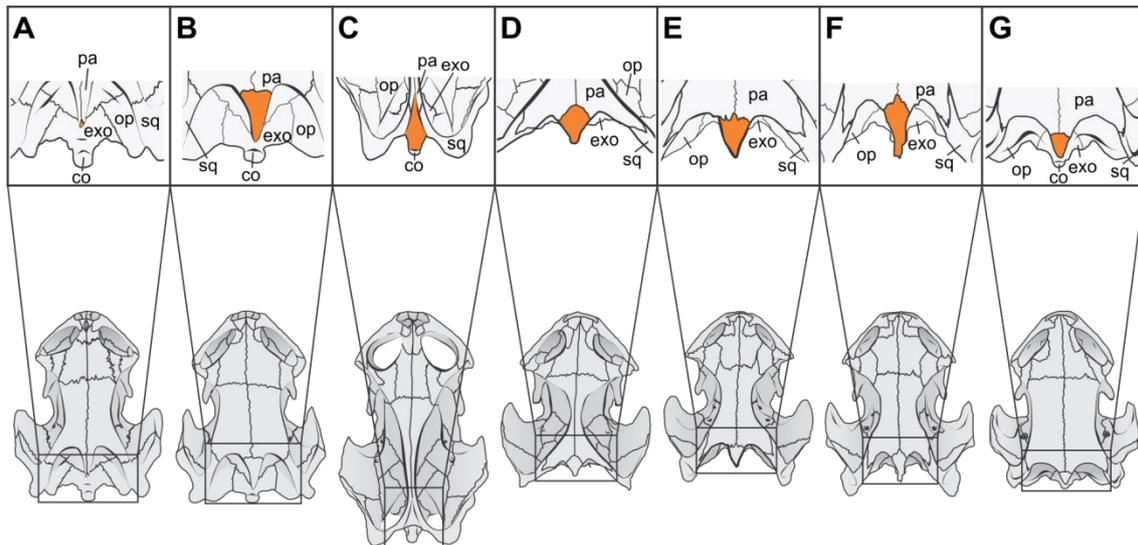
## Elementos del basicráneo

### *Supraoccipital*

El supraoccipital es un hueso impar que se ubica en la parte media y posterodorsal del cráneo. En vista dorsal, su forma y su tamaño son visiblemente variables entre las especies estudiadas. En *A. pallidipectoris* se observa como un elemento romboidal muy reducido; en *A. spixii*, *P. geoffroanus* y *P. williamsi* su forma se asemeja a un triángulo isóceles, con el ángulo menor apuntando hacia posterior, siendo en *P. williamsi* de tamaño proporcionalmente más reducido que en las otras dos especies mencionadas; en *H. tectifera*, *M. vanderhaegei* y *P. hilarii* su forma es más bien romboidal, con el eje menor más desplazado hacia posterior en *H. tectifera*, más centrado en *M. vanderhaegei* y más desplazado hacia anterior en *P. hilarii* (Fig. 3.3.27).

**Contactos:** En el techo craneano de *H. tectifera* el supraoccipital contacta al parietal anteriormente y al escamoso postero-lateralmente, en tanto que en las demás especies estudiadas no existe el contacto con el escamoso. En la pared lateral del cráneo contacta al parietal anteromedialmente, al proótico anterolateralmente, al opistótico posterolateralmente y al exoccipital posteromedialmente.

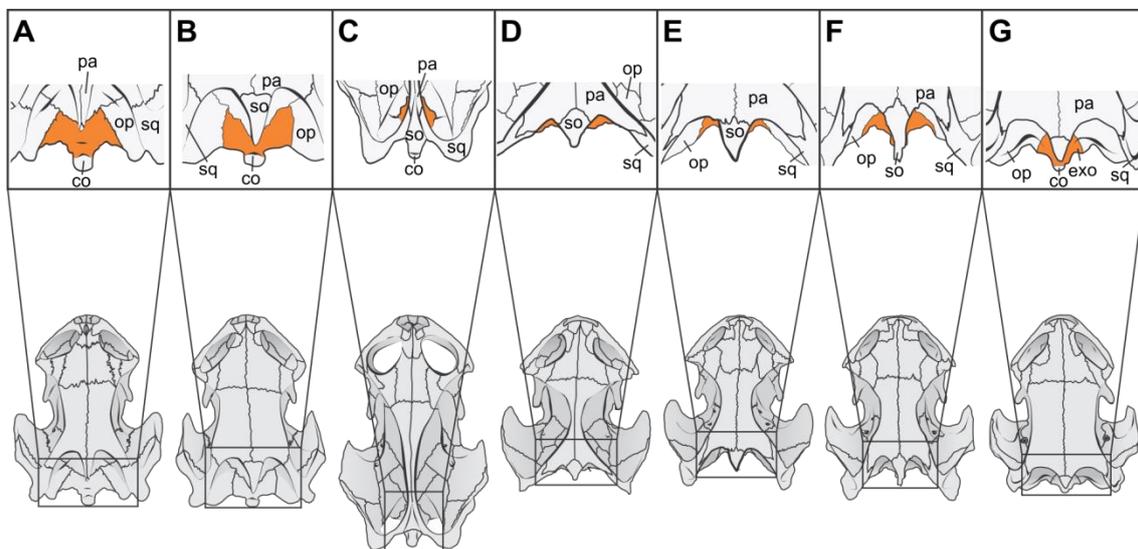
**Estructuras:** El supraoccipital tiene una exposición reducida en el techo craneano, donde forma la crista supraoccipitalis, cuya expansión varía entre las especies estudiadas, pero en ningún caso su extensión posterior excede a la extensión posterior del escamoso, como si ocurre generalmente en pelomedusoides. Además, el supraoccipital forma parte de la pared lateral y posterior del cráneo.



**Figura 3.3.27.** Vista dorsal del cráneo de todas las especies con distribución en Argentina, con detalle del hueso supraoccipital. **A:** *Acanthochelys pallidipectoris*, **B:** *Acanthochelys spixii*, **C:** *Hydromedusa tectifera*, **D:** *Mesoclemmys vanderhaegei*, **E:** *Phrynops geoffroanus*, **F:** *Phrynops hilarii*, **G:** *Phrynops williamsi*.

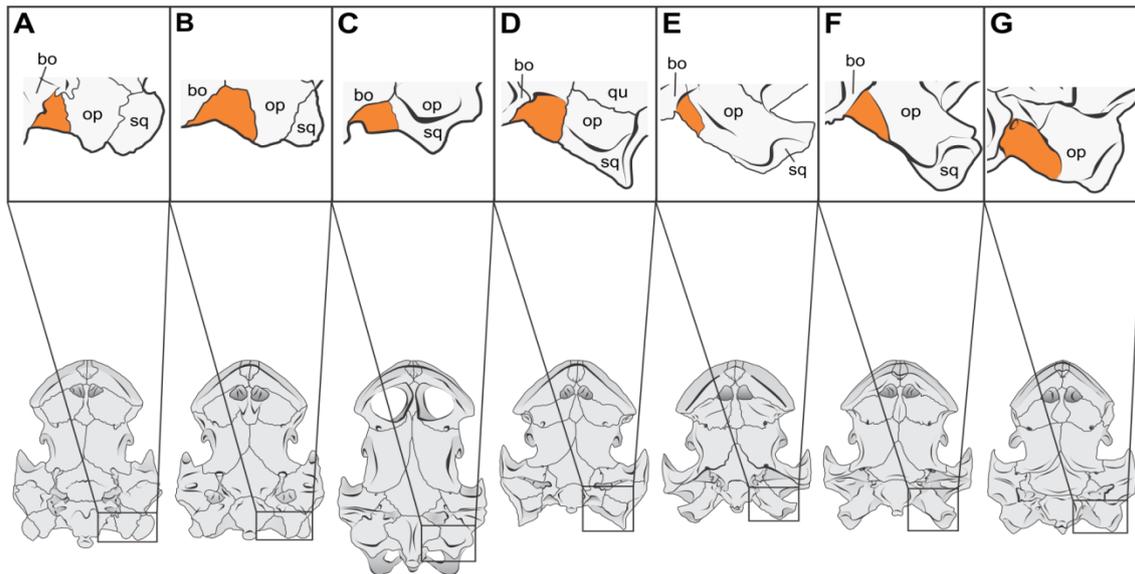
### *Exoccipital*

El exoccipital es un hueso par ubicado en la parte posterior del cráneo. En vista dorsal (Fig. 3.3.28), se observa una mayor exposición en las especies del género *Acanthochelys*.



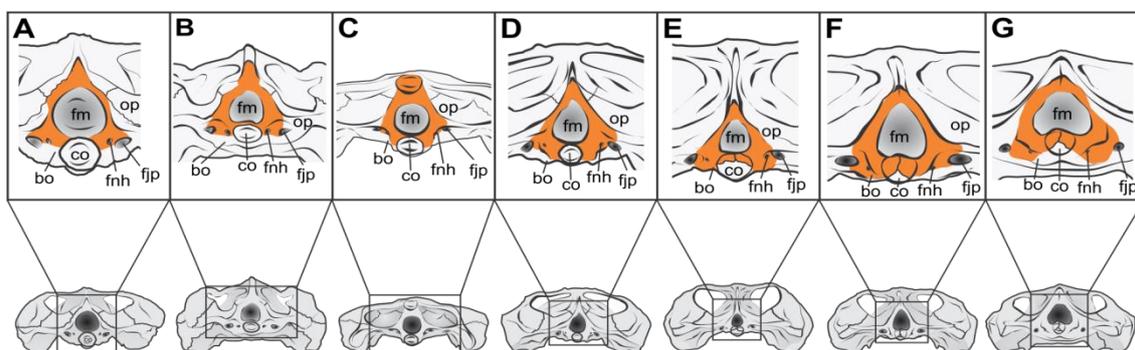
**Figura 3.3.28.** Vista dorsal del cráneo de todas las especies con distribución en Argentina, con detalle del hueso exoccipital. **A:** *Acanthochelys pallidipectoris*, **B:** *Acanthochelys spixii*, **C:** *Hydromedusa tectifera*, **D:** *Mesoclemmys vanderhaegei*, **E:** *Phrynops geoffroanus*, **F:** *Phrynops hilarii*, **G:** *Phrynops williamsi*.

**Contactos:** El exoccipital contacta al supraoccipital dorsalmente, al opistótico lateral y anteriormente, al basioccipital ventralmente y a su contraparte dorsalmente (Figs. 3.3.28, 3.3.29 y 3.3.30). El exoccipital y el basioccipital parecen estar fusionados en las dos especies de *Acanthochelys*, en *H. tectifera* y en *M. vanderhaegei*; no así en las tres especies de *Phrynops*, donde se observan suturas entre estos huesos en el condylus occipitalis (Fig. 3.3.30).



**Figura 3.3.29.** Vista ventral del cráneo de todas las especies con distribución en Argentina, con detalle del hueso exoccipital. **A:** *Acanthochelys pallidipectoris*, **B:** *Acanthochelys spixii*, **C:** *Hydromedusa tectifera*, **D:** *Mesoclemmys vanderhaegei*, **E:** *Phrynops geoffroanus*, **F:** *Phrynops hilarii*, **G:** *Phrynops williamsi*.

**Estructuras:** El exoccipital forma el borde lateral y dorsal del foramen magnum ya que ambos exoccipitales contactan en la línea media dorsalmente al foramen. El foramen magnum es elipsoidal, con el eje mayor en sentido vertical, aunque su forma se hace bastante más circular en *H. tectifera* y las especies de *Acanthochelys* (Fig. 3.3.30 A, B y C). La contribución del exoccipital al condylus occipitalis no se puede establecer en las especies en las que este hueso se encuentra fusionado al basioccipital (*A. pallidipectoris*, *A. spixii*, *H. tectifera* y *M. vanderhaegei*). Entre las tres especies de *Phrynops* la contribución del exoccipital al condylus occipitalis parece mayor en *P. hilarii*. El exoccipital contiene al foramen nervi hypoglossi (XII). Este hueso conjuntamente con el basioccipital, también forma parte del foramen jugulare posterius (por aquí saldrían del cráneo la vena capitis cerebialis y los nervios craneanos X y XI) (Fig. 3.3.30).



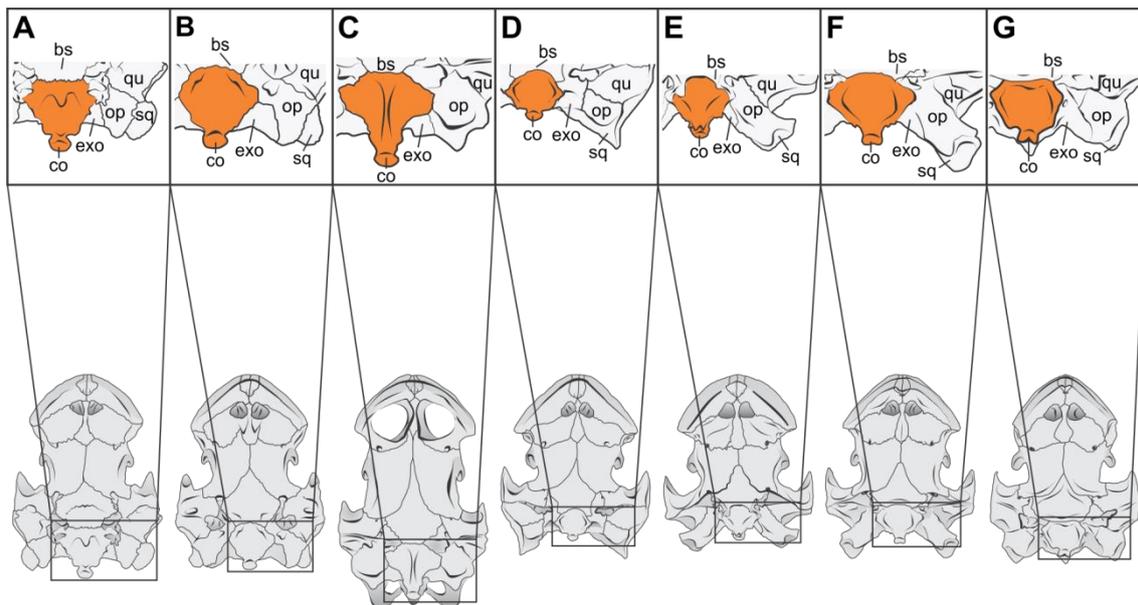
**Figura 3.3.30.** Vista posterior del cráneo de todas las especies con distribución en Argentina, con detalle del hueso exoccipital. **A:** *Acanthochelys pallidipectoris*, **B:** *Acanthochelys spixii*, **C:** *Hydromedusa tectifera*, **D:** *Mesoclemmys vanderhaegei*, **E:** *Phrynops geoffroanus*, **F:** *Phrynops hilarii*, **G:** *Phrynops williamsi*.

### *Basioccipital*

El basioccipital es un hueso impar ubicado en la parte posterior y central del cráneo. En vista ventral tiene forma de T con los procesos laterales y anteriores bien desarrollados y planos (Fig. 31).

**Contactos:** Contacta anteriormente al basiesfenoides, lateralmente al opistótico y lateralmente y dorsalmente al exoccipital.

**Estructuras:** El basioccipital forma parte del condylus occipitalis. Como se mencionó anteriormente, esta estructura se conforma en conjunto con el exoccipital, ya sea que ambos huesos estén fusionados en esta parte o no. En *H. tectifera* la línea media del basioccipital presenta una cresta visible, que está poco o nada desarrollada en las demás especies estudiadas (Fig. 3.3.31 C). Además, en esta especie el basioccipital también presenta una notable curvatura en la zona media, la cual tampoco se aprecia en las demás especies. El piso del oído interno entre el basiesfenoides y el basioccipital no está osificado, por lo que se puede observar en vista ventral gran parte del cavum labyrinthicum.

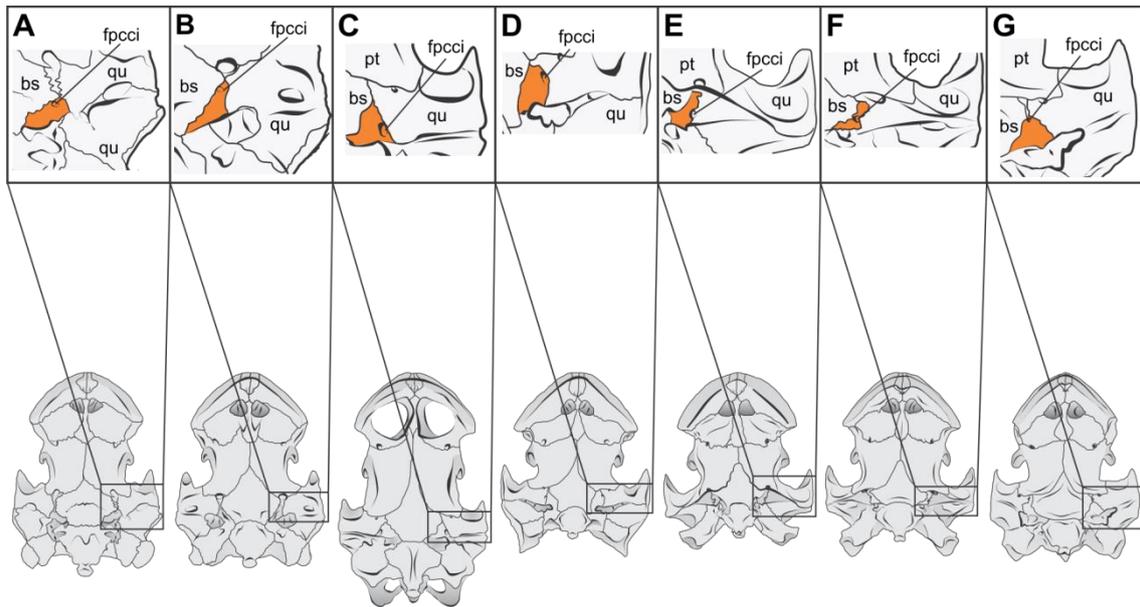


**Figura 3.3.31.** Vista ventral del cráneo de todas las especies con distribución en Argentina, con detalle del hueso basioccipital. **A:** *Acanthochelys pallidipectoris*, **B:** *Acanthochelys spixii*, **C:** *Hydromedusa tectifera*, **D:** *Mesoclemmys vanderhaegei*, **E:** *Phrynops geoffroanus*, **F:** *Phrynops hilarii*, **G:** *Phrynops williamsi*.

### *Proótico*

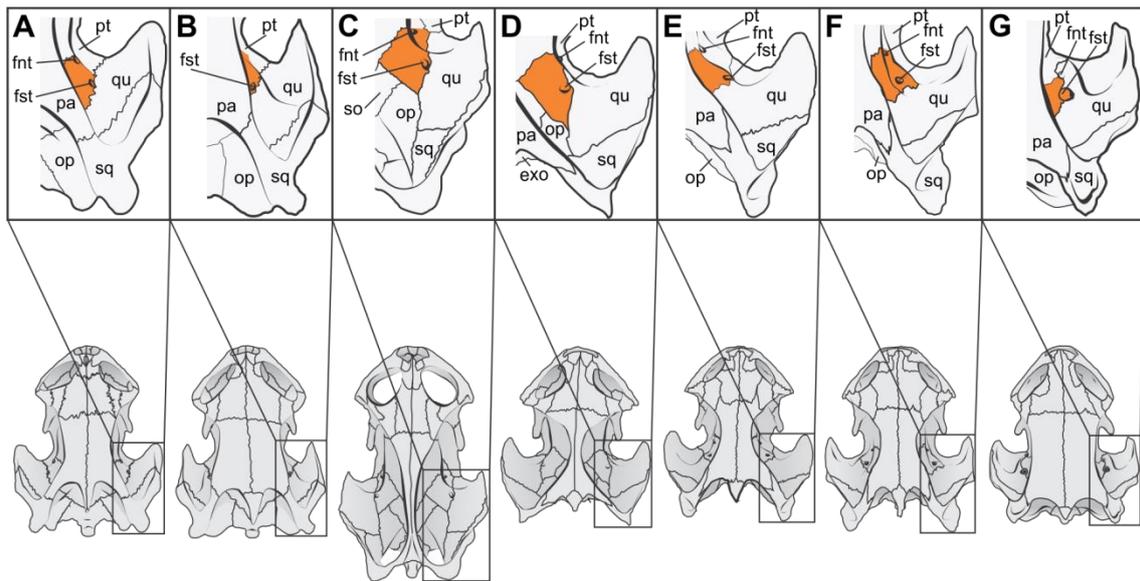
El prótico es un hueso par que, en vista ventral tiene forma triangular y está ubicado en la parte ventral del cráneo en la región media-posterior.

**Contactos:** En la pared lateral del cráneo, el prótico contacta al parietal anteromedialmente, al cuadrado lateralmente, al pterigoides ventralmente, al supraoccipital posteromedialmente y al opistótico posteriormente. En vista ventral (Fig. 3.3.32) contacta al basiesfenoides anteromedialmente y al cuadrado lateralmente.



**Figura 3.3.32.** Vista ventral del cráneo de todas las especies con distribución en Argentina, con detalle del hueso proótico. **A:** *Acanthochelys pallidipectoris*, **B:** *Acanthochelys spixii*, **C:** *Hydromedusa tectifera*, **D:** *Mesoclemmys vanderhaegei*, **E:** *Phrynops geoffroanus*, **F:** *Phrynops hilarii*, **G:** *Phrynops williamsi*.

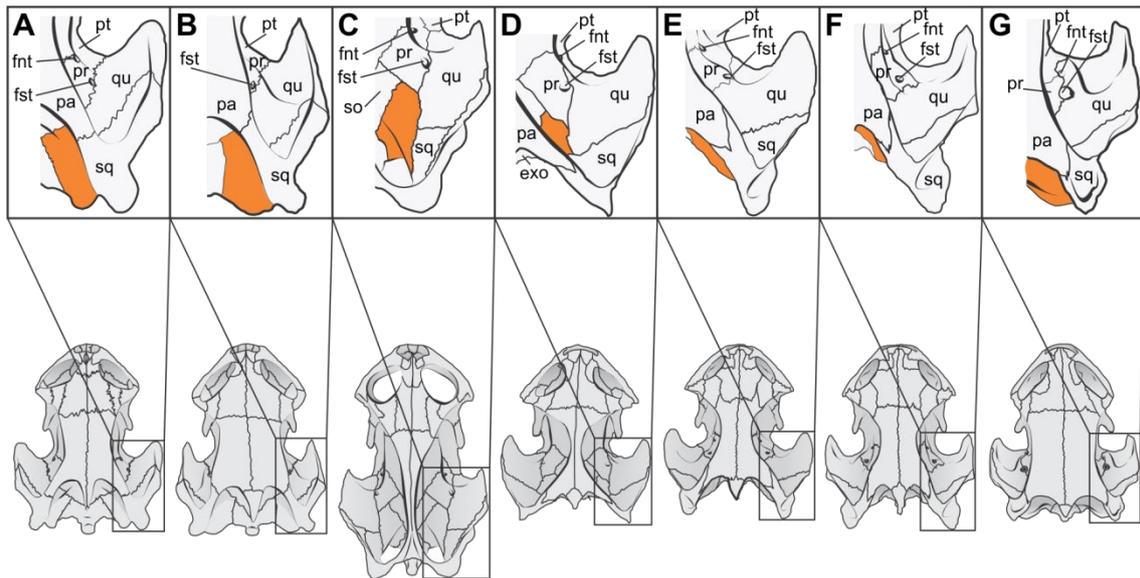
**Estructuras:** El proótico forma la parte anterior del oído interno. En vista dorsal, el proótico forma parte del foramen nervi trigemini (CN V) y del foramen stapedio-temporal (arteria estapedial) (Fig. 3.3.33). En vista ventral, el proótico contiene al foramen posterior canalis carotici interni por donde la arteria carótida interna ingresa al cráneo. El proótico forma también el borde anterior de la fenestra ovalis.



**Figura 3.3.33.** Vista dorsal del cráneo de todas las especies con distribución en Argentina, con detalle del hueso proótico. **A:** *Acanthochelys pallidipectoris*, **B:** *Acanthochelys spixii*, **C:** *Hydromedusa tectifera*, **D:** *Mesoclemmys vanderhaegei*, **E:** *Phrynops geoffroanus*, **F:** *Phrynops hilarii*, **G:** *Phrynops williamsi*.

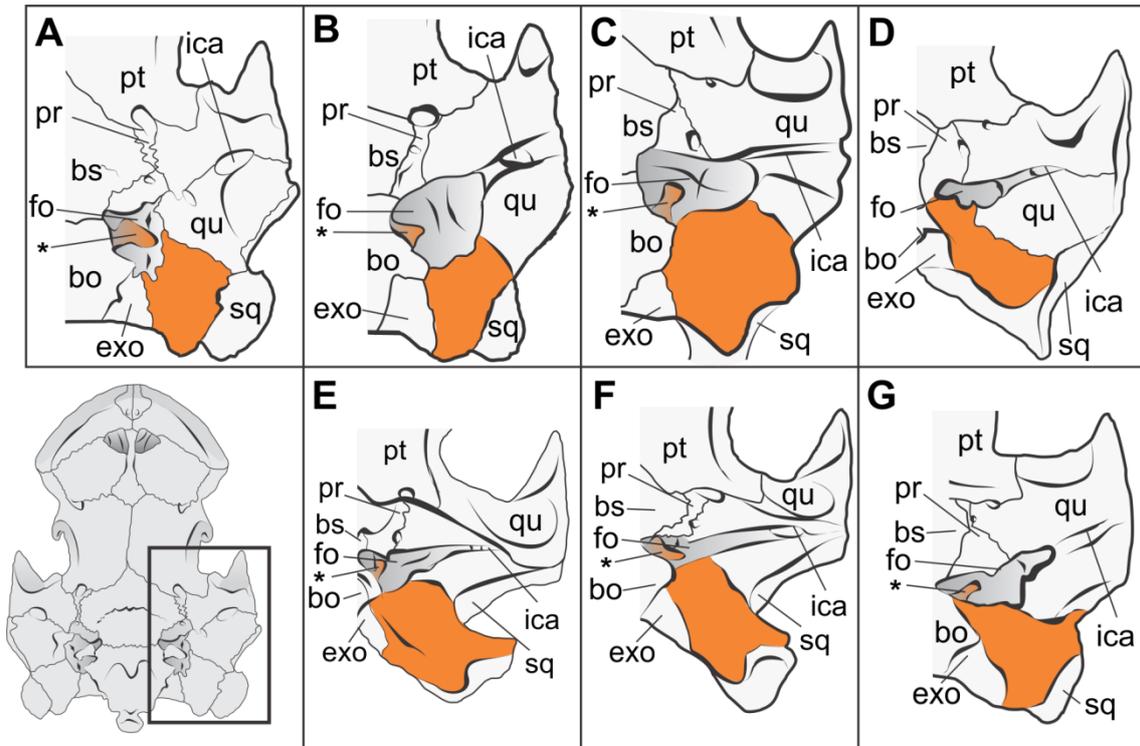
### Opistótico

El opistótico es un hueso par ubicado en la región posterior del cráneo, formando parte de la porción posterior de la cápsula ótica (Figs. 3.3.34 y 3.3.35).



**Figura 3.3.34.** Vista dorsal del cráneo de todas las especies con distribución en Argentina, con detalle del hueso opistótico. **A:** *Acanthochelys pallidipectoris*, **B:** *Acanthochelys spixii*, **C:** *Hydromedusa tectifera*, **D:** *Mesoclemmys vanderhaegei*, **E:** *Phrynops geoffroanus*, **F:** *Phrynops hilarii*, **G:** *Phrynops williamsi*.

**Contactos:** En vista dorsal, el opistótico contacta al proótico anteriormente, al supraoccipital anteromedialmente, al cuadrado anterolateralmente, al exoccipital posteromedialmente y al escamoso posterolateralmente (Fig. 3.3.34). En vista ventral, contacta al cuadrado anteriormente y al basioccipital y exoccipital medialmente (Fig. 3.3.35).



**Figura 3.3.35.** Vista ventral del cráneo de *A. pallidipectoris*, con recuadro en la región posterolateral. A-G esquema de la región mencionada, con detalle del hueso opistótico en todas las especies con distribución en Argentina. \* proceso interfenestral del opistótico. **A:** *Acanthochelys pallidipectoris*, **B:** *Acanthochelys spixii*, **C:** *Hydromedusa tectifera*, **D:** *Mesoclemmys vanderhaegei*, **E:** *Phrynops geoffroanus*, **F:** *Phrynops hilarii*, **G:** *Phrynops williamsi*.

**Estructuras:** El opistótico forma la parte posterior del oído interno. En vista ventral se observa el proceso paraoccipital del opistótico, que comienza en un plano horizontal culminando

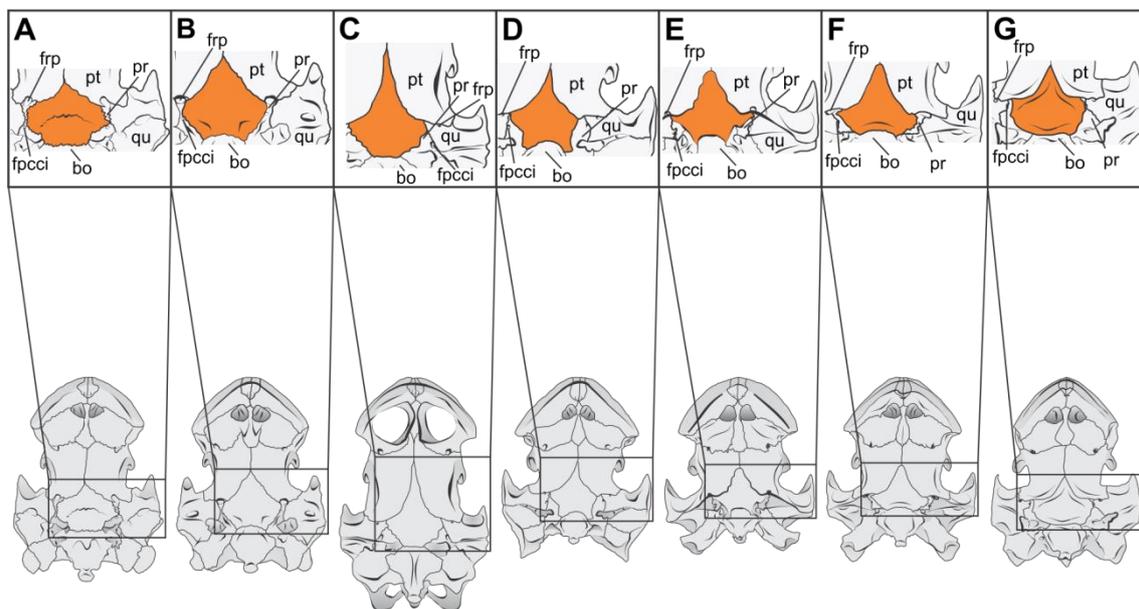
lateralmente en un proceso ventral. Este proceso se encuentra muy desarrollado en *H. tectifera*, en tanto que en las demás especies estudiadas se observa un grado de desarrollo menor, en donde *M. vanderhaegei* muestra el menor grado de desarrollo y curvatura en el borde del contacto opistótico-cuadrado-escamoso. El proceso interfenestralis del opistótico se observa en vista ventral en todas las especies estudiadas excepto en *M. vanderhaegei*. Además, este hueso forma el borde posterior de la fenestra ovalis (Fig. 3.3.35).

**Basiesfenoides**

El basiesfenoides es un hueso impar ubicado en la parte ventral del cráneo y en la región media. En vista ventral tiene forma de T invertida con un proceso anterior bien desarrollado, que varía en longitud entre las especies estudiadas.

**Contactos:** el basiesfenoides contacta al pterigoides anteriormente, al proótico lateroposteriormente, al basioccipital posteriormente y al cuadrado lateroanteriormente (Fig. 3.3.36), aunque este último contacto solo parece estar presente entre las especies estudiadas en *H. tectifera*, *P. geoffroanus* y *P. williamsi*.

**Estructuras:** Todas las estructuras en las que interviene este hueso son observables en vista dorsal, para lo cual se requiere del análisis del hueso desarticulado el uso de técnicas de tomografía computarizada.



**Figura 3.3.36.** Vista ventral del cráneo de todas las especies con distribución en Argentina, con detalle del hueso basiesfenoides. **A:** *Acanthochelys pallidipectoris*, **B:** *Acanthochelys spixii*, **C:** *Hydromedusa tectifera*, **D:** *Mesoclemmys vanderhaegei*, **E:** *Phrynops geoffroanus*, **F:** *Phrynops hilarii*, **G:** *Phrynops williamsi*.

**3.3.2. Histología y microanatomía lingual**

A ojo desnudo, la característica más notoria de superficie dorsal anterior del piso de la boca de los quélidos es la ausencia de una lengua verdadera, como se define para el resto de los tetrápodos. La lengua verdadera es un órgano muscular y sensitivo activo, asociado al transporte, degustación y deglución de alimentos (Iwasaki, 2019). En su lugar, la misma se presenta como una mucosa replegada transversalmente al eje del cuerpo (Fig. 3.2.1), donde estos pliegues pueden variar en abundancia, distribución y tamaño. Por ejemplo, entre las

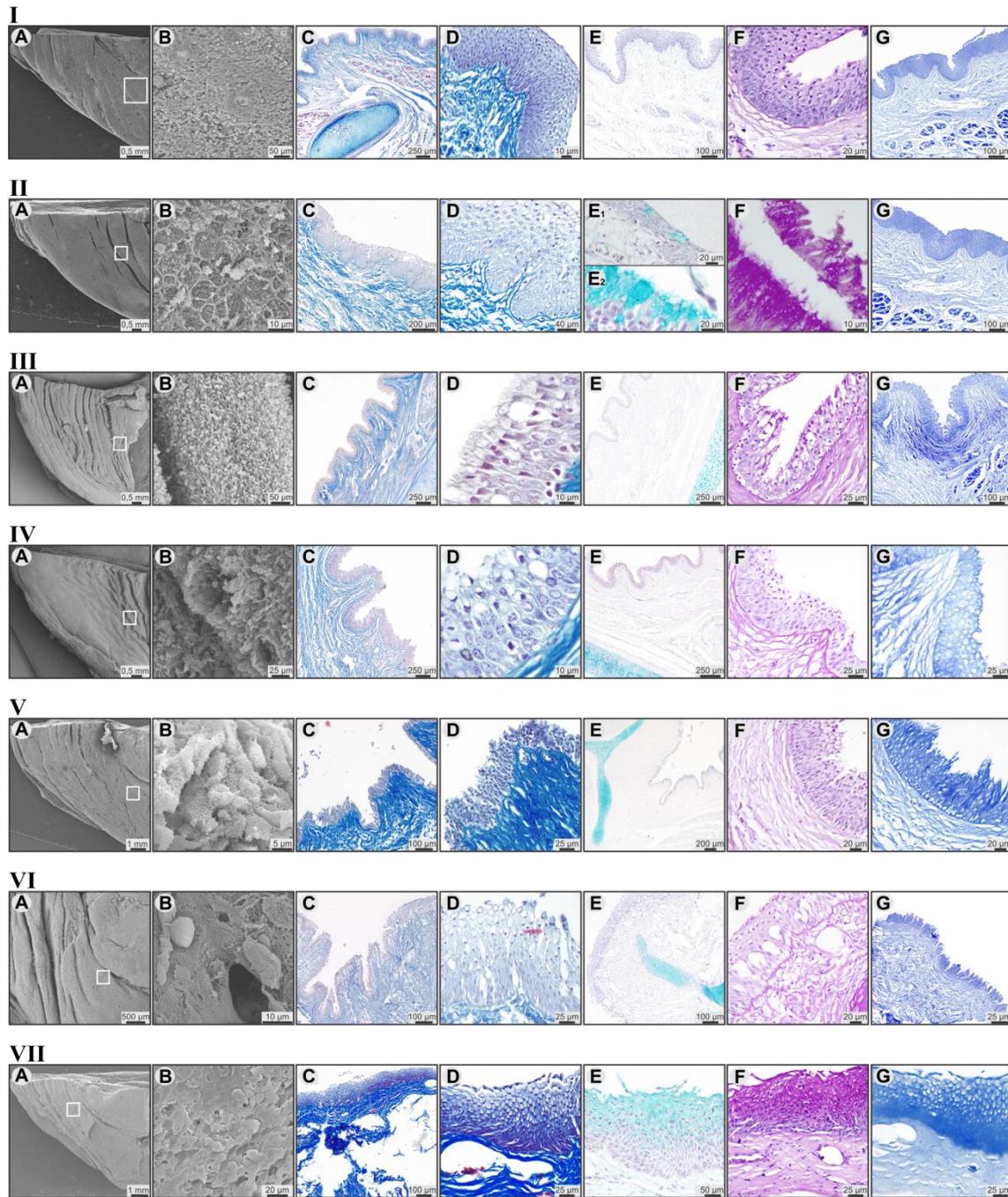
especies estudiadas *H. tectifera* presenta la mayor cantidad de pliegues, distribuidos de manera más o menos homogénea, en tanto que las especies de *Acanthochelys* muestran una mucosa con menor cantidad de pliegues y los mismos se muestran intercalados con surcos poco profundos (Fig. 3.3.37 I A-III A).

Al analizar dicho órgano mediante la aplicación de técnicas histológicas, microscopía óptica (MO) y de microscopía electrónica de barrido (MEB), se pudo explorar con un mayor nivel de detalle y observar estructuras que se describen a continuación por primera vez en este grupo. La figura 3.3.37 presenta el resumen de todo el trabajo realizado, donde cada fila de la figura (numeradas de I a VII) representa una especie diferente, según se indica en la leyenda de la figura. El segmento “A” de dicha figura muestra una vista general dorsal de cada hemisección de la lengua seleccionada para exploración mediante MEB, donde la región apical de la lengua se ubica a la izquierda y la región basal (próxima a la glotis) a la derecha. En este segmento se reconoce también un recuadro blanco que indica la región que se muestra a mayor aumento en el segmento “B” de la figura. Posteriormente los segmentos “C-G” presentan los resultados de la aplicación de las diferentes tinciones mencionadas en la sección de materiales y métodos, las cuales se detallan además en la leyenda de la figura. Por su parte las figuras 3.3.38 y 3.3.39 presentan un detalle a gran aumento de alguna vista de interés de MEB y dos vistas (a menor y mayor aumento) de cortes histológicos teñidos con la tinción TMM.

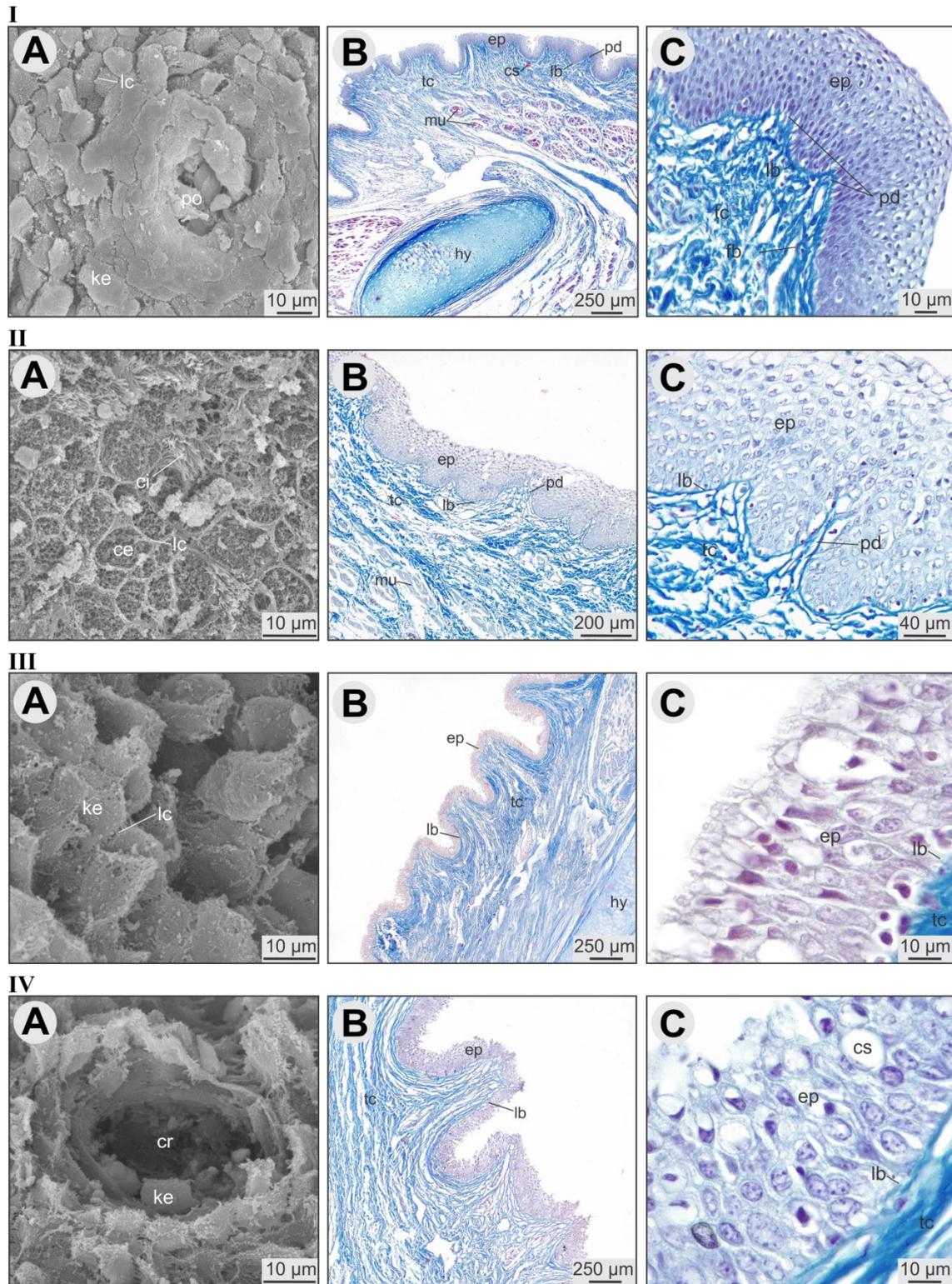
*MEB*: La vista de la superficie dorsal de la lengua mediante esta técnica destaca similitudes, diferencias y estructuras únicas entre las especies estudiadas. Como se mencionó antes, *H. tectifera* se presenta como la especie con mayor cantidad de pliegues (formados en capas más internas por papilas dérmicas), las especies pertenecientes al género *Acanthochelys* presentan lenguas poco replegadas y las especies pertenecientes al género *Phrynops* presentan un grado intermedio de repliegue, en tanto que *M. vanderhaegei* presenta una lengua con pocos pliegues pero con una característica única, que es la presencia de estructuras similares a cráteres (Fig. 3.3.37 I A-VII A). Entre las similitudes puede destacarse que la superficie dorsal de todas las especies está tapizada (en mayor o menor medida) de cortas microvellosidades, que aparecen en las imágenes como puntos blancos ampliamente distribuidos, que pueden confundirse también con gránulos de secreción mucosa, que también se observan en abundancia en algunas especies (e.g., Fig. 3.3.39 V A, *P. geoffroanus*). Estas características ya se han mencionado en la literatura para otras tortugas acuáticas (e.g., *Pelusios castaneus* [Beisser *et al.*, 2001]). Otra característica única es la presencia de células ciliadas, observadas sólo en *A. spixii*, donde el aspecto general de la superficie epitelial en torno a estas células muestra un intenso reticulado probablemente de origen proteico (e.g., matriz extracelular), en las cuales se destacan claramente los límites celulares (Fig. 3.3.38 II A). En el estudio de Beisser *et al.* (1995) se destaca la presencia de células con microvellocidades más largas de lo habitual distribuidas aleatoriamente por la superficie dorsal de la lengua, asociadas a papilas gustativas en *A. pallidipectoris*, por lo que es posible que las estructuras identificadas aquí como cilios en *A. spixii* se correspondan con esa descripción; sin embargo, dicho estudio no presenta ninguna figura en la cual se muestren estas estructuras y en el presente trabajo no se obtuvieron evidencias desde la histología que respalden dicha afirmación. Por otro lado, en *A. pallidipectoris*, *P. hylarii* y *P. williamsi*, se observaron poros de tamaño comparable al de una célula, aparentemente no relacionados a estructuras y/o funciones sensitivas, que son claramente diferenciables de las estructuras tipo cráter presentes en *M. vanderhaegei* (Figs.

3.3.38 I A, 3.3.38 IV A, 3.3.39 VI A). En algunas especies (*A. pallidipectoris*, *H. tectifera*, *M. vanderhaegei*, *P. williamsi*) se observa células aplanadas desprendidas de la capa descamante, llamadas queratinocitos (siguiendo la definición de otros autores), aunque los epitelios estudiados sean claramente no queratinizados.

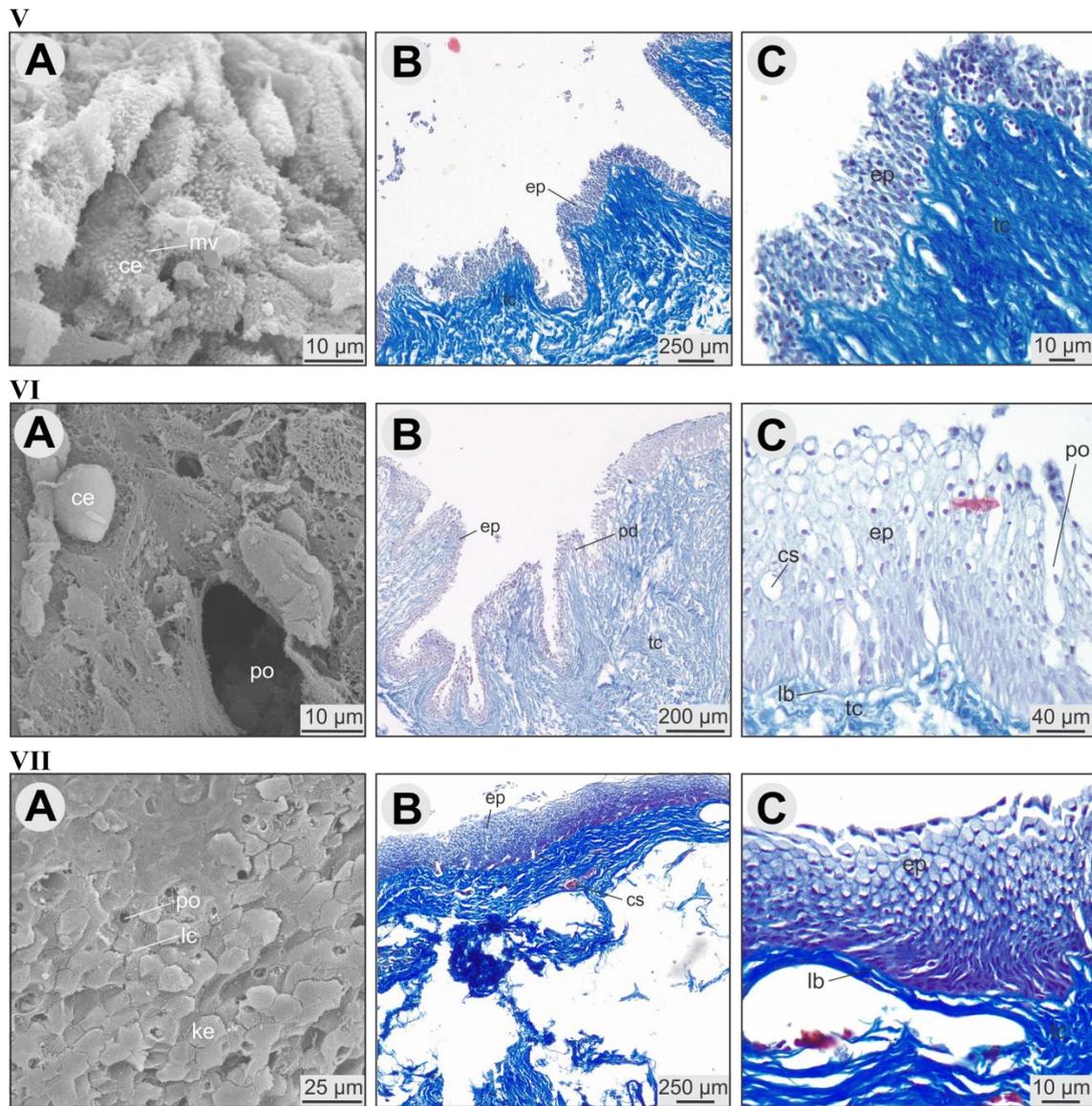
*MO*: La observación de los cortes histológicos al MO muestra que el epitelio de las especies estudiadas es estratificado, no queratinizado, con células mayormente cuboidales o columnares en algunos casos, que se aplanan hacia la capa más externa (capa descamante) y una lámina propia de tejido conectivo, que puede ser más o menos laxo en diferentes especies, el cual normalmente presenta prolongaciones hacia el epitelio en forma de papilas dérmicas (Figs. 3.3.37 C-G, 3.3.38 B-C, 3.3.39 B-C). Dicha lámina propia presenta los elementos característicos de un tejido conectivo, como capilares sanguíneos, fibras colágenas y fibroblastos. En *M. vanderhaegei* y *P. hylarii* el epitelio presenta capilares sanguíneos (Figs. 3.3.38 IV C, 3.3.39 VI C), característica que se ha relacionado, en otras tortugas de agua dulce, con el intercambio gaseoso durante los periodos de hibernación (Iwasaki *et al.*, 2019). En ninguna de las especies estudiadas se observaron cromatóforos de algún tipo, estructuras sensitivas evidentes, glándulas dérmicas, ni células epiteliales mucosas de tipo caliciforme u otro tipo de célula secretora.



**Figura 3.3.37.** Vistas de la microanatomía y la histología de la lengua de todas las especies con distribución en Argentina. I: *Acanthochelys pallidipectoris*, II: *Acanthochelys spixii*, III: *Hydromedusa tectifera*, IV: *Mesoclemmys vanderhaegei*, V: *Phrynops geoffroanus*, VI: *Phrynops hilarii*, VII: *Phrynops williamsi*. **A-B:** Microscopía electrónica de barrido (MEB), **C-G:** Microscopía óptica con diferentes tinciones: Tricrómico de Masson modificado (C-D), Alcian Blue (E), PAS (F), Coomassie Blue (G). El recuadro en **A** indica la región ampliificada que se muestra en B.



**Figura 3.3.38.** Detalle de estructuras según MEB (A) y MO (B-C) con la tinción de Tricrómico de Masson modificado (TMM) para las especies *A. pallidipectoris* (I), *A. spixii* (II), *H. tectifera* (III), *M. vanderhaegei* (IV). **ep:** epitelio, **tc:** tejido conectivo, **cs:** capilar sanguíneo, **ci:** cilios, **cr:** cráter, **ke:** queratinocito, **lb:** lámina basal, **pd:** papila dérmica, **mu:** músculo, **hy:** cartilago hipogloso, **fb:** fibroblasto, **lc:** límite celular, **po:** poro.



**Figura 3.3.39.** Detalle de estructuras según MEB (A) y MO (B-C) con la tinción de Tricrómico de Masson modificado (TMM) para las especies *P. geoffroanus* (V), *P. hilarii* (VI), *P. williamsi* (VII). **ep:** epitelio, **tc:** tejido conectivo, **cs:** capilar sanguíneo, **lb:** lámina basal, **ke:** queratinocito, **pd:** papila dérmica, **ce:** célula, **lc:** límite celular, **po:** poro, **mv:** microvellosidades.

### 3.4. Discusión y conclusiones

El objetivo principal de este segmento del presente trabajo de tesis es la generación de conocimiento basado en diferentes fuentes de información morfológica de las especies actuales del clado Chelidae con distribución en Argentina. A este efecto, se escogieron de manera exploratoria dos aspectos de la morfología: la osteología craneana y la histología y microanatomía de la lengua. Cabe destacar que si bien existen trabajos previos realizados en quélidos tanto sobre la osteología craneana como la ultraestructura lingual, los mismos son escasos y ninguno de ellos se focalizó en un grupo con una distribución regional en particular. Por último, el objetivo final de estas descripciones es la búsqueda de potenciales nuevas fuentes de variación, que puedan aportar información filogenéticamente codificable y útil. En este sentido, el trabajo realizado representa un esfuerzo inicial que debe ser profundizado tanto en el muestreo taxonómico como en las regiones o estructuras anatómicas exploradas, así como las técnicas científicas utilizadas para llevar adelante dicho objetivo.

#### 3.4.1 Osteología craneana y aportes de información cladística

El primer trabajo de descripciones craneanas en quélidos, que se tradujo en información cladística, y su resultante hipótesis filogenética, fue el de Gaffney (1977). Este trabajo incluyó un total de siete taxones, representando a siete géneros diferentes, y un total de 26 caracteres craneanos más siete caracteres de postcráneo. Posteriormente se realizaron contribuciones que, a pesar de incluir especies de quélidos, los objetivos principales estaban más relacionados con la obtención de filogenias más inclusivas o a niveles taxonómicos superiores, principalmente el orden Testudines (*e.g.*, Gaffney & Meylan, 1988; Gaffney, 1991, Shaffer *et al.*, 1997). Sin embargo, si se pone el foco en los trabajos posteriores a Gaffney (1977) que retomaron el objetivo específico de analizar las relaciones filogenéticas dentro del clado Chelidae (o Pan-Chelidae cuando se incluyeron especies extintas del “stem-group” Chelidae), surgen una serie de aportes que fueron reciclando y reanalizando datos morfológicos generados en trabajos previos, así como produciendo datos nuevos. La tabla 3.4.1 y la figura 3.4.1 dan cuenta de esta cronología, a partir de la cual puede observarse que, en general, el aporte de nuevos caracteres morfológicos en este grupo ha sido escaso en comparación con el uso y modificación de caracteres heredados, y en particular, esa relación se hace más contrastante si se toman en cuenta solo los caracteres de la morfología craneana. Esta situación puede estar relacionada a que la mayor parte de estos aportes provienen de la paleontología, en donde no siempre se cuenta con cráneos lo suficientemente completos como para posibilitar el hallazgo de nuevos caracteres útiles desde un punto de vista cladístico.

En este proceso, Bona & de la Fuente (2005) presentan una nueva filogenia morfológica para Chelidae, basada en una matriz constituida por 13 taxones (11 quélidos) y 37 caracteres (14 de cráneo y 23 de postcráneo). De los 37 caracteres que forman parte de este estudio 11 fueron tomados sin modificar y tres tomados con modificación de Gaffney (1977), un carácter fue tomado sin modificación de Shaffer *et al.* (1997), tres caracteres más fueron tomados con modificación de Lapparent de Broin & Murelaga (1999) y se incluyeron 19 nuevos caracteres (tres de cráneo y 16 de postcráneo) (Tabla 3.4.1, Fig. 3.4.1).

Posteriormente, en el año 2015 de la Fuente y colaboradores presentan un aporte, en el que describen nuevos restos de la especie extinta *Yaminuechelys maior* (Staesche, 1929) y realizan un nuevo análisis filogenético para Chelidae basado en 14 taxones (12 quélidos),

retomando la matriz de datos morfológicos de Bona & de la Fuente (2005), la cual modifican eliminando un carácter y agregando cuatro nuevos caracteres de postcráneo (Tabla 3.4.1, Fig. 3.4.1).

En el año 2017 se publican dos trabajos (de la Fuente *et al.*, 2017a; de la Fuente *et al.*, 2017b) que continúan con la metodología de presentar nuevos hallazgos paleontológicos relevantes en el grupo (restos pertenecientes a *Mendozachelys wichmanni* y *Rionegrochelys caldieroii*, respectivamente) y realizar nuevos análisis filogenéticos basados en matrices previas. En el primer caso, el análisis consistió de 18 taxones (15 quélidos) y 61 caracteres de una matriz construida íntegramente con caracteres previamente publicados (Gaffney, 1977; de la Fuente, 2003; Bona & de la Fuente, 2005; Cadena Rueda & Gaffney, 2005; Joyce, 2007; Cadena *et al.*, 2008 y Thomson & Georges, 2009), en tanto que en el segundo caso el análisis consistió de 22 taxones (18 quélidos) y 62 caracteres (61 caracteres tomados de de la Fuente *et al.*, 2017a y un carácter nuevo) (Tabla 3.4.1, Fig. 3.4.1).

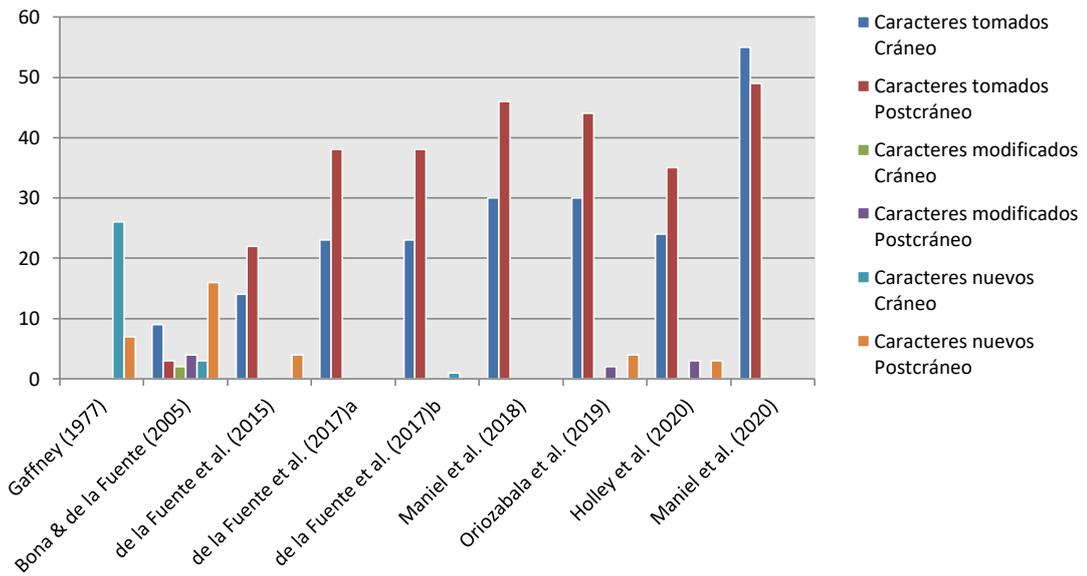
En el año 2018, Maniel *et al.* (2018) publican un nuevo estudio, donde presentan los restos del quélido extinto *Hydromedusa casamayorensis* y construyen una nueva matriz morfológica, basada en los caracteres presentados en dos estudios previos (Cadena, 2015; de la Fuente *et al.*, 2017a). Este estudio consistió de 26 taxones (20 quélidos) y 76 caracteres morfológicos, que como se mencionó, son el resultado del ensamblaje de caracteres previamente presentados (Tabla 3.4.1, Fig. 3.4.1).

En el siguiente año, se publican dos nuevos estudios en la temática de filogenia de Chelidae: Oriozabala *et al.* (2019) y Holley *et al.* (2020). El primero de estos estudios sigue con la línea de trabajos que se pone de manifiesto en esta sección, es decir, se describen nuevos restos fósiles de una especie de quélido (*Yaminuechelys sulcipeculiaris*) y se utilizan datos previos para realizar una reconstrucción filogenética del grupo, incluyendo la nueva especie descrita. Dicho análisis se llevó a cabo en base a una matriz morfológica constituida por 27 taxones (21 quélidos) y 80 caracteres, de los cuales, 74 fueron tomados sin modificar y dos con modificación de Maniel *et al.* (2018), y se produjeron cuatro caracteres nuevos de postcráneo. Por su parte, el estudio publicado por Holley *et al.* (2020) no presenta nuevos restos fósiles, sino que se centra en la inclusión de datos moleculares (nuevos y previamente publicados) y el análisis de estos datos, además de los datos morfológicos de manera individual y de manera combinada. La matriz morfológica utilizada en este estudio, estuvo constituida por 33 taxones (28 quélidos) y 65 caracteres, basados exclusivamente en los presentados por de la Fuente *et al.* (2017b), modificando tres caracteres y agregando tres caracteres nuevos de postcráneo (Tabla 3.4.1, Fig. 3.4.1).

El último estudio incluido en esta revisión es el correspondiente a Maniel *et al.* (2020), en el cual se describen nuevos restos de la especie extinta *Prochelidella buitrreraensis* y se incluye un análisis filogenético a partir de una matriz morfológica con 31 taxones (25 quélidos) y 104 caracteres provenientes en su totalidad de aportes previos (Maniel *et al.*, 2018; Ferreira *et al.*, 2018) (Tabla 3.4.1, Fig. 3.4.1).

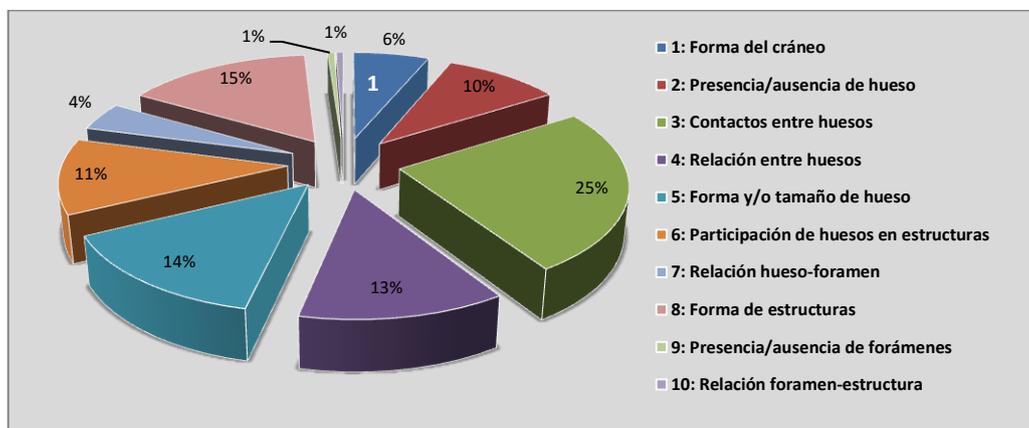
**Tabla 3.4.1.** Cronología de la generación de caracteres morfológicos y uso de los mismos de manera heredada, ya sea con o sin modificaciones, para el estudio de las relaciones filogenéticas del clado Chelidae (o Pan-Chelidae).

Estudio	N° Taxones		Caracteres tomados		Caracteres modificados		Caracteres nuevos		Total		
	Chelidae	Outgroup	Cráneo	Postcráneo	Cráneo	Postcráneo	Cráneo	Postcráneo	Cráneo	Postcráneo	Cráneo + Postcráneo
Gaffney (1977)	7	0	0	0	0	0	26	0	26	7	<b>33</b>
Bona & de la Fuente (2005)	11	2	9	3	2	4	3	16	14	23	<b>37</b>
de la Fuente <i>et al.</i> (2015)	12	2	14	22	0	0	0	4	14	26	<b>40</b>
de la Fuente <i>et al.</i> (2017)a	15	3	23	38	0	0	0	0	23	38	<b>61</b>
de la Fuente <i>et al.</i> (2017)b	18	4	23	38	0	0	1	0	24	38	<b>62</b>
Maniel <i>et al.</i> (2018)	20	6	30	46	0	0	0	0	30	46	<b>76</b>
Oriozabala <i>et al.</i> (2019)	21	6	30	44	0	2	0	4	30	50	<b>80</b>
Holley <i>et al.</i> (2020)	28	5	24	35	0	3	0	3	24	41	<b>65</b>
Maniel <i>et al.</i> (2020)	25	6	55	49	0	0	0	0	55	49	<b>104</b>



**Figura 3.4.1.** Cronología de la generación de caracteres morfológicos y uso de los mismos de manera heredada, ya sea con o sin modificaciones, para el estudio de las relaciones filogenéticas del clado Chelidae (o Pan-Chelidae).

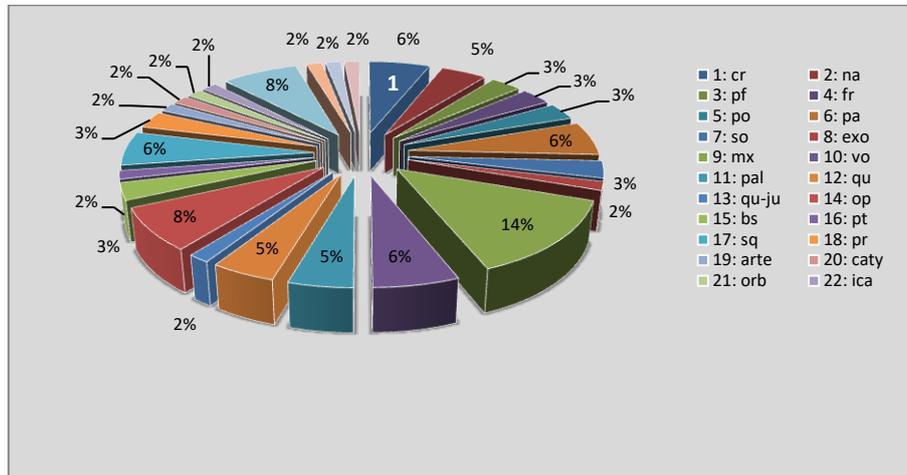
Cuando se pone el foco en los caracteres craneanos que fueron utilizados en las reconstrucciones filogenéticas previamente mencionadas, puede observarse que más de la mitad de los mismos podrían clasificarse en una de tres categorías según se basen en la búsqueda de variaciones de: **i)** los contactos entre huesos (25% de los caracteres, *e.g.*, presencia/ausencia de contacto entre el cuadrado y el basiesfenoides), **ii)** forma y/o tamaño de los huesos (14% de los caracteres, *e.g.*, porción dorsal del postorbital [grande o pequeña]) y **iii)** forma y/o tamaño de estructuras craneanas (15% de los caracteres, *e.g.*, presencia/ausencia de la extensión lateral del cavum tympani). Por otro lado, el aporte de caracteres relacionados a la presencia/ausencia de huesos, participación de huesos en la formación de estructuras o relaciones entre huesos es moderada (34%), en tanto que son escasos los aportes de caracteres relacionados a forámenes y forma general del cráneo (12%) (Fig. 3.4.2).



**Figura 3.4.2.** Proporción de caracteres craneanos utilizados en los trabajos analizados y presentados en la figura y tabla 3.4.1, cuando los mismos se ordenan en categorías de acuerdo a las características que los definen. El gráfico debe leerse en sentido horario a partir de la categoría 1 (en blanco).

Si se profundiza un poco más el análisis y se hace el recuento de los huesos y/o estructuras del cráneo que se estudiaron al momento de definir los caracteres morfológicos utilizados en

los trabajos previamente mencionados, puede observarse (razonablemente) que hay regiones, huesos y estructuras mucho más exploradas que otras, sin embargo el desbalance en proporción no es demasiado exagerado (Fig. 3.4.3). El hueso maxilar se muestra como el elemento del cráneo más estudiado (14% de los caracteres producidos), en tanto que existen varios elementos con una proporción de participación en caracteres del 2%, lo que representa el mínimo valor observado. Este porcentaje está representado por estructuras como forámenes, la incisura columella auris, la crista supraoccipitalis, las órbitas, el cavum tympani y el arco temporal; y los huesos pterigoides, exoccipital y cuadradoyugal (el cual no existe en quelidos y se utiliza como un carácter de definición outgroup/ingroup) (Fig. 3.4.3).



**Figura 3.4.3.** Huesos y estructuras exploradas en la definición de caracteres utilizados en estudios previos. Abreviaturas según se definen en la sección 3.2.1, más **cr**: cráneo, **qu-ju**: cuadrado-yugal, **arte**: arco temporal, **caty**: cavum tympani, **cs**: crista supraoccipitalis. El gráfico debe leerse en sentido horario a partir de la categoría 1 (en blanco).

En este contexto, y teniendo presente los caracteres ya definidos por otros autores, las descripciones osteológicas presentadas en este capítulo pueden servir de base en la búsqueda de nuevos caracteres craneanos. En este sentido, se ha observado que diferentes elementos del cráneo parecen exhibir diferentes niveles de variación poco explorados, que podrían aportar información cladística. Por ejemplo, los caracteres previamente definidos para el hueso nasal se basan en: **i**) su presencia/ausencia (e.g., ausente en *Chelus fimbriata* [carácter 1 en Gaffney, 1977; carácter 4 en Bona & de la Fuente, 2005; carácter 4 en de la Fuente *et al.*, 2015; carácter 2 en de la Fuente *et al.*, 2017a; carácter 2 en de la Fuente *et al.*, 2017b; carácter 1 en Maniel *et al.*, 2018; carácter 1 en Oriozabala *et al.*, 2019; carácter 2 en Maniel *et al.*, 2020; carácter 2 en Holley *et al.*, 2020]), **ii**) grado de cobertura del premaxilar (en vista dorsal) (carácter 2 en Maniel *et al.*, 2018; carácter 2 en Oriozabala *et al.*, 2019; carácter 3 en Maniel *et al.*, 2020) y **iii**) grado de separación de los nasales por el proceso anterior del frontal (carácter 3 en Gaffney, 1977; carácter 4 en Bona & de la Fuente, 2005; carácter 4 en de la Fuente *et al.*, 2015; carácter 2 en de la Fuente *et al.*, 2017a; carácter 4 en de la Fuente *et al.*, 2017b; carácter 4 en Maniel *et al.*, 2018; carácter 4 en Oriozabala *et al.*, 2019; carácter 5 en Maniel *et al.*, 2020; carácter 4 en Holley *et al.*, 2020). En la presente descripción (Fig. 3.3.8), se definen al menos dos formas de este hueso en vista dorsal (de triangular a cuadrado/rectangular) y también podría tenerse en cuenta la extensión y las características de los contactos del nasal con otros huesos. Por ejemplo: en *P. williamsi* este hueso no contacta al prefrontal, en las otras dos especies de *Phrynops* y *A. spixii* tiene un contacto reducido con el prefrontal, en *M.*

*vanderhaegei* el contacto entre estos huesos es moderado, en tanto que en *A. pallidipectoris* e *H. tectifera* el contacto es más extenso. Además, en *A. pallidipectoris* tiene un contacto medial aislado con el frontal, algo que fue previamente reportado para *H. tectifera* en el trabajo de Gaffney (1977). Con este ejemplo se muestra que tanto la forma de un hueso (o su porción expuesta) como la extensión de sus contactos con otros huesos son aspectos poco utilizados hasta ahora en la definición de caracteres y los mismos podrían aportar información cladística, algo que puede repetirse respecto de las variaciones mencionadas en cada una de las descripciones comparativas presentadas en la sección 3.3.1.2.

Respecto de la detección de posibles nuevos caracteres, referidos a huesos o estructuras no consideradas hasta el momento, el presente trabajo descriptivo aporta algunas ideas incipientes que podrían ser exploradas en un futuro con el objetivo específico de generar nuevos caracteres cladísticos. A modo de ejemplo ilustrativo, producto de este trabajo, se detecta por ejemplo una interesante variación en la fusión del hueso exoccipital y basioccipital, en el condylus occipitalis, la cual es observada en las dos especies de *Acanthochelys*, en *H. tectifera* y en *M. vanderhaegei*, pero no así en las tres especies de *Phrynops*, donde se observan suturas entre estos huesos (Fig. 3.3.30).

Otro aspecto a tener en cuenta es que todos los caracteres definidos para este grupo hasta hoy son caracteres clásicos, es decir caracteres cualitativos que se codifican en estados discretos (0, 1, 2, etc.), sin embargo existe una serie de aspectos del estudio de la anatomía (del cráneo en este caso) que podrían ser abordadas con mayor precisión mediante caracteres continuos, es decir mediciones cuantitativas que provengan ya sea de la morfometría clásica o de la morfometría geométrica. En este sentido, por ejemplo se realizaron (en esta tesis) de manera exploratoria, mediciones lineales del cráneo y se registraron las proporciones del par Ancho/Largo y se obtuvieron para las especies descritas, en promedio, los siguientes resultados: *A. pallidipectoris* (0,771), *A. spixii* (0,775), *H. tectifera* (0,644), *M. vanderhaegei* (0,792), *P. geoffroanus* (0,816), *P. hilarii* (0,811) y *P. williamsi* (0,814). Sin un análisis estricto y con el solo fin de establecer el concepto antes propuesto, parece claro que estos datos muestran una estructura gradual que se respeta al menos a nivel de género: *Hydromedusa* -> *Acanthochelys* -> *Mesoclemmys* -> *Phrynops*. Así mismo, podría nombrarse como otro ejemplo el clásico carácter definido por Gaffney (1977) y luego reutilizado en estudios posteriores, que define estados para el grado de achatamiento del cráneo (sin achatamiento [*e.g.*, *Phrynops*], achatamiento moderado [*e.g.*, *Chelodina*] y extremo [*Chelus*]). El mismo puede re definirse en términos cuantitativos, simplemente mediante la medición del ángulo del borde anterior del cráneo en vista lateral, en cuyo caso los resultados para las especies estudiadas rondan los siguientes: *A. pallidipectoris* (22,84°), *A. spixii* (21,78°), *H. tectifera* (18,21°), *M. vanderhaegei* (20,36°), *P. geoffroanus* (23,32°), *P. hilarii* (32,03°) y *P. williamsi* (32,37°).

Sin duda las variaciones interespecíficas presentadas en las descripciones comparativas de la sección 3.3.1.2 deben tomarse con cautela a la hora de interpretarse como posibles caracteres cladísticos, ya que el muestreo taxonómico es muy reducido y a la luz del conflicto entre las hipótesis filogenéticas propuestas hasta el momento para este grupo de tortugas, queda claro que el cráneo podría estar fuertemente modelado por el ambiente, conduciendo a condiciones homoplásicas más que a estados de caracteres compartidos por ancestralidad común. No obstante, el trabajo realizado, así como la revisión de los estudios anatómicos

previos que redundaron en información cladística y que fueron brevemente abordados aquí, dan cuenta del abanico de posibilidades en cuanto a nuevos resultados, que pueden surgir al explorar *de novo* regiones ya estudiadas, re definir condiciones anatómicas y utilizar diferentes herramientas de estudio, como pueden ser la definición de caracteres clásicos y/o aquellos más novedosos.

### 3.4.2 Microanatomía e histología lingual

La morfología, histología, microanatomía y/o ultraestructura de la lengua de las tortugas ha sido ampliamente estudiada y se han destacado ciertas características generales, que asemejan o diferencian esta estructura funcional de la del resto de los reptiles. La misma se presenta como un órgano triangular en vista dorsal, dorsoventralmente aplanado y con un ápex en punta. Al igual que en otros reptiles, consiste de una masa voluntaria de músculos, contenida dentro de una envoltura mucosa y soportada por un esqueleto hiolingual, pero a diferencia de la lengua de otros reptiles, su forma general no es adaptable (como en serpientes y lagartos) y su movilidad es reducida a causa de un pobre desarrollo de la musculatura intrínseca, donde las tortugas terrestres presentan el mayor grado de complejidad de estos músculos (Iwasaki *et al.*, 2019 y papers allí citados).

En lo referido específicamente a descripciones de la mucosa lingual mediante técnicas de histología y/o microanatomía y microscopía, la mayoría de los trabajos se han realizado sobre especies criptodiras, ya sean terrestres o acuáticas, y en general se trata de descripciones basadas en una sola especie (*e.g.*, Beisser *et al.*, 2004; Beisser *et al.*, 1998; Iwasaki, 1992; Iwasaki *et al.*, 1992; Iwasaki *et al.*, 1996a; Iwasaki *et al.*, 1996b; Iwasaki *et al.*, 1996c; Lintner *et al.*, 2012). En general, el grado de desarrollo de la lengua en estas tortugas es muy importante, en comparación con el que presentan las especies pleurodiras. Si bien la presencia de epitelio queratinizado, abundancia de papilas sensitivas y un notorio desarrollo muscular intrínseco son características que definen la lengua de las especies terrestres, las especies criptodiras acuáticas o semiacuáticas mantienen varias de estas cualidades, aunque la musculatura presenta cierta reducción, relacionada a la baja movilidad y la adaptación a la alimentación por succión en el medio acuático, y el epitelio no está queratinizado (aunque existen excepciones [*e.g.*, *Trionyx cartilagineus*]).

En contraste, las especies pleurodiras han sido mucho menos estudiadas, sin embargo se ha visto que la lengua de estas tortugas presentan un menor grado de desarrollo que las criptodiras que habitan ambientes similares, y entre las especies pleurodiras, las pertenecientes al clado Chelidae presentan el menor grado de desarrollo del orden Testudines (Winokur, 1988). Entre los escasos estudios que presentan una descripción de la mucosa bucofaríngea para quélidos, el trabajo de Beisser *et al.* (1995) constituye un aporte que puede usarse de base para comparar el trabajo realizado en esta tesis, ya que las técnicas utilizadas y los resultados alcanzados en ambos casos son comparables. Este estudio presenta una descripción de *A. pallidipectoris* que es congruente con la que se presenta aquí (dentro de una descripción general), aunque el mismo menciona la presencia de papilas gustativas que no han sido observadas en el material estudiado.

Las descripciones de la histología y la microanatomía de los quélidos actuales con distribución en Argentina, presentadas en esta sección de la tesis representan en sí mismas un

aporte valioso, ya que es el primer estudio que se realiza utilizando técnicas de microscopía electrónica y óptica, usando una amplia variedad de tinciones histológicas, sobre un grupo de especies de tortugas relacionadas tanto filogenéticamente como geográficamente. En este sentido, se hallaron rasgos compartidos y únicos entre las especies estudiadas, y además se nombran por primera vez en este grupo características raramente halladas en otras especies de tortugas acuáticas, que resultan muy interesantes desde un punto de vista adaptativo, como la presencia de vasos (capilares) sanguíneos “insertos” en el epitelio, que se ha vinculado con el intercambio gaseoso en periodos de hibernación (*Trionyx cartilagineus* [Iwasaki, *et al.* 2019]; *Pelusios castaneus* [Beisser *et al.*, 2001]), y la presencia células superficiales aplanadas, que se han definido como queratinocitos (*Heosemys grandis* [Lintner *et al.*, 2012]), a pesar de ser el epitelio de estas tortugas principalmente (y hasta el momento, totalmente) no queratinizado.

A pesar de ser estas descripciones el resultado de una indagación preliminar, las mismas son parte de un novedoso trabajo que se está realizando con la utilización de técnicas histológicas aplicadas a tejidos blandos del sistema bucofaríngeo y otros sistemas u órganos en quelidos, que representan un gran incentivo por su potencialidad implícita y la escasez de antecedentes en tortugas.

## Discusión general

El objetivo general planteado al comienzo de este trabajo de tesis doctoral, “contribuir al conocimiento general sobre la evolución de las tortugas pleurodiras...”, fue ampliamente cubierto. A efectos de cumplir con este objetivo y los objetivos más específicos, no solo se produjeron nuevas secuencias de ADN, nuevos caracteres morfológicos y nuevas descripciones detalladas, basadas en enfoques novedosos sobre la osteología craneana y la histología y microanatomía de los quélidos, sino que la búsqueda de explicaciones integrales sobre la evolución del grupo se llevó a cabo a través de un riguroso esfuerzo metodológico, cuantitativo y estadístico, donde hubo instancias de evaluación de los resultados en cada etapa. Dicho esfuerzo es destacable en más de un aspecto, ya que desde los primeros trabajos publicados, que han tratado el tema de las relaciones filogenéticas del clado Chelidae y su estructura taxonómica, a la fecha, muchos especialistas (a pesar de su enorme conocimiento) han proporcionado explicaciones parciales o sesgadas por la naturaleza de los datos analizados en cada caso. En este sentido, los resultados aquí presentados realzan la importancia de tres aspectos fundamentales, que deberían ser tenidos en cuenta al introducirse en el estudio sobre la historia evolutiva de un grupo: **i)** inclusión y evaluación de más de una fuente de información (*e.g.*, morfología y moléculas), **ii)** aplicación y evaluación de al menos dos métodos de inferencia filogenética (*e.g.*, Máxima Parsimonia e Inferencia Bayesiana) y **iii)** estimación y evaluación del marco temporal que acompaña la estructura de relaciones evolutivas obtenida, incluyendo la información proveniente de especies extintas de manera directa (incluyéndolas en las matrices de datos) o de manera indirecta (calibración de la edad de nodos internos).

## Consideraciones finales

### Relaciones filogenéticas, marco temporal y la evolución del cuello largo

A pesar de que la mayoría de los análisis filogenéticos realizados hasta la fecha, sobre la base de datos morfológicos han resultado en el agrupamiento de los quélidos de cuello largo, más de una vez este esquema ha sido cuestionado o puesto en duda, como un modelo evolutivo razonable para Chelidae, por los propios autores de los estudios donde se presentaron este tipo de resultados, en algunos casos cuestionando los caracteres que producían el agrupamiento (*e.g.*, Maniel *et al.*, 2018), en otros explorando la opción de forzar la topología morfológica hacia la estructura de la topología molecular para esbozar una explicación de los resultados basados en ella (*e.g.*, Maniel & de la Fuente, 2016; de la Fuente 2017a; Maniel *et al.*, 2018, Ferreira *et al.*, 2018), y en otros casos sencillamente explorando las fuentes de variación morfológica que se ajustan mejor a la estructura de la topología molecular que a la morfológica (*e.g.*, Winkler, 2006; Sánchez-Villagra *et al.*, 2007; Wilson & Sánchez-Villagra, 2011).

En este sentido, y a la luz de resultados recientes (de la Fuente *et al.*, 2017a; Holley *et al.*, 2020; Maniel *et al.*, 2020), incluyendo la topología morfológica obtenida aquí, parece claro que a medida que se aumenta el muestreo taxonómico y de caracteres, el agrupamiento de todos los quélidos de cuello largo en un mismo clado no es recuperado siempre. Si esto además, se complementa con exploraciones en lo metodológico (*e.g.*, uso de pesos implicados bajo diferentes esquemas de análisis o diferentes métodos de inferencia filogenética) y la

evaluación de los caracteres (*e.g.*, test de homoplasia), crece la probabilidad de obtener una topología morfológica con un alto grado de similitud global con respecto a la topología molecular (*i.e.*, obtención de los grupos geográficos como monofiléticos).

Por otro lado, la estructura general de la hipótesis filogenética molecular encuentra sustento como una explicación más razonable para la evolución de este grupo, en diversas e independientes evidencias:

**Contundencia de los datos:** estadísticamente hablando el volumen de datos que soporta la hipótesis morfológica representa, en casi todos los análisis hasta la actualidad, aproximadamente entre el 0,5% y el 1% del volumen total de datos que soportan la hipótesis filogenética molecular, considerando diferentes set de datos presentados en diferentes estudios.

**Linajes fantasma:** en la topología morfológica aquí obtenida, el nodo de origen del clado Chelidae representa una divergencia entre el clado de quelidos australasiáticos de cuello corto y el clado que contiene a todos los quelidos sudamericanos más *Chelodina* (Fig. 2.3.1). Dado que esta divergencia fue datada en 139,3 maap y el origen del clado de quelidos australasiáticos de cuello corto fue datado en 54,9 maap, existe aquí un primer un linaje fantasma de 84,4 millones de años (Fig. 2.3.1). De manera similar, el clado de quelidos sudamericanos de cuello corto, diverge del clado de quelidos de cuello largo (*Hydromedusa*, *Yaminuechelys* y *Chelodina*) a los 106,8 maap, sin embargo el mismo comienza a diversificarse a los 43,5 maap, este es un segundo linaje fantasma de aproximadamente 61 millones de años. Lo mismo ocurre con el clado de quelidos de cuello largo, donde *Hydromedusa* y *Chelodina* muestran linajes fantasma de al menos 25 millones de años cada uno, con el agravante de que estos taxones se encuentran en la posición más derivada del árbol, sugiriendo que el cuello largo es la “última” novedad evolutiva del grupo. Por otro lado, en la estructura de la topología molecular (o de Evidencia Total) (Fig. 2.3.2—2.3.3), en el clado sudamericano los quelidos de cuello largo (*Hydromedusa* + *Yaminuechelys*) se encuentran en la base del clado, donde el trayecto hacia las especies actuales de cuello corto, está completo con numerosos eventos de diversificación, lo que también ocurre dentro del género *Chelodina*, en el clado australasiático.

**Marco temporal y tasas evolutivas:** en general, cuando los datos filogenéticos y los datos temporales tienen un buen ajuste, (1) se observan divergencias más espaciadas hacia la raíz del árbol y más frecuentes hacia los terminales del árbol, en un proceso que tiene un sustento biológico e intuitivo (autocorrelación de tasas evolutivas); o (2) se observan eventos de diversificación regularmente espaciados, dando cuenta de cierta estacionalidad a lo largo de todo el árbol (tasas no correlacionadas). Por otro lado, cuando el ajuste entre la topología, la información temporal y las tasas de cambio no es bueno, se produce un artefacto en las estimaciones de los tiempos de divergencia (autocorrelación negativa), donde se acumulan divergencias sobre la base del árbol y se producen largas ramas hacia los terminales (Drummond *et al.*, 2006; Ho & Duchêne, 2014; Ho *et al.*, 2015). La estructura de la topología Morfológica induce este último efecto, razón por la cual (probablemente) las estimaciones de los tiempos de divergencia obtenidas a partir de ésta, fueron las que tuvieron la menor correlación estadística con las estimaciones realizadas a partir de toda la evidencia.

**Convergencia evolutiva versus sinapomorfía:** la convergencia evolutiva en el largo del cuello y la forma del cráneo (estructuras claramente dependientes), modelada por similitudes en los mecanismos de alimentación, es altamente probable como fue demostrado por Pritchard

(1984), quien categorizó a todas las tortugas piscívoras según tres estrategias de caza diferentes: (1) por señuelo, (2) por arrastre y filtrado y (3) por arponeo. El resultado de este estudio demostró que *Chelus fimbriata* se encuentra en el grupo 2 (alimentación por arrastre y filtrado), en tanto que las especies de los géneros *Chelodina* e *Hydromedusa* se encuentran en el grupo 3 (caza por arponeo) junto con otras especies actuales pertenecientes a Cryptodira (*Chelydra serpentina*, *Chitra indica* y las especies del género *Deirochelys*), lo cual sugiere que muchas de las modificaciones anatómicas presentes en estos géneros de cuello largo de Chelidae han surgido también independientemente en especies muy lejanamente relacionadas, e inclusive son condiciones exhibidas en tortugas basales como *Glyptops plicatulus* del Jurásico Tardío (Pritchard, 1984). Además, el mismo estudio aporta valiosas correlaciones con información ecológica y analiza críticamente la filogenia de Gaffney (1977). Según Pritchard (1984), muchos de los caracteres de la filogenia de Gaffney (1977), interpretados como sinapomorfías (e.g., cráneo achatado y elongado, reducción de la cobertura del techo del cráneo, poca distancia interorbital) del clado de quelídeos de cuello largo, son compartidos por todas las especies que se alimentan de peces por arponeo (grupo 3) y no parecen tener validez taxonómica por arriba del nivel de género. Además, sugiere que la pérdida del arco post temporal en *Chelodina* y su presencia en *Chelus* e *Hydromedusa*, es una fuerte evidencia de que los cráneos especializados hacia la piscivoría evolucionaron independientemente entre *Hydromedusa* y *Chelodina*.

### **Interpretación paleobiogeográfica**

En cuanto al escenario paleobiogeográfico, que puede ser interpretado a partir de los resultados filogenéticos y de reloj molecular aquí obtenidos, en particular los que están relacionados a la topología de Evidencia Total, puede inferirse un origen sudamericano del grupo. Esta interpretación se basa principalmente en dos aspectos de dicha topología y sus tiempos de divergencia: **i)** la presencia del clado de especies sudamericanas extintas de cuello corto (*stem group* Chelidae), surgido a fines del Jurásico, que comenzó a diversificarse a principios del Cretácico, donde uno de sus linajes dió origen al clado Chelidae (Fig. 2.3.3); **ii)** el origen del clado sudamericano, estimado como más antiguo (109,7 maap) que el origen del clado australasiático (101,7 maap) (Fig. 2.3.3). En base a esta evidencia, puede hipotetizarse que el clado Chelidae se habría originado en Sudamérica, a mediados del Cretácico Temprano, y posteriormente se habría dispersado hasta Australia, vía Antártida, en el lapso de tiempo entre el origen de Chelidae y el origen del clado sudamericano (13,5 ma). Luego, para el momento en que comienza a diversificarse el clado australasiático, a fines del Cretácico Temprano (101,7 maap), probablemente ambos grupos geográficos ya se encontraban aislados por algún evento vicariante, posiblemente atribuible a los cambios fisonómicos de Gondwana luego de la separación de India (130 maap) (Powell *et al.*, 1988; Brown *et al.*, 2006), posteriormente el comienzo de la separación entre Sudamérica y África (Nürnberg & Müller, 1991; Granot & Dymont, 2015), el gradual enfriamiento de Antártida, debido a su migración a latitudes más polares (100 maap) (van Hinsbergen *et al.*, 2015; Nicholson *et al.*, 2016), y más tarde la apertura del mar de Tasmania (90 maap) (Gaina *et al.*, 1998). Esta interpretación es contrapuesta al análisis presentado por Ferreira *et al.* (2018), quienes sugieren un origen australiano del clado Chelidae y posterior dispersión a Sudamérica. Sin embargo, ese resultado se basa en una topología morfológica, y en el mismo estudio re interpretan sus resultados

forzando una “topología molecular”, arribando a conclusiones similares a las recién explicadas aquí.

## Conclusiones

Con el soporte de todo el trabajo realizado a lo largo de esta tesis doctoral, y en función de las hipótesis inicialmente planteadas, se arribó a las siguientes conclusiones generales:

1. El clado Chelidae es un grupo monofilético, integrado por dos grupos geográficos, uno perteneciente a Australasia y otro perteneciente a Sudamérica, el cual habría tenido su origen a mediados del Cretácico Temprano (123,2 maap).
2. La presencia de un clado basal al clado Chelidae (*stem group*), integrado exclusivamente por especies sudamericanas extintas de cuello corto y la diversificación temprana del clado sudamericano, respecto del clado australasiático, sugieren que el origen biogeográfico del grupo se habría producido en Sudamérica.
3. El clado sudamericano habría comenzado a diversificarse a fines del Cretácico Temprano (109,7 maap) y el clado australasiático durante el límite Cretácico Temprano—Tardío (101,7 maap).
4. El cuello largo habría surgido independientemente en el clado sudamericano durante el Cretácico Tardío (93,2 maap) y en el clado australasiático a comienzos del Paleógeno (65,26 maap).
5. Las diversificaciones más recientes que dieron origen a las especies que integran los géneros actuales, en ambos grupos geográficos, se habrían producido posteriormente a la ruptura final del sur de Gondwana (50—35 maap).

## Literatura citada

- Abbate, F., Latella, G., Montalbano, G., Guerrero, M.C., Levanti, M.B. & Ciriaco, E. (2008). Scanning electron microscopical study of the lingual epithelium of green iguana (*Iguana iguana*). *Anatomia, histologia, embryologia*, 37(4), 314-316.
- Albrecht, P.W. (1967). The cranial arteries and cranial arterial foramina of the turtle genera *Chrysemys*, *Sternotherus*, and *Trionyx*: a comparative study with analysis of possible evolutionary implications. *Tulane Studies in Zoology*, 14(3), 81-99.
- Albrecht, P.W. (1976). The cranial arteries of turtles and their evolutionary significance. *Journal of Morphology*, 149(2), 159-182.
- Alcalde, L., Derocco, N.N. & Rosset, S.D. (2010). Feeding in syntopy: diet of *Hydromedusa tectifera* and *Phrynops hilarii* (Chelidae). *Chelonian Conservation and Biology*, 9(1), 33-44.
- Alibardi, L. (1999). Keratohyalin-like granules in embryonic and regenerating epidermis of lizards and *Sphenodon punctatus* (Reptilia, Lepidosauria). *Amphibia-Reptilia*, 20(1), 11-23.
- Aljanabi, S.M. & Martinez I. (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25, 4692-4693.
- Arevalo, E.S., Davis, S.K. & Sites, J.W. (1994). Mitochondrial DNA sequence divergence and phylogenetic relationships among eight chromosome races of the *Sceloporus grammicus* complex (Phrynosomatidae) in central Mexico. *Systematic Biology*, 43, 387-418.
- Avise, J.C. (1994). Molecular tools. In *Molecular markers, natural history and evolution* (pp. 44-91). Springer, Boston, MA.
- Baldo, J.D., Martinez, P., Boeris, J.M. & Giraud, A.R. (2007). Reptilia, Chelonii, Chelidae, *Phrynops geoffroanus* Schweigger, 1812 and *Mesoclemmys vanderhaegei* (Bour, 1973): Distribution extension, new country record, and new province records in Argentina. *Check List* 3, 348-352.
- Bardet, N., Falconnet, J., Fischer, V., Houssaye, A., Jouve, S., Suberbiola, Pereda, X., Pérez-García, A., Rage, J. & Vincent, P. (2014). Mesozoic marine reptile palaeobiogeography in response to drifting plates. *Gondwana Research*, 26(3-4), 869-887.
- Beisser, C.J., Lemell, P. & Weisgram, J. (2001). Light and transmission electron microscopy of the dorsal lingual epithelium of *Pelusios castaneus* (Pleurodira, Chelidae) with special respect to its feeding mechanics. *Tissue and Cell*, 33(1), 63-71.
- Beisser, C.J., Lemell, P. & Weisgram, J. (2004). The dorsal lingual epithelium of *Rhinoclemmys pulcherrima incisa* (Chelonia, Cryptodira). *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 277(1), 227-235.
- Beisser, C.J., Weisgram, J. & Splecht, H. (1995). Dorsal lingual epithelium of *Platemys pallidipectoris* (Pleurodira, Chelidae). *Journal of morphology*, 226(3), 267-276.
- Beisser, C.J., Weisgram, J., Hilgers, H. & Splecht, H. (1998). Fine structure of the dorsal lingual epithelium of *Trachemys scripta elegans* (Chelonia: Emydidae). *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 250(2), 127-135.

- Bels, V.L., Davenport, J. & Delheusy, V. (1997). Kinematic analysis of the feeding behavior in the box turtle *Terrapene carolina* (L.), (Reptilia: Emydidae). *Journal of Experimental Zoology*, 277(3), 198-212.
- Bista, B. & Valenzuela, N. (2020). Turtle insights into the evolution of the reptilian karyotype and the genomic architecture of sex determination. *Genes*, 11(4), 416.
- Bona, P. & De La Fuente, M.S. (2005). Phylogenetic and paleobiogeographic implications of *Yaminuechelys maior* (Staesche, 1929) new comb., a large long-necked chelid turtle from the early Paleocene of Patagonia, Argentina. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 25(3), 569-582.
- Bonin, F., Devaux, B. & Dupré, A. (2006). *Turtles of the World*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland, USA, 416 pp.
- Bouckaert, R.R., Heled, J., Kuehnert, D., Vaughan, T.G., Wu, C.H., Xie, D., Suchard, M.A., Rambaut, A. & Drummond A.J. (2014). BEAST2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS computational biology*, 10(4), e1003537.
- Boulenger, G.A. (1889). Catalogue of the chelonians, rynchocephalians and crocodiles in the British Museum (Natural History). London printed by order of the Trustees of the *British Museum (Natural History)*, 311 pp.
- Bour, R. & Zaher, H. (2005). A new species of *Mesoclemmys*, from the open formations of northeastern Brazil (Chelonii, Chelidae). *Papeis Avulsos de Zoologia*, 45(24), 295–311.
- Bour, R. (1973). Contribution a la connaissance de *Phrynops nasutus* (Schweigger: 1812) et *Phrynops tuberculatus* (Luederwaldt: 1926). Description d'une nouvelle sous-espece originaire du Paraguay, *Phrynops tuberculatus vanderhaegei* (Testudinata, Pleurodira, Chelidae). *Bulletin of the Zoological Society of France*, 98, 175-190.
- Bour, R., & Pauler, I. (1987). Identité de *Phrynops vanderhaegei* Bour 1973 et des espèces affines. *Mésogée*, 47, 3–23.
- Britten, R.J. (1986). Rates of DNA sequence evolution differ between taxonomic groups. *Science*, 231(4744), 1393-1398.
- Broin, F. & de la Fuente, M.S. (1993). Les tortues fossiles d'Argentine: synthèse. *Annales de Paléontologie*, 79(3), 169-232.
- Brown, B., Gaina, C. & Müller, R.D. (2006). Circum–Antarctic palaeobathymetry: Illustrated examples from Cenozoic to recent times. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 231(1-2), 158-168.
- Bull, J.J. & Legler, J.M. (1980). Karyotypes of side-necked turtles (Testudines: Pleurodira). *Canadian Journal of Zoology*, 58(5), 828-841.
- Burbidge, A.A., Kirsch, J.A., & Main, A.R. (1974). Relationships within the Chelidae (Testudines: Pleurodira) of Australia and New Guinea. *Copeia*, 392-409.
- Cadena Rueda, E.A. & Gaffney, E.S. (2005). *Notoemys zapatocaensis*, a new side-necked turtle (Pleurodira: Platycheilyidae) from the Early Cretaceous of Colombia. *American Museum Novitates*, 2005(3470), 1-19.

- Cadena, E. (2015). A global phylogeny of Pelomedusoides turtles with new material of *Neochelys franzeni* Schleich, 1993 (Testudines, Podocnemididae) from the middle Eocene, Messel Pit of Germany. *PeerJ*, 3, e1221.
- Cadena, E.A., Jaramillo, C.A., Paramo, M.E. (2008). New material of *Chelus colombiana* (Testudines; Pleurodira) from the lower Miocene of Colombia. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 28, 1206e1212.
- Cajade, R., Marangoni, F., Piñeiro, J.M. & Álvarez, B.B. (2014). Confirmación de la presencia de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudines, Chelidae) en la provincia de Misiones, Argentina. *Cuadernos de herpetología*, 28.
- Camin, J.H. & Sokal, R.R. (1965). A method for deducing branching sequences in phylogeny. *Evolution*, 311-326.
- Cann, J. (1998). Australian freshwater turtles. *Beaumont Publishing*, Singapore, Malaysia
- Cann, J., & Legler, J.M. (1994). The Mary River tortoise: a new genus and species of short-necked chelid from Queensland, Australia (Testudines: Pleurodira). *Chelonian Conservation and Biology*, 1(2).
- Cogger, H.G. (1975). Reptiles and amphibians of Australia. A.H. & A.W. Reed, Sidney, Australia.
- Cope, E. D. (1869). Seventh contribution to the herpetology of tropical America. *Proceedings of the American Philosophical Society*, 11(81), 147–192.
- Crawford, N.G., Parham, J.F., Sellas, A.B., Faircloth, B.C., Glenn, T.C., Papenfuss, T.J. & Simison, W. B. (2015). A phylogenomic analysis of turtles. *Molecular phylogenetics and evolution*, 83, 250-257.
- Darwin, C. (1859). On the origin of species by means of natural selection, or preservation of favoured races in the struggle for life. *Murray. J. van Wyhe (Ed. 2002-), The complete work of Charles Darwin online. <http://darwinonline.org.uk>*.
- de la Fuente, M.S., 2003. Two new pleurodiran turtles from the Portezuelo Formation (Upper Cretaceous) of northern Patagonia, Argentina. *Journal of Paleontology*, 77, 559e575.
- de la Fuente, M.S., Maniel, I., Jannello, J. M., Sterli, J., Riga, B. G., & Novas, F. (2017a). A new large panchelid turtle (Pleurodira) from the Loncoche Formation (upper Campanian-lower Maastrichtian) of the Mendoza Province (Argentina): Morphological, osteohistological studies, and a preliminary phylogenetic analysis. *Cretaceous Research*, 69, 147-168.
- de la Fuente, M.S., Maniel, I.J., Jannello, J.M., Filippi, L.S. & Cerda, I. (2015). Long-necked chelid turtles from the Campanian of northwestern Patagonia with comments on K/P survivorship of the genus *Yaminuechelys*. *Comptes Rendus Palevol*, 14(6-7), 563-576.
- de la Fuente, M.S., Maniel, I.J., Jannello, J.M., Sterli, J., Garrido, A.C., García, R.A., Salgado, L. & Bolatti, R. (2017b). Unusual shell anatomy and osteohistology in a new Late Cretaceous panchelid turtle from northwestern Patagonia, Argentina. *Acta Palaeontologica Polonica*, 62(3), 585–601.
- de la Fuente, M.S., Sterli, J. & Maniel, I. (2013). Origin, Evolution and Biogeographic History of South American Turtles. *Springer Earth System Sciences, Dordrecht and Heidelberg*.
- de la Fuente, M.S., Umazano, A.M., Sterli, J. & Carballido, J.L. (2011). New chelid turtles of the lower section of the Cerro Barcino Formation (Aptian–Albian?), Patagonia, Argentina. *Cretaceous Research*, 32, 527–537.

- de Vienne, D.M., Giraud, T. & Martin, O.C. (2007). A congruence index for testing topological similarity between trees. *Bioinformatics*, 23, 3119–3124.
- Delheusy, V., Toubeau, V., Bels, L. (1994). Tongue structure and function in *Oplurus cuvieri* (Reptilia: Iguanidae). *The Anatomical Record*, 238, 263–267.
- Dilcher, D. (2000). Towards a new synthesis: major evolutionary trends in the angiosperm fossil record. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 7030–7036.
- Dornburg, A., Beaulieu, J.M., Oliver, J.C. & Near, T.J. (2011). Integrating fossil preservation biases in the selection of calibrations for molecular divergence time estimation. *Systematic Biology*, 60, 519–527.
- Drummond, A.J. & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 214.
- Drummond, A.J., Ho, S.Y.W., Phillips, M.J. & Rambaut, A. (2006). Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology*, 4, 1–12.
- 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(8), 1969–1973.
- Duméril, A.M.C. & Bibron, G. (1835). *Erpétologie Générale ou Histoire Naturelle Complète des Reptiles. Tome Second*. Paris, Roret, 680 pp.
- Dunn, O.J. (1961). Multiple comparisons among means. *Journal of the American Statistical Association*, 56, 52–64.
- Fantasia, A., Föllmi, K.B., Adatte, T., Bernárdez, E., Spangenberg, J.E. & Mattioli, E. (2018). The Toarcian oceanic anoxic event in southwestern gondwana: an example from the Andean Basin, northern Chile. *Journal of the Geological Society*, 175(6), 883–902.
- Farris, J.S. (1970). Methods for computing Wagner trees. *Systematic Biology*, 19(1), 83–92.
- Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G. & Bult, C. (1994). Testing significance of incongruence. *Cladistics*, 10:315–319.
- Felsenstein, J. (1981)a. A likelihood approach to character weighting and what it tells us about parsimony and compatibility. *Biological Journal of the Linnean Society*, 16(3), 183–196.
- Felsenstein, J. (1981)b. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17(6), 368–376.
- Felsenstein, J. (1981)c. Maximum-likelihood estimation of evolutionary trees from continuous characters. *American Journal of Human Genetics*, 25(5), 471.
- Felsenstein, J. (1985). Phylogenies and the comparative method. *American Naturalist*, 125, 1–15.
- Ferguson, M.W.J. (1981). The structure and development of the palate in *Alligator mississippiensis*. *Archives of Oral Biology*, 26(5), 427–443.
- Ferreira, G.S., Bronzati, M., Langer, M.C. & Sterli, J. (2018). Phylogeny, biogeography and diversification patterns of sidenecked turtles (Testudines: Pleurodira). *Royal Society Open Science*, 5, 171773.
- Filoramo, N.I., Schwenk, K. (2000). Ultrastructure of the lingual surface in anguimorph lizards and snakes: Evolutionary and functional implications. *American Zoologist*, 248, 1015.

- Fisher, R.A. (1912). On an absolute criterion for fitting frequency curves. *Messenger of Mathematics*, 41, 155-156.
- Freiberg, M.A. (1945). Una nueva especie de tortuga del genero *Platemys* Wagler. *Physis*, 20, 19–23.
- Fujita, M.K., Engstrom, T.N., Starkey, D.E. & Shaffer, H.B. (2004). Turtle phylogeny: insights from a novel nuclear intron. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31(3), 1031-1040.
- Gaffney ES (1972) An illustrated glossary of turtle skull nomenclature. American Museum Novitates, 2486, 1–133.
- Gaffney, E. S. (1979). Comparative cranial morphology of Recent and fossil turtles. *Bulletin of the AMNH*, 164, 2.
- Gaffney, E.S. & Meylan, P. (1988). A phylogeny of turtles; pp. 157–219 in M. J. Benton (ed.), *The Phylogeny and Classification of the Tetrapods 1: Amphibians, Reptiles, Birds. Systematics Association*, 35A. Clarendon Press, Oxford.
- Gaffney, E.S. (1977). The side-necked turtle family Chelidae: a theory of relationships using shared derived characters. American Museum Novitates, 2620, 1–28.
- Gaffney, E.S., Meylan, P.A. & Wyss, A.R. (1991). A computer assisted analysis of the relationships of the higher categories of turtles. *Cladistics*, 7(4), 313-335.
- Gaffney, E.S., Meylan, P.A., Wood, R.C., Simons, E. & De Almeida Campos, D. (2011). Evolution of the side-necked turtles: the family podocnemididae. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 350, 1–237.
- Gaffney, E.S., Tong, H. & Meylan, P.A. (2006). Evolution of the side-necked turtles: the families Bothremydidae, Euraxemydidae, and Araripemydidae. *Bulletin of the American Museum of natural History*, 2006(300), 1-698.
- Gaina, C., Müller, D.R., Royer, J.Y., Stock, J., Hardebeck, J. & Symonds, P. (1998). The tectonic history of the Tasman Sea: a puzzle with 13 pieces. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth*, 103(B6), 12413-12433.
- Gavryushkina, A., Heath, T.A., Ksepka, D.T., Stadler, T., Welch, D. & Drummond, A.J. (2016) Bayesian total evidence dating reveals the recent Crown radiation of penguins. *Systematic Biology*, 66(1), 57–73.
- Gavryushkina, A., Welch, D., Stadler, T. & Drummond, A.J. (2014) Bayesian inference of sampled ancestor trees for epidemiology and fossil calibration. *PLOS Computational Biology*, 10, e1003919.
- GBIF.org (2020) GBIF occurrence download. Available at <https://doi.org/10.15468/dl.bnqjv8>. Acceso 24 de Junio de 2020.
- Georges, A., Birrell, J., Saint, K.M., McCord, W.P. & Donnellan, S.C. (1998). A phylogeny for side-necked turtles (Chelonia: Pleurodira) based on mitochondrial and nuclear gene sequence variation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 67(2), 213-246.
- Gernhard, T. (2008) The conditioned reconstructed process. *Journal of Theoretical Biology*, 253(4), 769–778.

- Gillingham, J.C., Clark, D. L. (1981). Snake tongue-flicking: transfer mechanics Jacobson's organ. *Canadian Journal of Zoology*, 59, 1651–1657.
- Goloboff, P., Farris, J. & Nixon, K. (2008b) TNT: tree search using new technology, vers. 1.1 (Willy Hennig Society Edition). Available online: <http://www.zmuc.dk/public/phylogeny/tnt>.
- Goloboff, P.A. (1993) Estimating character weights during tree search. *Cladistics* 9, 83–91.
- Goloboff, P.A. (2014) Extended implied weighting. *Cladistics*, 30, 260–272.
- Goloboff, P.A., Farris, J.S. & Nixon, K.C. (2008a) TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics*, 24, 774–786.
- Goloboff, P.A., Torres, A. & Arias, J.S. (2018) Weighted parsimony outperforms other methods of phylogenetic inference under models appropriate for morphology. *Cladistics*, 34(4), 407–437.
- Granot, R. & Dymont, J. (2015). The Cretaceous opening of the South Atlantic Ocean. *Earth and Planetary Science Letters*, 414, 156–163.
- Gray, J.E. (1831). Synopsis Reptilium. Part 1, Cataphracta, Tortoise, Crocodiles, Enaliosaura. London: Treuttel, Wurtz. 85 pp.
- Guillon, J.M., Guéry, L., Hulin, V. & Girondot, M. (2012). A large phylogeny of turtles (Testudines) using molecular data. *Contributions to Zoology*, 81(3), 147-158j.
- Gumpenberger, M., Gemel, R., Lemell, P., Snelderwaard, P., Weisgram, J. & Beisser, C.J. (2010). The feeding apparatus of *Chelus fimbriatus* (Pleurodira; Chelidae) - adaptation perfected? *Amphibia-Reptilia*, 31(1), 97-107.
- Hahn, A.T., Rosa, C.A., Bager, A. & Krause, L. (2014). Dietary variation and overlap in D'Orbigny's slider turtles *Trachemys dorbigni* (Duméril and Bibron 1835) (Testudines: Emydidae). *Journal of Natural History*, 48(11-12), 721-728.
- Hall T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor & analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95-98.
- Halpern, M. (1980). Chemical ecology of terrestrial vertebrates. *In Animals and Environmental Fitness: Physiological and Biochemical Aspects of Adaptation and Ecology* (pp. 263-282). Pergamon.
- Heath, T.A., Huelsenbeck, J.P. & Stadler, T. (2014) The fossilized birth–death process for coherent calibration of divergence–time estimates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, E2957–E2966.
- Hennig, W. (1965). Phylogenetic systematics. Urbana, Univ. Ill. Press, 263 pp.
- Ho, S. Y., & Duchêne, S. (2014). Molecular-clock methods for estimating evolutionary rates and timescales. *Molecular Ecology*, 23(24), 5947-5965.
- Ho, S. Y., Duchêne, S., & Duchêne, D. (2015). Simulating and detecting autocorrelation of molecular evolutionary rates among lineages. *Molecular Ecology Resources*, 15(4), 688-696.
- Holley, J.A., Sterli, J. & Basso, N.G. (2020). Dating the origin and diversification of Pan-Chelidae (Testudines, Pleurodira) under multiple molecular clock approaches. *Contributions to Zoology*, 1(aop), 1-29.

- Iverson, J.B. (1992). A Revised Checklist with Distribution Maps of the Turtles of the World. Privately Printed, Richmond, In.
- Iwasaki, S. (1990). Fine structure of the lingual epithelium of the lizard *Gekko japonicus* (Lacertilia, Gekkonidae). *American Journal of Anatomy*, 187, 12–20.
- Iwasaki, S., Asami, T., Wanichanon, Ch. (1996a). Fine structure of the dorsal lingual epithelium of the juvenile hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata bissa*. *The Anatomical Record*, 244, 437–443.
- Iwasaki, S., Erdoğan, S. & Asami, T. (2019). Evolutionary Specialization of the Tongue in Vertebrates: Structure and Function. In *Feeding in vertebrates* (pp. 333-384). Springer, Cham.
- Iwasaki, S., Miyata, K. (1985). Scanning electron microscopy of the lingual dorsal surface of the Japanese lizard, *Takydromus tacydromoides*. *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 62, 15–26.
- Iwasaki, S.I. (1992). Fine structure of the dorsal epithelium of the tongue of the freshwater turtle, *Geoclemys reevesii* (Chelonia, Emydinae). *Journal of Morphology*, 211(2), 125-135.
- Iwasaki, S.I. (2002). Evolution of the structure and function of the vertebrate tongue. *Journal of anatomy*, 201(1), 1-13.
- Iwasaki, S.I., Asami, T., Asami, Y. & Kobayashi, K. (1992). Fine structure of the dorsal epithelium of the tongue of the Japanese terrapin, *Clemmys japonica* (Chelonia, Emydinae). *Archives of Histology and Cytology*, 55(3), 295-305.
- Iwasaki, S.I., Wanichanon, C. & Asami, T. (1996b). Histological and ultrastructural study of the lingual epithelium of the juvenile Pacific ridley turtle, *Lepidochelys olivacea* (Chelonia, Cheloniidae). *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 178(3), 243-250.
- Iwasaki, S.I., Wanichanon, C. & Asami, T. (1996c). Ultrastructural study of the dorsal lingual epithelium of the Asian snail-eating turtle, *Malayemys subtrijuga*. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 178(2), 145-152.
- Joyce, W.G. (2007). Phylogenetic relationships of Mesozoic turtles. *Peabody Museum Bulletin* 48, 3e102.
- Joyce, W.G. (2015). The origin of turtles: a paleontological perspective. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 324(3), 181-193.
- Joyce, W.G., Parham, J.F. & Gauthier, J.A. (2004). Developing a protocol for the conversion of rank-based taxon names to phylogenetically defined clade names, as exemplified by turtles. *Journal of Paleontology*, 78, 989-1013.
- Joyce, W.G., Parham, J.F., Lyson, T.R., Warnock, R.C. & Donoghue, P.C. (2013). A divergence dating analysis of turtles using fossil calibrations: an example of best practices. *Journal of Paleontology*, 87, 612–634.
- Joyce, W.G., Rabi, M., Clark, J.M. & Xu, X. (2016). A toothed turtle from the Late Jurassic of China and the global biogeographic history of turtles. *BMC Evolutionary Biology*, 16(1), 236.
- Kardong, K.V. & Zalisko, E.Y. (1998). Comparative vertebrate anatomy. Boston: WCB McGraw-Hill.
- Kehlmaier, C., Zhang, X., Georges, A., Campbell, P.D., Thomson, S. & Fritz, U. (2019). Mitogenomics of historical type specimens of Australasian turtles: clarification of taxonomic confusion and old mitochondrial introgression. *Scientific reports*, 9(1), 1-12.

- Kennett, R., Roe, J., Hodges, K. & Georges, A. (2009). *Chelodina longicollis* (Shaw 1784) – eastern long-necked turtle, common long-necked turtle, common snake-necked turtle. *Chelonian Conservation and Biology*, 31, 1–8.
- Kiernan, J. (1999). *Histological and histochemical methods: Theory and practice* (3rd ed., 502 p.). Oxford, UK: Butterworth Heinemann.
- Kimura, M. & Ohta, T. (1974). On some principles governing molecular evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71, 2848-28.
- Kimura, M. (1983). *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Kimura, M. (1986). DNA and the neutral theory. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 312(1154), 343-354.
- Kishino, H. & Hasegawa, M. (1990). Converting distance to time: application to human evolution. *Methods in Enzymology*, 183, 550-570.
- Kluge, A.G. & Farris, J.S. (1969). Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Systematic Biology*, 18(1), 1-32.
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villablanca, F.X. & Wilson, A.C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(16), 6196-6200.
- Krenz, J.G., Naylor, G.J., Shaffer, H.B. & Janzen, F.J. (2005). Molecular phylogenetics and evolution of turtles. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37(1), 178-191.
- Kruskal, W.H. & Wallis, W.A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American statistical Association*, 47(260), 583-621.
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S.Y. & Guindon, S. (2012) PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 29, 1695–1701.
- Lapointe, F.J. & Rissler, L.J. (2005). Consensus, congruence, and the comparative phylogeography of codistributed species in California. *American Naturalist*, 166, 290–299.
- Lapparent de Broin, F. de & de la Fuente, M.S. (2001). Oldest world Chelidae (Chelonii, Pleurodira), from the Cretaceous of Patagonia, Argentina. *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 2. Sciences de la terre et des planètes*, 333(8), 463-470.
- Lapparent de Broin, F. de & Molnar, R.E. (2001) Eocene chelid turtles from Redbank Plains, Southeast Queensland, Australia. *Geodiversitas*, 23, 41–79.
- Lapparent de Broin, F. de & Murelaga, X. (1999). Turtles from the Upper Cretaceous of Laño (Iberian Peninsula). *Estudios del Museo de Ciencias Naturales de Alava 14 (Número Especial 1)*, 135–211.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. & Higgins, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947-2948.

- Lawver, L.A., Gahagan, L.M. & Dalziel, I.W. (2011). A different look at gateways: Drake Passage and Australia/Antarctica. In: J.B. Anderson, J.S. Wellner (Eds) Tectonic, Climatic, and Cryospheric Evolution of the Antarctic Peninsula, pp. 5–33. *American Geophysical Union*. Washington, DC.
- Le, M., Reid, B.N., McCord, W.P., Naro-Maciel, E., Raxworthy, C. J., Amato, G. & Georges, A. (2013). Resolving the phylogenetic history of the short-necked turtles, genera *Elseya* and *Myuchelys* (Testudines: Chelidae) from Australia and New Guinea. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 68(2), 251-258.
- Leigh, J.W., Lapointe, F.J., Lopez, P. & Baptiste, E. (2011). Evaluating phylogenetic congruence in the post-genomic era. *Genome Biology and Evolution*, 3, 571-587.
- Lemell, P., Beisser, C.J. & Weisgram, J. (2000). Morphology and function of the feeding apparatus of *Pelusios castaneus* (Chelonia; Pleurodira). *Journal of Morphology*, 244(2), 127-135.
- Lewis, P.O. (2001). A likelihood approach to estimating phylogeny from discrete morphological character data. *Systematic Biology*, 50(6), 913-925.
- Li, W.H. (1997). *Molecular evolution*. Sinauer, Sunderland, Mass.
- Lindholm, W.A. (1929). Revidiertes Verzeichnis der Gattungen der rezenten Schildkröten nebst Notizen zur Nomenklatur einiger Arten. *Zoologischer Anzeiger*, 81:275–295.
- Lintner M., Weissenbacher A. & Heiss E. (2012). The Oropharyngeal Morphology in the Semiaquatic Giant Asian Pond Turtle, *Heosemys grandis*, and Its Evolutionary Implications. *PLoS ONE*, 7(9), e46344.
- Livermore, R., Nankivell, A., Eagles, G. & Morris, P. (2005). Paleogene opening of Drake passage. *Earth and Planetary Science Letters*, 236, 459–470.
- Lourenço, J.M., Claude, J., Galtier, N. & Chiari, Y. (2012). Dating cryptodiran nodes: origin and diversification of the turtle superfamily Testudinoidea. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62(1), 496-507.
- Lyson, T.R. & Joyce, W.G. (2012). Evolution of the turtle bauplan: the topological relationship of the scapula relative to the ribcage. *Biology letters*, 8(6), 1028-1031.
- Maddison, W. & Maddison, D. (2007). Mesquite 2. A Modular System for Evolutionary Analysis. Available online at: <http://www.mesquiteproject.org>.
- Madzia, D., Szczygielski, T. & Wolniewicz, A.S. (2021). The giant pliosaurid that wasn't—revising the marine reptiles from the Kimmeridgian, Upper Jurassic, of Krzyżanowice, Poland.
- Maniel, I.J. & de la Fuente M.S. (2016). A review of the fossil record of turtles of the clade Pan-Chelidae. *Bulletin of the Peabody Museum of Natural History*, 57(2), 191-227.
- Maniel, I.J., de la Fuente, M.S., Apesteguía, S., Mayoral, J.P., Sanchez, M.L., Veiga, G.D. & Smales, I. (2020). Cranial and postcranial remains of a new species of *Prochelandella* (Testudines: Pleurodira: Chelidae) from 'La Buitrera' (Cenomanian of Patagonia, Argentina), with comments on the monophyly of this extinct chelid genus from southern Gondwana. *Journal of Systematic Palaeontology*, 18(12), 1033-1055.

- Maniel, I.J., de la Fuente, M.S., Sterli, J., Jannello, J.M. & Krause, J.M. (2018). New remains of the aquatic turtle *Hydromedusa casamayorensis* (Pleurodira, Chelidae) from the middle Eocene of Patagonia: taxonomic validation and phylogenetic relationships. *Papers in Palaeontology*, 4(4), 537–566.
- Mao, S., Wang, J., Huang, S., Chao, C., Chen, C. (1991). Ultrastructure of the tongue and anterior process of the sublingual plica in four species of venomous snakes. *Journal of Morphology*, 208, 279–292.
- Matschiner, M., Musilová, Z., Barth, J.M., Starostová, Z., Salzburger, W., Steel, M. & Bouckaert, R. (2016) Bayesian node dating based on probabilities of fossil sampling supports Trans Atlantic dispersal of cichlid fishes. *Systematic Biology*, 66 (1), 3–22.
- Mau, B. & Newton, M.A. (1997). Phylogenetic inference for binary data on dendrograms using Markov chain Monte Carlo. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, 6(1), 122–131.
- Mazzoleni, S., Augstenová, B., Clemente, L., Auer, M., Fritz, U., Praschag, P., Protiva, T., Velenský, P., Kratochvíl, L. & Rovatsos, M. (2020). Sex is determined by XX/XY sex chromosomes in Australasian side-necked turtles (Testudines: Chelidae). *Scientific reports*, 10(1), 1–11.
- McCord, W.P., & Thomson, S.A. (2002). A new species of *Chelodina* (Testudines: Pleurodira: Chelidae) from northern Australia. *Journal of Herpetology*, 36(2), 255–267.
- McGowran, B. (1991). Maestrichtian and early Cainozoic, southern Australia: Planktonic foraminiferal biostratigraphy. In: *The Cainozoic in Australia: A Re-appraisal of the Evidence*, M. A. J. Williams, P. de Decker, and A. P. Kershaw, eds., Geol. Soc. Aust. Spec. Publ 18, 79–98.
- McGowran, B., Holdgate, G.R., Li, Q. & Gallagher, S.J. (2004). Cenozoic stratigraphic succession in southeastern Australia. *Australian Journal of Earth Sciences*, 51, 459–496.
- Merico, A., Tyrrell, T. & Wilson, P.A. (2008). Eocene/Oligocene ocean de-acidification linked to Antarctic glaciation by sea-level fall. *Nature*, 452, 979–982.
- Mirande, J.M. (2019). Morphology, molecules and the phylogeny of Characidae (Teleostei, Characiformes). *Cladistics*, 35(3), 282–300.
- Montiel, E.E., Badenhorst, D., Lee, L.S., Literman, R., Trifonov, V. & Valenzuela, N. (2016). Cytogenetic insights into the evolution of chromosomes and sex determination reveal striking homology of turtle sex chromosomes to amphibian autosomes. *Cytogenetic and genome research*, 148(4), 292–304.
- Müller, R.D., Tikku, A., Mihut, D., Gaina, C., Stock, J. & Cande, S. (1997). The 95 Ma and 61 Ma (Chron 27) Tectonic events around Australia: The Relationship between absolute and relative plate motion, abstract presented at the Chapman Conference on the History and Dynamics of Global Plate Motions, AGU, Marshall, Calif., 1997.
- Near, T.J., Meylan, P.A. & Shaffer, H.B. (2005) Assessing concordance of fossil calibration points in molecular clock studies: an example using turtles. *American Naturalist*, 165, 137–146.
- Nicholson, D.B., Holroyd, P.A., Valdes, P. & Barrett, P.M. (2016). Latitudinal diversity gradients in Mesozoic non-marine turtles. *Royal Society Open Science*, 3, 160581.
- Nürnberg, D. & Müller, R.D. (1991). The tectonic evolution of the South Atlantic from Late Jurassic to present. *Tectonophysics*, 191(1–2), 27–53.

- Oriozabala, C., Sterli, J., & de la Fuente, M.S. (2020). New species of the long-necked chelid *Yaminuechelys* from the Upper Cretaceous (Campanian–Maastrichtian) of Chubut, Argentina. *Cretaceous Research*, 106, 104197.
- Palumbi, S.R. (1996). Nucleic acids I: The polymerase chain reaction. Pages 205–247 in *Molecular Systematics*, 2nd edition (D. M. Hillis, C. Moritz, and B. K. Mable, eds.). Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- Pereira, A.G., Sterli, J., Moreira, F.R. & Schrago, C. G. (2017). Multilocus phylogeny and statistical biogeography clarify the evolutionary history of major lineages of turtles. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 113, 59-66.
- Planet, P.J. (2006). Tree disagreement: measuring and testing incongruence in phylogenies. *Journal of Biomedical Informatics*, 39(1), 86-102.
- Powell, C.M., Roots, S.R. & Veevers, J.J. (1988). Pre-breakup continental extension in East Gondwanaland and the early opening of the eastern Indian Ocean. *Tectonophysics*, 155(1–4), 261–283.
- Prado, W.S., Waller, T., Albareda, D.A., Cabrera, M.R., Etchepare, E.G., Giraudo, A.R., González Carman, V., Prosdocimi, L. & Richard, E. (2012). Categorización del estado de conservación de las tortugas de la República Argentina. *Cuadernos de herpetología*, 26.
- Pritchard, P.C.H. (1984). Piscivory in turtles, and evolution of the long-necked Chelidae. *Symposia of the Zoological Society of London*, 52, 87–110.
- Pyron, R.A. (2011). Divergence time estimation using fossils as terminal taxa and the origins of Lissamphibia. *Systematic Biology*, 60, 466–481.
- R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rambaut, A. (2012). FigTree v 1.4.
- Rambaut, A., Drummond, A.J., Xie, D., Baele, G. & Suchard, M.A. (2018). Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology* 67:901–904.
- Read, D. W. (1975). Primate phylogeny, neutral mutations, and “molecular clocks”. *Systematic Biology*, 24(2), 209-221.
- Reed, K.M., Greenbaum, I.F., Hanks, B.G., Bickham, J.W., Rhodin, A.G., Mittermeier, R.A. & Fedullo, L.P. (1991). Cytogenetic analysis of the pleurodine turtle *Phrynops hogei* and its taxonomic implications. *Amphibia Reptilia*, 12(2), 203-212.
- Revell, L.J., Harmon, L.J. & Collar, D.C. (2008). Phylogenetic signal, evolutionary process, and rate. *Systematic Biology*, 57, 591–601.
- Rhodin, A.G., Mittermeier, R.A., & McMorris, J.R. (1984). *Platemys macrocephala*, a new species of chelid turtle from central Bolivia and the Pantanal region of Brazil. *Herpetologica*, 38-46.
- Rhodin, A.G.J., & Mittermeier, R.A. (1983). Description of *Phrynops williamsi*, a new species of chelid turtle of the South American *P. geoffroanus* complex. In: RHODIN, ANDERS G.J. & MIYATA, KENNETH. (Editors). *Advances in Herpetology and Evolutionary Biology*. Essays in Honor of Ernest E. Williams. Cambridge, Massachusetts: Museum of Comparative Zoology, pp. 58–73.

- Robinson, D.F. & Foulds, L.R. (1981) Comparison of phylogenetic trees. *Mathematical Biosciences*, 53, 131–147.
- Rodrigues, J.F.M. & Diniz-Filho, J.A.F. (2016) Ecological opportunities, habitat, and past climatic fluctuations influenced the diversification of modern turtles. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 101, 352–358.
- Romano, P.S., Gallo, V., Ramos, R.R. & Antonioli, L. (2014). *Atolchelys lepida*, a new side-necked turtle from the Early Cretaceous of Brazil and the age of crown Pleurodira. *Biology Letters*, 10(7), 20140290.
- Romero-Herrera, A. E., Lieska, N., Goodman, M., & Simons, E. L. (1979). The use of amino acid sequence analysis in assessing evolution. *Biochimie*, 61(7), 767-779.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. & Huelsenbeck, J.P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3), 539-542.
- Saint, K.M., Austin, C.C., Donnellan, S.C. & Hutchinson, M.N. (1998). C-mos, a nuclear marker useful for squamate phylogenetic analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 10(2), 259-263.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425.
- Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed., pp. 6.8–6.9, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sánchez-Villagra, M.R., Winkler, J.D. & Wurst, L. (2007). Autopodial skeleton evolution in side-necked turtles (Pleurodira). *Acta Zoologica*, 88(3), 199-209.
- Sanderson, M.J. (1997). A nonparametric approach to estimating divergence times in the absence of rate constancy. *Molecular Biology and Evolution*, 14, 1218–1231.
- Schweigger, A.F. (1812). *Prodromus monographiae Cheloniorum*. *Königsberger Archiv für Naturwissenschaft und Mathematik*, 1, 271–368, 406–462.
- Scheyer, T.M. & Sánchez-Villagra, M.R. (2007). Carapace bone histology in the giant pleurodiran turtle *Stupendemys geographicus*: phylogeny and function. *Acta Palaeontologica Polonica*, 52(1).
- Seddon, J.M., Georges, A., Baverstock, P.R. & McCord, W. (1997) Phylogenetic relationships of chelid turtles (Pleurodira: Chelidae) based on mitochondrial 12S rRNA gene sequence variation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7, 55–61.
- Shaffer, H.B., Meylan, P. & Mcknight, M.L. (1997). Test of turtle phylogeny: molecular, morphological, and paleontological approaches. *Systematic Biology*, 46, 235–268.
- Silveira, E.C., Mascarenhas, C.S. & Corrêa, F. (2019). Diet of *Trachemys dorbigni* (Duméril & Bibron, 1835) (Testudines: Emydidae) in anthropic environments from southern Brazil. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 14(1), 42-50.
- Silvestro, D., Salamin, N. & Schnitzler, J. (2014) PyRate: a new program to estimate speciation and extinction rates from incomplete fossil data. *Methods in Ecology and Evolution*, 5, 1126–1131.

- Simmons, M.P. & Norton, A.P. (2013). Quantification and relative severity of inflated branch-support values generated by alternative methods: an empirical example. *Molecular phylogenetics and Evolution*, 67(1), 277-296.
- Smith, E.T. (2010). Early Cretaceous chelids from Lightning Ridge, New South Wales. *Alcheringa*, 34, 375–384.
- Sneath, P.H. & Sokal, R.R. (1973). Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification.
- Spinks, P.Q., Georges, A. & Shaffer, H.B. (2015). Phylogenetic uncertainty and taxonomic re-revisions: an example from the Australian short-necked turtles (Testudines: Chelidae). *Copeia*, 103(3), 536-540.
- Springer, M.S., Murphy, W.J. & Roca, A. L. (2018). Appropriate fossil calibrations and tree constraints uphold the Mesozoic divergence of solenodons from other extant mammals. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 121, 158-165.
- Staesche, K. (1929). Schildkrötenreste aus der oberen Kreide Patagoniens. *Paläontographica*, 72:103–112.
- Starrfelt, J. & Liow, L.H. (2016). How many dinosaur species were there? Fossil bias and true richness estimated using a Poisson sampling model (TRiPS). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 371(1691), 20150219.
- Sterli, J., De La Fuente, M.S. & Rougier, G.W. (2018). New remains of *Condorchelys antiqua* (Testudinata) from the Early-Middle Jurassic of Patagonia: anatomy, phylogeny, and pedomorphosis in the early evolution of turtles. *Journal of Vertebrate Paleontology*, 38(4), 1-17.
- Stumpf, S. (2017). A Synoptic Review of the Vertebrate Fauna from the "Green Series" (Toarcian) of Northeastern Germany with Descriptions of New Taxa: A Contribution to the Knowledge of Early Jurassic Vertebrate Palaeobiodiversity Patterns (Doctoral dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald).
- Swofford, D.L. PAUP\* version 4.02b. In: Sinauer Associates, Inc. Publishers, 1999.
- Thomson, S., Georges, A. (2009). *Myuchelys* gen. nov. a new genus for *Elseya latisternum* and related forms of Australian freshwater turtle (Testudines: Pleurodira: Chelidae). *Zootaxa*, 2053, 32e42.
- Turtle Taxonomy Working Group [Rhodin, A.G.J., Iverson, J.B., Bour, R. Fritz, U., Georges, A., Shaffer, H.B., & van Dijk, P.P.]. (2017) Turtles of the world: Annotated Checklist and Atlas of Taxonomy, Synonymy, Distribution, and Conservation Status (8th Ed.). In: A.G.J. Rhodin, J.B. Iverson, P.P. van Dijk, R.A. Saumure, K.A. Buhlmann, P.C.H. Pritchard, & R.A. Mittermeier (Eds) Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises: A Compilation Project of the IUCN/SSC Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group. Chelonian Research Monographs 7, 1–292.
- Vaidya, G., Lohman, D.J. & Meier, R. (2011). SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with carácter set and codon information. *Cladistics*, 27, 171–180.
- van Hinsbergen, D.J., de Groot, L.V., van Schaik, S.J., Spakman, W., Bijl, P.K., Sluijs, A., Langereis, C.G. & Brinkhuis, H. (2015). A paleolatitude calculator for paleoclimate studies. *PLoS ONE*, 10, e0126946.
- Vawter, A. T., Rosenblatt, R., & Gorman, G. C. (1980). Genetic divergence among fishes of the eastern Pacific and the Caribbean: support for the molecular clock. *Evolution*, 705-711.

- Vitt, L.J. & Caldwell, J.P. (2013). *Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles*. Academic press.
- Vlachos, E., Randolfe, E., Sterli, J. & Leardi, J.M. (2018). Changes in the diversity of turtles (Testudinata) in South America from the Late Triassic to the present. *Ameghiniana*, 55(6), 619–644.
- Warren, D.L., Geneva, A.J. & Lanfear, R. (2017). RWTY (R We There Yet): an R package for examining convergence of Bayesian phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 34(4), 1016-1020.
- Werneburg, I., Wilson, L.A., Parr, W.C. & Joyce, W.G. (2015). Evolution of neck vertebral shape and neck retraction at the transition to modern turtles: an integrated geometric morphometric approach. *Systematic Biology*, 64(2), 187-204.
- Wilcoxon, F. (1992). Individual comparisons by ranking methods. In *Breakthroughs in statistics* (pp. 196-202). Springer, New York, NY.
- Williston, S.W. (1917). The phylogeny and classification of reptiles. *Contrib Walker Mus* 2:61–71.
- Wilson, L.A. & Sánchez-Villagra, M.R. (2011). Evolution and phylogenetic signal of growth trajectories: the case of chelid turtles. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 316(1), 50-60.
- Winkler, J.D. (2006). Testing phylogenetic implications of eggshell characters in side-necked turtles (Testudines: Pleurodira). *Zoology*, 109(2), 127-136.
- Winokur, R.M. (1988). The buccopharyngeal mucosa of the turtles (Testudines). *Journal of Morphology*, 196(1), 33-52.
- Woodburne, M.O. & Case, J.A. (1996). Dispersal, vicariance, and the Late Cretaceous to early Tertiary land mammal biogeography from South America to Australia. *Journal of Mammalian Evolution*, 3, 121–161.
- Xu, X. & Pol, D. (2014). Archaeopteryx, paravian phylogenetic analyses, and the use of probability-based methods for palaeontological datasets. *Journal of Systematic Palaeontology*, 12(3), 323-334.
- Yang, Z. & Rannala, B. (1997). Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Markov Chain Monte Carlo method. *Molecular Biology and Evolution*, 14(7), 717-724.
- Yang, Z., (2007). PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1586–1591.
- Yule, G.U. (1925) A mathematical theory of evolution, based on the conclusions of Dr. JC Willis, FRS. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 213, 21–87.
- Zachos, J., Pagani, M., Sloan, L., Thomas, E. & Billups, K. (2001). Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. *Science*, 292, 686–693.
- Zuckerkandl, E., & Pauling, L. (1962). Molecular disease, evolution, and genetic heterogeneity, pp. 189–225 in *Horizons in Biochemistry*, edited by M. Kasha and B. Pullman. Academic Press, New York.
- Zuckerkandl, E., & Pauling, L. (1965). Evolutionary divergence and convergence in proteins, pp. 97–166 in *Evolving Genes and Proteins*, edited by V. Bryson and H. J. Vogel. Academic Press, New York.

# Apéndices

## Apéndice I: Soluciones de laboratorio

### **EDTA 0,5 M (pH 8) – 1 litro-:**

- Mezclar 186 g de EDTA con 800 ml de agua destilada.
- Ajustar el pH con NaOH (~20 ml) sólo se termina de disolver cuando se ajusta el pH.
- Utilizar agua destilada para llevar a 1 lt.
- Autoclavar.

### **EDTA salina:**

- 150 ml EDTA 0,5 M.
- 150 ml NaCl 0,5 M (PM 58,44 g).
- 200 ml agua destilada.

### **NaCl 0,5 M – para 500 ml:**

- 14,61 g NaCl.
- agua destilada hasta completar 500 ml.
- Agitar hasta disolver completamente.
- La solución se guarda a temperatura ambiente para que no se cristalice.

### **NaCl 5M:**

- Disolver 292,2 g de NaCl en 800 ml de agua destilada agitando.
- Llevar a 1 litro con agua destilada.
- La solución se guarda a temperatura ambiente para que no se cristalice.

### **SDS 20% (dodecil sulfato sódico) – para 500 ml:**

- 100 g SDS en polvo.
- llevar a 500 ml con agua destilada.
- Agitar.
- La solución se guarda a temperatura ambiente para que no se cristalice.

### **Tris-Cl 1M – para 500 ml (pH 8,0):**

- Agregar 400 ml de agua destilada a 60,57 g de Tris.
- Agregar aproximadamente 33 ml de HCl para llevar a pH >7,8.
- Completar con agua destilada.

### **Buffer TE – para 1 lt (Tris Cl 0,01 M; EDTA 0,001 M):**

- 10 ml Tris-Cl 1 M pH 8,0.
- 2 ml EDTA 0,5 M.
- Llevar a 1 litro con agua destilada.
- Una vez preparada la solución se autoclava y luego se guarda en la heladera.

**Purificación de fenol (sólido) – para 500 g de fenol:**

- Fundir a 68 °C y colocar el fenol líquido en un erlenmeyer de 2 lts de capacidad.
  - Agregar 0,5 g de 8- hidroxiquinolina.
  - Agregar 1 volumen de Tris-Cl 0,5 M pH 8,0 (primer lavado).
  - Agitar con agitador magnético 15 minutos.
  - Dejarlo reposar hasta que se separen bien las fases.
  - Descartar la fase superior (ya que en el primer lavado las fases no se separan bien).
  - Agregar 1 volumen de Tris-Cl 0,1 M pH 8,0 (segundo lavado).
  - Agitar con agitador magnético 15 minutos.
  - Dejarlo reposar hasta que se separen bien las fases.
  - Descartar la fase superior.
  - Repetir el 2do lavado hasta llegar al pH deseado (mayor a 7,8).
  - Generalmente el lavado se repite 3 veces.
- \*Si no se llega al pH deseado agregar unas perlas de NaOH en el último lavado.

**Cloroformo-isoamílico:**

- 24 partes de cloroformo.
- 1 parte de alcohol isoamílico.

**Acetato de sodio 3M – para 500 ml:**

- Agregar a 123,06 g de acetato de sodio (PM 82,04) agua destilada hasta completar 500 ml.
- Agitar con agitador magnetico hasta disolver.

**Buffer de lisis:**

- 5 ml de Tris HCl 1M (pH 8).
- 10 ml de EDTA 0,5 M (pH 8).
- 10 ml de SDS 10% (o 5 ml al 20 %).
- 1 ml de ClNa (5M).
- Mezclar todo y llevar a 100 ml con agua destilada.

**Proteinasa K (1mg/ml):**

- 10 mg de proteinasa K (o sea, 0,01 g).
- 10 ml de agua estéril.

**TBE 5X:**

- 54 g de Tris base.
- 27,5 g de ácido bórico.
- 20 ml de 0,5 EDTA (pH 8,0).
- Preparar y agitar con 800 ml de agua destilada.
- Enrazar a 1 lt.

\*Se guarda en heladera en un frasco color caramelo.

**Loading 10X:**

- 250 mg de azul de bromofenol.
- 33 ml de Tris pH 7,6 (150 mM).
- 60 ml de glicerol.
- Llevar a 100 ml con agua destilada.

\*Guardar en heladera o freezer. En geles de agarosa se usa 6X.

**Gel de agarosa 1% - cuba de 12 x15 cm:**

- Colocar 1gr de agarosa en Erlenmeyer.
- 100 ml de TBE 0,5 X. Llevar 2 min a microondas o hasta que esté cristalino.
- Agregar 1,5 µl de bromuro de Etidio.
- Enfriar hasta que se pueda sostener con la mano.
- Poner los peines.
- Verter en la cuba encintada y dejar enfriar hasta que se puedan sacar fácilmente los peines.
- Colocar el gel dentro de la cuba para que no se seque.

**Apéndice II: Caracteres incorporados a la matriz morfológica y sus estados**

Fuente	Carácter	0	1	2	3
Orioizabala et al. (2020)	1_ Cobertura dorsal del premaxilar por parte de los nasales	Completa	Parcial	Sin cobertura	
	2_ Contacto de los prefrontales en la línea media	Presente	Presente, por encima del proceso anterior de los frontales	Ausente	
	3_ Frontales	Suturados	Fusionados		
	4_ Proceso posterior del maxilar alcanzado el margen posterior de la órbita	Presente	Ausente		

	5_ Contacto de los maxilares en la linea media	Presente	Ausente, separados por el vómer	Ausente, separados por el premaxilar	
	6_ Contacto entre el escamoso y el parietal	Ausente	Presente		
	7_ Forma del supraoccipital	Romboidal	Subtriangular	Elongada (eje anteroposterior más largo que el lateromedial)	
	8_ Emarginación posterior del cráneo	No alcanzando el cuadrado en vista ventral	Alcanzando el cuadrado en vista dorsal	Extendiéndose más allá del cuadrado en vista dorsal	
	9_ Emarginación posterior del cráneo ligada a la emarginación lateral	Ausente	Presente		
	10_ Contacto Pterigoides-Maxilar	Presente	Ausente		
	11_ En ausencia de contacto Pterigoides-Maxilar	Separado por los palatinos	Separado por el yugal		
	12_ Contacto Pterigoides-basioccipital	Presente	Ausente		
	13_ Proceso medial del basiesfenoides separando los pterigoides	completamente	Casi completamente	Sólo en la región posterior	
	14_ Foramen posterius canalis carotici interni en vista ventral	Desarrollado entre el basiesfenoides y el proótico	Desarrollado sólo sobre el proótico	Desarrollado sobre el proótico y el cuadrado	Desarrollado entre el pterigoides y el proótico
	15_ Proceso anterior del arco neural del axis	Ausente	Presente		
	16_ Cervical 2	Anficélica	Precélica	Opistocélica	
	17_ Cervical 3	Opistocélica	Precélica		
	18_ Cervical 4	Biconvexa	Precélica	Opistocélica	
	19_ Cervical 5	Procélica	Biconvexa		
	20_ cervical 6	Procélica	Bicóncava		
	21_ cervical 7	Procélica	Bicóncava		
	22_ cervical 8	Procélica	Biconvexa		
	23_ forma de la placa pugal	Trapezoidal	rectangular	hexagonal	
Presente contribución	24_ N° cromosómico (2N)	NCrs <= 40	41 <= NCrs <= 50	51 <= NCrs <= 60	NCrs > 60
	25_ N° fundamental	N <=60	61 <= N <= 70	N > 70	
	26_ N° de macro Crs grandes	10 o mas	menos de 10		
	27_ N° de macro Crs medianos	18 o mas	menos de 18		
	28_ N° de micro Crs	10 o menos	entre 11 y 20	entre 21 y 30	31 o más
	29_ Presencia de constricción secundaria del par 1	Presente	Ausente		
	30_ N° de Crs metacéntricos	Ausencia	Uno		
	31_ N° de Crs submetacéntricos	Ausencia	Uno	Dos	Tres
	32_ N° de Crs acrocéntricos	Ausencia	entre 1 y 5	entre 5 y 10	más de 10
	33_ N° de Crs subtlocéntricos	Ausencia	Uno		
	34_ N° de Crs bibraquiados	5 o menos	más de 5		
	35_ determinación sexual	TSD	XY	GSD	

### Apéndice III: Matriz molecular final

Taxones	ARNr12s	ARNr16s	COI	CytB	ND4	R35	Rag1	c-mos
---------	---------	---------	-----	------	-----	-----	------	-------

Apéndices

<i>Acanthochelys macrocephala</i>	NA	NA	HQ329587.1	149786837	149786816	NA	NA	NA
<i>Acanthochelys pallidipectoris</i>	PC	PC	PC	PC	PC	NA	PC	AF109204.1
<i>Acanthochelys radiolata</i>	NA	AY283250.1	HQ329590.1	EF535289.1	149786832	NA	NA	NA
<i>Acanthochelys spixii</i>	PC	PC	PC	PC	PC	NA	PC	NA
<i>Chelodina colliei</i>	U40634.1	345894201	HQ329593.1	NC_041291.1	NC_041291.1	KP876874	KP876946	AF109202.1
<i>Chelodina expansa</i>	KY776450.1	KY776450.1	KY776450.1	KY776450.1	618931452	NA	NA	NA
<i>Chelodina longicollis</i>	671729501	AF113630.1	671729501	671729501	671729501	AY339636.1	AY687921.1	NA
<i>Chelodina novaeguineae</i>	KY776446.1	KY776446.1	HQ329592.1	KY776446.1	KY776446.1	NA	NA	NA
<i>Chelodina oblonga</i>	345894201	345894201	345894201	345894201	345894201	KC753141.1	KC753120.1	AF039486
<i>Chelodina pritchardi</i>	NC_037386.1	NC_037386.1	HQ329595.1	NC_037386.1	NC_037386.1	NA	NA	NA
<i>Chelus fimbriata</i>	HQ172156.1	HQ172156.1	HQ172156.1	HQ172156.1	HQ172156.1	KC753142.1	AY687918.1	AF109203.1
<i>Eelseya albagula</i>	NC_041287.1	KF255969.1	HQ329600.1	NC_041287.1	JX871353.1	KF255977.1	KP876948	NA
<i>Eelseya branderhorsti</i>	745999357	JN188831.1	745999357	745999357	745999357	KC755140.1	KC753121.1	NA
<i>Eelseya dentata</i>	U40637.1	AF113627.1	HQ329604.1	KC755172.1	KC755113.1	KF255979.1	KP876951	AF039485.1
<i>Eelseya irwini</i>	NA	KF255970.1	HQ329606.1	KC755173.1	KF255958.1	KF255980.1	KP876952	NA
<i>Eelseya lavarackorum</i>	NC_041283.1	KF255974.1	HQ329607.1	NC_041283.1	NC_041283.1	KP876883	KP876954	NA
<i>Eelseya novaeguineae</i>	JN188821.1	KF255963.1	HQ329615.1	388594169	KC755118.1	KF255982.1	KP876960	NA
<i>Elusor macrurus</i>	U40639.1	AF113623.1	HQ329617.1	NC_030217.1	NC_030217.1	KC755155.1	KP876959	AF109200.1
<i>Emydura macquarii</i>	U40640.1	AF113625.1	HQ329618.1	KC755183.1	KF181885.1	KC755156.1	KP876957	NA
<i>Emydura subglobosa</i>	745999371	AY283249.1	745999371	745999371	745999371	KC755163.1	KC753122.1	NA
<i>Emydura tanybaraga</i>	NC_042476.1	NC_042476.1	KP876800	NC_042476.1	NC_042476.1	KC755160.1	KP876965	NA
<i>Emydura victoriae</i>	NA	745999371	HQ329625.1	NA	KF255960.1	KC755162.1	KP876968	NA
<i>Erymnochelys madagascariensis</i>	U40641.1	AF113640.1	HQ329738.1	228478620	228479229:1-658	NA	JQ073220.1	NA
<i>Flaviemys purvisi</i>	AF095893.1	AF113628.1	HQ329616.1	KC755193.1	KC755136.1	KC755166.1	NA	NA
<i>Hydromedusa maximiliani</i>	PC	PC	HQ329626.1	PC	PC	NA	PC	NA
<i>Hydromedusa tectifera</i>	PC	PC	NA	PC	PC	NA	PC	AF109207.1
<i>Mesoclemmys dahli</i>	JX139086.1	NA	NA	JX139049.1	NA	JX139078.1	NA	JX139082.1
<i>Mesoclemmys gibba</i>	U40646.1	AF113636.1	NA	JX139068.1	149786834	AY742455.1	AY687919.1	AF109206.1
<i>Mesoclemmys heliostemma</i>	NA	NA	HQ329627.1	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Mesoclemmys hogeii</i>	NC_036346.1	JN999705.2	NC_036346.1	NC_036346.1	NC_036346.1	NA	NA	NA
<i>Mesoclemmys nasuta</i>	U40645.1	AF113637.1	AF113661.1	NA	NA	AY339637.1	NA	NA
<i>Mesoclemmys raniceps</i>	NA	NA	HQ329628.1	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Mesoclemmys tuberculatus</i>	NA	NA	HQ329630.1	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Mesoclemmys vanderhaegei</i>	PC	PC	PC	PC	PC	NA	PC	NA
<i>Mesoclemmys zuliae</i>	JX139087.1	NA	NA	JX139067.1	JX139070.1	JX139079.1	NA	JX139083.1
<i>Myuchelys bellii</i>	KY924930.1	KY924930.1	KP876804	KY924930.1	KC755134.1	KC755164.1	KP876970	NA
<i>Myuchelys georgesii</i>	AF095894.1	671729501	HQ329605.1	NC_042474.1	NC_042474.1	KC755165.1	KP876972	NA
<i>Myuchelys latisternum</i>	U40638.1	AF113626.1	KP876808	NC_042475.1	NC_042475.1	AY339643.1	AY687920.1	NA
<i>Pelomedusa subrufa</i>	U40642.1	FJ230874.1	JQ909513.1	658131273	658131413:1-109	NA	FJ230878.1	AF109208.1
<i>Peltocephalus dumerilianus</i>	U40643.1	AF113643.1	HQ329739.1	228478618	228479235:1-658	NA	NA	NA
<i>Pelusios sinuatus</i>	U40644.1	AF113641.1	NA	359385412:1-664	359815884:1-669	NA	FN645349.1	NA
<i>Phrynops geoffroanus</i>	PC	PC	PC	PC	PC	JX139081.1	PC	AF109205.1

<i>Phrynops hilarii</i>	PC	PC	JN999705.2	PC	PC	NA	PC	JX139085.1
<i>Phrynops williamsi</i>	PC	PC	PC	PC	PC	NA	PC	NA
<i>Platemys platycephala</i>	745999399	745999399	745999399	JN999705.2	745999399	GU213861.1	KC753124.1	NA
<i>Podocnemis expansa</i>	U40649.1	AF113642.1	HQ329741.1	745999399	228479231:1-658	NA	AY687924.1	AF109209.1
<i>Podocnemis sextuberculata</i>	AM943819.1	NA	HQ329743.1	AM943831.1	FM165616.1	AM943844.1	NA	NA
<i>Podocnemis unifilis</i>	409125474	409125474	409125474	228478612	409125474	NA	KC753125.1	NA
<i>Pseudemydura umbrina</i>	U40650.1	AF113621.1	HQ329635.1	KY486272.1	KY486272.1	NA	NA	NA
<i>Rheodytes leukops</i>	U40651.1	AF113622.1	HQ329636.1	409125474	KF255962.1	KC755167.1	KP876978	AF109201.1
<i>Rhinemys rufipes</i>	NA	NA	HQ329637.1	NA	NA	NA	NA	NA

En verde se muestran las secuencias generadas durante esta tesis (PC: presente contribución) y en amarillo se destacan las nuevas secuencias incorporadas desde GenBank. NA: secuencia no disponible.

## Apéndice IV: Condiciones y scripts utilizados en los análisis filogenéticos

### Análisis con PartitionFinder

```
## ALIGNMENT FILE ##
```

```
alignment = concatenada.phy;
```

```
## BRANCHLENGTHS: linked | unlinked ##
```

```
branchlengths = linked;
```

```
## MODELS OF EVOLUTION for PartitionFinder: all | raxml | mrbayes | beast | <list> ##
```

```
models = mrbayes;
```

```
# MODEL SELECTION: AIC | AICc | BIC #
```

```
model_selection = BIC;
```

```
## DATA BLOCKS: see manual for how to define ##
```

```
[data_blocks]
```

```
1_ARNr_12s = 1-1004;
```

```
2_ARNr_16s = 1005-2685;
```

```
3_COI = 2686-4236;
```

```
4_Cytb = 4237-5367;
```

```
5_ND4 = 5368-6054;
```

```
6_RAG_1 = 6055-8854;
```

```
7_R35 = 8855-9965;
```

```
8_cmos = 9966-10330;
```

```
## SCHEMES, search: all | greedy | rcluster | hcluster | user ##
```

```
[schemes]
```

```
search = greedy;
```

### Análisis filogenéticos con TNT

#### Script de TNT para análisis con pesos implicados bajo estrategia SEP (Mirande, 2019)

```
macro=;
```

```
warn=;
```

```
report=;
```

```

var: longmin pasosmin dif E F K;
ho 100000; mu= re 100 ho 100; bb;
set longmin length [0];
set pasosmin minsteps;
set dif ('longmin'-'pasosmin');
set E ('dif'/pasosmin');
quote
=====
el numero de pasos promedio es 'E'
=====
;

set F 0.5;
set K ('F*'E')/(-F+1);
piwe= 'K';
proc "MATRIZ A NALIZAR.tnt";
taxname=;
xpiwe=;
mu= re 100 ho 100; bb;
tsave* MPTs_K_1.tre; save; ts/;
export- MPTs_nex_K_1.tre;
quote =====;
quote los arboles se buscaron con K de 'K';
quote =====;
set F 0.65;
set K ('F*'E')/(-F+1);
piwe= 'K';
xpiwe=;
mu= re 100 ho 100; bb;
tsave* MPTs_K_2.tre; save; ts/;
export- MPTs_nex_K_2.tre;
quote =====;
quote los arboles se buscaron con K de 'K';
quote =====;
set F 0.75;
set K ('F*'E')/(-F+1);
piwe= 'K';
xpiwe=;
mu= re 100 ho 100; bb;
tsave* MPTs_K_3.tre; save; ts/;
export- MPTs_nex_K_3.tre;
quote =====;
quote los arboles se buscaron con K de 'K';
quote =====;
set F 0.85;
set K ('F*'E')/(-F+1);
piwe= 'K';
xpiwe=;
mu= re 100 ho 100; bb;
tsave* MPTs_K_4.tre; save; ts/;
export- MPTs_nex_K_4.tre;
quote =====;
quote los arboles se buscaron con K de 'K';
quote =====;
set F 0.95;
set K ('F*'E')/(-F+1);
piwe= 'K';
xpiwe=;
mu= re 100 ho 100; bb;

```

```

tsave* MPTs_K_5.tre; save; ts/;
export- MPTs_nex_K_5.tre;
quote =====;
quote los arboles se buscaron con K de 'K';
quote =====;
set F 0.99;
set K ('F*'E)/(-F+1);
piwe= 'K';
xpiwe=;
mu= re 100 ho 100; bb;
tsave* MPTs_K_6.tre; save; ts/;
export- MPTs_nex_K_6.tre;
quote =====;
quote los arboles se buscaron con K de 'K';
quote =====;
keep 0; proc MPTs_K_1.tre; proc MPTs_K_2.tre; proc MPTs_K_3.tre; proc MPTs_K_4.tre; proc MPTs_K_5.tre;
proc MPTs_K_6.tre;
export- MPTs_todos.tre;
var-;
piwe-;

```

**Script de TNT para análisis con pesos implicados bajo estrategia POS (Mirande, 2019)**

```

macro=;
warn-;
report=;
var: longmin pasosmin dif E F K;
ho 100000; mu= re 100 ho 100; bb;
set longmin length [0];
set pasosmin minsteps;
set dif ('longmin'-pasosmin');
set E ('dif'/pasosmin');
quote
=====
el numero de pasos promedio es 'E'
=====
;
set F 0.5;
set K ('F*'E)/(-F+1);
piwe= 'K';
proc "MATRIZ A NALIZAR.tnt";
taxname=;
xpiwe/1:2:3
mu= re 100 ho 100; bb;
tsave* MPTs_K_1.tre; save; ts/;
export- MPTs_nex_K_1.tre;
quote =====;
quote los arboles se buscaron con K de 'K';
quote =====;
set F 0.65;
set K ('F*'E)/(-F+1);
piwe= 'K';
xpiwe/1:2:3
mu= re 100 ho 100; bb;
tsave* MPTs_K_2.tre; save; ts/;
export- MPTs_nex_K_2.tre;

```

```

quote =====;
quote los arboles se buscaron con K de 'K';
quote =====;
set F 0.75;
set K ('F*'E)/(-F+1);
piwe= 'K';
xpiwe/1:2:3
mu= re 100 ho 100; bb;
tsave* MPTs_K_3.tre; save; ts/;
export- MPTs_nex_K_3.tre;
quote =====;
quote los arboles se buscaron con K de 'K';
quote =====;
set F 0.85;
set K ('F*'E)/(-F+1);
piwe= 'K';
xpiwe/1:2:3
mu= re 100 ho 100; bb;
tsave* MPTs_K_4.tre; save; ts/;
export- MPTs_nex_K_4.tre;
quote =====;
quote los arboles se buscaron con K de 'K';
quote =====;
set F 0.95;
set K ('F*'E)/(-F+1);
piwe= 'K';
xpiwe/1:2:3
mu= re 100 ho 100; bb;
tsave* MPTs_K_5.tre; save; ts/;
export- MPTs_nex_K_5.tre;
quote =====;
quote los arboles se buscaron con K de 'K';
quote =====;
set F 0.99;
set K ('F*'E)/(-F+1);
piwe= 'K';
xpiwe/1:2:3
mu= re 100 ho 100; bb;
tsave* MPTs_K_6.tre; save; ts/;
export- MPTs_nex_K_6.tre;
quote =====;
quote los arboles se buscaron con K de 'K';
quote =====;
keep 0; proc MPTs_K_1.tre; proc MPTs_K_2.tre; proc MPTs_K_3.tre; proc MPTs_K_4.tre; proc MPTs_K_5.tre;
proc MPTs_K_6.tre;
export- MPTs_todos.tre;
var-;
piwe-;

```

### **Script de TNT para análisis de la matriz concatenada**

```

macro=;
warn-;
taxname=;
report=;
piwe=;
proc concatenada.tnt;

```

```
xpiwe(0.2684 /2.25;
xpiwe(2685.4235 /2.15;
xpiwe(4236.6053 /5.81;
xpiwe(6054.9964 /0.42;
xpiwe(9965.10329 /0.87;
mu= re 100 ho 100;bb;
piwe-;
```

### **Script de TNT para análisis de la matriz de evidencia total**

```
macro=;
warn-;
taxname=;
report=;
piwe=;
proc Evidencia_total.tnt;
xpiwe(0.99 /6.5;
xpiwe(100.2784 /1.56;
xpiwe(2785.4335 /2.15;
xpiwe(4336.6153 /4.02;
xpiwe(6154.10064 /0.14;
xpiwe(10065.10429 /0.26;
mu= re 100 ho 100;bb;
piwe-;
```

### **Script de R para comparación de condiciones analíticas mediante distancias topológicas**

```
require(ape)
require(tcltk2)
d <- tk_choose.dir(default = "", caption = "Select directory") #elegir carpeta con los archivos para analizar
setwd(d)
Col <- c("#F4FF05","#96FF33","#48FF5A","#05F287","#19C4A4","#29A0BC")
#####arreglar arboles#####
for (a in 1:6) {
  f <- paste("MPTs_nex_K_",a,".tre",sep = "")
  t <- scan(f,"raw",sep = "\n")
  pos <- grep("tree",t)
  t[pos[1]] = gsub(";",",",t[pos[1]])
  pos = pos+1
  pos = pos[-1]
  for (i in pos) {
    t[i] = gsub(" ", "", t[i])
  }
  t[length(t)] = gsub(";",",",t[length(t)])
  cat(t,file = f,sep = "\n")
}
f <- "MPTs_todos.tre"
t <- scan(f,"raw",sep = "\n")
pos <- grep("tree",t)
t[pos[1]] = gsub(";",",",t[pos[1]])
pos = pos+1
pos = pos[-1]
for (i in pos) {
  t[i] = gsub(" ", "", t[i])
}
t[length(t)] = gsub(";",",",t[length(t)])
```

```

cat(t,file = f,sep = "\n")
#####distancias
MPTs#####
medias <- c()
s <- c()
mpts <- c()
todos <- read.nexus("MPTs_todos.tre")
mrt <- consensus(todos,p=0.5)
DIST <- list(D1 <- c(),D2 <- c(),D3 <- c(),D4 <- c(),D5 <- c(),D6 <- c())
Ks <- c(1:6)
status <- tkProgressBar(min=0, max= 6, title= "Process data")
for (i in 1:6) {
  Dlst <- c()
  tr1 <- read.nexus(paste("MPTs_nex_K_",i,".tre",sep = ""))
  if (class(tr1) == "phylo") tr1 <- list(tr1)
  mpts <- c(mpts,length(tr1))
  if (length(tr1)>300) tr1 <- tr1[sample(x=1:length(tr1),300,replace = TRUE)]
  ks <- Ks[-i]
  for (j in ks) {
    Dist <- c()
    tr2 <- read.nexus(paste("MPTs_nex_K_",j,".tre",sep = ""))
    if (class(tr2) == "phylo") tr2 <- list(tr2)
    if (length(tr2)>300) tr2 <- tr2[sample(x=1:length(tr1),300,replace = TRUE)]
    correct <- sum(length(tr1),length(tr2))/length(todos)
    for (t1 in 1:length(tr1)) {
      dist <- c()
      for (t2 in 1:length(tr2)) {
        dist <- c(dist,correct*(dist.topo(unroot(tr1[[t1]]),unroot(tr2[[t2]]))/2))
      }
    }
    Dist <- c(Dist,dist)
  }
  Dlst <- c(Dlst,Dist)
}
DIST[[i]] = Dlst
medias <- c(medias,mean(Dlst))
s <- c(s,sd(Dlst))
setTkProgressBar(status, i, label= "working")
show(paste(length(tr1)))
}
close(status)
m <- matrix(ncol = 6,nrow = 3)
m[1,] = as.character(mpts)
m[2,] = as.character(medias)
m[3,] = as.character(s)
colnames(m) <- c("K1","K2","K3","K4","K5","K6")
rownames(m) <- c("MPTs","Media","Sd")
##### show results#####
m
##### plot and save results#####
pdf("RF_dist.pdf")
boxplot(DIST, ylab="Distancias RFc", xlab= "Ajuste", col=Col)
points(1:6,medias,pch="*")
dev.off()

```

## Análisis filogenéticos con MrBayes

### **Matriz morfológica**

```
outgroup Chelydra_serpentina;  
ctype ord : 4 5 28 30 36 41 43 45 54 55 58 61 62;  
Begin MrBayes;  
Lset Rates = Invgamma Coding = informative;  
mcmc ngen = 30000000 samplefreq = 1000;  
sumt Burninfrac=0.1;  
sump Burninfrac=0.1;  
End;
```

### **Matriz ARNr 12s-16s**

```
outgroup Pelusios_sinuatus;  
Begin MrBayes;  
Lset nst=6 rates=gamma;  
mcmc ngen=30000000 samplefreq=1000;  
sumt Burninfrac=0.1;  
sump Burninfrac=0.1;  
End;
```

### **Matriz ARNr COI**

```
outgroup Podocnemis_unifilis;  
Begin MrBayes;  
Lset nst=6 rates=invgamma;  
mcmc ngen=30000000 samplefreq=1000;  
sumt Burninfrac=0.1;  
sump Burninfrac=0.1;  
End;
```

### **Matriz ARNr CytB-ND4**

```
outgroup Erymnochelys_madagascariensis;  
Begin MrBayes;  
Lset nst=6 rates=invgamma;  
mcmc ngen=30000000 samplefreq=1000;  
sumt Burninfrac=0.1;  
sump Burninfrac=0.1;  
End;
```

### **Matriz RAG1-R35**

```
outgroup Pelomedusa_subrufa;  
Begin MrBayes;  
Lset nst=2 rates=gamma;  
mcmc ngen=30000000 samplefreq=1000;  
sumt burninfrac=0.1;  
sump burninfrac=0.1;  
End;
```

### **Matriz c-mos**

```
outgroup Pelomedusa_subrufa;  
Begin MrBayes;  
Lset nst=1 rates=inv;  
mcmc ngen=30000000 samplefreq=1000;  
sumt burninfrac=0.1;  
sump burninfrac=0.1;  
End;
```

### **Matriz Concatenada**

```

outgroup Pelusios_sinuatus;
Begin MrBayes;
    CHARSET 12s_16s=1-2685;
    CHARSET COI=2686-4236;
    CHARSET CytB_ND4=4237-6054;
    CHARSET RAG1_R35=6055-9965;
    CHARSET cmos=9966-10330;
partition favored = 5: 12s_16s, COI, CytB_ND4, RAG1_R35, cmos;
set partition = favored;

lset applyto=(2,3) nst=6 rates=invgamma;
lset applyto=(1) nst=6 rates=gamma;
lset applyto=(4) nst=2 rates=gamma;
lset applyto=(5) nst=1 rates=inv;
mcmc ngen=30000000 samplefreq=1000;
sumt burninfrac=0.1;
sump burninfrac=0.1;
End;

```

### **Matriz de Evidencia Total**

```

outgroup Chelydra_serpentina;
Begin MrBayes;
    CHARSET 1_morphology = 1-100;
    CHARSET 2_12s_16s=101-2785;
    CHARSET 3_COI=2786-4336;
    CHARSET 4_CytB_ND4=4337-6154;
    CHARSET 5_RAG1_R35=6155-10065;
    CHARSET 6_cmos=10066-10430;

partition favored = 6: 1_morphology, 2_12s_16s, 3_COI, 4_CytB_ND4, 5_RAG1_R35, 6_cmos;
set partition = favored;
lset app=(1) rates = Invgamma Coding = informative;
lset app=(3,4) nst=6 rates=invgamma;
lset app=(2) nst=6 rates=gamma;
lset app=(5) nst=2 rates=gamma;
lset app=(6) nst=1 rates=inv;
mcmc ngen=30000000 samplefreq=1000;
sumt burninfrac=0.1;
sump burninfrac=0.1;
End;

```

### **Test de congruencia metodológica**

```

require(ape)
require(tcltk2)
require(ggplot2)
#####muestrear 100 bayes trs#####
for (i in 1:4) {
  f <- choose.files() #a diferencia de file.choose, elige varios archivos
  for (i in 1:length(f)) {
    fix <- scan(paste(ff[i],sep=""),"raw",sep = "\n")
    if (fix[length(fix)]!="end;") {
      cat(fix,file = paste(ff[i],sep=""),sep="\n",append = FALSE)
      cat("end;",file = paste(ff[i],sep=""),append = TRUE)
    }
  }
}
t1<-read.nexus(ff[1])

```

```

t2<-read.nexus(ff[2])
t <- c(t1[sample(1:length(t1),50,replace = FALSE)],t2[sample(1:length(t2),50,replace = FALSE)])
d <- tk_choose.dir(default = "", caption = "Select directory") #elegir carpeta con los archivos para analizar
setwd(d)
write.nexus(t,file="mcmc_trs.tre") #exportar 100 arboles al azar
}
#####arreglar arboles
TNT#####
d <- tk_choose.dir(default = "", caption = "Select directory") #elegir carpeta con los archivos para analizar
setwd(d)
f <- c("mpt.tre","boot_trs.tre")
for (i in 1:2) {
  t <- scan(ff[i],"raw",sep = "\n")
  pos <- grep("tree",t)
  t[pos[1]] = gsub(";",",",t[pos[1]])
  pos = pos + 1
  pos = pos-1
  for (j in pos) {
    t[j] = gsub(";",",",t[j])
  }
  t[length(t)] = gsub(";",",",t[length(t)])
  cat(t,file = ff[i],sep = "\n")
}
#####distancias#####
require(ape)
require(tcltk2)
require(ggplot2)
d <- tk_choose.dir(default = "", caption = "Select directory") #elegir carpeta con los archivos para analizar
setwd(d)
m <- c("AOMP versus AMCMCs","AOIB versus ABOOTs")
DIST <- c()
single_trs <- c("mpt.tre", "ppt.tre")
sampled_trs <- c("mcmc_trs.tre", "boot_trs.tre")
for (i in 1:2) {
  best <- read.nexus(single_trs[i])
  samples <- read.nexus(sampled_trs[i])
  status <- tkProgressBar(min=0, max= length(samples), title= "Processing data")
  for (j in 1:length(samples)) {
    DIST <- c(DIST,dist.topo(unroot(best),unroot(samples[j]))/2)
    setTkProgressBar(status, j, label= "Computing tree distances")
  }
  close(status)
  #method <- c(method, rep(m[i],length(samples)))
}
#####t test sobre las
distancias#####
t_test <- t.test(DIST[1:100],DIST[101:200])
t <- signif(t_test$statistic,3)
ste <- signif(t_test$stderr,3)
p <- signif(t_test$p.value,3)
cat(x=paste("Estadístico","Error estandar","Valor p", sep = "\t"), file = "Test_results.txt", sep = "\n")
##### plot and save results#####
cat(x=paste(t,ste,p, sep = "\t"), file = "Test_results.txt", sep = "\n", append = TRUE)
medias <- c(mean(DIST[1:100]),mean(DIST[101:200]))
st_err <- c(sd(DIST[1:100])/10,sd(DIST[101:200])/10)*2
df <- data.frame(RFd=medias, Comparación=m, S_err=st_err)
pdf("test_de_congruencia.pdf")
ggplot(df) +

```

```
geom_bar(aes(x=Comparación, y=RFd, fill=Comparación), colour = "black",stat="identity") +
geom_errorbar(aes(x=Comparación, ymin=RFd, ymax=RFd+S_err), width=0.4, colour="black", size=0.5)
dev.off()
ggplot(df) +
geom_bar(aes(x=Comparación, y=RFd, fill=Comparación), colour = "black",stat="identity") +
geom_errorbar(aes(x=Comparación, ymin=RFd, ymax=RFd+S_err), width=0.4, colour="black", size=0.5)
```

## Apéndice V: Condiciones y scripts utilizados en los análisis de reloj molecular

### Datos del registro fósil

Los datos de ocurrencia de especies extintas se utilizan en la estimación de parámetros propios del modelo de árbol FBD, como son las tasas de especiación, extinción y muestreo de fósiles. Los mismos fueron descargados desde el repositorio PBDB (<https://paleobiodb.org>) y procesados para incluir solo ocurrencias a nivel de especies.

Species	Status	MinT	MaxT
<i>Acanthochelys cosquinensis</i>	extinct	2.588	5.333
<i>Acleistochelys maliensis</i>	extinct	56	66
<i>Albertwoodemys testudinum</i>	extinct	28.1	33.9
<i>Albertwoodemys testudinum</i>	extinct	15.97	20.44
<i>Algorachelus parvus</i>	extinct	93.5	99.6
<i>Algorachelus parvus</i>	extinct	93.5	99.6
<i>Algorachelus peregrinus</i>	extinct	93.5	99.6
<i>Algorachelus peregrinus</i>	extinct	93.5	99.6
<i>Algorachelus tibert</i>	extinct	93.9	100.5
<i>Andrewsemys libyca</i>	extinct	28.1	33.9
<i>Andrewsemys libyca</i>	extinct	33.9	38
<i>Andrewsemys libyca</i>	extinct	28.1	33.9
<i>Apodichelys lucianoi</i>	extinct	89.3	93.5
<i>Araiochelys hirayamai</i>	extinct	61.6	66
<i>Araripemys barretoii</i>	extinct	109	112.03
<i>Araripemys barretoii</i>	extinct	100.5	113
<i>Araripemys barretoii</i>	extinct	100.5	113
<i>Araripemys barretoii</i>	extinct	100.5	113
<i>Araripemys barretoii</i>	extinct	113	125
<i>Arenila krebsi</i>	extinct	66	72.1
<i>Arenila krebsi</i>	extinct	66	72.1
<i>Atolchelys lepida</i>	extinct	125	129.4
<i>Azabbaremys moragjonesi</i>	extinct	56	66
<i>Bairdemys hartsteini</i>	extinct	15.97	20.44
<i>Bairdemys healeyorum</i>	extinct	23.03	28.1
<i>Bairdemys sanchezi</i>	extinct	5.333	11.608
<i>Bairdemys thalassica</i>	extinct	11.608	15.97
<i>Bairdemys venezuelensis</i>	extinct	15.97	20.44
<i>Bairdemys venezuelensis</i>	extinct	5.333	11.608
<i>Bairdemys venezuelensis</i>	extinct	5.333	11.608

<i>Bairdemys venezuelensis</i>	extinct	5.333	11.608
<i>Bairdemys winklerae</i>	extinct	5.333	11.608
<i>Bauruemys elegans</i>	extinct	66	83.6
<i>Birlimarr gaffneyi</i>	extinct	11.608	15.97
<i>Bonapartemys bajobarrealis</i>	extinct	89.3	99.6
<i>Bothremys arabicus</i>	extinct	83.6	86.3
<i>Bothremys cooki</i>	extinct	66	72.1
<i>Bothremys cooki</i>	extinct	70.6	83.5
<i>Bothremys cooki</i>	extinct	72.1	83.6
<i>Bothremys cooki</i>	extinct	70.6	83.5
<i>Bothremys kellyi</i>	extinct	59.2	61.6
<i>Bothremys maghrebiana</i>	extinct	61.6	66
<i>Bothremys maghrebiana</i>	extinct	61.6	66
<i>Brasilemys josai</i>	extinct	109	112.03
<i>Caninemys tridentata</i>	extinct	5.333	11.608
<i>Carbonemys cofrinii</i>	extinct	58.7	61.7
<i>Caririemys violeatae</i>	extinct	109	112.03
<i>Carteremys leithi</i>	extinct	66	72.1
<i>Cearachelys placidoi</i>	extinct	109	112.03
<i>Cearachelys placidoi</i>	extinct	100.5	113
<i>Cerrejonemys wayuunaiki</i>	extinct	58.7	61.7
<i>Chedighaii barberi</i>	extinct	70.6	83.5
<i>Chedighaii barberi</i>	extinct	72.1	83.6
<i>Chedighaii barberi</i>	extinct	70.6	83.5
<i>Chedighaii barberi</i>	extinct	72.1	83.6
<i>Chedighaii barberi</i>	extinct	72.1	83.6
<i>Chedighaii barberi</i>	extinct	72.1	83.6
<i>Chedighaii barberi</i>	extinct	72.1	83.6
<i>Chedighaii hutchisoni</i>	extinct	70.6	83.5
<i>Chedighaii hutchisoni</i>	extinct	70.6	83.5
<i>Chedighaii hutchisoni</i>	extinct	70.6	83.5
<i>Chelodina alanrxi</i>	extinct	41.3	66
<i>Chelodina insculpta</i>	extinct	2.588	5.333
<i>Chelodina longicollis</i>	extant	0	0.0117
<i>Chelodina longicollis</i>	extant	0.0117	2.588
<i>Chelodina rugosa</i>	extant	0	0.0117
<i>Chelus colombianus</i>	extinct	7.246	11.62
<i>Chelus colombianus</i>	extinct	7.246	11.62
<i>Chelus colombianus</i>	extinct	15.97	20.44
<i>Chelus colombianus</i>	extinct	11.608	15.97
<i>Chelus colombianus</i>	extinct	11.8	13.8
<i>Chelus colombianus</i>	extinct	23.03	33.9
<i>Chelus colombianus</i>	extinct	15.97	23.03
<i>Chelus colombianus</i>	extinct	5.333	11.608
<i>Chelus colombianus</i>	extinct	5.333	11.608
<i>Chupacabrachelys complexus</i>	extinct	70.6	83.5

<i>Chupacabrachelys complexus</i>	extinct	70.6	83.5
<i>Cordichelys antiqua</i>	extinct	33.9	38
<i>Cordichelys antiqua</i>	extinct	33.9	38
<i>Crassachelys neurirregularis</i>	extinct	47.8	56
<i>Crassachelys neurirregularis</i>	extinct	66	145
<i>Dacquemys paleomorpha</i>	extinct	28.1	33.9
<i>Dacquemys paleomorpha</i>	extinct	33.9	38
<i>Dacquemys paleomorpha</i>	extinct	28.1	33.9
<i>Dirqadim schaefferi</i>	extinct	93.5	105.3
<i>Dirqadim schaefferi</i>	extinct	93.9	100.5
<i>Elochelys perfecta</i>	extinct	72.1	83.6
<i>Elseya latisternum</i>	extant	0	0.0117
<i>Elseya lavarackorum</i>	extant	3.6	5.333
<i>Elseya uberrima</i>	extinct	0.0117	2.588
<i>Eocnochelus eremberti</i>	extinct	41.3	47.8
<i>Eocnochelus eremberti</i>	extinct	47.8	56
<i>Eocnochelus eremberti</i>	extinct	41.3	47.8
<i>Eocnochelus farresi</i>	extinct	33.9	38
<i>Eocnochelus lacombianus</i>	extinct	47.8	56
<i>Eotaphrosphys ambiguum</i>	extinct	66	72.1
<i>Erymnochelys madagascariensis</i>	extant	83.6	89.3
<i>Euraxemys essweini</i>	extinct	100.5	113
<i>Foxemys mechinorum</i>	extinct	70.6	83.5
<i>Foxemys mechinorum</i>	extinct	70.6	83.5
<i>Foxemys mechinorum</i>	extinct	70.6	83.5
<i>Foxemys mechinorum</i>	extinct	66	83.5
<i>Foxemys mechinorum</i>	extinct	66	83.5
<i>Foxemys trabanti</i>	extinct	83.6	86.3
<i>Galianemys emringeri</i>	extinct	93.5	99.6
<i>Galianemys emringeri</i>	extinct	93.9	100.5
<i>Galianemys whitei</i>	extinct	93.5	99.6
<i>Galianemys whitei</i>	extinct	93.9	100.5
<i>Hamadachelys escuilliei</i>	extinct	93.5	105.3
<i>Hamadachelys escuilliei</i>	extinct	93.9	100.5
<i>Hydromedusa casamayorensis</i>	extinct	61.6	66
<i>Hydromedusa casamayorensis</i>	extinct	37.2	48.6
<i>Hydromedusa casamayorensis</i>	extinct	37.2	48.6
<i>Hydromedusa casamayorensis</i>	extinct	37.2	48.6
<i>Hydromedusa casamayorensis</i>	extinct	37.2	48.6
<i>Hydromedusa tectifera</i>	extant	0.126	0.781
<i>Hydromedusa tectifera</i>	extant	4	6.8
<i>Hydromedusa tectifera</i>	extant	0.0117	0.126
<i>Hydromedusa tectifera</i>	extant	0.0117	2.588
<i>Hydromedusa tectifera</i>	extant	0.0117	2.588
<i>Hydromedusa tectifera</i>	extant	0.0117	2.588
<i>Hydromedusa tectifera</i>	extant	0.0117	2.588



<i>Neochelys liriae</i>	extinct	47.8	56
<i>Neochelys nicolisii</i>	extinct	41.3	47.8
<i>Neochelys salmanticensis</i>	extinct	33.9	38
<i>Neochelys salmanticensis</i>	extinct	33.9	38
<i>Neochelys salmanticensis</i>	extinct	37.2	48.6
<i>Neochelys salmanticensis</i>	extinct	37.2	48.6
<i>Neochelys salmanticensis</i>	extinct	37.2	48.6
<i>Neochelys salmanticensis</i>	extinct	37.2	48.6
<i>Neochelys salmanticensis</i>	extinct	33.9	47.8
<i>Neochelys salmanticensis</i>	extinct	41.3	47.8
<i>Neochelys salmanticensis</i>	extinct	41.3	47.8
<i>Neochelys salmanticensis</i>	extinct	40.4	48.6
<i>Neochelys salmanticensis</i>	extinct	37.2	48.6
<i>Neochelys salmanticensis</i>	extinct	40.4	48.6
<i>Neochelys salmanticensis</i>	extinct	41.3	47.8
<i>Neochelys salmanticensis</i>	extinct	41.3	47.8
<i>Neochelys salmanticensis</i>	extinct	41.3	47.8
<i>Neochelys zamorensis</i>	extinct	41.3	47.8
<i>Neochelys zamorensis</i>	extinct	41.3	47.8
<i>Nigeremys gigantea</i>	extinct	66	72.1
<i>Nigeremys gigantea</i>	extinct	33.9	56
<i>Nostimochelone lampra</i>	extinct	15.97	23.03
<i>Palaeophrynops patagonicus</i>	extinct	66	83.6
<i>Peiropemys mezzalirai</i>	extinct	66	72.1
<i>Pelusios rusingae</i>	extinct	15.97	20.44
<i>Phosphatochelys tedfordi</i>	extinct	47.8	56
<i>Phrynops geoffroanus</i>	extant	6.8	9
<i>Phrynops geoffroanus</i>	extant	4	9
<i>Phrynops paranaensis</i>	extinct	6.8	9
<i>Podocnemis argentinensis</i>	extinct	55.8	61.7
<i>Podocnemis argentinensis</i>	extinct	55.8	58.7
<i>Podocnemis argentinensis</i>	extinct	55.8	58.7
<i>Podocnemis argentinensis</i>	extinct	23.03	33.9
<i>Podocnemis bassleri</i>	extinct	5.333	11.608
<i>Podocnemis brasiliensis</i>	extinct	61.6	66
<i>Podocnemis brasiliensis</i>	extinct	66	83.5
<i>Podocnemis geologorum</i>	extinct	16.3	17.5
<i>Podocnemis harrisi</i>	extinct	66	83.5
<i>Podocnemis medemi</i>	extinct	2.588	23.03
<i>Podocnemis negrii</i>	extinct	4	9
<i>Podocnemis pritchardi</i>	extinct	11.8	13.8
<i>Podocnemis stromeri</i>	extinct	33.9	38
<i>Polysternon atlanticum</i>	extinct	70.6	83.5
<i>Polysternon atlanticum</i>	extinct	70.6	83.5
<i>Polysternon atlanticum</i>	extinct	66	100.5
<i>Polysternon provinciale</i>	extinct	70.6	83.5

<i>Polysternon provinciale</i>	extinct	70.6	86.3
<i>Polysternon provinciale</i>	extinct	70.6	86.3
<i>Polysternon provinciale</i>	extinct	66	83.5
<i>Polysternon provinciale</i>	extinct	66	72.1
<i>Polysternon provinciale</i>	extinct	72.1	83.6
<i>Portezueloemys patagonica</i>	extinct	85.8	93.5
<i>Pricemys caiera</i>	extinct	66	72.1
<i>Prochelidella argentinae</i>	extinct	89.3	99.6
<i>Prochelidella cerrobarcinae</i>	extinct	100.5	125
<i>Prochelidella portezuelae</i>	extinct	85.8	93.5
<i>Puentemys mushaisaensis</i>	extinct	55.8	61.7
<i>Puentemys mushaisaensis</i>	extinct	55.8	61.7
<i>Puentemys mushaisaensis</i>	extinct	55.8	61.7
<i>Puentemys mushaisaensis</i>	extinct	58.7	61.7
<i>Rhothonemys brinkmani</i>	extinct	61.6	66
<i>Rionegrochelys caldieroi</i>	extinct	83.5	89.3
<i>Rosasia soutoi</i>	extinct	66	83.5
<i>Roxochelys vilavilensis</i>	extinct	48.6	58.7
<i>Roxochelys vilavilensis</i>	extinct	61.6	66
<i>Roxochelys vilavilensis</i>	extinct	61.6	66
<i>Roxochelys vilavilensis</i>	extinct	61.6	66
<i>Roxochelys vilavilensis</i>	extinct	61.6	66
<i>Roxochelys wanderleyi</i>	extinct	66	72.1
<i>Roxochelys wanderleyi</i>	extinct	66	72.1
<i>Roxochelys wanderleyi</i>	extinct	66	83.5
<i>Roxochelys wanderleyi</i>	extinct	66	83.5
<i>Salamanchelys palaeocenica</i>	extinct	61.6	66
<i>Salamanchelys palaeocenica</i>	extinct	61.7	66
<i>Sankuchemys sethnai</i>	extinct	66	70.6
<i>Shweboemys pilgrimi</i>	extinct	0.0117	23.03
<i>Shweboemys pisdurensis</i>	extinct	66	72.1
<i>Sokatra antitra</i>	extinct	66	72.1
<i>Sokatra antitra</i>	extinct	66	72.1
<i>Sokatra antitra</i>	extinct	66	72.1
<i>Sokatra antitra</i>	extinct	66	72.1
<i>Stereogenys cromeri</i>	extinct	33.9	38
<i>Stupendemys geographicus</i>	extinct	6.8	9
<i>Stupendemys geographicus</i>	extinct	6.8	9
<i>Stupendemys geographicus</i>	extinct	6.8	9
<i>Stupendemys geographicus</i>	extinct	6.8	9
<i>Stupendemys souzai</i>	extinct	5.333	11.608
<i>Taphrosphys congolensis</i>	extinct	59.2	61.6
<i>Taphrosphys congolensis</i>	extinct	59.2	61.6
<i>Taphrosphys congolensis</i>	extinct	59.2	61.6
<i>Taphrosphys congolensis</i>	extinct	59.2	61.6
<i>Taphrosphys congolensis</i>	extinct	59.2	61.6

<i>Taphrosphys congolensis</i>	extinct	59.2	61.6
<i>Taphrosphys congolensis</i>	extinct	59.2	61.6
<i>Taphrosphys congolensis</i>	extinct	59.2	61.6
<i>Taphrosphys congolensis</i>	extinct	59.2	61.6
<i>Taphrosphys congolensis</i>	extinct	59.2	61.6
<i>Taphrosphys ippolitoi</i>	extinct	61.6	66
<i>Taphrosphys nodosus</i>	extinct	66	70.6
<i>Taphrosphys nodosus</i>	extinct	66	72.1
<i>Taphrosphys strenuus</i>	extinct	66	70.6
<i>Taphrosphys sulcatus</i>	extinct	61.7	70.6
<i>Taphrosphys sulcatus</i>	extinct	56	66
<i>Taphrosphys sulcatus</i>	extinct	66	100.5
<i>Taphrosphys sulcatus</i>	extinct	66	70.6
<i>Taphrosphys sulcatus</i>	extinct	66	70.6
<i>Taphrosphys sulcatus</i>	extinct	66	70.6
<i>Taphrosphys sulcatus</i>	extinct	66	70.6
<i>Taphrosphys sulcatus</i>	extinct	66	70.6
<i>Taphrosphys sulcatus</i>	extinct	66	70.6
<i>Taphrosphys sulcatus</i>	extinct	61.7	70.6
<i>Taphrosphys sulcatus</i>	extinct	66	70.6
<i>Taphrosphys sulcatus</i>	extinct	61.7	70.6
<i>Taphrosphys sulcatus</i>	extinct	66	70.6
<i>Taphrosphys sulcatus</i>	extinct	66	70.6
<i>Taphrosphys sulcatus</i>	extinct	66	70.6
<i>Taphrosphys sulcatus</i>	extinct	66	70.6
<i>Taquetochelys decorata</i>	extinct	100.5	125
<i>Taquetochelys decorata</i>	extinct	112.03	122.46
<i>Tartaruscola teodorii</i>	extinct	47.8	56
<i>Teneremys lapparenti</i>	extinct	112.03	122.46
<i>Turkanemys pattersoni</i>	extinct	2.588	11.608
<i>Turkanemys pattersoni</i>	extinct	7.246	11.62
<i>Turkanemys pattersoni</i>	extinct	2.588	11.62
<i>Turkanemys pattersoni</i>	extinct	2.588	11.62
<i>Turkanemys pattersoni</i>	extinct	2.588	5.333
<i>Ummulisani rutgersensis</i>	extinct	47.8	56
<i>Ummulisani rutgersensis</i>	extinct	47.8	56
<i>Yaminuechelys gasparinii</i>	extinct	66	83.5
<i>Yaminuechelys gasparinii</i>	extinct	70.6	83.5
<i>Yaminuechelys gasparinii</i>	extinct	66	83.5
<i>Yaminuechelys gasparinii</i>	extinct	66	83.5
<i>Yaminuechelys maior</i>	extinct	61.7	66
<i>Yaminuechelys maior</i>	extinct	61.6	66
<i>Yaminuechelys maior</i>	extinct	61.6	66
<i>Yaminuechelys maior</i>	extinct	61.6	66
<i>Yaminuechelys maior</i>	extinct	70.6	83.5
<i>Yaminuechelys maior</i>	extinct	70.6	83.5
<i>Yuraramirim montealtensis</i>	extinct	66	83.5
<i>Zolhafah bella</i>	extinct	66	72.1

---

### **Estimación de la tasa de muestreo de fósiles con el método *TRiPS* (Starrfelt and Liow, 2015):**

Este análisis utiliza los recuentos de ocurrencia por especie del registro fósil y el período de tiempo para estas observaciones, para estimar (mediante máxima verosimilitud) la tasa de muestreo de fósiles, la probabilidad de muestreo y la riqueza de especies. Todos estos resultados se presentan con su IC del 95% asociado. Los códigos fuente para ejecutar este análisis están disponibles en el repositorio indicado en el paper (<https://datadryad.org/resource/doi:10.5061/dryad.86922/1>). Una vez descargados los archivos necesarios, y preparada la lista de fósiles, se ejecuta el siguiente código de R:

```
data <- read.table("Path_to/fossils_list_file", sep = "\t", head=T) #load fossil occurrence data

sps_ocurrences <- as.integer(table(data$ Species)) #obtain ocurrences

library(stats4) # load necessary package

source("Path_to/functions_DinoBino_toweb.R") #load source code with TRiPS functions

dt <- (max(data$ MaxT)-min(data$ MinT)) #calculate time period

Out = doTRiPS_abs(sps_ocurrences,t=dt) #do the analysis

Out #show results
```

### **Estimación de tasas de especiación y extinción mediante *PyRate* (Silvestro et al., 2014):**

Este programa puede usarse para estimar las tasas de especiación y extinción a lo largo del tiempo, a partir de datos de ocurrencia de especies fósiles y actuales, mediante el uso de un algoritmo MCMC. Después de descargar los códigos fuente necesarios (<https://sourceforge.net/projects/pyrate/>), realizamos el análisis utilizando los datos de ocurrencia de especies fósiles que se muestran en la tabla anterior y el número de especies de pleurodiras existentes de acuerdo con el Turtle Taxonomy Working Group (2017). El procedimiento completo y las configuraciones utilizadas se detallan a continuación:

```
source(file = "/path_to_file/pyrate_utilities.r") #load the R source code with initial functions

extract.ages(file = "/path_to_file/Ocurr_Pleurodira_filtered.txt") #resample ages from the fossil occurrence file and
export the result to a Python file

python PyRate.py Ocurr_Pleurodira_filtered_PyRate.py -N 93 -mG -n 100000000 -s 5000 -p 5000 #run the
analysis to estimate birth and death rates under the indicated parameters
```

-N = number of extant species

-mG = preservation rate is assumed to be gamma distributed

-n = number of generations in the MCMC chain

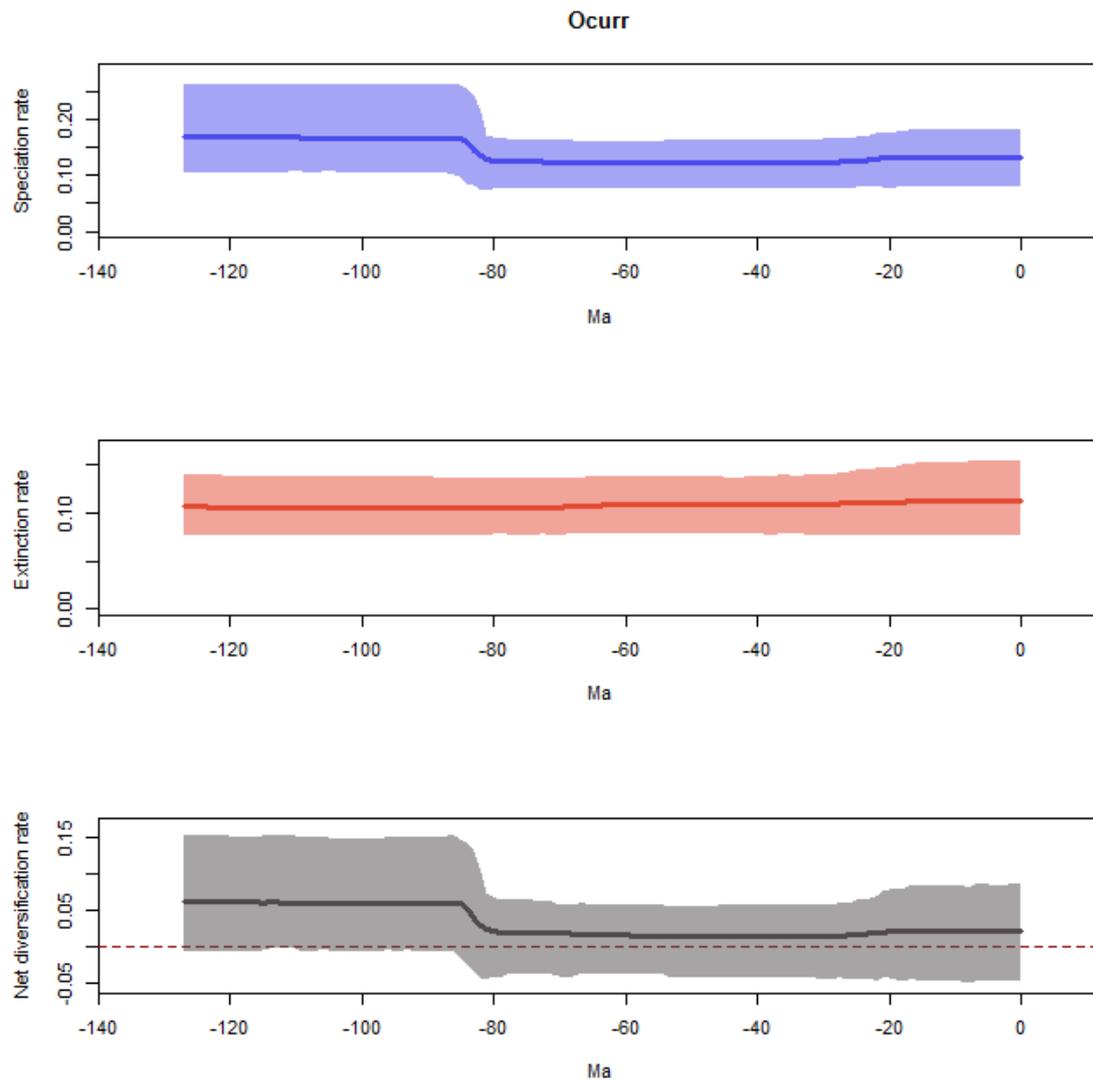
-s = sample frequency in the MCMC chain

-p = frequency of computation print

Los resultados se obtienen en dos archivos .log, que se inspeccionan mediante un código de R que produce un gráfico de las tasas estimadas en el tiempo. Dicho código se genera tipiendo en un shell cmd de Windows lo siguiente:

```
python PyRate.py -mProb/path_to_file/ Ocurr_Pleurodira_filtered_1_G_mcmc.log
```

Luego de correr el código R se obtiene un gráfico como el siguiente:



Las tasas estimadas previamente (con TRiPS y PyRate) se utilizaron para calcular los valores iniciales y los límites de las distribuciones *a priori* en las tasas requeridas para el modelo FBD (y BD) para los análisis de reloj molecular. Los parámetros finales requeridos por BEAST, se derivan de las tasas principales, estos son:

$$\text{Net diversification rate} = \text{Birth rate} - \text{Death rate}$$

$$\text{TurnOver} = \text{Death rate}/\text{Birth rate}$$

$$\text{Sampling proportion} = \text{Sampling rate}/(\text{Sampling rate} + \text{Death rate})$$

Los valores medios, mínimos y máximos (del IC del 95%) de las tasas estimadas con TRiPS y PyRate, se utilizaron para calcular los valores medios de estos parámetros y definir límites de distribuciones uniforme *a priori*. Estos valores se ingresaron como configuraciones en BEAUti para el archivo *xml* de BEAST2. Por ejemplo, la configuración de BEAUti para los parámetros del modelo FBD en el análisis de Evidencia Total es la siguiente:

Net diversification rate			Turnover			Sampling proportion		
Min	Max	Mean	Min	Max	Mean	Min	Max	Mean
-0.05	0.153	0.05	0.584	1.05	0.82	0.036	0.077	0.056

### Script de R para realizar comparaciones entre este estudio y estudios previos mediante test estadísticos:

```
require("readxl")
require("dunn.test")

datos <- read_excel("D:/Desktop/DOCTORADO/TESIS/Relej/date_comparissons.xlsx", sheet = "test")
View(datos)
str(datos)
#kruskal.test(x=datos$Edad[datos$Nodo == 1],g=factor(datos$Estudio[datos$Nodo == 1]))
idx <- 1:10
idx <- idx[-2]
idx <- idx[-7]
for (i in idx) {
  show(paste("Resultados para el nodo",i))
  dunn.test(x=datos$Edad[datos$Nodo == i],g=factor(datos$Estudio[datos$Nodo == i]),method = "sidak")
}

for (i in c(2,8)) {
  wilcox.test(datos$Edad[datos$Nodo == i][1:3],datos$Edad[datos$Nodo == i][4:6])
}
```

### Datos para realizar comparaciones entre este estudio y estudios previos mediante test estadísticos:

Edad	Estudio	Nodo
193,7	Hea (2020) – ET	1
165,62	Hea (2020) – ET	1
217,21	Hea (2020) – ET	1
180,74	PC - ET	1
149,01	PC - ET	1
216,2	PC - ET	1
147,3	Dea (2011)	1
133,5	Dea (2011)	1
162,8	Dea (2011)	1
164,09	Jea (2013)	1
155,6	Jea (2013)	1
171,35	Jea (2013)	1
129,06	R&DF (2016)	1

112,38	R&DF (2016)	1
149,23	R&DF (2016)	1
161,74	Pea (2017)	1
149,25	Pea (2017)	1
168,9	Pea (2017)	1
146,82	Hea (2020) – ET	2
121,67	Hea (2020) – ET	2
177,12	Hea (2020) – ET	2
155,07	PC - ET	2
116,9	PC - ET	2
193,38	PC - ET	2
112,08	Hea (2020) – ET	3
92,03	Hea (2020) – ET	3
134,04	Hea (2020) – ET	3
123,18	PC - ET	3
93,68	PC - ET	3
160	PC - ET	3
80,4	Dea (2011)	3
73,2	Dea (2011)	3
90,2	Dea (2011)	3
116,01	Jea (2013)	3
99,35	Jea (2013)	3
133,19	Jea (2013)	3
77,22	R&DF (2016)	3
66,46	R&DF (2016)	3
92	R&DF (2016)	3
117,46	Pea (2017)	3
99,45	Pea (2017)	3
135,3	Pea (2017)	3
85,26	Hea (2020) – ET	4
65,43	Hea (2020) – ET	4
108	Hea (2020) – ET	4
101,75	PC - ET	4
70,57	PC - ET	4
135	PC - ET	4
44,4	Dea (2011)	4
25,9	Dea (2011)	4
63	Dea (2011)	4
94,62	Jea (2013)	4
76,31	Jea (2013)	4
113,52	Jea (2013)	4
60,04	R&DF (2016)	4
46,01	R&DF (2016)	4
75,8	R&DF (2016)	4
104,41	Pea (2017)	4

85,86	Pea (2017)	4
122,5	Pea (2017)	4
53,61	Hea (2020) – ET	5
45	Hea (2020) – ET	5
74,09	Hea (2020) – ET	5
65,26	PC - ET	5
45	PC - ET	5
80,4	PC - ET	5
21,46	R&DF (2016)	5
12,58	R&DF (2016)	5
32,07	R&DF (2016)	5
40,12	Pea (2017)	5
27,23	Pea (2017)	5
57,14	Pea (2017)	5
65,16	Hea (2020) – ET	6
45,66	Hea (2020) – ET	6
87,52	Hea (2020) – ET	6
81,1	PC - ET	6
52,9	PC - ET	6
118,6	PC - ET	6
50,58	R&DF (2016)	6
36,53	R&DF (2016)	6
66,59	R&DF (2016)	6
90,08	Pea (2017)	6
68,86	Pea (2017)	6
108,61	Pea (2017)	6
101,86	Hea (2020) – ET	7
85,36	Hea (2020) – ET	7
122,18	Hea (2020) – ET	7
109,77	PC - ET	7
88,07	PC - ET	7
142,4	PC - ET	7
67,87	R&DF (2016)	7
54,88	R&DF (2016)	7
83,38	R&DF (2016)	7
99,3	Pea (2017)	7
81,51	Pea (2017)	7
117,62	Pea (2017)	7
60,38	Hea (2020) – ET	8
48	Hea (2020) – ET	8
83,88	Hea (2020) – ET	8
61,6	PC - ET	8
48	PC - ET	8
83,6	PC - ET	8
68,7	Hea (2020) – ET	9

51	Hea (2020) – ET	9
88	Hea (2020) – ET	9
93,2	PC - ET	9
28,9	PC - ET	9
119,8	PC - ET	9
44,4	Dea (2011)	9
25,9	Dea (2011)	9
63	Dea (2011)	9
72	Jea (2013)	9
54	Jea (2013)	9
90	Jea (2013)	9
50	R&DF (2016)	9
39,5	R&DF (2016)	9
62	R&DF (2016)	9
67,6	Pea (2017)	9
55,1	Pea (2017)	9
82,5	Pea (2017)	9
50,98	Hea (2020) – ET	10
37,12	Hea (2020) – ET	10
65,65	Hea (2020) – ET	10
69,38	PC - ET	10
23,9	PC - ET	10
94,3	PC - ET	10
40,56	R&DF (2016)	10
31,01	R&DF (2016)	10
50,64	R&DF (2016)	10
57,13	Pea (2017)	10
47,08	Pea (2017)	10
68,74	Pea (2017)	10

### Script de R para realizar regresiones lineales entre edades de nodos:

```
require(ape)
require(phyloch)
require(ggplot2)
require(ggpubr)
f1 <- file.choose()
r_tr <- read.nexus(f1) #seleccionar arbol a podar
f2 <- file.choose()
c_tr <- read.nexus(f2) #seleccionar arbol de comparacion
t <- comparePhylo(r_tr,c_tr) #comparar arboles
if(length(t$messages) == 9) {
  s <- t$messages[3]
  s <- unlist(strsplit(s,":"))#
  s = s[-1]
  s1 <- gsub("[.]", "", s) #obtener tips a cortar
  s2 <- gsub(" ", "", s1) #
  s3 <- unlist(strsplit(s2,",")) #
  R_tr <- drop.tip(r_tr,s3)
```

```

ref_tr <- read.beast(f1)
ref_TR <- drop.tip2(ref_tr,s3)
s <- t$messages[4]
s <- unlist(strsplit(s,":"))#
s = s[-1]
s1 <- gsub("[.]", "",s)      #obtener tips a cortar
s2 <- gsub(" ", "",s1)      #
s3 <- unlist(strsplit(s2,",")) #
c_tr <- drop.tip(c_tr,s3)
comp_tr <- read.beast(f2)
comp_tr <- drop.tip2(comp_tr,s3)
} else {
s <- t$messages[3]
s <- gsub("Tips in r_tr not in c_tr : ", "",s)#
s1 <- gsub("[.]", "",s)      #obtener tips a cortar
s2 <- gsub(" ", "",s1)      #
s3 <- unlist(strsplit(s2,",")) #
R_tr <- drop.tip(r_tr,s3)
ref_tr <- read.beast(f1)
ref_TR <- drop.tip2(ref_tr,s3)
comp_tr <- read.beast(f2)
}

r_sub_tr <- subtrees(R_tr)
c_sub_tr <- subtrees(c_tr)
nodes_r_tr <- c()
nodes_c_tr <- c()

for (i in 1:R_tr$Nnode) {
  for (j in 1:c_tr$Nnode) {
    if(paste(sort(r_sub_tr[[i]]$tip.label),collapse = " ") ==
      paste(sort(c_sub_tr[[j]]$tip.label),collapse = " ")){
      show(paste(i,j))
      nodes_r_tr <- c(nodes_r_tr,i)
      nodes_c_tr <- c(nodes_c_tr,j)
    }
  }
}

x <- ref_TR$height_median[nodes_r_tr]
y <- comp_tr$height_median[nodes_c_tr]
#reg <- lm(y~x)
#R2 <- summary(reg)$r.squared
#p_val <- summary(reg)$coefficients[2,4]
df1 <- data.frame(Concatenada=x, ARNr=y)
p1 <- ggplot(data=df1, mapping=aes(x=Concatenada, y=ARNr)) +
  geom_point(alpha=.8,color="darkorchid1") +
  geom_smooth(alpha=.2, color= "darkorchid1",method= "lm",formula= y~x,size= 1) +
  labs(title = "Edades de los nodos (MAAP)") +
  labs(x="Evidencia total") +
  labs(y="c-mos") +
  stat_cor(method = "pearson", label.x = 3, label.y = 100) +
  theme(plot.title = element_text(hjust = 0.5))

```