

Efectos de la temperatura de incubación en el periodo termosensitivo de determinación sexual y evaluación de morfometría geométrica como técnica de sexaje en la tortuga del río Magdalena (*Podocnemis lewyana*)

Catalina Gómez Saldarriaga, MV

Directora

Claudia Patricia Ceballos Fonseca, MV, MSc, PhD

Profesora asistente

Escuela de Medicina Veterinaria

Facultad de Ciencias Agrarias

Universidad de Antioquia

Comité tutorial

Clara Susana Arias MV, MSc

Iván Darío Soto Calderón Biol, MSc, PhD

**Trabajo presentado para optar al título de Magíster en Ciencias Animales
Línea Medicina de la Conservación**

Universidad de Antioquia

2014

AGRADECIMIENTOS

A Álvaro Díaz Pineda y a Isabel Romero, por su invaluable ayuda y por haberme acogido como parte de su familia. Muchas gracias.

A AAFUVER por el apoyo logístico y a la comunidad de Estación Cocorná por las diferentes formas en que apoyaron este proyecto.

A mi tutora Claudia Ceballos por su amable disposición, colaboración, responsabilidad y principalmente por su paciencia. Gracias.

A los miembros de mi comité tutorial, Clara e Iván, por su disponibilidad y valiosos aportes.

A la profesora Nicole Valenzuela por su asesoría y el préstamo de las incubadoras usadas en la investigación.

A mis compañeros de maestría por su colaboración y apoyo.

A mis padres, Julián y Silvia, porque gracias a ellos he llegado hasta donde estoy. Gracias por siempre.

A mis hermanos, Daniela y Andrés, por estar constantemente dispuestos a ayudarme.

A John F. por estar siempre a mi lado y soportar todos los altibajos. Muchas, muchas gracias.

A la Universidad de Antioquia, al CODI y al grupo de investigación Centauro por el apoyo y financiación a este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	4
LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE ANEXOS	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. OBJETIVO GENERAL.....	12
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
4. MARCO TEÓRICO	13
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
6. RESULTADOS	25
6.1 Parámetros reproductivos	25
6.2 Efecto de las temperaturas de incubación sobre las proporciones sexuales en los grupos controles	26
6.3 Efectos de la temperatura de incubación de los grupos experimentales sobre el periodo termosensitivo (PTS).....	26
6.4 Efecto de la temperatura de incubación en el tamaño y la forma.....	27
6.5 Dimorfismo sexual en tamaño y forma	29
6.6 Sexaje por medio de la forma.....	30
6.7 Efectos maternos	30
7. DISCUSIÓN.....	31
7.1 Efecto de las temperaturas de incubación sobre las proporciones sexuales	31
7.2 Efecto de las temperaturas de incubación sobre el periodo termosensitivo	32
7.3 Efecto de la temperatura de incubación en la forma y el tamaño.....	34
7.4 Dimorfismo sexual en tamaño y forma	35
7.5 Sexaje por medio de la forma.....	36
8. CONCLUSIONES	37
9. REFERENCIAS	38

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Diseño experimental, temperaturas registradas durante la incubación de huevos de <i>P. lewyana</i> y proporciones sexuales observadas de acuerdo al sexaje con la forma del plastrón a los 7 días de edad.....	48
Tabla 2. Número de huevos, tiempo de incubación y número de neonatos eclosionados en cada tratamiento de incubación.....	49
Tabla 3. Efecto materno en el tamaño y peso de neonatos de <i>P. lewyana</i> a los 7 días de edad.....	50
Tabla 4. Tamaño y peso de neonatos de <i>P. lewyana</i> a los 7 días de edad de cada tratamiento de incubación.	51
Tabla 5. Dimorfismo sexual, significancia y efectividad del sexaje basado en la forma del caparazón, plastrón y muesca anal de <i>P. lewyana</i> a los 7 días y 3.5 meses de edad.	52
Tabla 6. Proporciones sexuales (porcentaje de hembras) obtenidas en cada tratamiento de incubación de acuerdo a la forma del caparazón, plastrón y muesca anal en <i>P. lewyana</i> a los 7 días y 3.5 meses de edad.....	53
Tabla 7. Test ANOVA del efecto de la temperatura de incubación y nido de origen en el tamaño de <i>P. lewyana</i> a los 7 días y 3.5 meses de edad.....	54
Tabla 8. Test ANOVA basado en distancias de Procrustes del efecto del sexo, la temperatura de incubación y nido de origen en la forma de <i>P. lewyana</i> a los 7 días y 3.5 meses de edad.....	55
Tabla 9. Test ANOVA de la distancia ombligo- muesca (DOM) y de su proporción al largo recto del plastrón (LRP) en <i>P. lewyana</i> a los 3.5 meses de edad.	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación de las playas de anidación de <i>P. lewyana</i> en el río Claro Cocorná Sur utilizadas en este estudio.....	58
Figura 2. Puntos digitalizados en el caparazón, plastrón y muesca anal en los tortuguillos a los 7 días y 3.5 meses de edad.....	59
Figura 3. Forma promedio de los grupos indicando los efectos de la temperatura de incubación en la forma del caparazón, plastrón y muesca anal de <i>P. lewyana</i> a los 7 días de edad.....	60
Figura 4. Forma promedio de los grupos indicando los efectos de la temperatura de incubación en la forma del caparazón, plastrón y muesca anal de <i>P. lewyana</i> a los 3.5 meses de edad.....	61
Figura 5. Análisis de componentes principales de la forma del plastrón de neonatos de 7 días de edad.....	62
Figura 6. Dimorfismo sexual en la forma del caparazón, plastrón y muesca anal de <i>P. lewyana</i> a los 7 días y 3.5 meses de edad.....	63
Figura 7. Diagrama de caja de la distancia lineal desde el ombligo hasta la muesca anal (DOM) en tortuguillos hembras y machos de <i>P. lewyana</i> de 3.5 meses de edad..	64
.....	
Figura 8. Correlación entre el peso del huevo y el peso de tortuguillos de <i>P. lewyana</i> a los 7 días y 3.5 meses de edad.....	65
Figura 9. Peso de neonatos de <i>P. lewyana</i> a los 7 días de edad de acuerdo al nido de origen.	66
Figura 10. Efecto del nido de origen en la forma del caparazón y del plastrón de juveniles de <i>P. lewyana</i> a los 3.5 meses de edad.....	67

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Prueba de galera del manuscrito aceptado para publicación por la revista Acta Biológica Colombiana.....	68
Anexo 2. Reglamento de la revista Acta Biológica Colombiana.	76

RESUMEN

El período termosensitivo (PTS) durante el cual se define el sexo en los embriones de los reptiles ha sido estudiado principalmente a temperaturas constantes, sin embargo los efectos de temperaturas variables antes y durante el PTS mismo han sido poco evaluados. Igualmente es necesario conocer el efecto que la temperatura de incubación tiene sobre el sexo y la forma, particularmente en reptiles amenazados de extinción cuyos huevos son incubados bajo condiciones artificiales. Este estudio evaluó el efecto de la temperatura de incubación sobre el sexo, el período termosensitivo y la forma del caparazón y el plastrón de la tortuga del río Magdalena, *Podocnemis lewyana*, que habita en el río Claro Cocorná Sur, en Puerto Triunfo, Antioquia. Los objetivos específicos fueron: evaluar las proporciones sexuales producidas en huevos incubados a temperaturas promedio masculinizantes (29.2 ± 0.8 y 31.2 ± 0.4 °C) y feminizantes (34.6 ± 1.2 °C); y determinar el efecto de dos velocidades de desarrollo embrionarias en el inicio y la duración del PTS usando dos temperaturas masculinizantes antes del mismo. Se observó que la temperatura masculinizante baja (29.4 ± 1.6 °C) indujo el inicio del PTS a partir del día 20 del periodo de incubación con una duración aproximada de 20 días, mientras que una temperatura dos grados más alta (masculinizante alta, 31.3 ± 1.3 °C) indujo el inicio del PTS también en el día 20 pero con una duración de 30 días.

Adicionalmente en este trabajo se evaluó el efecto de la temperatura de incubación sobre la forma del caparazón y plastrón de los recién nacidos. Los resultados sugieren que las temperaturas de incubación más bajas (29.2 °C) se asocian a neonatos con un cuerpo más ancho y una muesca anal más profunda que los neonatos de temperaturas más altas (34.6 °C). Las formas observadas fueron similares a lo reportado en otra especie congénérica, *Podocnemis expansa*, sugiriendo un patrón de efectos similares de la temperatura de incubación en la forma del cuerpo, al menos para el clado *Podocnemis*.

Finalmente, como parte de la metodología usada en este trabajo, se reporta la efectividad de la morfometría geométrica como una técnica de sexaje no letal en neonatos de *P. lewyana*. Este sexaje tuvo una efectividad del 91% y 85% empleando

la forma del plastrón a los 7 días y 3.5 meses de edad respectivamente. Se observó que las hembras tienen un cuerpo más alargado y una muesca anal menos marcada que los machos, formas similares a las encontradas en temperaturas altas y bajas, respectivamente. Dado el grado de amenaza de conservación de la especie se sugiere usar este método como una técnica estimativa del sexo de individuos de *P. lewyana* en estadios juveniles sin dimorfismo sexual evidente.

Palabras claves: Morfometría geométrica, Periodo termosensitivo, *Podocnemis lewyana*, Sexaje.

ABSTRACT

The thermosensitive period (TSP) during which the sex of reptile embryos is defined has been studied mainly at constant temperatures. However, the effects of varying temperatures before and during this TSP have not been assessed in detail and therefore need to be studied. Likewise, it is important to know the effects of the incubation temperature on the sex and shape of the animals, particularly for threatened reptile species whose eggs are being incubated under artificial conditions to increase their survival. This study assessed the effect of hatching temperature on the sex, the thermosensitive period, and the carapace and plastron shapes of the Magdalena River Turtle, *Podocnemis lewyana*, inhabiting the Claro Cocorná Sur river, located in Puerto Triunfo, Antioquia, Colombia. The specific objectives were: to evaluate the sex ratios produced in eggs incubated at masculinizing (29.2 ± 0.8 y 31.2 ± 0.4 °C) and feminizing (34.6 ± 1.2 °C) average temperatures, and determine the effect of those two embryonic development speeds (under 29.4 ± 1.6 y 31.3 ± 1.3 °C) on the onset and duration of the TSP. It was observed that the slower masculinizing temperature (29.4 °C) induced the TSP onset from day 20 of the incubation period and lasted approximately 20 days, while the faster masculinizing temperature (31.3 °C), a temperature 2 °C higher induced the TSP onset also on day 20 but lasted 30 days.

Additionally, the effect of incubation temperature on the carapace and plastron shape of hatchlings was evaluated. The results suggest that lower incubation temperatures (29.2 °C) are associated with hatchlings with a wider body and a deeper anal notch than hatchlings of higher temperatures (34.6 °C). These body forms were similar to those reported in other congeneric species, *Podocnemis expansa*, suggesting a similar pattern of effects of incubation temperature on body shape, at least for the clade *Podocnemis*.

Finally, as part of the methodology used in this study, I report the effectiveness of geometric morphometrics as a non-lethal sexing technique in hatchlings of *P. lewyana*. This sexing technique had an effectiveness of 91% and 85% using the plastron shape at 7 days and 3.5 months of age respectively. It was observed that females have a more elongated body and a less marked anal notch than males, similar to the body shapes found under high and low incubation temperatures, respectively. Given the conservation threat degree of this species I suggest the use of this method as a sexing technique for *P. lewyana* hatchlings or juveniles with no evident sexual dimorphism.

Keywords: Geometric Morphometrics; *Podocnemis lewyana*; Sexing; Thermosensitive Period.

1. INTRODUCCIÓN

Colombia es considerada la cuarta nación a nivel mundial en el número de especies animales y vegetales, ocupando el primer lugar en el mundo en número de anfibios y aves, el segundo en plantas, el tercero en reptiles y el quinto en mamíferos (IAvH 2012). Dentro de los reptiles, en el orden Testudines, nuestro país posee 33 especies, 18 de las cuales presentan algún riesgo de amenaza (Castaño-Mora 2002), principalmente debido al consumo intensivo de huevos y adultos por parte del hombre y al deterioro y fragmentación de sus hábitats (Ministerio del Medio Ambiente 2002). Las medidas de conservación urgentes que deben tomarse para evitar la extinción de estas especies implican que el estudio de su biología y fisiología adquieran una especial importancia.

Dentro de las amenazas para la supervivencia de los quelonios se encuentra además el calentamiento global, fenómeno que ha causado un aumento de 0.6 ± 0.2 °C en la temperatura de la superficie de la tierra a lo largo del siglo XX, el cual probablemente sea el mayor aumento de todos los siglos durante los últimos 1.000 años (Houghton *et al.*, 2001). Estos cambios ambientales pueden tener un efecto aún más marcado en especies de quelonios (Neuwald y Valenzuela, 2011; Patiño-Martínez *et al.*, 2012) cuyo sexo se define por la temperatura de incubación experimentada por los huevos (o determinación sexual por temperatura, DST), en las cuales la temperatura ambiental es determinante de las proporciones sexuales de la población (Bull, 1980). Es importante entender los efectos de las variaciones de la temperatura de incubación de los huevos y el momento en que estos ocurren en el embrión. Esto es fundamental en particular en los programas de conservación que incuban huevos de forma artificial, puesto que sus efectos se verán reflejados en las proporciones sexuales de las poblaciones naturales.

El tiempo durante el cual el embrión es sensible a la temperatura ambiental y se define su sexo gonadal se denomina periodo termosensitivo (PTS). El inicio y la duración del PTS han sido evaluadas en algunos estudios, sin embargo estos reportan hallazgos muy variables. Por ejemplo, se ha determinado que el PTS inicia en el segundo tercio o en la mitad del periodo de incubación de los huevos (Wibbels *et al.*, 1991; 1994; Young *et al.*, 2004). Otros autores han sugerido que dicho periodo puede ocurrir en el último tercio del periodo de incubación (Bonach *et al.*, 2011). La duración del PTS también ha sido variable. Se ha reportado por ejemplo que el PTS puede abarcar del 15 al 20% del tiempo de desarrollo embrionario bajo ciertas temperaturas de incubación constantes (Pieau y Dorizzi, 1981; Wibbels *et al.*, 1991; 1994; Young *et al.*, 2004) pero pudiendo incluso suceder durante un tiempo más extendido, hasta un 50% del desarrollo en condiciones naturales (de Souza y Vogt, 1994). Dado que la temperatura de incubación afecta la velocidad de desarrollo del embrión, tal como se refleja en la duración del periodo de incubación, la temperatura previa al inicio del PTS debe ser tomada en cuenta a la hora de definir el PTS mismo (Valenzuela, 2001; Georges *et al.*, 2005). Por ejemplo, diferencias de 4 °C han resultado en desfases de más de 10 días en el mismo estado embrionario (Okada *et*

al., 2011), lo cual sugiere que la temperatura de incubación puede afectar el inicio del PTS.

El estudio de cómo varía el inicio y la duración del PTS según las diferentes condiciones de incubación es importante ya que permite un mayor entendimiento del mecanismo de determinación sexual por temperatura y por ende sus posibles efectos en los programas de conservación de especies amenazadas. El momento del período de incubación en el que se define el sexo o PTS en la tortuga del río Magdalena (*Podocnemis lewyana*) y la forma cómo diferentes temperaturas pueden modificar su inicio y duración no ha sido estudiado. Este fue el objetivo principal de este estudio.

Además de definir el sexo de los embriones, la temperatura de incubación puede también afectar la forma del cuerpo de los recién nacidos (Gutzke *et al.*, 1987; Du *et al.*, 2006; Ceballos y Valenzuela, 2011; Ceballos *et al.*, 2014a). Estos efectos de la temperatura en la forma deben ser determinados porque pueden estar directamente relacionados con el desempeño de los neonatos (Ashmore y Janzen, 2003; Booth *et al.*, 2004; Refsnider, 2013) y potencialmente con su supervivencia (Janzen, 1993a; Freedberg *et al.*, 2001). Por ejemplo, en tortugas hicotéas, *Trachemys scripta*, se encontró que individuos relativamente más pesados, cortos y anchos nadan más rápido que los más livianos, largos y delgados (Myers *et al.*, 2007), por tanto sería de esperarse que las tortugas con cuerpos anchos puedan evadir depredadores más fácilmente. Esta información es de vital importancia dada la manipulación de las nidadas realizada por los programas de conservación.

Debido a que los neonatos carecen de dimorfismo sexual observable a simple vista, la técnica más utilizada para su sexaje es la histología gonadal, la cual desafortunadamente requiere del sacrificio de los neonatos. Para evitar estos sacrificios es necesario evaluar otras técnicas de sexaje no letales basadas en diferencias morfológicas entre machos y hembras. La morfometría geométrica (MG) es una técnica no invasiva y no letal que consiste en tomar fotografías digitales al caparazón y plastrón del neonato y posteriormente digitalizar puntos de referencia en las intersecciones de los escudos por medio de software especializados (Rohlf 2001a; b; 2003; 2004). La MG ya ha sido utilizada exitosamente en otras especies

de tortugas como *Chrysemys picta*, *Trachemys scripta*, *Chelydra serpentina* y *Podocnemis expansa* (Valenzuela *et al.*, 2004; Myers *et al.*, 2007; Ceballos y Valenzuela, 2011; Ceballos *et al.*, 2014a) lo que sugiere que este es un método de sexaje apropiado para investigaciones que requieren sexar neonatos de especies amenazadas.

Este trabajo fue desarrollado usando como especie modelo la tortuga del río Magdalena, *Podocnemis lewyana*. Esta es una especie dulceacuícola endémica de Colombia, la cual está clasificada como “En Peligro” por la UICN y el Libro Rojo de Reptiles de Colombia (Castaño-Mora, 2002). Esta categoría sin embargo se ha sugerido cambiarla a “En Peligro Crítico” debido a la continua reducción en sus poblaciones (Restrepo *et al.*, 2008) a causa de la destrucción de su hábitat y la depredación humana de sus huevos y adultos (Vargas-Ramírez *et al.*, 2006).

2. OBJETIVO GENERAL

Determinar los efectos de la temperatura de incubación en el periodo termosensitivo, el sexo y la morfología de neonatos de *Podocnemis lewyana* del río Claro Cocorná Sur, Puerto Triunfo, Antioquia.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1. Proporciones sexuales:** Determinar el efecto de la temperatura de incubación en el sexo de recién nacidos, específicamente de dos temperaturas masculinizantes (29° y 31 °C) y una feminizante (34.7 °C) reportadas en otra población de la misma especie.
- 2. Periodo termosensitivo:** Determinar el efecto de dos temperaturas de incubación masculinizantes que afectan diferencialmente la velocidad de desarrollo del embrión, sobre el inicio y la duración del PTS.
- 3. Morfología:** Determinar el efecto de tres temperaturas de incubación, dos masculinizantes y una feminizante (29, 31 y 34.7 °C), en la morfología del caparazón y plastrón de los neonatos.

- 4. Sexaje:** Determinar las diferencias morfológicas del caparazón y plastrón entre los sexos como un método alternativo de sexaje no letal.

4. MARCO TEÓRICO

Las proporciones sexuales se definen como la distribución ajustada de un sexo con respecto al otro en una población dada. En especies con determinación sexual por temperatura este parámetro demográfico está sujeto a variaciones en la temperatura ambiental (Janzen, 1994). Estudios en diferentes especies de tortugas han reportado proporciones sexuales que difieren de 1:1, con variaciones a favor de machos o hembras de acuerdo a la zona de muestreo, la temporada evaluada, los métodos utilizados y la playa de anidación (Gibbons, 1970; Valenzuela *et al.*, 1997; Forero-Medina *et al.*, 2007; de Souza Alcântara *et al.*, 2013). En *Podocnemis lewyana* las proporciones sexuales encontradas en neonatos varían de 1:1 a 2.6-8.4:1 en favor de las hembras de acuerdo al año evaluado y la temperatura de incubación promedio en los nidos (Páez *et al.*, 2009; Correa *et al.*, 2010).

Dado lo anterior, es necesario conocer cómo los cambios ambientales influyen en las proporciones sexuales de los quelonios y que tan vulnerables pueden llegar a ser ante los mismos. En varias especies de reptiles ocurre la determinación sexual por temperatura (DST), en la cual el sexo es definido por señales del medio ambiente, independiente de la composición genética del cigoto (Bull, 1980). Un pequeño cambio en la temperatura de incubación determina si el embrión será un macho o una hembra. Este tipo de determinación del sexo ha sido identificado para todas las especies de cocodrilos estudiadas hasta la fecha y algunas especies de tortugas y de lagartos (Johnston *et al.*, 1995; Valenzuela, 2004). En la DST tipo Ia, las hembras son producidas a temperaturas altas, mientras que los machos se producen a temperaturas bajas. Lo contrario ocurre en la DST tipo Ib, es decir, las hembras son producidas a temperaturas bajas, mientras que los machos se producen a temperaturas altas. En la DST tipo II las hembras se producen a temperaturas bajas y altas, y los machos a temperaturas intermedias (Valenzuela, 2004).

Durante el desarrollo del embrión hay una ventana de tiempo en el cual éste es sensible a la temperatura para la definición del sexo, el cual se denomina periodo termosensitivo (PTS) (Yntema, 1979; Bull, 1980). En general se sabe que un aumento en la temperatura ambiental induce la expresión de los genes involucrados dentro del mecanismo de DST, tales como FoxL2 y Rspo1, encargados de la diferenciación ovárica a temperaturas productoras de hembras, al igual que el gen Aromatasa, el cual codifica la enzima que cataliza la conversión de andrógenos a estrógenos. En las temperaturas productoras de machos algunos de los genes posiblemente involucrados son Sox9 y Dmrt1. Una vez activada una de las dos vías, aumenta la producción de la hormona respectiva de acuerdo al sexo (estrógenos o testosterona) y se inicia la diferenciación de ovarios o testículos (Matsumoto y Crews, 2012). Sin embargo, se han encontrado tanto en condiciones de laboratorio como en la naturaleza, individuos con intersexualidad gonadal, es decir, con testículos fértiles con oocitos inmaduros en su interior, bajo condiciones de incubación cercanas a la temperatura pivotal, temperaturas fluctuantes o en tratamientos con hormonas exógenas (Pieau *et al.*, 1999).

Se sabe que para especies de tortugas de agua dulce como *Trachemys scripta* y *Carettochelys insculpta* y otros reptiles con determinación sexual por temperatura el PTS va desde el segundo tercio hasta la mitad del periodo de incubación (Wibbels *et al.*, 1991; 1994; Young *et al.*, 2004). Para *Podocnemis expansa* se ha sugerido que inicia aproximadamente en el segundo tercio del período de incubación y abarca los estadios de desarrollo embrionario 17 a 24 (Valenzuela, 2001a). Otros autores sin embargo han sugerido para la misma especie que dicho periodo puede ocurrir en el último tercio del periodo de incubación (Bonach *et al.*, 2011). En muchas especies de reptiles la termosensibilidad comienza antes de la diferenciación gonadal y se extiende hasta un momento en que los cambios específicos del sexo se hacen evidentes en las gónadas (Wibbels *et al.*, 1994). Durante este periodo termosensitivo la temperatura de incubación a la cual se producen los dos sexos en igual proporción se designa temperatura pivotal. Pequeños cambios en la temperatura pueden resultar en grandes cambios en las proporciones sexuales (Yntema y Mrosovsky, 1982).

Los primeros estudios sobre estadios de desarrollo embrionario en tortugas fueron descritos por Yntema (1968) en la especie *Chelydra serpentina*. Estos fueron delimitados de acuerdo al desarrollo y crecimiento del embrión y se clasifican en: periodo “temprano o presegmento” (estadios 0 a 3), el periodo “segmento” (estadios 4 al 10) y el periodo “extremidad” (estadios 11 al 26). Estos estadios fueron observados en embriones incubados a 20 y 30 °C, en los cuales pudo compararse las diferencias en el crecimiento entre ambas temperaturas. Otros estudios han determinado también las diferencias en el desarrollo embrionario de acuerdo a la temperatura de incubación. Para *C. serpentina*, la tasa de desarrollo a 31 °C es aproximadamente el doble que a 25 °C, y consecuentemente en una semana de desarrollo a 31 °C se desarrollan el doble de estadios que en una semana a 25 °C (Bull y Vogt, 1981).

Con base en estos estadios de desarrollo, algunos investigadores han intentado definir más específicamente el momento de la incubación en el cual el embrión es sensible a la temperatura para determinar su sexo (Bull y Vogt, 1979; Yntema, 1979; Bull, 1980; Pieau y Dorizzi, 1981; Yntema y Mrosovsky, 1982; Valenzuela, 2001a; Hewavisenthi y Parmenter, 2002). Los huevos son incubados inicialmente en la temperatura que produce un sexo para luego cambiarlos a otra temperatura que produce el otro sexo durante un periodo de tiempo específico. Estos estudios han establecido que entre los estadios 14 al 22 del desarrollo embrionario aproximadamente es el momento más sensible a la temperatura. Dado que se ha detectado una respuesta diferencial en los estadios embrionarios entre los sexos, es probable entonces que una variación en la temperatura inicial afecte la presentación del PTS en forma distinta. En otras palabras, si la definición del sexo masculino en el embrión ocurre en el estadio embrionario 17, mientras que la definición del sexo femenino ocurre a partir del estadio 23 (Bull, 1980), entonces el modificar la temperatura inicial (durante las primeras semanas del desarrollo embrionario) podría afectar el inicio del PTS. Por ejemplo, huevos de *Natator depressus*, fueron incubados a dos temperaturas iniciales masculinizantes, 26 y 29 °C, y luego se pasaron a una temperatura feminizante en diferentes momentos del periodo de incubación. La incubación inicial a 29 °C y la posterior exposición a temperaturas feminizantes logró la producción de hembras en cualquier momento del segundo

tercio de la incubación, mientras que a 26 °C el cambio debió hacerse en estadios del desarrollo más tempranos para conseguir la feminización de los embriones (Hewavisenthi y Parmenter, 2002).

Dado que la temperatura de incubación afecta el periodo de incubación, igualmente se espera que el desarrollo embrionario ocurra a una velocidad diferente, y que el periodo termosensitivo suceda en otro momento (se adelante o atrase) (Yntema, 1979; Bull, 1980; Hewavisenthi y Parmenter, 2002). Por ejemplo en la especie *Chelydra serpentina* la disminución de 2 °C en la temperatura extiende el periodo de incubación 20 días (Yntema, 1978), mientras que en *P. lewyana* una diferencia de 2.5 °C alarga el periodo de incubación en 13 días (Páez *et al.*, 2009). En efecto, algunos experimentos han mostrado que los estadios de desarrollo embrionario durante los cuales se define el sexo pueden variar con la temperatura de incubación inicial porque la tasa de desarrollo embrionario es dependiente de la temperatura (Yntema, 1979; Bull y Vogt, 1981). Los experimentos de cambio de temperatura de incubación de los huevos implican que los embriones cambian también la tasa de desarrollo. La forma como esta temperatura inicial afecta la ocurrencia del PTS ha tenido resultados contradictorios según el tipo de cambio (de temperatura productora de machos a una de hembras o viceversa). Por un lado se ha encontrado que para la producción de hembras es necesario mantener la temperatura feminizante (en la cual se producen hembras) durante más tiempo de modo que se abarque hasta un estadio más avanzado del desarrollo embrionario comparado con el número de estadios necesarios para la producción de machos (Pieau y Dorizzi, 1981). Este resultado apoyaría la hipótesis que la determinación masculina es más fácilmente inducida que la femenina (Bull, 1980). Por otro lado, otros trabajos han encontrado que para la producción de hembras es necesario mantener la temperatura feminizante sólo durante una parte del PTS, mientras que para producir machos es necesario mantener la incubación masculinizante durante todo el PTS (Yntema, 1979). Este resultado apoyaría la hipótesis contraria, que la producción de hembras es más fácilmente inducida que la de machos.

Además de determinar el sexo, la temperatura de incubación también puede afectar la forma y tamaño del neonato. En *Chelydra serpentina*, las temperaturas de

incubación más altas (28 °C) producen neonatos con caparazones más amplios anteriormente y plastrones más estrechos comparados con los neonatos de otros tratamientos (26 y 27 °C) (Ceballos y Valenzuela, 2011). En *Chrysemys picta* se encontró que los huevos incubados en temperaturas altas (32 °C) producían neonatos con caparazones más cortos que los incubados a temperaturas menores (22 y 27 °C) (Gutzke *et al.*, 1987). En *Apalone mutica* las temperaturas de incubación más bajas (28.5 °C) producen neonatos más grandes y la variación térmica en las temperaturas más altas (32.5 °C) tiende a producir neonatos más pequeños que la misma variación a temperaturas bajas (28.5 °C) (Mullins y Janzen, 2006). En *Podocnemis expansa*, las temperaturas de incubación más frías producen neonatos con caparazones y plastrones más cortos con una región pectoral más amplia, mientras las temperaturas más altas producen formas más alargadas con una región anal más ancha (Ceballos *et al.*, 2014a). El sexo *per se* es otro factor que puede afectar la forma del neonato. En *P. expansa* se encontró dimorfismo sexual en la forma de la muesca anal del plastrón, siendo más profunda en los machos que en las hembras (Ceballos *et al.*, 2014a). Igualmente se han encontrado diferencias entre la forma del caparazón de machos y hembras en neonatos de *P. expansa* y *C. picta* (Valenzuela *et al.*, 2004; Lubiana y Ferreira Júnior, 2009). Dichas formas pueden ser empleadas entonces como una técnica de sexaje no letal en individuos sin dimorfismo sexual detectable a simple vista.

Una alternativa que permite cuantificar los efectos de la temperatura de incubación y el sexo en el tamaño y la forma de especímenes es la morfometría geométrica (MG). Esta técnica consiste en hacer una cuantificación de la forma corporal digitalizando puntos de referencia en puntos específicos del cuerpo para detectar diferencias en la forma que no se observan a simple vista (Bookstein, 1986). La ubicación de estos puntos en las intersecciones de los escudos del caparazón y plastrón se realiza por medio de software específicos en las fotografías digitales tomadas a los especímenes de interés (Rohlf, 2001a; b; 2003; 2004). En estudios anteriores se ha encontrado que la MG tiene una efectividad del 98% en el sexaje de neonatos de *C. picta* y del 75 - 90% en *P. expansa* (Valenzuela *et al.*, 2004; Ceballos *et al.*, 2014a).

La especie objeto de este estudio es la tortuga del río Magdalena *Podocnemis lewyana*. Esta especie es endémica de los ríos Sinú, Magdalena y San Jorge. La longitud máxima del caparazón de la hembra es de 46 cm, y el peso máximo es de 8 kg. Los machos son más pequeños que las hembras y tienen la cola más larga. El color del caparazón varía de café-gris oscuro a café-oliva y el plastrón es amarillo verdoso con manchas oscuras en el lóbulo anterior y su porción media. Se reporta un tamaño de nidada de 10 a 30 huevos por postura (Castaño-Mora, 2002; Correa-H *et al.*, 2010). Esta especie enfrenta problemas de conservación por la extracción de sus huevos y caza de adultos para consumo humano razón por la cual se considera gravemente amenazada (Castaño-Mora, 2002). *P. lewyana* exhibe determinación del sexo por temperatura (DST-la), en la cual las hembras se producen a temperaturas altas y los machos a temperaturas bajas. Específicamente, temperaturas entre 29 y 33 °C producen 100% machos, 33.4°C es la temperatura pivotal (50% machos: 50% hembras) y 34.7°C produce 100% hembras (Páez *et al.*, 2009). Estudios llevados a cabo en cuanto a la diversidad genética de la especie han encontrado baja variación y baja diferenciación (Vargas-Ramírez *et al.*, 2007; Vargas-Ramírez *et al.*, 2012). De otro lado, las disminuciones en las poblaciones de *P. lewyana* han sido confirmadas en diferentes sitios del río Magdalena, las cuales están asociadas a los asentamientos humanos. La depredación, contaminación y la alteración de su hábitat son causantes directas de tal disminución (Gallego-García y Castaño-Mora 2008; Restrepo *et al.*, 2008).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Sitio de estudio

Este estudio se llevó a cabo en el río Claro Cocorná Sur, que bordea el corregimiento Estación Cocorná (6°2'8" N, 74°38'20" W), municipio de Puerto Triunfo, departamento de Antioquia, Colombia. La temperatura promedio oscila entre 26 y 28 °C, con una precipitación por encima de los 2000 mm anuales (Caballero Acosta *et al.*, 2009). Allí la Asociación Ambientalista Futuro Verde "AAFUVER" está llevando a cabo el proyecto comunitario denominado "Manejo y conservación de la

tortuga de río (*Podocnemis lewyana*), en la cuenca baja del río Claro Cocorná Sur, Antioquia” (Romero, 2011). El objetivo general es proteger los huevos y adultos de *P. lewyana*, así como sensibilizar y educar a la comunidad regional sobre la importancia de esta especie. AFFUVER cuenta con unas instalaciones que incluye un salón de incubación de huevos y una piscina para levante de las crías, ésta última fue utilizada en esta investigación.

Como parte del trabajo de campo de este trabajo se realizó además una caracterización de los lugares de anidación y de los parámetros reproductivos de *P. lewyana* durante dos temporadas reproductivas, con el objetivo de contribuir al conocimiento del comportamiento de la población que habita en el río Claro Cocorná Sur y al programa de conservación de AAFUVER (Ceballos *et al.*, 2014b en Anexo 1).

5.2 Recolección de huevos e incubación

Durante la estación reproductiva de diciembre de 2012, se recolectaron un total de 227 huevos (10 nidos) para ser utilizados en este estudio. Estos fueron obtenidos de nidos naturales los cuales se ubicaron por los rastros de las hembras dejados en la arena de las playas del río (Figura 1). Los huevos fueron trasladados a la estación de AAFUVER teniendo especial cuidado de no rotarlos para no afectar la supervivencia de los embriones. Para hacer un monitoreo individual del crecimiento de los tortuguillos y no perder la información del nido de origen, cada huevo fue marcado individualmente. Igualmente cada huevo fue pesado con una balanza electrónica marca Lexus de 1,000 gramos (precisión 0.1 gr) y sus diámetros (ancho y largo) medidos con un pie de rey electrónico Brown and Sharpe® de 12 pulgadas y precisión 0.1 mm.

5.3 Diseño experimental

Tres temperaturas de incubación que ya habían sido evaluadas en otra población de esta especie que habita en Mompox (Bolívar) fueron usadas para determinar las proporciones sexuales producidas en la población objeto de estudio en el río Claro Cocorná Sur. Estas temperaturas objetivo fueron: 29 y 31 °C (que producen 100%

machos) y 34.7 °C (que produce 100% hembras) (Páez *et al.*, 2009). Estos tratamientos se denominaron Control 29, Control 31 y Control 34 respectivamente. Para evaluar el efecto de dos temperaturas iniciales que afectan la velocidad del desarrollo embrionario (“lento” = 29 °C y “rápido” = 31 °C) en el momento de inicio y duración del periodo termosensitivo se diseñaron dos experimentos denominados “lento” y “rápido” en los cuales se realizó un cambio doble de la temperatura de incubación: masculinizante – feminizante - masculinizante. En el tratamiento lento, la temperatura masculinizante objetivo fue 29 °C y en el tratamiento rápido la temperatura masculinizante objetivo fue 31 °C. La temperatura feminizante objetivo, 34.7 °C, fue aplicada en 3 momentos del periodo de incubación de la siguiente manera: días 20 a 30, días 30 a 40, y días 40 a 50. Luego de aumentar la temperatura durante estos periodos de tiempo, la temperatura regresó a la inicial, 29 o 31 °C, hasta el final del periodo de incubación (día en que el primer tortuguillo del grupo rompió el cascarón). Estos tratamientos se denominaron tratamiento 1, 2 y 3 para el experimento lento y tratamientos 4, 5 y 6 para el experimento rápido, respectivamente (Tabla 1). El período de tiempo entre los días 20 al 50 fue escogido porque se ha reportado que el periodo termosensitivo en tortugas de agua dulce es el segundo tercio del periodo de incubación (Bull, 1980; Wibbels *et al.*, 1994; Valenzuela, 2001a). El periodo de incubación total puede extenderse hasta 50 ó 72 días según la temperatura de incubación (34.7 y 29.5 ± 0.4 °C respectivamente, Páez *et al.*, 2009). La producción de hembras en cada uno de los tratamientos indicará el momento en que ocurrió el periodo termosensitivo.

La totalidad de los huevos fueron recolectados de nidos naturales los cuales fueron asignados a los tratamientos experimentales en forma aleatoria y homogénea de la siguiente manera: Inicialmente 91 huevos (provenientes de 4 nidos) se asignaron a los tres tratamientos controles así: 31 huevos fueron incubados en el grupo Control 29, 30 huevos en el grupo Control 31 y 30 huevos en el grupo Control 34. Posteriormente 69 y 67 huevos (provenientes de otros 6 nidos) fueron asignados a los experimentos lento y rápido respectivamente (Tabla 2). Los huevos fueron incubados en recipientes plásticos empleando como sustrato arena de las mismas playas naturales de donde fueron colectados (Kam y Ackerman, 1990). La humedad inicial de la arena no fue cuantificada, pero fue mantenida en las incubadoras por

medio de reposiciones semanales de humedad. Esta reposición se hizo pesando cada recipiente de incubación y reponiendo la humedad (peso) perdida. En cada recipiente se incubaron entre 10 y 12 huevos de nidos diferentes. Finalmente, para compensar diferencias en la distribución de la temperatura dentro de las incubadoras, las cajas de arena fueron rotadas semanalmente dentro de la incubadora de adelante hacia atrás y en el sentido de las manecillas del reloj. Las temperaturas de incubación fueron monitoreadas durante todo el período de incubación hasta el nacimiento del primer tortuguillo por medio de 3 ó 4 dataloggers (HOBOs) ubicados dentro de las incubadoras los cuales tuvieron una precisión de $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$, y con una frecuencia de registro de temperatura de 1 dato por hora.

La incubación de los huevos se hizo en un cuarto de una casa alquilada en Estación Cocorná y adaptada para este propósito. El cuarto de 3 x 4 metros fue revestido (paredes y techo) con láminas de icopor para aislarlo de las altas temperaturas ambientales de la región y enfriado con un aire acondicionado portátil encendido las 24 horas durante toda la temporada.

5.4 Nacimientos

La fecha en que cada tortuguillo rompió el cascarón fue registrada para calcular el periodo de incubación. Una vez cicatrizó el ombligo (entre 5 y 7 días de edad después de la eclosión), los tortuguillos fueron retirados de las incubadoras, pesados, medidos (largo y ancho recto del caparazón y plastrón) y fotografiados. Cada uno fue marcado amarrando chaquiras de colores al borde del caparazón (Galbraith y Brooks, 1984) y posteriormente trasladado a las piscinas de AAFUVER. Allí permanecieron hasta que cumplieron entre tres y cuatro meses de edad. El peso y la forma (descrito abajo) fueron nuevamente monitoreados para detectar cambios asociados al crecimiento.

5.5 Análisis de datos

5.5.1 Cuantificación de la forma por morfometría geométrica

Para cuantificar la forma del cuerpo de los tortuguillos se tomaron fotografías del caparazón y plastrón a los 7 días y 3.5 meses de edad (contados a partir de la fecha

del rompimiento del huevo) con una cámara digital marca Olympus SP-500 UZ. Estas fotos se usaron para digitalizar 29 puntos fijos en las intersecciones de los escudos de caparazón, 21 puntos fijos entre los escudos del plastrón, y 7 puntos fijos y 12 puntos deslizantes en el contorno de la muesca anal (Figura 2). Los puntos deslizantes son ubicados en cualquier parte de una línea curva y pueden moverse entre puntos fijos, y se usaron con el fin de captar mejor la forma de las líneas curvas (Bookstein, 1997). Los individuos con deformidades o escudos supernumerarios fueron excluidos de este análisis. Posteriormente se realizaron Análisis Generalizados de Procrustes para obtener las variables de tamaño y forma de cada una de las tres partes anatómicas: caparazón, plastrón y muesca anal a las dos edades: 7 días y 3.5 meses. Este análisis consiste en superponer los puntos de referencia de todos los individuos maximizando su alineación en un plano cartesiano, y posteriormente se calculan variables de forma y tamaño centroide de cada individuo (Rohlf y Slice, 1990). El tamaño centroide es la raíz cuadrada de las distancias de los puntos de referencia a su centro de gravedad (Bookstein, 1996). Dicha variable se empleó como sustituta del tamaño del caparazón y plastrón.

De esta manera se obtuvo un total de 54 variables de caparazón, 38 de plastrón y 34 de la muesca anal, las cuales fueron empleadas para los análisis de forma. Adicionalmente se crearon gráficas con el fin de visualizar los cambios en las formas según el nido de origen, la temperatura de incubación y el sexo. Para todos los análisis morfométricos se emplearon los software TpsDig, TpsRelw, TpsUtil y TpsSpln (Rohlf, 2001b; 2003; 2004).

5.5.2 Sexaje

Para estimar el sexo de todos los tortuguillos se verificó el sexo de 20 individuos por medio de análisis histológicos de sus gónadas. Para esto se seleccionaron 10 individuos incubados en temperatura feminizante (34.7 °C) y 10 de temperaturas masculinizantes (5 individuos de 29 °C y 5 individuos de 31 °C) para conocer la forma del cuerpo de 10 hembras y 10 machos (según proporciones sexuales reportadas en Páez *et al.*, 2009). Las gónadas fueron preservadas en alcohol y posteriormente fijadas en formol en el Laboratorio de Patología de la Universidad de

Antioquia, donde fueron procesadas e identificadas microscópicamente. El sexo observado de estos 20 individuos fue el sexo esperado: 10 hembras y 10 machos.

Para determinar si existían diferencias significativas en la forma de machos y hembras se realizaron modelos lineales con las variables de forma de los 20 individuos con el sexo confirmado. Estos modelos se construyeron empleando la función *procD.lm* (Adams y Otárola-Castillo, 2013), en los cuales se incluyó el sexo como factor y la distancia de Procrustes entre las formas del caparazón, el plastrón y la muesca anal de los individuos como variables respuesta. Esta función realiza permutaciones basadas en dichas distancias para explicar variaciones estadísticamente significativas entre las mismas. La distancia de Procrustes entre dos formas (dos individuos) se define como la raíz cuadrada de la suma de diferencias cuadráticas entre las posiciones de los puntos anatómicos en dos configuraciones superpuestas óptimamente al tamaño centroide (Marcus, 1996). Este tipo de modelo es específicamente apropiado para aquellos estudios donde se tienen más variables que especímenes. El nido de origen se incluyó como covariable en todos los modelos debido al efecto materno significativo encontrado en otros estudios, incluyendo *P. lewyana* (Páez *et al.*, 2009). La función *procD.lm* está disponible en el paquete estadístico *Geomorph* (Adams y Otárola-Castillo, 2013) en el software R versión 3.0.1 (R Core Team, 2013). Este tipo de modelo realiza permutaciones las cuales son estadística no paramétrica, por lo tanto no requieren prueba de normalidad.

Una vez confirmadas las diferencias significativas en la forma del caparazón ($P_{7\text{días}}=0.003$, $P_{3.5\text{meses}}<0.001$), el plastrón ($P_{7\text{días}}<0.001$, $P_{3.5\text{meses}}<0.001$) y la muesca anal ($P_{7\text{días}}<0.001$, $P_{3.5\text{meses}}<0.001$) de los 20 individuos con sexo confirmado por histología se construyeron funciones discriminantes con estas formas. Posteriormente se empleó la función *Predicted* para estimar el sexo de los individuos con sexo desconocido ($n=164$ individuos de 7 días y $n=147$ individuos de 3.5 meses de edad). El número de individuos varió a las dos edades debido a que algunos de ellos escaparon o fueron depredados en el transcurso de la investigación. La efectividad del sexaje por medio de la forma del caparazón, plastrón y muesca anal fue determinada a las dos edades realizando validaciones cruzadas. Con este

objetivo se creó una función discriminante con el 75% de los individuos con sexo conocido y se sexó el restante 25% que tenían sexo confirmado por medio de la función *Predicted* para determinar el porcentaje de clasificación correcta (Valenzuela *et al.*, 2004). La validación de la función se realizó con 18 de los 20 individuos a los 3.5 meses de edad, 10 hembras y 8 machos (2 individuos machos a esta edad no fueron fotografiados por error humano). Este análisis se realizó con el paquete estadístico *MASS* (Venables y Ripley, 2002) en el software R versión 3.0.1.

5.5.3 Morfología bajo incubación artificial

Para conocer si habían efectos del sexo y las temperaturas de incubación sobre la forma del caparazón, el plastrón y la muesca anal a los 7 días y a los 3.5 meses de edad se corrieron análisis de varianza (ANOVA's) de las distancias de Procrustes y el nido de origen como covariable. Cuando los efectos fueron significativos se realizaron análisis *post hoc* para determinar qué grupos (de las tres temperaturas controles) eran estadísticamente diferentes. El efecto del sexo y las temperaturas de incubación en el tamaño de los neonatos se determinó por medio de ANOVAS empleando el tamaño centroide. Para estos análisis se empleó el paquete estadístico *nlme* (Pinheiro *et al.*, 2007) y el software estadístico R versión 3.0.1 (R Core Team, 2013).

5.6 Efectos maternos

El peso de los huevos asignados a cada uno de los tratamientos experimentales fue similar ($P=0.953$) lo que confirma un diseño experimental al azar. Para determinar la presencia de efectos maternos sobre el tamaño de los tortuguillos se analizó el efecto del nido de origen, diámetro y peso del huevo sobre el peso, largo y ancho recto de caparazón y de plastrón del tortuguillo por medio de modelos lineales.

La normalidad de los residuos en los modelos fue verificada por medio de la prueba de Shapiro Wilks (función *shapiro.test* en R) y la homogeneidad de las varianzas por medio de las pruebas de Bartlett (*bartlett.test*) y Fligner (*fligner.test*). Las variables que no cumplían con los supuestos fueron transformadas por medio de la transformación Box-cox (*modelBoxCox*). Si después de transformadas el modelo

aún no cumplía con los supuestos se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (*kruskal.test*).

5.7 Permisos

Esta investigación contó con el aval del Comité de Ética para la Experimentación con Animales de la Universidad de Antioquia como consta en el Acta N° 76 y con el permiso de investigación biológica de la Corporación Autónoma Regional CORNARE N° 134-0067 del 31 de mayo de 2012.

6. RESULTADOS

6.1 Parámetros reproductivos

De las 14 playas monitoreadas durante las dos temporadas de anidación (Diciembre de 2012 y Junio de 2013), se encontró que dos de ellas, Alto Bonito y Bélgica, concentraron la mayor cantidad de nidos, con un 51 y un 28.3% respectivamente. Se contabilizaron 47 nidos para un total de 957 huevos producidos durante un año. Se registraron además las temperaturas en los nidos naturales y en el cuarto de incubación utilizado por AAFUVER, encontrándose que éstas últimas son más bajas y menos variables que las temperaturas en las playas. Se realizó además seguimiento al crecimiento de los tortuguillos hasta los 3.5 meses de edad, encontrándose una relación positiva entre el peso del huevo y el peso del neonato a los 7 días de edad, relación que fue menos fuerte tres meses después (Ceballos *et al.*, 2014b en Anexo 1).

Específicamente para los experimentos realizados en esta investigación se utilizaron 10 nidos del total recolectado. El tamaño promedio de estos nidos fue de 23.1 huevos (desviación estándar: ± 3.21 , rango: 17-27). El peso promedio de los huevos fue de 27.12 ± 3.33 gramos (20.0-38.0), el largo promedio fue de 42.61 ± 2.08 mm (33.49-49.59) y el ancho promedio de 32.90 ± 1.25 mm (30.09-37.17). El peso de los huevos estuvo significativamente correlacionado con el nido de origen ($P < 0.001$). Del total de huevos recolectados ($n=227$), nacieron 195 tortuguillos, para un porcentaje de eclosión de 85.9%. Dos nidos presentaron bajos porcentajes de eclosión (41.6 y 62.9%), principalmente en el tratamiento Control 31 debido

posiblemente a infertilidad de los huevos (Tabla 2). El peso promedio de los tortuguillos fue de 20.25 ± 2.35 gramos (rango: 14.7 - 27.8), el largo recto del caparazón fue de 46.88 ± 2.07 mm (rango: 39.87-52.81), el ancho recto del caparazón promedio fue de 44.45 ± 1.79 mm (rango: 36.86-48.76), el largo recto del plastrón fue de 42.55 ± 1.83 mm (rango: 33.87-47.40) y el ancho recto del caparazón fue de 35.14 ± 1.33 mm (rango: 29.34-38.60). Los datos de acuerdo al nido de origen y el tratamiento de incubación son presentados en las tablas 3 y 4.

6.2 Efecto de las temperaturas de incubación sobre las proporciones sexuales en los grupos controles

Las temperaturas registradas en los tratamientos controles fueron: 29.2 ± 0.8 , 31.2 ± 0.4 y 34.6 ± 1.2 para el Control 29, 31 y 34 respectivamente. Estas temperaturas tuvieron una variabilidad más alta de la esperada, sin embargo las dos primeras se encontraron siempre dentro del rango 100% masculinizante reportado para la especie (28-33 °C) (Tabla 1).

El dimorfismo sexual entre machos y hembras fue significativo a ambas edades y en las tres partes del cuerpo evaluadas. Dado que la forma del plastrón completo a los 7 días de edad arrojó un mayor porcentaje de efectividad (91%), dicha forma se utilizó para determinar el sexo del resto de los individuos con sexo desconocido de los diferentes tratamientos de incubación (Tablas 5 y 6).

Utilizando entonces el sexo estimado, las proporciones sexuales (porcentaje de hembras) estimadas en los tratamientos controles fueron: 7.7% en el grupo Control 29, 17.6% en el grupo Control 31 y 86.3% en el grupo Control 34 (Tabla 1). La duración del periodo de incubación para cada uno de los tratamientos fue de 81.38 ± 0.85 , 64.29 ± 0.77 y de 51.13 ± 0.56 días, respectivamente (Tabla 2).

6.3 Efectos de la temperatura de incubación de los grupos experimentales sobre el periodo termosensitivo (PTS)

Las temperaturas promedio registradas en el experimento lento fueron: 29.3 ± 1.5 , 29.4 ± 1.7 y 29.5 ± 1.7 °C para los tratamientos 1, 2 y 3 respectivamente, durante los

días en que no se aumentó la temperatura. En el experimento rápido las temperaturas promedio fueron: 31.3 ± 1.3 , 31.4 ± 1.3 y 31.3 ± 1.3 °C en los tratamientos 4, 5 y 6 respectivamente. En los días de aumento de temperatura el promedio fue de 35.5 ± 1.2 °C en los días 20 a 30, 35.1 ± 1.4 °C en los días 30 a 40, y 35.3 ± 1.8 °C en los días 40 a 50 (Tabla 1). Las proporciones sexuales encontradas en los tratamientos experimentales fueron las siguientes:

En el experimento lento el porcentaje de hembras encontrado fue de 36.8%, 20% y 4.1% en los tratamientos 1, 2 y 3 respectivamente (Tabla 1). La duración del periodo de incubación fue de 71 ± 0.46 días en promedio. Esto indica que bajo la temperatura masculinizante lenta, 29 °C, el PTS se dio durante los días **20 a 40**, lo cual corresponde al segundo tercio del periodo de incubación y abarcó un 28% del periodo de incubación. El bajo porcentaje de hembras encontradas en los días 40 - 50 (4.1%) indica una baja sensibilidad de los embriones a la temperatura feminizante durante este periodo.

Por otro lado, en el experimento rápido, el porcentaje de hembras encontrado fue de 55.5, 31.6 y 65.2% en los tratamientos 4, 5 y 6 respectivamente (Tabla 1). La duración del periodo de incubación fue de 57.7 ± 1.1 días en promedio. Esto indica que bajo la temperatura masculinizante rápida, 31 °C, el PTS se dio durante los días **20 a 50**, lo cual corresponde al segundo y parte del tercer tercio del periodo de incubación. Este PTS se extiende casi el doble de tiempo que en el experimento lento puesto que duró el 52% del periodo de incubación.

6.4 Efecto de la temperatura de incubación en el tamaño y la forma

El efecto del sexo y la temperatura de incubación en el tamaño y la forma de todos los tortuguillos nacidos de los tratamientos controles fue evaluado a ambas edades ($n_{7d}=65$, $n_{3.5m}=54$) por medio de modelos lineales, sin embargo su interacción (sexo x temperatura) no fue evaluada debido al bajo número de machos y hembras en cada uno de los tratamientos. En estos modelos el sexo de los tortuguillos que no fueron sexados por histología fue el estimado por MG. Los efectos del sexo y la temperatura fueron evaluados en el mismo modelo (Tablas 7 y 8) y se describen a continuación.

6.4.1 Neonatos:

Inicialmente se evaluó el efecto de las temperaturas de incubación en el peso y tamaño de los tortuguillos de los tratamientos controles. Aunque el efecto de la temperatura de incubación en el peso de los neonatos no fue significativo, ($P=0.148$), este si fue significativo en el tamaño del caparazón ($P=0.035$) y del plastrón ($P=0.008$). Sin embargo, este efecto fue muy débil dado que no se encontraron diferencias significativas en el tamaño de los tres grupos en los análisis *post hoc* (Tabla 7).

Posteriormente se evaluó el efecto de las tres temperaturas controles sobre la forma de los tortuguillos a los 7 días de edad. La temperatura de incubación tuvo un efecto significativo en la forma del caparazón ($P<0.001$), encontrándose diferencias en la forma de los neonatos provenientes de los tres tratamientos de incubación (Tabla 8). Los tortuguillos provenientes del Control 31 tuvieron un caparazón más ancho, mientras en los del Control 29 y 34 es más angosto (Figura 3). La forma del plastrón y la muesca anal también varía de acuerdo a la temperatura de incubación ($P<0.001$ para ambos factores) encontrándose diferencias entre los tres grupos (Tabla 8). Los neonatos incubados en el Control 31 tuvieron un plastrón relativamente más ancho y corto que los incubados en el Control 34, especialmente hacia la región caudal, notándose además en estos últimos una forma triangular en la región gular. La muesca anal fue más profunda en los tortuguillos incubados en el Control 29 y poco profunda en los tortuguillos del Control 34. La muesca de los tortuguillos del Control 31 tuvo una forma intermedia entre las dos anteriores.

6.4.2 Juveniles:

La temperatura de incubación tuvo un efecto significativo en el tamaño del caparazón ($P<0.001$), esto es, los tortuguillos provenientes de huevos incubados en el Control 29 fueron los más pequeños, pero no hay diferencias entre los tortuguillos provenientes de los Controles 31 y 34. El tamaño del plastrón también estuvo afectado por la temperatura de incubación ($P<0.001$), siendo los tortuguillos del Control 34 los más grandes y los del Control 29 lo más pequeños (Tabla 7).

La temperatura de incubación tuvo efecto en la forma del caparazón de los tortuguillos a los 3.5 meses ($P=0.001$). Aunque no se encontraron diferencias entre los tortuguillos incubados en los grupos Controles 29 y 31, la forma del grupo Control 34 si fue significativamente diferente, con un caparazón más delgado y alargado (Figura 4). En la forma del plastrón y de la muesca anal se encontró también efecto significativo de la temperatura de incubación ($P<0.001$) (Tabla 8, Figura 5). El plastrón de los tortuguillos provenientes del Control 34 es más alargado y estrecho en la región medial, además se observan diferencias entre los tres grupos en la región gular y anal. En la forma de la muesca anal, los tortuguillos incubados a bajas temperaturas presentaron una muesca anal mucho más marcada y profunda, mientras en los individuos incubados a temperaturas más altas, ésta tendió a aplanarse, y en el Control 31 se observó una forma intermedia entre las dos, diferencias similares a las encontradas a los 7 días de edad (Figura 4).

6.5 Dimorfismo sexual en tamaño y forma

6.5.1 Neonatos:

El dimorfismo sexual en el tamaño del caparazón de los neonatos fue significativo ($P<0.001$) siendo más grandes los machos; pero no hubo diferencias detectables en el tamaño del plastrón ($P=0.105$) (Tabla 7). Por otro lado, el dimorfismo sexual en la forma del caparazón, el plastrón y la muesca anal fue significativo ($P<0.001$ para todas las formas) (Tabla 8, Figura 5). Los machos tuvieron un caparazón y un plastrón más ancho que las hembras y una muesca anal más profunda. En las hembras se observó un angostamiento en la región caudal del plastrón, una región gular triangular y una muesca anal más aplanada (Figura 6).

6.5.2 Juveniles:

El dimorfismo sexual en el tamaño del caparazón y el plastrón de los juveniles fue significativo ($P=0.007$ y <0.001 respectivamente), siendo mayor el tamaño en las hembras (Tabla 7). En los neonatos no se detectaron diferencias significativas en el tamaño del plastrón de acuerdo al sexo, pero en los juveniles el plastrón de las hembras fue más grande en un 7.3%, lo que sugiere que las hembras tuvieron una mayor tasa de crecimiento en relación a los machos.

Por otro lado, el dimorfismo sexual en la forma del caparazón, el plastrón y la muesca anal fue significativo ($P < 0.001$ en todos los casos) (Tabla 8). A los 3.5 meses de edad el alargamiento del caparazón y del plastrón en las hembras se acentuó, con un marcado angostamiento en la región caudal y una región gular en forma de triángulo, y una mayor profundidad de la muesca anal en los machos (Figura 6).

El dimorfismo sexual en la distancia lineal del ombligo a la muesca anal (DOM), es decir, la distancia entre los puntos de referencia 8 al 12 del plastrón (Figura 2B) a los 7 días y 3.5 meses de edad también fue evaluado como un método de sexaje alternativo más simple que pudiera ser usado en el campo. A los 7 días de edad no hay diferencias significativas en la longitud de la muesca anal ($P = 0.531$, $n = 20$) en los neonatos con sexo confirmado, sin embargo si fue significativo a los 3.5 meses de edad ($P < 0.001$, $n = 18$). Para calcular el promedio de esta medida se utilizaron las DOMs de todos los tortuguillos con sexo confirmado por histología más los tortuguillos cuyo sexo estimado coincidió 100% con las tres formas (caparazón, plastrón y muesca anal) ($n = 46$). La DOM para los machos en promedio fue de 18.46 ± 1.71 mm y para las hembras de 21.85 ± 1.41 (Figura 7). Sin embargo, dado que dichas medidas son relativas al tamaño de los individuos, se calculó la proporción DOM/largo recto del plastrón (DOM ponderado), pero no se encontraron diferencias significativas entre los sexos ($P = 0.159$, $n = 18$) (Tabla 9).

6.6 Sexaje por medio de la forma

De acuerdo a las validaciones cruzadas para cada una de las formas, se encontró que el sexaje a partir de la forma del plastrón a los 7 días y a los 3.5 meses de edad fueron los más efectivos, con 91 y 85% de clasificación correcta respectivamente. Los porcentajes más bajos de efectividad se encontraron con la forma del caparazón y la muesca anal a los 3.5 meses de edad (55 y 45 % respectivamente) (Tabla 5).

6.7 Efectos maternos

Los efectos maternos en diversas variables de forma y tamaño de los tortuguillos han sido significativos en varias investigaciones y por lo tanto fueron evaluados e

incluidos como covariable (nido de origen) en los modelos de este trabajo. El peso del huevo tuvo un efecto significativo en el peso de los tortuguillos ($p < 0.001$) (Figura 8). Los huevos más pesados fueron de los nidos A y C, y los más livianos del nido G, resultando por lo tanto en neonatos más y menos pesados, respectivamente (Figura 9). Así mismo, el peso del huevo estuvo correlacionado con el largo y ancho recto del caparazón y el plastrón a los 7 días de edad ($p < 0.001$).

Además del efecto del nido sobre el peso, también se encontró un efecto sobre el tamaño del caparazón y plastrón a los 7 días ($P < 0.001$), sin embargo sólo el efecto sobre el tamaño del plastrón perduró hasta los 3.5 meses ($P = 0.006$, tabla 7). El efecto del nido sobre la forma del caparazón y plastrón fue significativo a los 7 días ($P < 0.001$ para ambas formas) y también a los 3.5 meses ($P < 0.001$ en ambos casos) (Tabla 8). Análisis *post-hoc* indican que sólo el nido B tuvo un efecto diferencial sobre la forma del caparazón los tortuguillos ($P < 0.001$). Esto es, el caparazón es más ancho con una región caudal más angosta. En la forma del plastrón hay diferencias entre las formas de los nidos A y B ($P < 0.001$) y entre el nido D y todos los demás nidos (valores P entre 0.002 y 0.01) (Figura 10).

7. DISCUSIÓN

7.1 Efecto de las temperaturas de incubación sobre las proporciones sexuales

A pesar de la alta variabilidad de las temperaturas de incubación experimentadas en los grupos Controles 29 y 31, dichas temperaturas estuvieron siempre dentro del rango masculinizante (27.6 – 33.4 °C de acuerdo a Páez *et al.*, 2009). Por esta razón se esperaba que estos tratamientos produjeran 100% neonatos machos, sin embargo también se observó una producción de hembras (sexadas por GM). Por otro lado, el grupo control 34 tuvo una temperatura de incubación muy variable, experimentando temperaturas dentro del rango transicional que produce machos y hembras. Los machos encontrados en este grupo pudieron haberse diferenciado debido a esta alta variabilidad. La humedad del sustrato de incubación no fue cuantificada, aunque si se hicieron esfuerzos por mantenerla similar en todos los tratamientos experimentales y constante durante todo el periodo de incubación.

Existe la posibilidad de que esta humedad podría haber afectado la temperatura de incubación de los huevos y por lo tanto el sexo de los neonatos (Gutzke y Paukstis, 1983; Paukstis *et al.*, 1984).

Una hipótesis que surge entonces a partir de estos resultados es que esta población es más sensible a la temperatura de incubación para producir hembras. Esto podría estar asociado a una variabilidad genética de la especie o plasticidad fenotípica debido a temperaturas ambientales menores comparadas con las de Mompós, Bolívar. Otra alternativa que podría explicar las proporciones sexuales observadas en los grupos controles son efectos maternos diferenciales (por ejemplo, contenido hormonal en el huevo, revisado por Dodd *et al.*, 2006).

Dados estos resultados, y si la población de estudio fuera realmente más sensible a la temperatura de incubación para producir hembras, es probable que la temperatura pivotal en esta población posiblemente sea más baja que la reportada para la población de Mompós (Páez *et al.*, 2009). Como un ejercicio teórico se calculó la temperatura pivotal para esta población utilizando el software TSD versión 4.0.3 (Girondot, 1999; Godfrey *et al.*, 2003) y empleando las proporciones sexuales encontradas por histología (20 individuos). Este programa requiere al menos dos temperaturas constantes que produzcan ambos sexos, la temperatura promedio, y la variabilidad de las temperaturas. El resultado sugiere una temperatura pivotal de 33 °C para esta población, la cual estaría 0.4 °C por debajo de la reportada para la población de Mompós (Páez *et al.*, 2009). Diferencias geográficas en la temperatura pivotal dentro de las especies ya han sido reportadas, algunas de ellas relacionadas con las variaciones en las condiciones ambientales pero otras sin una tendencia detectable (Bull *et al.*, 1982; Ewert *et al.*, 1994; Ewert *et al.*, 2005). Estas hipótesis deben ser probadas en futuros estudios con un mayor tamaño de muestra y usando incubadoras más confiables para determinar con mayor precisión las temperaturas de incubación experimentadas y las proporciones sexuales producidas.

7.2 Efecto de las temperaturas de incubación sobre el periodo termosensitivo

Una de las hipótesis a probar en este trabajo era que a una temperatura de incubación inicial más “fría” (29 °C) el periodo termosensitivo iniciaría en un

momento más tardío del segundo tercio de la incubación comparado con la temperatura “cálida”, debido a la velocidad del desarrollo embrionario. Pero de acuerdo al porcentaje de hembras observado en los tratamientos experimentales lento 20-30 y 30-40 (36.8% y 20.0% respectivamente), el PTS inició más temprano, es decir, a partir del día 20 y se extendió hasta el día 40 del periodo de incubación. Dado que el periodo de incubación fue de 71 días en promedio, el PTS se presentó en el segundo tercio del periodo de incubación.

Por otro lado, en el experimento relativamente cálido (31 °C) que se esperaba tuviera una mayor velocidad de desarrollo embrionario en comparación con el experimento “frío”, se esperaba que el PTS iniciara en un momento más temprano del periodo de incubación (semana 4). De acuerdo a la proporción de hembras encontradas en los tratamientos días 20-30, 30-40 y 40-50 (55.5, 31.6 y 65.2% respectivamente) el PTS abarcó desde el día 20 al día 50 del periodo de incubación. Dado que el periodo de incubación promedio fue de 57.7 días, el PTS se presentó en el segundo y parte del tercer tercio de dicho periodo. Aunque no es posible explicar estos resultados, estos son similares a lo reportado recientemente para la especie *Malaclemys terrapin*, en la cual el PTS ocurre en el tercio medio de la incubación en huevos incubados a 25 °C, pero en el tercer tercio en incubación a 31 °C (Burke y Calichio, en prensa).

De acuerdo a estos resultados, el PTS tiene una duración de 30 días bajo temperaturas de incubación iniciales relativamente cálidas. Esto concuerda con lo reportado bajo condiciones de incubación naturales para la especie congénica *Podocnemis unifilis*, en la cual el PTS puede durar al menos la mitad del periodo de incubación y llega a ser más largo que en otras especies como *Graptemys ouachitensis*, *Chrysemys picta* y *Emys orbicularis* (de Souza y Vogt, 1994). Esto concuerda en parte con lo reportado bajo condiciones naturales para *P. expansa* (Bonach *et al.*, 2011) y bajo incubación artificial para el cocodrilo *Alligator mississippiensis* (Lang y Andrews, 1994), especies en las cuales se ha sugerido que el PTS puede ocurrir en el tercer tercio del periodo de incubación.

Posiblemente una razón para no haber logrado la feminización de la totalidad de los embriones bajo ninguno de los tratamientos, es que el sexo femenino en *P. lewyana* requiera para su producción una temperatura sostenida durante más tiempo que los machos, como se ha encontrado para otras especies de tortugas. En estos casos, las hembras requieren un periodo más largo para lograr su diferenciación y por lo tanto el sexo masculino es definido más tempranamente (Bull y Vogt, 1981; Pieau y Dorizzi, 1981; Mrosovsky y Pieau, 1991). Otras investigaciones han encontrado que cambios de temperatura en momentos intermedios del PTS han resultado en proporciones variables de machos, hembras e individuos intersexos de acuerdo al momento de la incubación en que los realicen, el tiempo que dure la exposición a determinada temperatura y al efecto acumulativo de temperaturas previas (Yntema, 1979; Bull y Vogt, 1981; Pieau y Dorizzi, 1981). En *P. lewyana* la producción de intersexos no ha sido reportada, pero dado que los experimentos realizados hasta ahora no incluyen cambios de temperatura, es posible que bajo condiciones constantes se obtengan solo individuos bien diferenciados. No se descarta la posibilidad de que en este estudio pueda haber una cantidad de individuos con sexo intermedio que no es posible identificar por medio de morfometría geométrica.

7.3 Efecto de la temperatura de incubación en la forma y el tamaño

La temperatura de incubación no afectó significativamente el peso de los neonatos y el efecto de dicha variable sobre el tamaño fue débil, similar a lo reportado por otros estudios (Packard *et al.*, 1989; Demuth, 2001; Ashmore y Janzen, 2003). Aunque la mayoría de investigaciones si han encontrado diferencias significativas en el peso y tamaño de los neonatos asociados a los tratamientos de incubación (Gutzke y Packard, 1987; Hewavisenthi *et al.*, 2001; Steyermark y Spotila, 2001; Valenzuela, 2001b; Du *et al.*, 2006), en donde los neonatos de temperaturas más bajas tienden a ser más grandes (Booth, 2000).

En los juveniles si se detectaron diferencias significativas en el tamaño asociadas al tratamiento de incubación. Los tortuguillos de la temperatura de incubación más baja tuvieron el caparazón y el plastrón más pequeños, consistente con lo reportado por Janzen (1993b) y Ceballos y Valenzuela (2011). Esto puede indicar que en *P. lewyana* se favorece un mayor tamaño para los tortuguillos de temperaturas altas,

las hembras, lo cual ha sido asociado a una menor predación y mayor supervivencia (Janzen, 1993a). En este trabajo no es posible separar los efectos de la temperatura de incubación de los del sexo *per se* en la forma de los neonatos dado que no hay hembras producidas a temperaturas bajas ni machos producidos a temperaturas altas. Otros estudios han logrado esto mediante la aplicación de hormonas sobre los huevos en forma experimental (Crews *et al.*, 1989; 1991).

Los efectos de la temperatura de incubación en la forma de *P. lewyana* fueron significativos a las dos edades, con tortuguillos más alargados a altas temperaturas y más cortos y anchos en la región pectoral a temperaturas bajas e intermedias, resultados similares a los reportados para *P. expansa* (Ceballos *et al.*, 2014a). Esto refleja que probablemente existe una tendencia dentro del género *Podocnemis* en cuanto al efecto de las temperaturas en la forma del cuerpo. De acuerdo a la teoría de Charnov y Bull (1977), los individuos alargados podrían tener un mejor desempeño en ambientes cálidos mientras los individuos anchos y cortos podrían sobrevivir mejor en ambientes intermedios y fríos. Y de acuerdo a Myers *et al.*, (2007), los individuos con cuerpos más anchos y cortos podrían nadar más rápido, lo que favorecería el desplazamiento en los machos.

7.4 Dimorfismo sexual en tamaño y forma

La mayoría de estudios se han enfocado en describir las diferencias entre los sexos empleando el tamaño de los individuos, más no su forma (Lovich *et al.*, 1998; Brophy, 2006; Muñoz y Nicolau, 2006; Kaddour *et al.*, 2008; Underwood *et al.*, 2013). En *P. lewyana* se encontró efecto del sexo en el tamaño del caparazón a las dos edades, y en el tamaño del plastrón de los juveniles, al igual que en otras especies (Ceballos *et al.*, 2014a). A los 7 días de edad los machos tienen el caparazón más grande que las hembras, efecto que se invierte a los 3.5 meses. En los neonatos el mayor tamaño de los machos puede ser debido a que estos son producidos en temperaturas relativamente más bajas, lo cual ha sido asociado a tortuguillos más grandes (Booth, 2000).

Se encontró dimorfismo sexual en la forma del caparazón, el plastrón y la muesca anal de tortuguillos de *P. lewyana* a los 7 días y 3.5 meses de edad, los efectos del sexo en la forma del cuerpo son similares a lo reportado en otros estudios con

individuos del mismo género (Valenzuela *et al.*, 2004; Lubiana y Ferreira Júnior, 2009; Ceballos *et al.*, 2014a). Una muesca anal más profunda y una región anal más amplia en el plastrón de los machos posiblemente esté asociado a la facilitación del movimiento de la cola en el momento de la cópula, como se ha observado en otras especies de tortugas (McRae *et al.*, 1981). El dimorfismo entre los sexos es detectable desde el momento del nacimiento, haciéndose más evidente con la edad. Esto coincide con una mayor tasa de crecimiento en las hembras, observada en este estudio.

La distancia lineal del ombligo a la muesca anal puede considerarse un carácter sexual secundario. En este trabajo se encontró que la distancia lineal del ombligo a la muesca anal DOM fue significativa, pero no su proporción al largo recto del plastrón. Por esta razón no pudo definirse una relación específica al sexo y por tanto no es posible su uso como método de sexaje. Otros estudios han encontrado diferencias significativas entre los sexos empleando diferentes tipos de medidas como el ancho anal y la muesca anal, sin embargo estas medidas no son claramente dimórficas hasta que no se alcanza la madurez sexual y dependen igualmente de otras medidas del cuerpo (Mushinsky *et al.*, 1994; McRae *et al.*, 1981).

7.5 Sexaje por medio de la forma

Los resultados de este estudio sugieren que la forma del plastrón de los tortuguillos puede ser empleado como un método de sexaje, con una efectividad del 91 y 85% a los 7 días y 3.5 meses de edad respectivamente. La forma del plastrón también se ha encontrado sexualmente dimórfica en investigaciones anteriores (Ceballos y Valenzuela, 2011; Ceballos *et al.*, 2014). Estudios previos han empleado la forma de la muesca anal con un 75% de efectividad (Ceballos *et al.*, 2014a) y el caparazón con un 85% de efectividad (Valenzuela *et al.*, 2004).

En este estudio sin embargo debe tenerse en cuenta algunas consideraciones que pueden aumentar el margen de error del método. El número de tortuguillos sexados por medio de histología gonadal fue bajo representando apenas 4 nidos. En algunos tratamientos, especialmente en el experimento rápido, hubo grandes diferencias en los porcentajes de hembras encontradas a las dos edades. Esto pudo ser debido en

parte a error de la técnica (6% menos efectivo a los 3.5 meses), y a que en estas temperaturas se produjeron neonatos con formas intermedias (entre la forma los sexos).

8. CONCLUSIONES

En este estudio se observaron evidencias de que las temperaturas previas al PTS tienen un efecto definitivo sobre el PTS mismo. Una variación en la temperatura de incubación inicial de 2 °C puede generar diferencias importantes en la duración del PTS y por lo tanto en las proporciones sexuales resultantes. Debido a la cantidad de calor acumulada en el periodo previo al PTS, la inducción de la producción de hembras, exponiendo los huevos a una temperatura feminizante durante periodos de 10 días en el segundo y tercer tercio de la incubación, lograron la feminización de altos porcentajes de embriones cuando la incubación inicia a 31 °C. Por otro lado, la exposición de los huevos a una temperatura de incubación inicial relativamente más fría, 29 °C, limitó el PTS a un poco menos del segundo tercio del periodo de incubación. Mediante los experimentos diseñados en esta investigación, fue posible definir la duración del PTS bajo dos tratamientos de incubación específicos, sin embargo no se evaluó el efecto de temperaturas feminizantes antes del día 20 ni después del día 50 durante los cuales los embriones podrían, o no, ser sensibles a la temperatura de incubación.

Los efectos de la temperatura de incubación y del sexo en la forma y tamaño de los neonatos son significativos, con fenotipos que difieren entre machos y hembras y entre temperaturas frías y cálidas. Para entender las implicaciones de tales fenotipos en la supervivencia y el desempeño reproductivo estos deben ser evaluados en futuras investigaciones que idealmente incluyan pruebas de desempeño y los fenotipos producidos en condiciones naturales.

La morfometría geométrica es un método de bajo costo que puede ser empleado para conocer variaciones en las formas de los individuos y el cual presenta una efectividad confiable para ser empleada como técnica de sexaje no letal. De acuerdo a los resultados obtenidos en esta y otras investigaciones, se concluye que en cada

especie se debe definir la parte(s) del cuerpo que arroje el mayor porcentaje de efectividad de sexaje. El dimorfismo sexual y los efectos de la temperatura de incubación en la forma de los individuos fueron significativos prácticamente desde el momento del nacimiento y se acentúan con la edad.

Este trabajo provee evidencias de que fenómenos como el cambio climático pueden tener efectos sesgados en la producción del sexo y la morfología de algunos reptiles con determinación sexual por temperatura.

9. REFERENCIAS

- Adams, D. C., and E. Otárola-Castillo. 2013. geomorph: an R package for the collection and analysis of geometric morphometric shape data. *Methods in Ecology and Evolution* **4**:393-399.
- Ashmore, G. M., and F. J. Janzen. 2003. Phenotypic variation in smooth softshell turtles (*Apalone mutica*) from eggs incubated in constant versus fluctuating temperatures. *Oecologia* **134**:182-188.
- Bonach, K., A. Malvasio, E. R. Matushima, and L. M. Verdade. 2011. Temperature-sex determination in *Podocnemis expansa* (Testudines, Podocnemididae). *Iheringia Serie Zoologia* **101**:151-155.
- Bookstein, F. L. 1986. Size and shape spaces for landmark data in two dimensions. *Statistical Science*:181-222.
- Bookstein, F. L. 1996. Landmark methods for forms without landmarks: localizing group differences in outline shape. Pages 279-289. IEEE.
- Bookstein, F. L. 1997. *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology*. Cambridge University Press.
- Booth, D. T. 2000. Incubation of eggs of the Australian broad-shelled turtle, *Chelodina expansa* (Testudinata: Chelidae), at different temperatures: effects on pattern of oxygen consumption and hatchling morphology. *Australian Journal of Zoology* **48**:369-378.

- Booth, D. T., E. Burgess, J. McCosker, and J. M. Lanyon. 2004. The influence of incubation temperature on post-hatching fitness characteristics of turtles. *International Congress Series* **1275**:226-233.
- Brophy, T. R. 2006. Allometry and Sexual Dimorphism in the Snail-Eating Turtle *Malayemys macrocephala* from the Chao Phraya River Basin of Central Thailand. *Chelonian Conservation and Biology* **5**:159-165.
- Bull, J. J. 1980. Sex Determination in Reptiles. *The Quarterly Review of Biology* **55**:3-21.
- Bull, J. J., and R. C. Vogt. 1979. Temperature-dependent sex determination in turtles. *Science* **206**:1186-1188.
- Bull, J. J., and R. C. Vogt. 1981. Temperature-sensitive periods of sex determination in emydid turtles. *Journal of Experimental Zoology* **218**:435-440.
- Bull, J. J., R. C. Vogt, and C. J. McCoy. 1982. Sex determining temperatures in turtles: a geographic comparison. *Evolution*:326-332.
- Burke, R.L., A. M. Calichio. En prensa. Temperature-dependent sex determination in the Diamond-backed Terrapin, *Malaclemys terrapin*.
- Castaño-Mora, O. V. 2002. Libro rojo de reptiles de Colombia. Instituto Humboldt Colombia, Universidad Nacional de Colombia.
- Caballero Acosta, H., C. Durango Lopez, and C. A. Giraldo Castro. 2009. Los humedales del Magdalena medio antioqueño desde la perspectiva física y sociocultural. Instituto de estudios ambientales, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.
- Ceballos, C., O. Hernández, and N. Valenzuela. 2014a. Divergent Sex-Specific Plasticity in Long-Lived Vertebrates with Contrasting Sexual Dimorphism. *Evolutionary Biology* **41**:81-98.
- Ceballos, C. P., I. Romero-Geréz, C. Gómez-Saldarriaga, and K. Miranda. 2014b. Reproduction and conservation of the Magdalena River Turtle (*Podocnemis lewyana*) in the Claro Cocorná Sur River, Colombia. *Acta Biológica Colombiana* **19**:393-400.

- Ceballos, C. P., and N. Valenzuela. 2011. The Role of Sex-specific Plasticity in Shaping Sexual Dimorphism in a Long-lived Vertebrate, the Snapping Turtle *Chelydra serpentina*. *Evolutionary Biology* **38**:163-181.
- Charnov, E. L., and J. Bull. 1977. When is sex environmentally determined? *Nature* **266**:828-830.
- Correa-H, J. C., A. M. Cano-Castaño, V. P. Páez, and A. Restrepo. 2010. Reproductive Ecology of the Magdalena River Turtle (*Podocnemis lewyana*) in the Mompos Depression, Colombia. *Chelonian Conservation and Biology* **9**:70-78.
- Crews, D., T. Wibbels, W.H.N. Gutzke. 1989. Action of sex steroid hormones on temperature-induced sex determination in the snapping turtle (*Chelydra serpentina*). *Gen Comp Endocr* **75**:159-166.
- Crews D., J.J. Bull, T. Wibbels. 1991. Estrogen and sex reversal in turtles: Dosages producing both sexes produce few intersexes. *Gen Comp Endocr* **81**:357-364.
- Crews, D., J. M. Bergeron, J. J. Bull, D. Flores, A. Tousignant, J. K. Skipper, and T. Wibbels. 1994. Temperature-dependent sex determination in reptiles: Proximate mechanisms, ultimate outcomes, and practical applications. *Developmental Genetics* **15**:297-312.
- de Souza Alcântara, A., D. F. da Silva, and J. C. B. Pezzuti. 2013. Effects of the Hydrological cycle and human settlements on the population status of *Podocnemis unifilis* (Testudines: Podocnemididae) in the Xingu River, Brazil. *Chelonian Conservation and Biology* **12**:134-142.
- de Souza, R. R., and R. C. Vogt. 1994. Incubation temperature influences sex and hatchling size in the neotropical turtle *Podocnemis unifilis*. *Journal of Herpetology*:453-464.
- Demuth, J. P. 2001. The effects of constant and fluctuating incubation temperatures on sex determination, growth, and performance in the tortoise *Gopherus polyphemus*. *Canadian Journal of Zoology* **79**:1609-1620.
- Dodd, K. L., C. Murdock, and T. Wibbels. 2006. Interclutch variation in sex ratios produced at pivotal temperature in the red-eared slider, a turtle with temperature-dependent sex determination. *Journal of herpetology* **40**:544-549.

- Du, W.-G., R.-Q. Zheng, and L. Shu. 2006. The influence of incubation temperature on morphology, locomotor performance, and cold tolerance of hatchling Chinese three-keeled pond turtles, *Chinemys reevesii*. *Journal Information* **5**.
- Ewert, M. A., J. W. Lang, and C. E. Nelson. 2005. Geographic variation in the pattern of temperature-dependent sex determination in the American snapping turtle (*Chelydra serpentina*). *Journal of Zoology* **265**:81-95.
- Ewert, M. A., D. R. Jackson, and C. E. Nelson. 1994. Patterns of temperature-dependent sex determination in turtles. *Journal of Experimental Zoology* **270**:3-15.
- Forero-Medina, G., O. V. Castaño-Mora, and O. Montenegro. 2007. Abundance, population structure, and conservation of *Kinosternon scorpioides albogulare* on the Caribbean island of San Andrés, Colombia. *Chelonian Conservation and Biology* **6**:163-169.
- Freedberg, S., M. A. Ewert, and C. E. Nelson. 2001. Environmental effects on fitness and consequences for sex allocation in a reptile with environmental sex determination. *Evolutionary Ecology Research* **3**:953-967.
- Galbraith, D. A., and R. J. Brooks. 1984. A tagging method for use in hatchling turtles. *Herp review* **15**:73-75.
- Gallego-García, N., and O. V. Castaño-Mora. 2008. Ecology and Status of the Magdalena River Turtle, *Podocnemis lewyana*, a Colombian Endemic. *Chelonian Conservation and Biology* **7**:37-44.
- Georges, A., K. Beggs, J. E. Young, and J. S. Doody. 2005. Modelling development of reptile embryos under fluctuating temperature regimes. *Physiological and Biochemical Zoology* **78**:18-30.
- Gibbons, J. W. 1970. Sex ratios in turtles. *Researches on population ecology* **12**:252-254.
- Girondot, M. 1999. Statistical description of temperature-dependent sex determination using maximum likelihood. *Evolutionary Ecology Research* **1**:479-486.
- Godfrey, M.H., V. Delmas, M. Girondot. 2003. Assessment of patterns of temperature-dependent sex determination using maximum likelihood model selection. *Ecoscience* **10**: 265-272.

- Gosnell, J. S., G. Rivera, R. W. Blob, and B. Moon. 2009. A Phylogenetic Analysis of Sexual Size Dimorphism in Turtles. *Herpetologica* **65**:70-81.
- Gutzke, W. H. N., and G. C. Packard. 1987. The influence of temperature on eggs and hatchlings of Blanding's Turtles, *Emydoidea blandingii*. *Journal of Herpetology*:161-163.
- Gutzke, W. H. N., G. C. Packard, M. J. Packard, and T. J. Boardman. 1987. Influence of the Hydric and Thermal Environments on Eggs and Hatchlings of Painted Turtles (*Chrysemys picta*). *Herpetologica* **43**:393-404.
- Gutzke, W. H. N., and G. L. Paukstis. 1983. Influence of the hydric environment on sexual differentiation of turtles. *Journal of Experimental Zoology* **226**:467-469.
- Hewavisenthi, S., and C. J. Parmenter. 2002. Thermosensitive period for sexual differentiation of the gonads of the flatback turtle (*Natator depressus* Garman). *Australian Journal of Zoology* **50**:521-527.
- Hewavisenthi, S., C. J. Parmenter, and R. E. Gatten Jr. 2001. Influence of incubation environment on the development of the flatback turtle (*Natator depressus*). *Copeia* **2001**:668-682.
- Houghton, J. T., Y. Ding, D. J. Griggs, M. Noguer, P. J. van der Linden, X. Dai, K. Maskell, and C. A. Johnson. 2001. Climate Change 2001: The Scientific Basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change- IPCC. . Page 881, Cambridge University Press, Cambridge and New York.
- Janzen, F. J. 1993a. An experimental analysis of natural selection on body size of hatchling turtles. *Ecology*:332-341.
- Janzen, F. J. 1993b. The influence of incubation temperature and family on eggs, embryos, and hatchlings of the smooth softshell turtle (*Apalone mutica*). *Physiological Zoology* **66**:349-373.
- Janzen, F. J. 1994. Climate change and temperature-dependent sex determination in reptiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**:7487-7490.
- Johnston, C. M., M. Barnett, P. T. Sharpe, J. A. M. Graves, M. B. Renfree, B. Capel, and D. Mireille. 1995. the molecular biology of temperature-dependent sex determination [and discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **350**:297-304.

- Kaddour, K. B., T. Slimani, X. Bonnet, and F. Lagarde. 2008. Sexual dimorphism in the Greek tortoise: a test of the body shape hypothesis. *Journal Information* **7**.
- Kam, Y.-C., and R. Ackerman. 1990. The effect of incubation media on the water exchange of snapping turtle (*Chelydra serpentina*) eggs and hatchlings. *Journal of Comparative Physiology B* **160**:317-324.
- Lang, J. W., and H. V. Andrews. 1994. Temperature-dependent sex determination in crocodylians. *Journal of Experimental Zoology* **270**:28-44.
- Lovich, J. E., C. H. Ernst, R. T. Zappalorti, and D. W. Herman. 1998. Geographic variation in growth and sexual size dimorphism of Bog Turtles (*Clemmys muhlenbergii*). *The American midland naturalist* **139**:69-78.
- Lubiana, A., and P. D. Ferreira Júnior. 2009. Pivotal temperature and sexual dimorphism of *Podocnemis expansa* hatchlings (Testudines: Podocnemididae) from Bananal Island, Brazil. *Zoologia (Curitiba)* **26**:527-533.
- Marcus, L. F. 1996. *Advances in morphometrics*. Springer.
- Matsumoto, Y., and D. Crews. 2012. Molecular mechanisms of temperature-dependent sex determination in the context of ecological developmental biology. *Molecular and cellular endocrinology* **354**:103-110.
- McRae, W. A., J. L. Landers, and G. D. Cleveland. 1981. Sexual dimorphism in the gopher tortoise (*Gopherus polyphemus*). *Herpetologica*:46-52.
- Ministerio del Medio Ambiente de Colombia. 2002. Programa Nacional para la Conservación de las Tortugas Marinas y Continentales de Colombia. Imprenta Nacional Bogotá.
- Mrosovsky, N., and C. Pieau. 1991. Transitional range of temperature, pivotal temperatures and thermosensitive stages for sex determination in reptiles. *Amphibia-Reptilia* **12**:169-179.
- Mullins, M. A., and F. J. Janzen. 2006. Phenotypic effects of thermal means and variances on smooth softshell turtle (*Apalone mutica*) embryos and hatchlings. *Herpetologica* **62**:27-36.
- Mushinsky, H. R., D. S. Wilson, and E. D. McCoy. 1994. Growth and Sexual Dimorphism of *Gopherus Polyphemus* in Central Florida. *Herpetologica* **50**:119-128.

- Muñoz, A., and B. Nicolau. 2006. Sexual dimorphism and allometry in the stripe-necked terrapin, *Mauremys leprosa*, in Spain. *Chelonian Conservation and Biology* **5**:87-92.
- Myers, E. M., J. K. Tucker, and C. H. Chandler. 2007. Experimental analysis of body size and shape during critical life-history events of hatchling slider turtles, *Trachemys scripta elegans*. *Functional Ecology* **21**:1106-1114.
- Neuwald, J. L., and N. Valenzuela. 2011. The lesser known challenge of climate change: thermal variance and sex-reversal in vertebrates with temperature-dependent sex determination. *PloS one* **6**:e18117.
- Okada, Y., T. Yabe, and S.-I. Oda. 2011. Embryonic Development of the Japanese Pond Turtle, *Mauremys japonica* (Testudines: Geoemydidae). *Current Herpetology* **30**:89-102.
- Packard, G. C., M. J. Packard, and G. F. Birchard. 1989. Sexual Differentiation and Hatching Success by Painted Turtles Incubating in Different Thermal and Hydric Environments. *Herpetologica* **45**:385-392.
- Patino-Martinez, J., A. Marco, L. Quiñones, and L. Hawkes. 2012. A potential tool to mitigate the impacts of climate change to the caribbean leatherback sea turtle. *Global Change Biology* **18**:401-411.
- Paukstis, G. L., W. H. N. Gutzke, and G. C. Packard. 1984. Effects of substrate water potential and fluctuating temperatures on sex ratios of hatchling painted turtles (*Chrysemys picta*). *Canadian journal of zoology* **62**:1491-1494.
- Pieau, C., and M. Dorizzi. 1981. Determination of temperature sensitive stages for sexual differentiation of the gonads in embryos of the turtle, *Emys orbicularis*. *Journal of Morphology* **170**:373-382.
- Pieau, C., M. Dorizzi, N. Richard-Mercier, and G. Desvages. 1998. Sexual differentiation of gonads as a function of temperature in the turtle *Emys orbicularis*: endocrine function, intersexuality and growth. *Journal of Experimental Zoology* **281**:400-408.
- Pieau, C., M. Dorizzi, and N. Richard-Mercier. 1999. Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **55**:887-900.

- Pinheiro, J., D. Bates, S. DebRoy, and D. Sarkar. 2007. Linear and nonlinear mixed effects models. R package version **3**:57.
- Páez, V. P., J. C. Correa, A. M. Cano, and B. C. Bock. 2009. A comparison of maternal and temperature effects on sex, size, and growth of hatchlings of the Magdalena River Turtle (*Podocnemis lewyana*) incubated under field and controlled laboratory conditions. *Copeia* **2009**:698-704.
- R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-Project.org/>.
- Refsnider, J. M. 2013. High thermal variance in naturally incubated turtle nests produces faster offspring. *Journal of ethology* **31**:85-93.
- Restrepo, A., V. P. Páez, C. López, and B. C. Bock. 2008. Distribution and Status of *Podocnemis lewyana* in the Magdalena River Drainage of Colombia. *Chelonian Conservation and Biology* **7**:45-51.
- Rohlf, F. J. 2001a. Comparative methods for the analysis of continuous variables: Geometric interpretations. *Evolution* **55**:2143-2160.
- Rohlf, F. J. 2001b. TpsDig, version 1.31. Department of Ecology and Evolution. State University of New York at Stony Brook, Stony Brook, New York, USA.
- Rohlf, F. J. 2003. TpsRelw, Version 1.29. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, New York, USA.
- Rohlf, F. J. 2004. TpsSpln, version 1.20. Department of Ecology and Evolution. State University of New York at Stony Brook, Stony Brook, New York, USA.
- Rohlf, F. J., and D. Slice. 1990. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Biology* **39**:40-59.
- Romero, I. 2011. Proyecto de Conservación de la tortuga de río *Podocnemis lewyana* en la Cuenca baja del río Claro Cocorná Sur. Page 40. CORNARE, CORANTIOQUIA, Asociación Ambientalista Futuro Verde AAFUVER.
- Sakata, J. T., and D. Crews. 2003. Embryonic temperature shapes behavioural change following social experience in male leopard geckos, *Eublepharis macularius*. *Animal behaviour* **66**:839-846.

- Steyermark, A. C., and J. R. Spotila. 2001. Effects of maternal identity and incubation temperature on hatching and hatchling morphology in snapping turtles, *Chelydra serpentina*. *Journal Information* **2001**.
- IUCN. 2014. The IUCN Red List of Threatened Species. www.iucnredlist.org.
- Underwood, E. B., S. Bowers, J. C. Guzy, J. E. Lovich, C. A. Taylor, J. W. Gibbons, and M. E. Dorcas. 2013. Sexual Dimorphism and Feeding Ecology of Diamond-backed Terrapins (*Malaclemys terrapin*). *Herpetologica* **69**:397-404.
- Valenzuela, N. 2001a. Constant, shift, and natural temperature effects on sex determination in *Podocnemis expansa*. *Ecology* **82**:3010-3024.
- Valenzuela, N. 2001b. Maternal effects on life-history traits in the Amazonian giant river turtle *Podocnemis expansa*. *Journal of Herpetology*:368-378.
- Valenzuela, N. 2004. Introduction. Pages 1-4 in N. Valenzuela and V. Lance, editors. Temperature-dependent sex determination in Vertebrates. Smithsonian Books, Washington.
- Valenzuela, N., D. C. Adams, R. M. Bowden, and A. C. Gauger. 2004. Geometric morphometric sex estimation for hatchling turtles: A powerful alternative for detecting subtle sexual shape dimorphism. Pages 735-742, *Copeia*.
- Valenzuela, N., R. Botero, and E. Martínez. 1997. Field study of sex determination in *Podocnemis expansa* from Colombian Amazonia. *Herpetologica*:390-398.
- Vargas-Ramírez, M., Y. Chiari, O. V. Castaño-Mora, and S. B. J. Menken. 2006. First genetic survey on the Magdalena's endemic fresh water turtle *Podocnemis lewyana* (Testudines, Podocnemididae) and its relation with human communities. Consequences for the species conservation. Final report. Consequences for the species conservation. Report, 49pp. On line www.fundacionbiodiversa.org/proyectos_tortuga.html.
- Vargas-Ramírez, M., Y. Chiari, O. V. Castaño-Mora, and S. B. J. Menken. 2007. Low genetic variability in the endangered Colombian endemic freshwater turtle *Podocnemis lewyana* (Testudines, Podocnemididae). *Contributions to Zoology* **76**:1-7.
- Vargas-Ramírez, M., H. Stuckas, O. V. Castano-Mora, and U. Fritz. 2012. Extremely low genetic diversity and weak population differentiation in the endangered

- Colombian river turtle *Podocnemis lewyana* (Testudines: Podocnemididae).
Conservation Genetics **13**:65-77.
- Venables, W. N., B. D. Ripley. 2002. Modern Applied Statistics with S. Fourth edition.
Springer, New York. ISBN 0-387-95457-0.
- Wibbels, T., J. J. Bull, and D. Crews. 1991. Chronology and morphology of
temperature-dependent sex determination. Journal of Experimental Zoology
260:371-381.
- Wibbels, T., J. J. Bull, and D. Crews. 1994. Temperature-dependent sex
determination: A mechanistic approach. Journal of Experimental Zoology
270:71-78.
- Yntema, C. L. 1968. A series of stages in the embryonic development of *Chelydra
serpentina*. Journal of Morphology **125**:219-251.
- Yntema, C. L. 1978. Incubation times for eggs of the turtle *Chelydra serpentina*
(Testudines: Chelydridae) at various temperatures. Herpetologica:274-277.
- Yntema, C. L. 1979. Temperature levels and periods of sex determination during
incubation of eggs of *Chelydra serpentina*. Journal of Morphology **159**:17-27.
- Yntema, C. L., and N. Mrosovsky. 1982. Critical periods and pivotal temperatures for
sexual differentiation in loggerhead sea turtles. Canadian Journal of Zoology
60:1012-1016.
- Young, J. E., A. Georges, J. S. Doody, P. B. West, and R. L. Alderman. 2004. Pivotal
range and thermosensitive period of the pig-nosed turtle, *Carettochelys
insculpta* (Testudines : Carettochelydidae), from northern Australia. Canadian
Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie **82**:1251-1257.

TABLAS

Tabla 1. Diseño experimental, temperaturas registradas durante la incubación de huevos de *P. lewyana* y proporciones sexuales observadas de acuerdo al sexaje con la forma del plastrón a los 7 días de edad. Abreviaturas: % sexo_{obs} = proporción sexos observada (% hembras) en este estudio, n_{7d} = número de tortugas a los 7 días de edad. Los números entre paréntesis indican el rango de error en la producción del porcentaje de hembras de acuerdo al porcentaje de efectividad del sexaje por morfométrica geométrica (9% de error).

Grupos	Días de incubación						% Sexo_{obs} (± error de MG)
	1- 10	11-19	20-30	31-40	41-50	>50	
Control 29 $n_{7d}=26$			29.2 ± 0.8°				7.7 (± 0.69)
Control 31 $n_{7d}=17$			31.2 ± 0.4°				17.6 (± 1.58)
Control 34 $n_{7d}=22$			34.6 ± 1.2°				86.3 (± 7.77)
Lento 20-30 $n_{7d}=19$	29.3 ± 1.5°		35.5 ± 1.2°		29.3 ± 1.5°		36.8 (± 3.31)
Lento 30-40 $n_{7d}=25$		29.4° ± 1.7°		35.1 ± 1.4°	29.4 ± 1.7°		20 (± 1.80)
Lento 40-50 $n_{7d}=24$			29.5 ± 1.7°		35.3 ± 1.8°	29.5 ± 1.7°	4.1 (± 0.37)
Rápido 20-30 $n_{7d}=9$	31.3 ± 1.3°		35.5 ± 1.2°		31.3 ± 1.3°		55.5 (± 4.99)
Rápido 30-40 $n_{7d}=19$		31.4 ± 1.3°		35.1 ± 1.4°	31.4 ± 1.3°		31.6 (± 2.84)
Rápido 40-50 $n_{7d}=23$			31.3 ± 1.3°		35.3 ± 1.8°	31.3 ± 1.3°	65.2 (± 5.87)

Tabla 2. Número de huevos, tiempo de incubación y número de neonatos eclosionados en cada tratamiento de incubación.

Tratamientos	Número de huevos	Periodo incubación (días)	% eclosión (número neonatos)
Control 29	31	81.38 ± 0.85	83.87 (26)
Control 31	30	64.29 ± 0.77	56.66 (17)
Control 34	30	51.13 ± 0.56	73.33 (22)
Lento (29 °C)			
Días 20-30 (34.7 °C)	20	70.42 ± 0.5	95 (19)
Días 30-40 (34.7 °C)	25	70.80 ± 0.4	100 (25)
Días 40-50 (34.7 °C)	24	71.83 ± 0.48	100 (24)
Rápido (31 °C)			
Días 20-30 (34.7 °C)	19	57.1 ± 0.33	100 (19)
Días 30-40 (34.7 °C)	24	56.52 ± 0.77	79.16 (19)
Días 40-50 (34.7 °C)	24	59.54 ± 2.22	100 (24)

Tabla 3. Efecto materno en el tamaño (mm) y peso (gr) de neonatos de *P. lewyana* a los 7 días de edad. Abreviaturas: LRC: largo recto del caparazón, ARC: ancho recto del caparazón, LRP: largo recto del plastrón, ARP: ancho recto del plastrón, Prom: promedio.

Nido	Peso	LRC	ARC	LRP	ARP
A	24.52 (22.7-27.8)	50.07 (46.99-52.81)	47.14 (45.63-48.76)	45.31 (43.26-46.91)	37.56 (36.65-38.60)
B	21.88 (20.1-24.2)	46.65 (44.27-48.59)	45.71 (43.76-46.78)	43.99 (43.22-44.64)	36.05 (35.15-37.25)
C	22.83 (22.1-23.7)	50.26 (46.64-52.27)	47.08 (46.41-48.63)	44.77 (43.00-47.40)	36.74 (36.21-38.14)
D	18.65 (16.3-21.1)	44.78 (41.99-46.76)	42.53 (40.79-44.13)	40.42 (37.96-42.48)	33.90 (32.56-35.32)
E	20.06 (19.0-21.3)	47.53 (45.32-49.71)	44.70 (42.14-46.87)	43.49 (42.05-44.68)	34.93 (32.13-36.70)
F	18.17 (14.7-19.3)	45.26 (39.87-46.90)	43.33 (36.86-45.09)	41.38 (36.22-42.82)	34.27 (29.34-35.51)
G	16.68 (14.8-19.1)	44.13 (41.88-46.57)	41.98 (39.28-44.47)	39.73 (33.87-42.39)	33.13 (30.80-35.00)
H	21.13 (19.1-23.0)	47.73 (45.46-49.79)	44.92 (42.54-46.97)	42.60 (40.11-44.12)	35.50 (33.39-37.35)
I	19.15 (17.2-21.4)	45.75 (43.69-47.97)	43.05 (41.24-45.19)	42.16 (41.24-45.19)	34.73 (33.49-36.09)
J	19.48 (16.2-21.5)	46.71 (43.26-49.32)	44.09 (41.03-46.67)	41.73 (39.80-43.81)	34.66 (32.48-36.60)
Prom	20.25 ± 2.35	46.88 ± 2.07	44.45± 1.79	42.55±1.83	35.14±1.33

Tabla 4. Tamaño (mm) y peso (gr) de neonatos de *P. lewyana* a los 7 días de edad de cada tratamiento de incubación.

Tratamiento	Peso	LRC	ARC	LRP	ARP
Control 29	22.64 (18.2-27.8)	48.51 (43.1-52.81)	45.85 (40.79-48.76)	43.02(37.96-45.92)	36.11(33.04-38.6)
Control 31	21.47 (16.5-24.7)	46.16 (41.99-48.7)	45.13 (40.94-47.57)	43.19 (39.45-45.14)	36.08(33.12-38.21)
Control 34	21.35 (16.3-23.8)	47.64 (40.87-52.27)	45.42 (41.25-48.06)	44.54 (39.32-47.4)	35.85 (32.56-38.32)
Lento (29°C)					
Días 20-30	19.16 (14.7-21.3)	46.72 (39.87-49.71)	44.42 (36.86-46.87)	42.56 (36.22-44.68)	34.87 (29.34-36.7)
Días 30-40	18.1 (15.2-21.4)	45.57 (43.03-47.97)	43.04 (40.87-45.19)	41.34 (38.4-43.34)	34.24 (32.31-36.09)
Días 40-50	20.92 (19.1-22.7)	48.03 (45.46-49.32)	45.63 (42.54-46.97)	42.22 (40.11-43.81)	35.76 (33.59-37.35)
Rápido (31°C)					
Días 20-30	19.64 (19-20.9)	46.45 (45.32-47.58)	43.60 (42.14-44.45)	42.87 (42.05-43.7)	34.24 (32.13-35.4)
Días 30-40	17.53 (14.8-20.0)	44.02 (41.88-45.87)	41.76 (39.28-43.78)	40.62 (38.41-42.65)	33.42 (30.8-35.48)
Días 40-50	19.48 (16.2-23.0)	46.26 (43.26-49.79)	43.24 (41.03-46.26)	42.01 (39.8-44.12)	34.26 (32.48-36.67)
Promedio	20.03±1.68	46.59±1.36	44.23±1.4	42.48±1.13	34.98±0.99

Tabla 5. Dimorfismo sexual, significancia (P) y efectividad del sexaje basado en la forma del caparazón, plastrón y muesca anal de *P. lewyana* a los 7 días y 3.5 meses de edad. La mayor efectividad se observó usando el plastrón en ambas edades (resaltado en negrilla).

Edad	Forma	P	Efectividad
7 días	Caparazón	0.003	71%
	Plastrón	<0.001	91%
	Muesca anal	<0.001	70%
3.5 meses	Caparazón	<0.001	55%
	Plastrón	<0.001	85%
	Muesca anal	<0.001	45%

Tabla 6. Proporciones sexuales (porcentaje de hembras) obtenidas en cada tratamiento de incubación de acuerdo a la forma del caparazón, plastrón y muesca anal en *P. lewyana* a los 7 días y 3.5 meses de edad. Abreviaturas: n= tamaño muestral en cada edad.

Temperatura	7 días			3.5 meses		
	Caparazón	Plastrón	Muesca anal	Caparazón	Plastrón	Muesca anal
Control 29 (n _{7d} =26,n _{3.5m} =22)	7,7%	7,7%	19,2%	31,8%	9,0%	22,7%
Control 31 (n _{7d} =17,n _{3.5m} =16)	17,6%	17,6%	47,0%	68,7%	6,2%	43,7%
Control 34 (n _{7d} =22,n _{3.5m} =16)	77,2%	86,3%	86,3%	87,5%	93,7%	87,5%
Lento 20-30 (n _{7d} =19,n _{3.5m} =19)	31,5%	36,8%	89,4%	57,8%	47,3%	68,4%
Lento 30-40 (n _{7d} =25,n _{3.5m} =24)	4,0%	20,0%	76,0%	29,1%	50,0%	66,6%
Lento 40-50 (n _{7d} =24,n _{3.5m} =24)	0,0%	4,1%	12,5%	12,5%	29,1%	20,8%
Rápido 20-30 (n _{7d} =9 ,n _{3.5m} =7)	44,4%	55,5%	100,0%	85,7%	85,7%	85,7%
Rápido 30-40 (n _{7d} =19,n _{3.5m} =18)	42,1%	31,6%	57,8%	66,6%	55,5%	66,6%
Rápido 40-50 (n _{7d} =23,n _{3.5m} =21)	47,8%	65,2%	56,5%	85,7%	85,7%	80,9%

Tabla 7. Test ANOVA del efecto del sexo, la temperatura de incubación y nido de origen en el tamaño de *P. lewyana* a los 7 días y 3.5 meses de edad.

Variable	GL	SC	MS	F	P	Comparaciones pareadas
Caparazón						
7 días						
Sexo	1	83.98	83.98	19.582	<0.001	
T. Incubación	2	30.31	15.16	3.534	0.035	29=31 (P=0.20) 29=34 (P=0.12) 31=34 (P=0.85)
Nido	3	1062.04	354.01	82.541	<0.001	
Residuos	57	244.47	4.29			
3.5 meses						
Sexo	1	267.25	267.25	7.731	0.007	
T. Incubación	2	1170.37	585.18	16.928	<0.001	29 ≠ 31 (P<0.001) 29 ≠ 34 (P<0.001) 31 = 34 (P=0.077)
Nido	3	114.21	38.07	1.101	0.358	
Residuos	47	1624.73	34.57			
Plastrón						
7 días						
Sexo	1	7.69	7.694	2.700	0.105	
T. Incubación	2	29.6	14.802	5.195	0.008	29=31 (P=0.24) 29=34 (P=0.74) 31=34 (P=0.40)
Nido	3	772.39	257.463	90.371	<0.001	
Residuos	58	165.24	2.849			
3.5 meses						
Sexo	1	876.86	876.86	46.748	<0.001	
T. Incubación	2	1924.78	962.39	51.308	<0.001	29 ≠ 31 (P<0.001) 29 ≠ 34 (P<0.001) 31 ≠ 34 (P<0.001)
Nido	3	256.79	85.60	4.563	0.006	
Residuos	47	881.58	18.76			

Tabla 8. Test ANOVA basado en distancias de Procrustes del efecto del sexo, la temperatura de incubación y nido de origen en la forma de *P. lewyana* a los 7 días y 3.5 meses de edad.

Variable	GL	SC	MS	P	Comparaciones pareadas
Caparazón					
7 días:					
Sexo	1	0.006	0.006	<0.001	
T. Incubación	2	0.009	0.004	<0.001	29 ≠ 31 (P<0.001) 29 ≠ 34 (P<0.001) 31 ≠ 34 (P<0.001)
Nido	3	0.015	0.005	<0.001	
Total	64	0.069	0.001		
3.5 meses:					
Sexo	1	0.005	0.005	<0.001	
T. Incubación	2	0.005	0.002	0.001	29 = 31 (P=0.035) 29 ≠ 34 (P<0.001) 31 ≠ 34 (P=0.001)
Nido	3	0.009	0.003	<0.001	
Total	53	0.047	0.000		
Plastrón					
7 días:					
Sexo	1	0.012	0.012	<0.001	
T. Incubación	2	0.008	0.004	<0.001	29 ≠ 31 (P=0.002) 29 ≠ 34 (P<0.001) 31 ≠ 34 (P<0.001)
Nido	3	0.005	0.001	<0.001	
Total	64	0.057	0.000		
3.5 meses:					
Sexo	1	0.005	0.005	<0.001	
T. Incubación	2	0.003	0.001	<0.001	29 ≠ 31 (P=0.005) 29 ≠ 34 (P<0.001) 31 ≠ 34 (P<0.001)
Nido	3	0.004	0.001	<0.001	
Total	53	0.027	0.000		
Muesca anal					
7 días:					
Sexo	1	0.017	0.017	<0.001	
T. Incubación	2	0.010	0.005	<0.001	29 ≠ 31 (P=0.001) 29 ≠ 34 (P<0.001) 31 ≠ 34 (P<0.001)
Nido	3	0.008	0.002	0.006	
Total	64	0.079	0.001		
3.5 meses:					

Sexo	1	0.017	0.017	<0.001	
T. Incubación	2	0.009	0.004	<0.001	29 ≠ 31 (P=0.009)
					29 ≠ 34 (P<0.001)
					31 ≠ 34 (P<0.001)
Nido	3	0.009	0.003	0.005	
Total	53	0.061	0.001		

Tabla 9. Test ANOVA de la distancia ombligo- muesca (DOM) y de su proporción al largo recto del plastrón (LRP) en *P. lewyana* a los 3.5 meses de edad.

Variable	GL	SC	MS	P
DOM				
Sexo	1	33.148	33.148	<0.001
Residuos	16	25.360	1.585	
Proporción DOM/LRP				
Sexo	1	0.172	0.172	0.159
Residuos	16	1.260	0.078	

FIGURAS

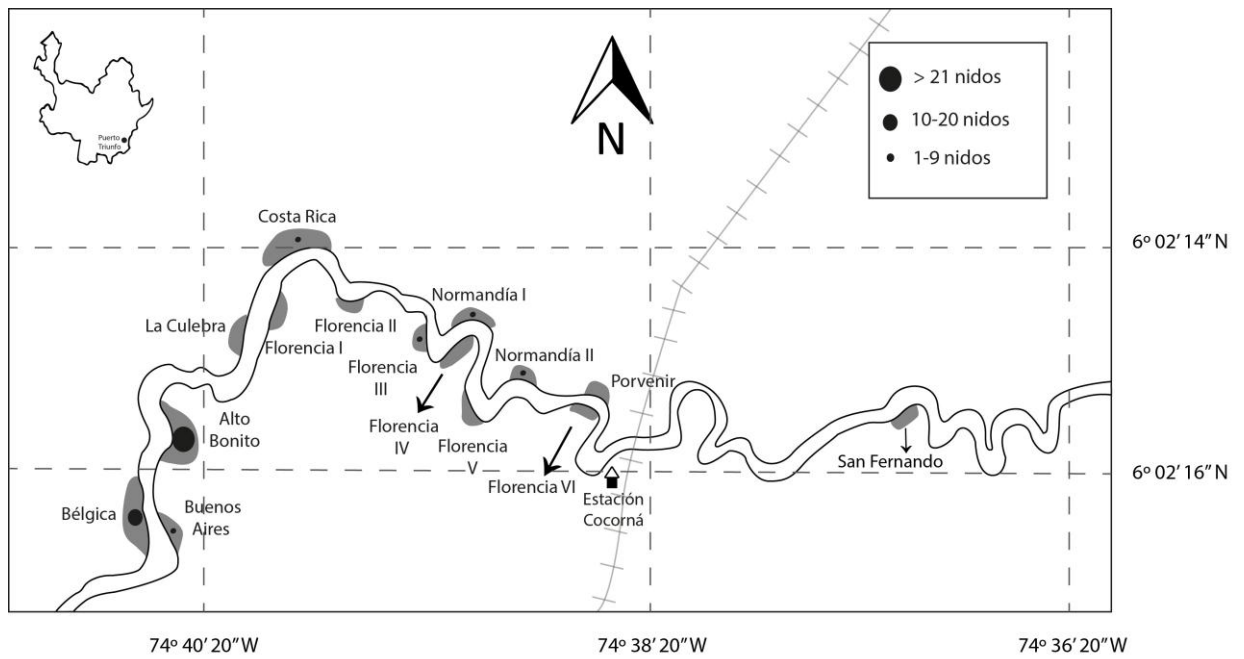


Figura 1. Ubicación de las playas de anidación de *P. lewyana* en el río Claro Cocorná Sur utilizadas en este estudio (Tomado de Ceballos *et al.*, 2014b).

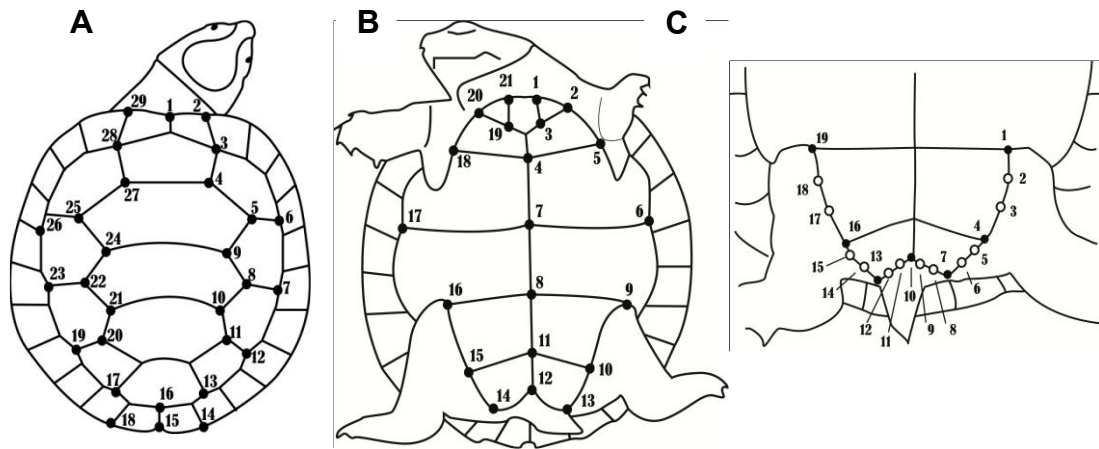


Figura 2. Puntos digitalizados en el caparazón (A), plastrón (B) y muesca anal (C) en los tortuguillos a los 7 días y 3.5 meses de edad. Círculos negros indican puntos fijos y círculos blancos indican puntos deslizantes (modificado de Ceballos *et al.*, 2014a).

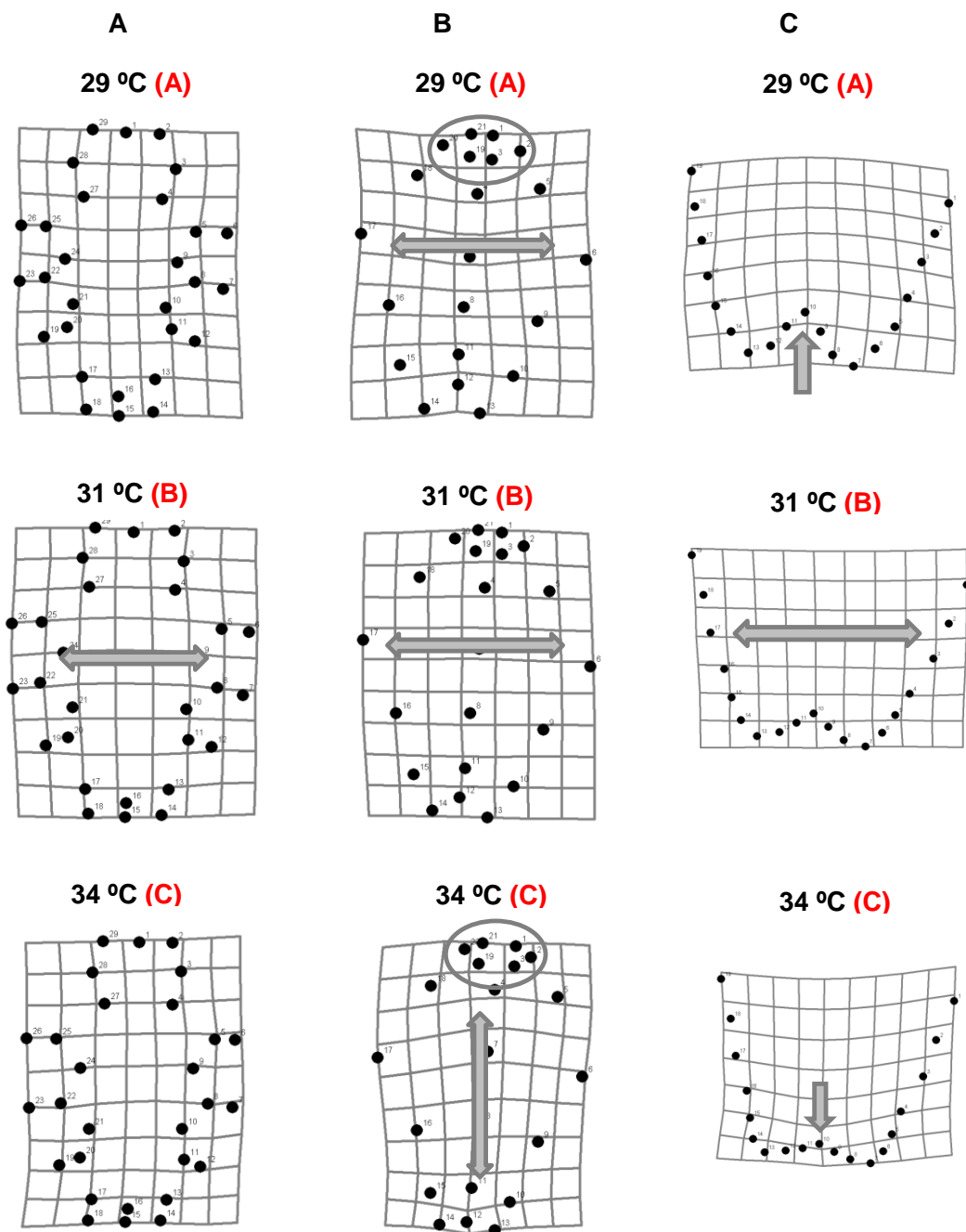


Figura 3. Formas promedio ($n=65$) de los grupos indicando los efectos de la temperatura de incubación en la forma del caparazón (A), plastrón (B) y muesca anal (C) de *P. lewyana* a los 7 días de edad. Letras diferentes indican diferencias en el análisis *post-hoc*. Las flechas y círculos indican las zonas de mayor diferencia en la forma (magnificación 3x).

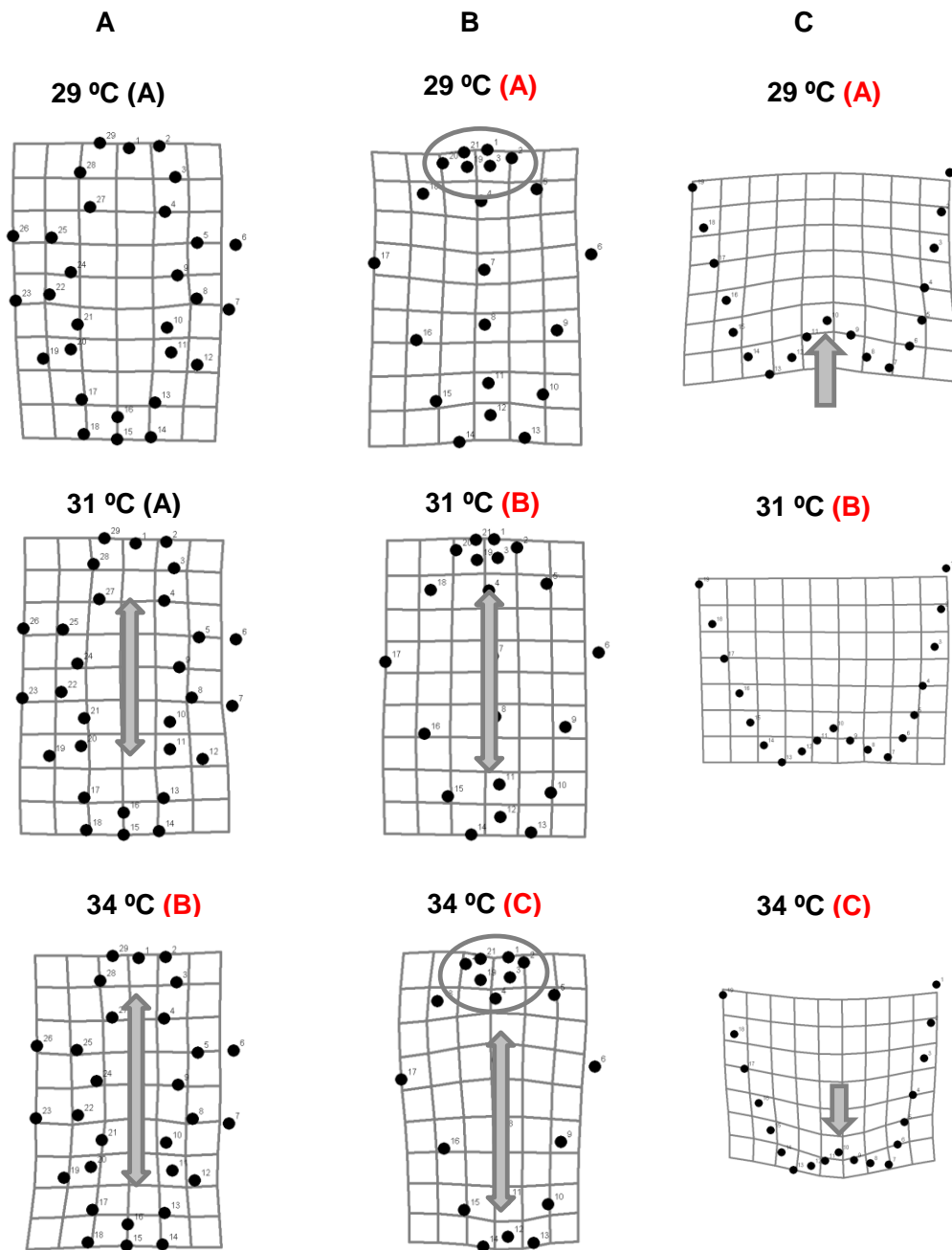


Figura 4. Formas promedio ($n=54$) de los grupos indicando los efectos de la temperatura de incubación en la forma del caparazón (A), plastrón (B) y muesca anal (C) de *P. lewyana* a los 3.5 meses de edad. Letras diferentes indican diferencias en el análisis *post-hoc*. Las flechas y círculos indican las zonas de mayor diferencia en la forma (magnificación 3x).

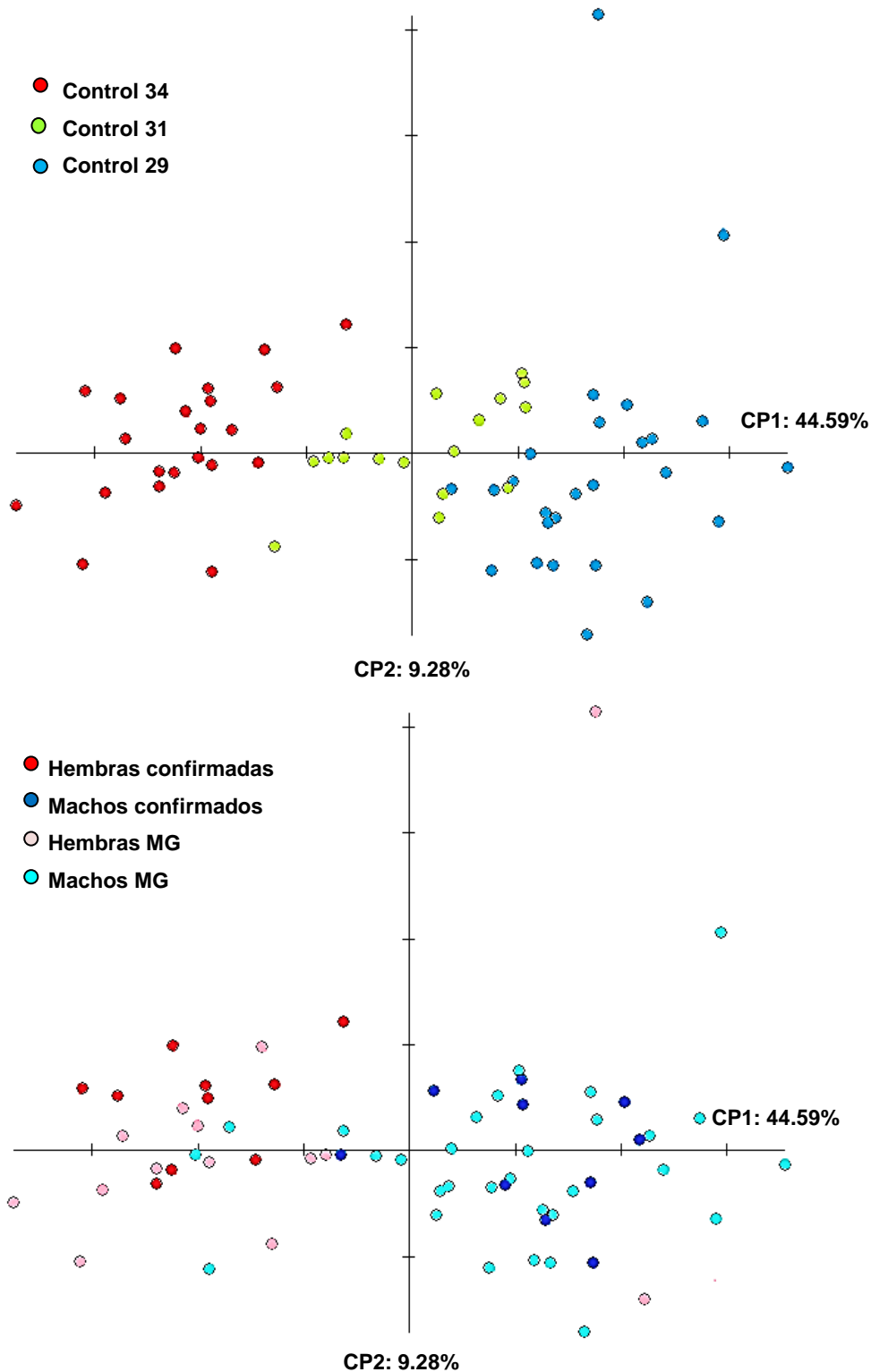


Figura 5. Análisis de componentes principales de la forma del plastrón de neonatos de 7 días de edad. Arriba: Análisis discriminando los grupos de acuerdo al tratamiento de incubación control. Abajo: Análisis discriminando los grupos de acuerdo al sexo determinado por histología (hembras y machos confirmados) y estimados con morfometría geométrica (hembras y machos MG).

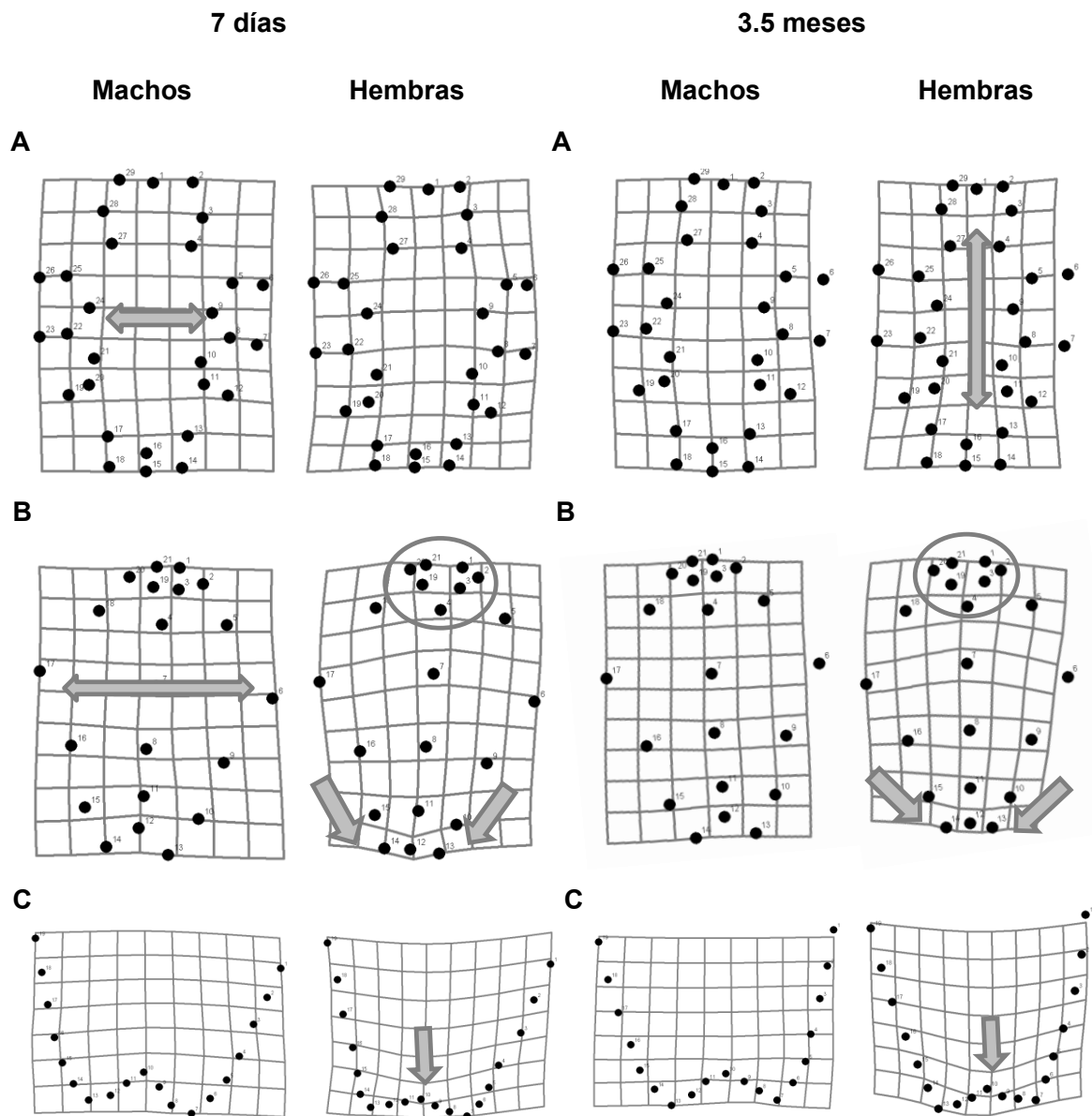


Figura 6. Dimorfismo sexual en la forma del caparazón (A), plastrón (B) y muesca anal (C) de *P. lewyana* a los 7 días y 3.5 meses de edad. Las flechas y círculos indican las zonas de mayor cambio en la forma entre los sexos (magnificación 3x). Figuras son formas promedio de los 20 individuos con sexo confirmado.

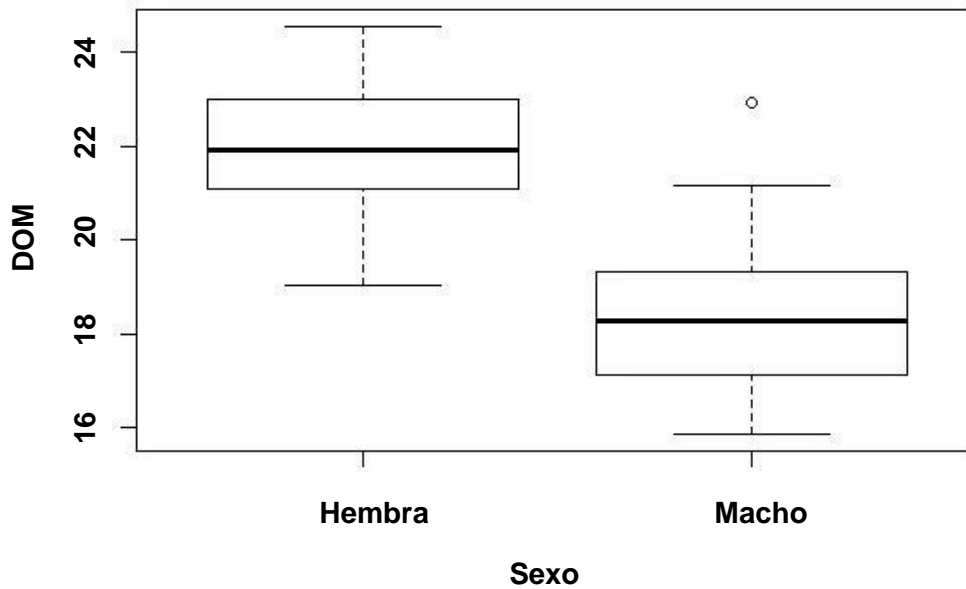


Figura 7. Diagrama de caja de la distancia lineal desde el ombligo hasta la muesca anal (DOM) en tortuguillos hembras y machos de *P. lewyana* de 3.5 meses de edad. Aunque la distancia DOM fue significativamente mayor en las hembras que en los machos, al tener en cuenta el tamaño del individuo (DOM/largo recto del plastrón) el DOM no fue significativo.

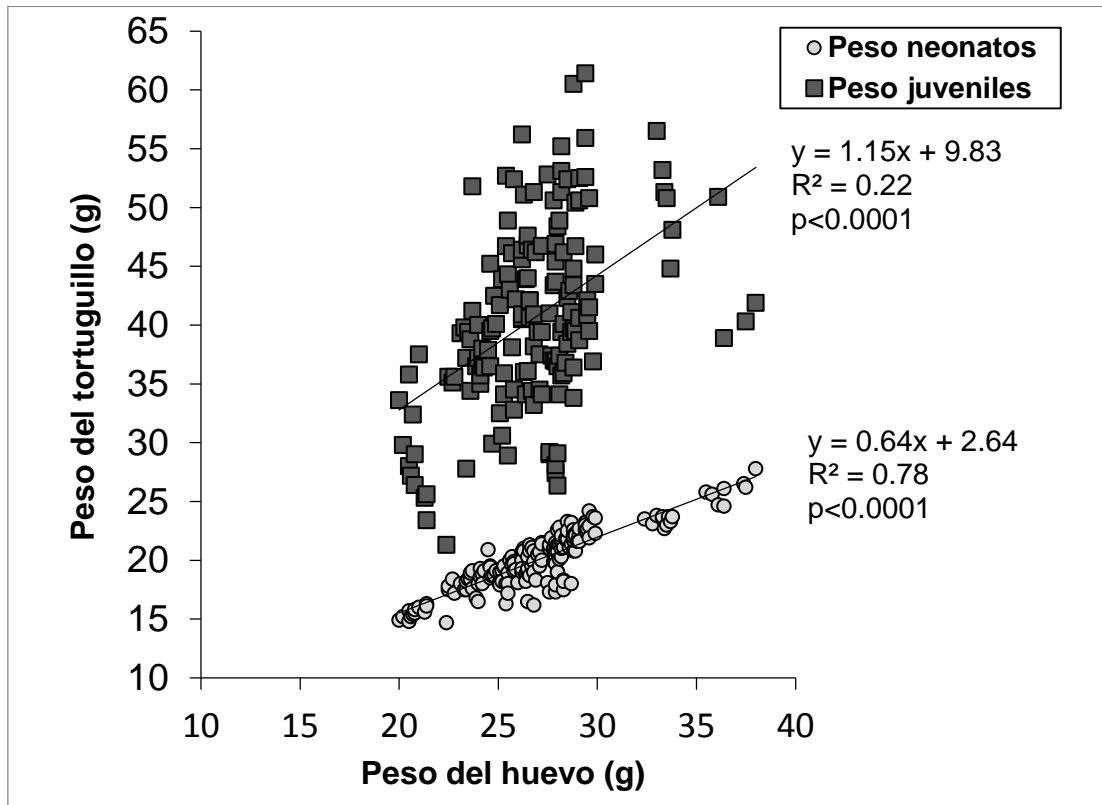


Figura 8. Correlación entre el peso del huevo (g) y el peso de tortuguillos (g) de *P. lewyana* a los 7 días y 3.5 meses de edad (Tomado de Ceballos *et al.*, 2014b).

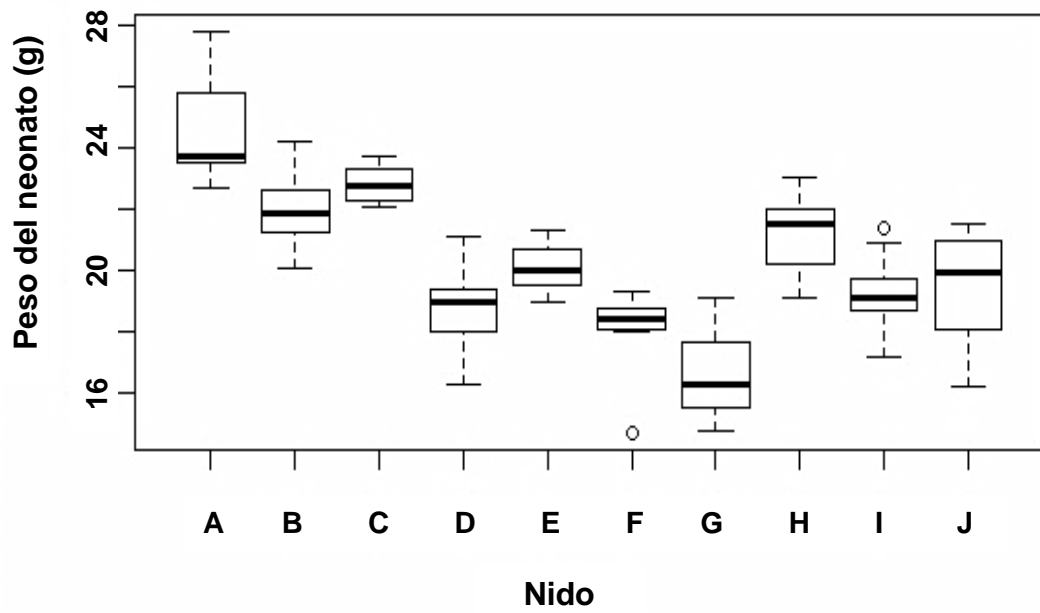


Figura 9. Peso de neonatos (g) de *P. lewyana* a los 7 días de edad de acuerdo al nido de origen.

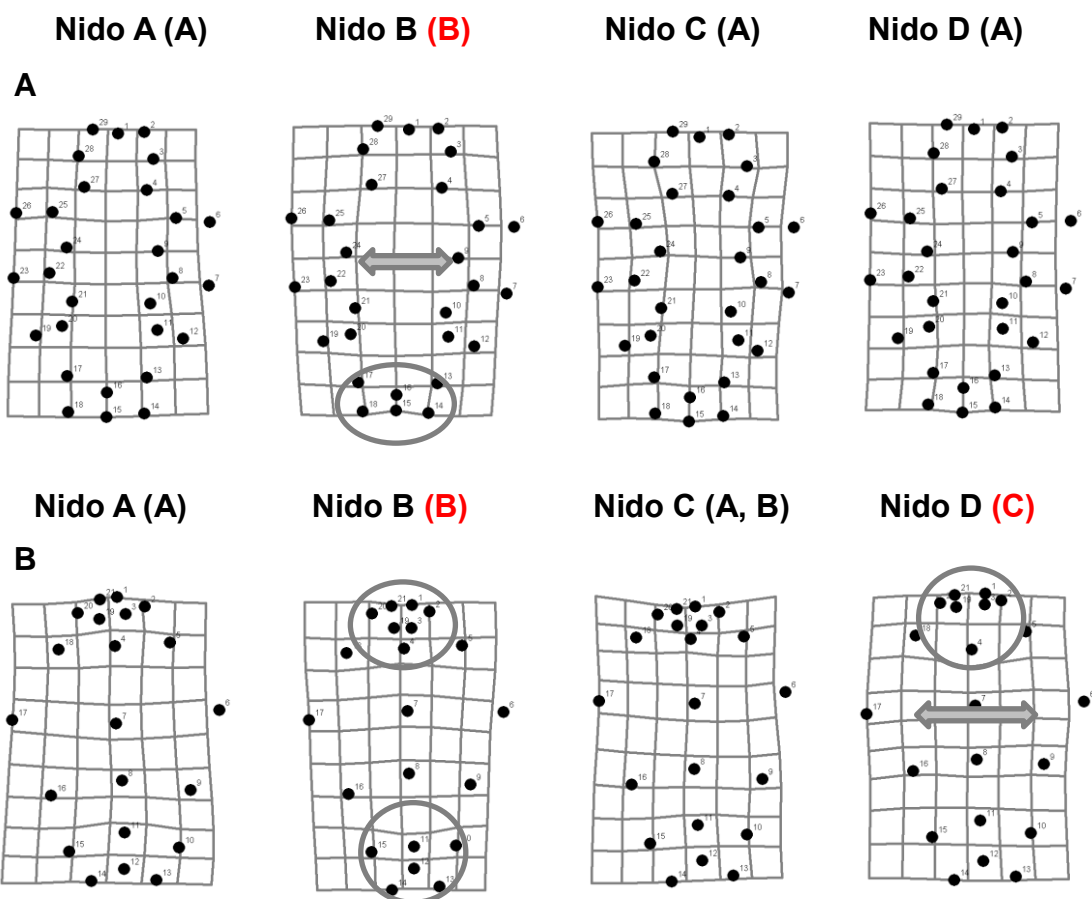


Figura 10. Efecto del nido de origen en la forma del caparazón (A) y del plastrón (B) de juveniles de *P. lewyana* a los 3.5 meses de edad. Letras diferentes indican diferencias en el análisis *post-hoc*. La flecha y los círculos indican las zonas de mayor diferencia en la forma (magnificación 5x). Figuras son formas promedio de 54 individuos.

ANEXOS

Anexo 1. Prueba de galera del manuscrito aceptado para publicación por la revista Acta Biológica Colombiana.



ACTA BIOLÓGICA COLOMBIANA
ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

REPRODUCTION AND CONSERVATION OF THE MAGDALENA RIVER TURTLE (*Podocnemis Lewyana*) IN THE CLARO COCORNÁSUR RIVER, COLOMBIA

Reproducción y conservación de la tortuga del Río Magdalena (*Podocnemis Lewyana*) en el Río Claro Cocornásur, Colombia

CLAUDIA P. CEBALLOS¹, Ph.D.; ISABEL ROMERO², Bachiller; CATALINA GÓMEZ-SALDARRIAGA¹, M.V.; KARLA MIRANDA³, M.V.

¹ Grupo Centauro, Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia UdeA, Carrera 75 No. 65-87, Medellín, Colombia. claudiaceb@gmail.com; cgsaldarriaga@gmail.com

² Asociación Ambientalista Futuro Verde, AAFUVER, Carrera 12 N° 12-04, Corregimiento Estación Cocorná, Puerto Triunfo, Antioquia, Colombia. irgded@hotmail.com

^{3,4} Carrera 75 N° 65-87, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia UdeA, Medellín, Colombia.

Author for correspondence: claudiaceb@gmail.com

Received 28 December 2013, first decision 6 May 2014, accepted 10 May 2014.

Citation / Citar este artículo como: CEBALLOS CP, ROMERO I, GÓMEZ-SALDARRIAGA C, MIRANDA K. Reproduction and conservation of the Magdalena River turtle (*Podocnemis lewyana*) in the Claro Cocornásur River, Colombia. Acta biol. Colomb. 2014;19(3):383-390.

ABSTRACT

La Tortuga del Río Magdalena, *Podocnemis lewyana*, is an endangered and endemic turtle from Colombia. Among the most important information needed to conserve endangered species is to identify, monitor, and protect the sites used by the species to reproduce and grow. In this study we report, for the first time, the reproductive output and the nesting beaches of *P. lewyana* in the Claro Cocornásur River, a tributary of the Magdalena River drainage. We systematically examined a river transect of 8 km with 14 sandy beaches during two nesting seasons in one year. We recorded a yearly production of 47 clutches, 957 eggs, and two preferred nesting beaches: Alto Bonito with 51 %, and Bélgica with 28.3 % of this reproductive output. AAFUVER, a community-based organization has led a headstarting program since 2010 to decrease *in-situ* egg mortality due to predation on nesting beaches. AAFUVER collects and incubates the eggs *ex-situ*, raises the hatchlings for one to five months and then releases them into the same river. To understand potential effects of such egg manipulation, we monitored and compared *in-situ* and *ex-situ* incubation temperatures. We found *ex-situ* temperatures below the pivotal temperature known for *P. lewyana* and below the temperatures in nesting beaches. Finally, we monitored hatchlings growth under AAFUVER captive conditions, and found that hatchlings duplicated their body mass during the first three months of age. Egg weight was strongly associated to body weight at hatching, however this association is lost by the third month of age. We strongly encourage supporting this community-based conservation program, and the protection of the Claro Cocornásur River as an important nesting and growth habitat for the conservation of *P. lewyana*.

Keywords: growth, incubation temperatures, nesting.

RESUMEN

La tortuga del Río Magdalena, *Podocnemis lewyana*, es una tortuga categorizada como amenazada y además endémica colombiana. Dentro de la información más necesaria para entender el estado de conservación de estas especies está el identificar, monitorear y proteger sus sitios de reproducción y crecimiento. En este estudio se reporta, por primera vez, el potencial reproductivo y las principales playas de anidación de *P. lewyana* en el río Claro Cocornásur, un tributario del río Magdalena. Un trayecto de 8 km del río que albergaba 14 playas arenosas fueron monitoreados sistemáticamente durante dos estaciones de anidación en un año. Durante este tiempo se registraron 47 nidos, 957 huevos y dos playas de mayor anidación: Alto Bonito

con el 51 %, y Bélgica con el 28,3 % de dicha producción anual. AAFUVER, una organización de la comunidad local, ha liderado un programa de reforzamiento poblacional para disminuir la mortalidad de los huevos incubados *in-situ*. AAFUVER colecta e incuba los huevos *ex-situ*, cría los neonatos durante uno a cinco meses, y los libera en el río de origen. Para entender los efectos potenciales de esta manipulación de los huevos las temperaturas de incubación *in-situ* y *ex-situ* fueron monitoreadas y comparadas. Se encontró que las temperaturas *ex-situ* son inferiores a la temperatura pivotal de *P. lewyana* y a las temperaturas en las playas de anidación. Finalmente, se reporta el crecimiento corporal de los tortuguillos dadas las condiciones de cautiverio de AAFUVER. Se encontró una fuerte asociación entre el peso del huevo y el peso de los neonatos a los siete días de edad, sin embargo esta asociación se perdió a los tres meses de edad. Nosotros enfatizamos en la importancia de apoyar este programa de conservación liderado por la comunidad local, y la protección del Río Claro Cocorná Sur como un hábitat importante de anidación y crecimiento de *P. lewyana*.

Palabras clave: anidación, crecimiento, temperaturas de incubación.

INTRODUCTION

The Magdalena River Turtle (*Podocnemis lewyana*) is an endemic turtle of the Magdalena, Sinú and San Jorge rivers and their tributaries in Colombia. In addition to its restricted distribution, this species faces high mortality of eggs and adults due to animal and human predation and habitat alteration associated with artificial manipulations of rivers by hydroelectric dams, river beach mining and forest destruction to grow pasture for cattle (Vargas-Ramírez *et al.*, 2007; Gallego-García and Castaño-Mora, 2008; Páez *et al.*, 2012). These threats have driven this species to be categorized as Endangered at the national and international level (Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group, 1996; Castaño-Mora, 2002). Other authors however consider its conservation status is even worse, and have suggested listing it as Critically Endangered. The species *P. lewyana* has been reviewed recently (Páez *et al.*, 2009b, Páez *et al.*, 2012) and of particular interest for conservation actions are those studies providing information on the status of natural populations throughout its distributional range for conservation actions. During the last decade several researchers have studied the reproductive ecology and conservation status of populations of *P. lewyana* in different rivers across its range. For example, a population of *P. lewyana* inhabiting the Prado River in Tolima, a tributary of the Magdalena River was monitored as part of an initiative to create a community-based conservation program (Vargas-Ramírez *et al.*, 2007). As part of this program nesting beaches were monitored for two months in 2007, but in spite of their

search efforts the authors were able to locate only two nests, perhaps due to the lack of native guides trained to find nests (Vargas-Ramírez *et al.*, 2007). The following year the Sinú River was monitored in search of nesting beaches and individuals to estimate the species home range and population structure (Gallego-García and Castaño-Mora, 2008). Five nesting beaches were reported in the mid and low basin of the Sinú River. Though nesting reports were based on anecdotal information, and in spite of the high egg predation by fishermen, authors were able to locate two clutches and report their size and egg morphometry. At the same time, the distribution and abundance of *P. lewyana* in the Magdalena River drainage was also studied (Restrepo *et al.*, 2008). Out of the 18 different sites that were visited by the authors, the Chicagua River was found to be the most important for the species, and was classified as exhibiting a high abundance of turtles. Four more sites were reported exhibiting an intermediate abundance, and 13 other sites a low abundance. Among these sites, the Cocorná River was also visited and the authors confirmed the turtle's presence by means of carcasses of depredated turtles, but no live animals were observed. Using anecdotal information from locals the turtle abundance was classified as low (Restrepo *et al.*, 2008, Páez *et al.*, 2009b).

Currently there is a community-based program for the conservation of *P. lewyana* in the Claro Cocorná Sur River, a program led by the non-governmental organization Asociación Ambientalista Futuro Verde (AAFUVER). This program started in 2010 and works in the lower reaches of the Claro Cocorná Sur River, specifically in the River segment between the municipalities of Puerto Nare and Puerto Triunfo, Department of Antioquia (Romero, 2011). Sponsored by the local authorities, this program has included training of the AAFUVER members on fieldwork techniques, and the implementation of a conservation center in the town of Estación Cocorná. The project has now moved on to monitor the nesting activity of *P. lewyana* of neighboring river beaches. Because egg mortality in the river beaches is high due to human and animal predation and river flooding, AAFUVER built a small incubation room to incubate eggs *ex-situ*. After hatching the neonates are maintained in an outdoor pool for one to five months until they are released in wetlands of the same river (Romero, 2011). This headstarting program is expected to increase egg survival and in this way to contribute to the conservation of the local population at this site as has been shown in the congeneric *Podocnemis expansa* (Hernández and Espin, 2006). Data from this monitoring during the last two years have been collected in spite of economic and logistic difficulties; they have not been analyzed previously and thus are included in this study. The present study had three objectives. First, we quantified the reproductive output of *P. lewyana* at this site by carrying out a systematic monitoring of nesting activity during one year. This data is complemented with unpublished data previously

collected by AAFUVER. We specifically recorded the number of nests per beach, clutch size, and egg morphometry. To understand how reproduction varies across space and time we compared our findings across nesting beaches and seasons. Second, given the effects of incubation temperature on sex, size, and growth of neonates (Páez *et al.*, 2009a) we compared the incubation temperatures *in-situ* in river beaches with the *ex-situ* temperatures at the AAFUVER incubation room. Finally, we estimated hatchlings body growth given maternal effects and the captive conditions during the first three months at the AAFUVER station before being released into the river.

MATERIALS AND METHODS

Study area

This study was carried out in the lowland of the Claro Cocornásur River that runs by the town of Estación Cocorná (6°2'8"N, 74°38'20"W) in the municipality of Puerto Triunfo, Department of Antioquia, Colombia. We monitored 14 sand beaches during two nesting seasons: from 10 December 2012 to 12 January 2013 (herein called the "December season"), and from 13 June to 19 July 2013 ("June season"). These beaches were chosen because AAFUVER had reported them as the main nesting sites of *P. lewyana* in this transect of the river (Romero, 2011).

Egg collection

Boat trips were made every morning starting at approximately 5:00 am. All beaches were inspected for fresh turtle tracks left on the sand the night before with the guidance of AAFUVER members native to this region. Once a nest was found, eggs were recovered with special care to avoid egg rotation and transported to the incubation room within 2-6 hours of collection. Eggs were marked with a pencil to individually identify them, weighed (g), and length and width measured (mm). Most of the clutches from the December season, plus all clutches from the June season were incubated following the AAFUVER protocol as part of their headstarting program. Ten clutches from the December season were incubated as part of another study published elsewhere.

This study is part of the population monitoring study carried out between AAFUVER, and the environmental authorities CORNARE and CORANTIOQUIA, thus it does not require a research permit.

Nest location and incubation temperatures

All natural nests on river beaches were characterized in terms of their depth and relative location with respect to the water and vegetation. This is particularly important because this river is highly dynamic and nesting beaches can be flooded after a strong rain. Likewise, to compare the incubation temperatures *in-situ* (in the natural nests in the river nesting beaches) and *ex-situ* (in the incubation room at AAFUVER center) we recorded temperatures in both

locations. *In-situ* incubation temperatures were recorded by inserting packs of three HOBO dataloggers within a zip-lock bag. To facilitate its location, the bag was tied with a rope to the trunk of a nearby plant, or to a wooden stick buried in the sand. Dataloggers were set to record the temperature every one hour and were left buried for 60 days. We buried dataloggers in 16 emptied nests at four different beaches: Alto Bonito (n = 8), Bélgica (n = 4 packs), Normandía (n = 3), and Costa Rica (n = 1). *Ex-situ* incubation temperatures were recorded by inserting one datalogger in ten different incubation containers, each with a different clutch. These clutches came from the same beaches: Alto Bonito (n = 6), Bélgica (n = 3) and Normandía (n = 1). The incubation protocol was the same used regularly by AAFUVER as described below.

AAFUVER headstarting program

Podocnemis lewyana nests two times during the year in this region: near the middle and at the end of the year. AAFUVER has been slowly improving their protocol since they started in 2010. Specifically they have monitored the nesting activity during these seasons: December 2010, June 2011, December 2011, and June 2012. Monitoring results from December 2012 and June 2013 were a joint effort with AAFUVER. Because foxes and humans heavily depredate turtle eggs when they are left *in-situ* in the nesting river beaches, all eggs were transported and incubated at the AAFUVER station.

The incubation room (2 x 3 m) is equipped with shelves, where eggs are incubated in plastic containers fully buried in river sand collected from where the nest was collected. The room temperature varies with natural day and night cycles and additional heat is provided by a light bulb for the entire room. The containers are covered with plastic tied with rubber to maintain humidity. After hatching, neonates are left within the incubation containers a few more days until they completely emerge from the eggshell and the remaining yolk is internalized. Afterwards hatchlings are moved to an outdoor pool for one-five months. The pool is made of cement, 3 m long x 2 m wide x 1 m deep, with 40 cm of water column, and is provided with a continuous river water (dechlorinated) flow-through system. To avoid bird predation, the pool is covered with a polyethylene mesh. Live "buchón de agua" (*Eichornia crassipens*) are provided to serve as perches and hiding places for hatchlings. In addition, turtles are fed daily with dinder or "árbol de mora" (*Chlorophora tinctoria*), "lenteja de agua" (*Lemma minor*), and "plátanotopocho" (*Musa paradisiaca*). To monitor the effect of these captivity conditions, we recorded the body growth of hatchlings before being released. The neonates hatched between 3 February and 7 March 2013, and they were weighed at seven days and three to 3.5 months of age. To monitor individual growth, hatchlings were tagged by attaching colored beads to the marginal scutes of their carapace

(Galbraith and Brooks, 1984), a technique that has been useful in monitoring individual growth in turtles for several months (Ceballos y Valenzuela, 2011).

RESULTS

Nesting beaches

A total of 47 clutches of *Podocnemis lewyana* were recorded along the Claro CocornáSur River in one year. Of this total, 21 clutches were laid during the December 2012 season and 26 nests during the June 2013 season. We missed egg collection from nine nests at the beginning of the June season, and thus we were able to record clutch size in only 17 nests. Including clutches with size data in both seasons ($n = 38$), we estimated a yearly production of 957 eggs at this site (Table 1). Out of the 14 river beaches that we monitored in a transect of 8 km of this river, we observed that turtles nested on only seven beaches, and of these, turtles heavily used two beaches. The main nesting site was Alto Bonito beach, with a yearly production of 24 clutches containing 488 eggs (51 %). The other main nesting site was Bélgica beach with 13 clutches containing 271 eggs (28.3 %) (Fig. 1). Linear length of nesting beaches varied from approximately 170 to 1.312 m. Nesting beaches were highly dynamic, with a new beach, Buenos Aires, that appeared towards the end of the December season.

The distance of clutches respect to the water and vegetation was measured and we found that clutches ($n = 17$) were laid

closer to the vegetation than to the river water during the June season. Clutches were 25.4 m on average away from the vegetation (range 6.8 to 60 m) and 54.2 m on average from the river (range 15 to 96 m). Nest depth was also recorded during the June season. On average, nests were 16.8 cm deep with a wide variability that ranged from 13 to 27 cm deep. Clutch size was also highly variable during the June season, ranging from 15 to 30 eggs, however we found no relationship between nest depth and clutch size ($p = 0.4272$, $n = 17$). We suspect that nest width may have correlated with clutch size; however we did not measure nest width and cannot confirm this idea.

Number of clutches and clutch size variability by season

Counting both nesting seasons, and excluding the nine clutches that we missed in June, we found average clutch size was 21.6 eggs ($n = 38$), egg weight was 26.3 g, and egg size was 42.4 x 32.5 mm (Table 2).

To better understand the reproductive cycle of *P. lewyana*, we tested for a difference between the two nesting seasons in terms of clutch size and egg size. In absolute numbers, the number of clutches and the number of eggs per clutch were higher in the middle of the year, the June season; nevertheless we found no statistical difference between the number of eggs laid each season ($p = 0.411$). Interestingly however, eggs laid at the end of the year were heavier ($p < 0.0001$) and wider ($p < 0.0001$) than eggs laid in the middle of the

Table 1. Number of nests of *Podocnemis lewyana* recorded during two nesting seasons in the Claro CocornáSur River, Antioquia, Colombia.

Nesting beach	Beach length (m)	Dec. 2012 season		June 2013 season		Yearly production	
		Clutches	Eggs	Clutches	Eggs	Clutches	Eggs
Alto Bonito	453	11	227	13	261	24	488
Bélgica	821	5	108	8	163	13	271
Buenos Aires	100*	1	19	0	0	1	19
Costa Rica	1312	1	24	1	27	2	51
Florencia I	303	0	0	0	0	0	0
Florencia II	378	0	0	0	0	0	0
Florencia III	665	1	25	0	0	1	25
Florencia IV	324	0	0	0	0	0	0
Florencia V	279	0	0	0	0	0	0
La Culebra	N/A	0	0	0	0	0	0
Normandía I	237	1	21	0	0	1	21
Normandía II	385	1	26	4	56	4	82
Porvenir	177	0	0	0	0	0	0
San Fernando	170	0	0	0	0	0	0
Total		21	450	26	507	47	957

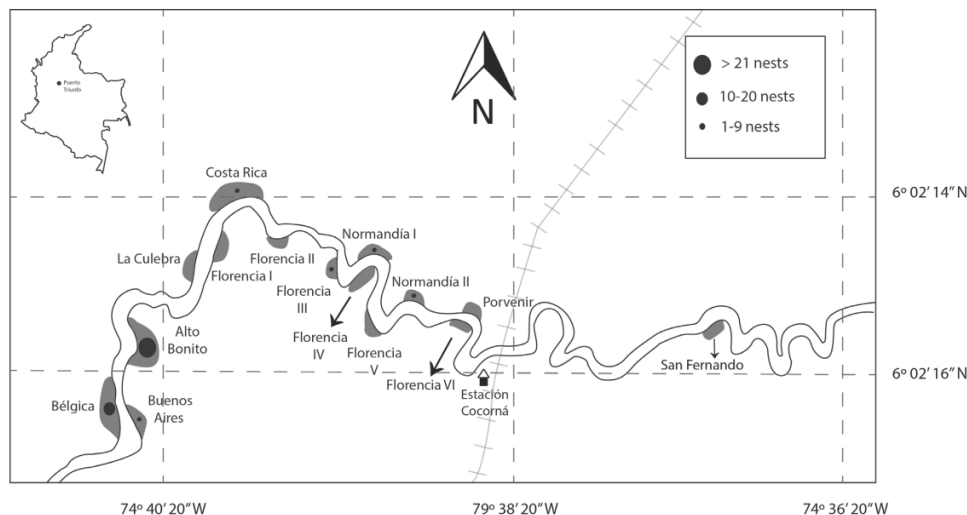


Figure 1. Map of the Claro Cocornásur River, Antioquia, showing the nesting activity of *Podocnemis lewyana* on the 14 river beaches monitored during one year in this study.

Table 2. Clutch size and egg morphometry from clutches of *Podocnemis lewyana* monitored during two nesting seasons in the Río Claro Cocornásur, Antioquia, Colombia. Bold letters indicate the nesting season with heavier and wider eggs.

	December 2012–January 2013	June–July 2013	Both seasons	Are nesting seasons different?
Clutch size				
n	21	17*	38	
Average	21.2	22.0	21.6	No ($p = 0.7453$)
Min	11	15	11	
Max	27	30	30	
Egg weight				
n	445	373	818	
Average	27.0	25.5	26.3	Yes ($p < 0.0001$)
Min	20.0	18.0	18.0	
Max	38.0	31.3	38.0	
Egg length				
N	445	374	819	
Average	42.5	42.2	42.4	No ($p = 0.0865$)
Min	33.5	32.62	32.6	
Max	49.6	47.9	49.6	
Egg width				
n	445	374	819	
Average	32.9	32.1	32.5	Yes ($p < 0.0001$)
Min	29.4	21.1	21.1	
Max	38.5	36.6	38.5	

* The total number of clutches in the June season was 26 however we missed egg morphometry data at the beginning of the June season for logistic reasons and thus herein we report data from only 17 nests.

year (Table 1). Egg morphometry was not been recorded in previous seasons, thus we do not know if these differences are consistent through time.

Incubation temperatures

Out of the 16 packs of dataloggers buried in four nesting beaches for two months, we recovered the dataloggers in only seven sites (empty nests): three in Normandia, three in Bélgica and one in Costa Rica. Unfortunately we lost all dataloggers buried in Alto Bonito beach, and because the ropes used to fix them to nearby trees were found sharply cut, we suspect they were stolen. Average sand temperatures were as follows: Normandia: 34.1°C (st. dev. = 4.2°C), Bélgica: 32.8°C (st. dev. = 2.5°C), Costa Rica: 33.7°C (st. dev. = 2.0°C). On the other hand, the temperatures maintained by AAFUVER in their incubation room were lower (average = 31.81°C) and less variable (st. dev. = 1.83°C) than those of natural beaches.

Hatchlings growth

We followed individual body growth of a sample of hatchlings. Their egg weight was 27.2 g (st. dev. = 3.5, n = 175). Body weight at seven days of age was lower, averaging 20.1 g (st. dev. = 2.6, n = 175), but at three months of age their body weight doubled, averaging 40.6 g (st. dev. = 7.8, n = 159). We observed a positive relationship between egg

weight and hatchling body weight ($p < 0.0001$, $R^2 = 0.78$). Nevertheless, three months later, this relationship was diluted as its variance increased considerably ($R^2 = 0.22$) making this association weak (Fig. 2).

DISCUSSION

Reproductive output

We monitored two nesting seasons of *P. lewyana* at the Rio Claro CocornáSur River and were able to document production of 957 eggs from 47 nests, with an average clutch of 21.6 eggs at this site. The hatching success given the incubation conditions of AAFUVER in recent years has been high: 93 % (n = 65) in 2010, 97.9% (n = 285) in 2010-2011 (Romero, 2011), and 84 % (n = 432) in December 2012. Hatching success data from June 2013 was not recorded. Thus, assuming an average hatching success from all these years of 91.6 %, applied to the two seasons that were systematically monitored (n = 957 eggs), we estimate that at least 877 *P. lewyana* neonates were produced at this site during that year. This number however may be even higher if we missed nests at the monitored or nearby river beaches. This river then provides an important nesting habitat, and we urge its preservation for the conservation of this endangered species.

In addition to nesting beaches, it is important to mention that this river also provides refuge for juveniles in its associated

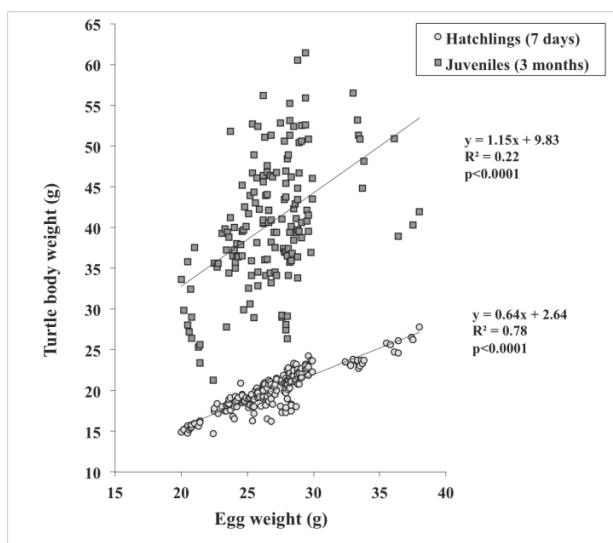


Figure 2. Regression of egg weight on turtle body weight of *Podocnemis lewyana* at two different ages monitored in this study.

swamps. AAFUVER and the regional environmental authorities, CORNARE and CORANTIOQUIA, recently started a capture-recapture program aimed at estimating population size at this site. The first monitoring was carried out between 7 July and 4 August 2011 with 72 turtles captured (42 males, 19 females and 11 juveniles) in four swamps: Paticos, La Culebra, La Posada, and Buenos Aires (García-Hernández, 2011). The second monitoring was carried out between Dec 30 2012 and 23 Feb 2013, with 109 turtles captured (44 males, 29 females and 36 juveniles) in the same four swamps (García-Hernández, 2013). Most (80.9 %) of these individuals, in the second monitoring, were under 20 cm of linear carapace length. Considering the total area of these four swamps is 17.68 ha (Londoño *et al.*, 2009), the population density counted so far varies between 4.1 and 6.3 juvenile turtles/ha. The fact that these swamps are shallow areas between 1 and 2.7 m deep (Londoño *et al.*, 2009), and that larger turtles are mainly found in deeper areas above 3 m (Gallego-García and Castaño-Mora, 2008), it explains the high percentage of small turtles found by this capture-recapture studies. One recommendation to improve the AAFUVER conservation program is to encourage capture using different techniques (e.g., traps, nets, diving) in deeper areas of the river in order to include larger turtles in their capture-recapture program.

Nesting seasons and nesting beaches

As in the Sinú, Magdalena and Prado Rivers (Vargas-Ramírez *et al.*, 2007; Gallego-García and Castaño-Mora, 2008; Restrepo *et al.*, 2008), *P. lewyana* has two nesting seasons in the Rio Claro Cocornásur River (this study), December to January and June to July approximately. We found a higher number of nests during the June season; however, egg weight was significantly greater in the December season, and egg

weight has an important association on hatchling growth, thus it is important to keep monitoring and protecting both nesting seasons at this site.

In addition, we found that during the last three years nesting has been concentrated on two river beaches: Alto Bonito and Bélgica beaches (Table 3). These two beaches were not the largest, and cattle were often seen resting or walking on them; however, these livestock do not seem to deter turtles from nesting there. We did not monitored nesting in more distant beaches but it seems important to highlight that these two beaches were the farthest sites from the town of Estación Cocorná, and perhaps turtles prefer these sites because they are less disturbed by human activities.

Incubation temperatures

The average incubation temperature from all nesting beaches monitored in the Claro Cocornásur was calculated as 33.5 °C. This temperature is very close to 33.4°C the pivotal temperature reported for *P. lewyana* (Páez *et al.*, 2009a), and a little above 32.8 °C reported for nesting beaches in the Magdalena River (Páez *et al.*, 2012), and above the 33.2 °C reported for nesting beaches in the Sinú River (Gallego-García and Castaño-Mora, 2008). The effect of natural temperatures on sex ratios is hard to predict because it is not only the average temperature during the middle third of the incubation period that is important, but also the temperature variability that defines the accumulated heat experienced by the embryos (Valenzuela, 2001). In addition, the information available on the effect of temperature on sex determination of *P. lewyana* was obtained using a population in the Mompox Depression of the Magdalena River (Páez *et al.*, 2009a) and pivotal temperatures may vary with genetics, the environment, and even geographic trends (Ewert *et al.*, 2004). However, the incubation temperature

Table 3. Number and percentages of nests of *Podocnemis lewyana* in the Claro Cocornásur River by nesting beach. Bold letters indicate the main nesting beaches through time.

Nesting beaches	2010		2011		2012		2013
	June (n = 3)	Dec (n = 14)	June (n = 25)	Dec (n = 7)	June (n = 13)	Dec (n = 21)	June (n = 26)
Alto Bonito		21 %	28 %	14 %	54 %	52 %	50 %
Bélgica		57 %	32 %	57 %	23 %	24 %	31 %
Buenos Aires						5 %	
Costa Rica		7 %	8 %			5 %	4 %
Florencia	67 %	14 %	8 %		8 %	5 %	
La Culebra			12 %				
Normandía			8 %	29 %	15 %	10 %	15 %
Porvenir			4 %				
San Fernando	33 %						
Total	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

achieved with a light bulb at the AAFUVER incubation room was much lower (31.8 °C) than in natural beaches of the Claro Cocorná Sur River. Another recommendation to improve the AAFUVER headstarting program is to increase their *ex-situ* incubation temperature by 1.5 to 2 °C to match temperatures under natural conditions.

Hatchlings growth

The positive relationship between egg weight and initial hatchling size and one month later in *P. lewyana* had been documented already (Páez *et al.*, 2009a). Here we find this association is lost by the third month of age; it is likely that other environmental factors such as available food resources (Ceballos *et al.*, 2014) are also influencing body weight. Further studies on the effect of different types and amount of food offered in captivity are encouraged to foster hatchlings growth.

CONCLUSIONS

We highlight the Claro Cocorná Sur River as a very important site for the conservation of *P. lewyana* because it provides nesting and growing habitat for this population. We emphasize the importance of community-based programs to conserve native endangered species, as it is the local communities that are living with them every day. The institutional support from the environmental authorities has been vital to empower the community towards a truly long-term conservation goal.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Alvaro Díaz-Pineda, Aurelio Delgado and Alvaro Díaz-Romero for their logistic help and sharing their expertise to locate nests in the field, A. Gómez for designing the map in Fig. 1. Funding was provided by the Comité para el Desarrollo de la Investigación, CODI, and the 2013-2014 Sustainability Program of the University of Antioquia. This work was carried out under protocol approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the University of Antioquia in Act 76, and research permit N°134-0067 issued by the local government authority CORNARE.

REFERENCES

Castaño-Mora OV. Libro Rojo de Reptiles de Colombia. Bogotá, D.C., Colombia: Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional, Ministerio del Medio Ambiente, Conservación Internacional-Colombia; Santa Fe de Bogotá; 2002. p. 160.

Ceballos CP, Hernandez P OE, Valenzuela N. Divergent Sex-specific Plasticity in Long-lived Vertebrates with Contrasting Sexual Dimorphism. *Evol Biol.* 2014;41(1):81-98. DOI: 10.1007/s11692-013-9249-0.

Ewert MA, Etchberger CR, Nelson CE. Turtle sex-determining modes and TSD patterns, and some TSD pattern correlates in temperature-dependent sex determination in vertebrates. In: Valenzuela N, Lance VA,

editors. Temperature-Dependent Sex Determination in Vertebrates. Smithsonian Books. Washington, DC; 2004. p. 21-32.

Gallego-García N, Castaño-Mora OV. Ecology and status of the Magdalena River turtle, *Podocnemis lewyana*, a Colombian endemic. *Chelonian Conserv Biol.* 2008;7(1):37-44.

García-Hernández CJ. Primer monitoreo: Estructura poblacional de la tortuga de río (*Podocnemis lewyana*) en la Cuenca Baja del río Claro Cocorná Sur, corregimiento de Estación Cocorná, municipio de Puerto Triunfo, Antioquia. Reporte. Convenio interinstitucional CORNARE CORANTIOQUIA y AAFUVER, 2011. 18 p.

Hernández O, Espin R. Efectos del reforzamiento sobre la población de tortuga Arrau (*Podocnemis expansa*) en el Orinoco Medio, Venezuela. *Interciencia.* 2006;31(6):424-430.

Londoño G, Hoyos-Marín S, Lopera-Henao A, López F. Los humedales aledaños al río Claro Cocorná Sur. CORNARE, CORANTIOQUIA, Asociación Ambientalista Futuro Verde, y Asociación de Pescadores y Medio Ambiente. Antioquia; 2009. p. 22.

Páez VP, Correa JC, Cano AM, Bock BC. A comparison of maternal and temperature effects on sex, size, and growth of hatchlings of the Magdalena river turtle (*Podocnemis lewyana*) incubated under field and controlled laboratory conditions. *Copeia.* 2009;4:698-704. DOI: 10.1643/ce-08-149.

Páez VP, Restrepo A, Vargas-Ramírez M, Bock BC. *Podocnemis lewyana* Duméril 1852-Magdalena River Turtle. *Chelon Res Monogr.* 2009;5:024.1-024.6.

Páez VP, Restrepo A, Vargas-Ramírez M, Bock BC, Gallego-García N. *Podocnemis lewyana*. In: Páez VP, Morales-Betancourt MA, Lasso CA, Castaño-Mora OV, Bock BC, editors. V Biología y conservación de las tortugas continentales de Colombia. Bogotá, D. C., Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH); 2012. p. 375-381.

Restrepo A, Páez V, Lopez C, Bock B. Distribution and Status of *Podocnemis lewyana* in the Magdalena River Drainage of Colombia. *Chelonian Conserv Biol.* 2008;7:45-51.

Romero I. Proyecto de Conservación de la tortuga de río *Podocnemis lewyana* en la Cuenca baja del río Claro Cocorná Sur. 2011. p. 40.

Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group. *Podocnemis lewyana*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. Available at URL: <http://www.iucnredlist.org>. Downloaded 22 Nov 2013.

Vargas-Ramírez M, Meza-Fernández N, Castaño-Mora OV. Participatory research towards the conservation of the endangered-endemic river turtle *Podocnemis lewyana* in the upper Magdalena river, Colombia. Final report. Fundación Biodiversa, 2007. 60 p. Available at URL: http://www.fundacionbiodiversa.org/proyectos_tortuga.htm.

Anexo 2. Reglamento de la revista Acta Biológica Colombiana.

ACTA BIOLÓGICA
COLOMBIANA

DESCRIPCIÓN

ACTA BIOLÓGICA COLOMBIANA (ABC) es una publicación Open Access. La revisión, gestión, producción y alojamiento en línea es financiada en su totalidad por la Universidad Nacional de Colombia. Ni autores, ni lectores tienen cargo alguno por publicar o tener acceso a nuestra publicación. La revista se publica cuatrimestralmente y divulga resultados originales e inéditos de investigación básica y aplicada sobre temas biológicos con especial interés en presentar resultados sobre temas del neotrópico. Los manuscritos pueden ser artículos de investigación, artículos de revisión, artículos de reflexión o notas breves. ABC, cuenta con Comité científico y editorial compuestos por investigadores de reconocida trayectoria en sus áreas de especialidad.

La primera fase de revisión consiste en verificar que los manuscritos cumplan con las normas de publicación de la revista. En caso positivo, cada manuscrito es asignado a un editor de sección especialista, quien evalúa el mérito científico del manuscrito y determina si puede ser enviado a evaluación por pares académicos. Los revisores conservan el anonimato durante el proceso. Si el artículo es aceptado aparecerá inicialmente en formato pre-impresión en la página web. Posteriormente aparecerá la versión final online (ISSN 1900-1649) y en versión impresa (ISSN 0120-548X).

TIPOS DE ARTÍCULOS

Artículos de revisión. En su mayoría serán solicitadas por invitación del Comité Editorial teniendo en cuenta la experticia de los autores en el tema. Es aquel artículo que consigna el estado actual del conocimiento sobre un tema en particular donde el autor establece su aporte y criterio. El documento Word a doble espacio es máximo de 30 páginas. Debe tener por lo menos 50 referencias bibliográficas relevantes y preferiblemente de la última década.

Artículos de investigación. Son escritos científicos cuyo contenido debe incluir resumen, introducción, materiales y métodos, resultados, discusión, agradecimientos y bibliografía. Se aceptan máximo cinco figuras y/o tablas y máximo 50 citas bibliográficas recientes y relevantes en el tema del artículo.

Artículos de reflexión. Son escritos en los cuales los autores presentan una posición determinada sobre un tema en particular, y basan su argumentación en su trabajo y en literatura de relevancia consultada. Debe tener entre 30-50 referencias bibliográficas.

Notas breves: Son comentarios concisos y críticos que consignan un resultado original de un tema, con máximo cinco páginas. En texto se escribe corrido sin dividirlo en introducción, materiales y métodos, etc. Cuando sea estrictamente necesario, pueden ser incluidas máximo dos figuras o tablas por trabajo. Máximo 30 citas bibliográficas.

DIRECTRICES PARA AUTORES

PREPARACIÓN DE MANUSCRITOS

Los manuscritos enviados a Acta Biológica Colombiana para su posible publicación deben ser inéditos (no sometidos al mismo tiempo a ninguna otra publicación impresa o digital). Los autores son responsables por las opiniones e ideas declaradas en el manuscrito. La precisión de la información en los manuscritos, incluyendo figuras, tablas y citas bibliográficas es responsabilidad completa del autor o de los autores.

Para que el manuscrito sea considerado deberá ser enviado mediante el formato único de sometimiento electrónico y ajustarse a la temática e instrucciones de formato de la revista. El procedimiento de envío se realiza a través de la plataforma OJS de la revista: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/about/submissions#onlineSubmissions>

Formato. El documento se debe presentar en tamaño carta, a doble espacio, con márgenes de 3 cm en los cuatro lados y en letra Times New Roman 12.

Idioma. Los manuscritos se aceptan en español, inglés o portugués, sin embargo, siempre el título, resumen y palabras claves deben presentarse en inglés y español. En caso que el artículo este escrito en portugués, deben aparecer título, resumen y palabras claves en los tres idiomas. Como estrategia para aumentar la difusión y visibilidad de los resultados se sugiere presentar los manuscritos en inglés.

La página inicial constará lo siguiente:

Título. El título debe ser conciso pero informativo y no debe exceder 120 caracteres incluyendo los espacios. Para nombres científicos escriba entre paréntesis la familia taxonómica después del nombre de la especie. No adicione autoría o año de las especies en el título.

Autor (es). El manuscrito en Word no debe presentar dato alguno de los autores para mantener la revisión a ciegas. Los datos de autores serán agregados únicamente en el PASO 3 al realizar el envío online. (Ver en este documento: **PREPARACIÓN ENVÍO ONLINE**).

Resumen. El resumen incluye el objetivo central del trabajo, procedimientos básicos (selección de los sujetos del estudio; métodos de observación y de análisis), hallazgos más importantes (consignando información específica o datos y su significación estadística siempre que sea posible) y conclusiones principales. Deberán destacarse las observaciones y aspectos más novedosos y relevantes del estudio. Tamaño máximo de 250 palabras. Debe aparecer siempre en español e inglés.

Palabras clave. Máximo cinco y usando palabras estándar internacionalmente aceptadas que sirvan para fines de compilación y que no se incluyan en el título del trabajo (nombre común y científico, conceptos, etc.). Deben presentarse siempre en inglés y español y organizadas alfabéticamente.

Se recomienda consultar: <http://decses.bvsalud.org/E/homepagee.htm>

Para palabras en español consultar la base de Scielo

http://decs.bvs.br/E/DocumentosDeCS_e.htm

Para palabras claves en inglés se puede consultar la Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos o afines

(<http://www.nlm.nih.gov/mesh/> <http://regional.bvsalud.org/php/decsws.php>).

Texto.

1. Los títulos de las secciones (RESUMEN, INTRODUCCIÓN, etc.) deben ir centrados con mayúscula sostenida y negrilla. Los subtítulos primarios y secundarios deben ir justificados al margen izquierdo y en negrilla; los subtítulos primarios con mayúscula sostenida y secundarios solo la primera letra en mayúscula.
2. Siempre se definirán los términos estadísticos, abreviaturas y los símbolos. Para las unidades de medida use el sistema métrico decimal, excepto en citas textuales, y no utilice puntos después de ninguna abreviatura como (g, mm, m, km, ha, l, etc.). Cuando no van seguidos de unidades, los números enteros hasta diez se escriben con la palabra (uno, dos, diez) y mayores de diez con números (11, 12, 102). Cuando se utilicen números, éstos deberán ir seguidos de su símbolo y se mantendrá un espacio entre uno y otro (100 m, 50 mL). Para los símbolos o abreviaturas se recomiendan las minúsculas; algunas excepciones son: la K de la unidad Kelvin de temperatura; la A de la unidad de corriente eléctrica, el amperio; M de concentración molar; y la L de litro. Ningún símbolo deberá expresarse como plural; todos los símbolos serán singulares (kg, m, etc.). Para los valores "p" de significancia estadística será utilizada la letra *p* en minúscula e itálica.
3. Si su trabajo incluye coordenadas geográficas se escriben de la siguiente forma abreviada: (4°46' N, y 75°24' W); norte "oeste" se abrevia con W, no con O. Para expresar altitud se utiliza la abreviatura m s. n. m.
4. En manuscritos escritos en español las cifras decimales van separadas por comas y en inglés por punto.
5. **Nombres Científicos:** Los nombres científicos de taxones deberán escribirse en cursiva. Su nomenclatura se conformará de acuerdo con las reglas y recomendaciones del código internacional de nomenclatura pertinente, en su edición más reciente. El autor y año de cada taxón solo aparecen la primera vez que se menciona en el cuerpo del manuscrito.

Los nombres científicos se escribirán completos la primera vez que se utilicen en el texto. Subsecuentemente, el nombre genérico se abreviará, excepto cuando aparezca al principio de una oración.

No utilice ningún tipo especial de letra dentro del texto. Las abreviaturas como sp., sp. nov., spp., no van en itálica. Note que en castellano, la palabra taxón se escribe con tilde (plural, taxones); en latín, los términos correspondientes son taxón y taxa.

6. Cite cada figura y tabla en el texto de acuerdo al orden de aparición y en el siguiente formato: (Fig. 4) o (Figs. 4 y 5) o (Fig. 3A-3F) o (Tabla 1.).

7. Descripciones para nuevas especies. Debe presentarse en el siguiente orden: Nombre de la especie (de acuerdo a lo estipulado en el Código Internacional de Nomenclatura pertinente); Ejemplar tipo (holótipo) con el número de la colección en que está depositado, nombre de la colección lugar exacto. Sitio de colecta o captura (país, departamento/estado/provincia, localidad exacta, latitud, longitud, altitud, fecha, etc.; isótipos, alótipos y parátipos (si los hay) junto con los datos de colecta y de la colección en donde están depositados. Etimología del nombre; datos sobre su distribución y ecología; Comentarios sobre sus afinidades taxonómicas, usos, u otras notas pertinentes.

INTRODUCCIÓN

Debe contener el propósito del trabajo y resumir los fundamentos lógicos para la realización del mismo. Solo se darán las referencias estrictamente oportunas y no incluirá datos o conclusiones del trabajo que se está publicando.

MATERIALES Y MÉTODOS

Identifique con precisión todos los reactivos utilizados y equipos (reseñar el nombre del fabricante y el país entre paréntesis). Describa los procedimientos utilizados con detalle suficiente como para permitir a otros profesionales reproducir la investigación. Incluya las referencias de la metodología y métodos estadísticos. Suministre referencias y breves descripción de los métodos que aunque ya estén publicados no sean muy conocidos; describa los métodos nuevos o los que han sido sustancialmente modificados y sustente las razones para utilizarlos, evaluando sus limitaciones.

Los autores que envíen artículo como revisiones deberán describir de forma resumida y estructurada los métodos empleados para localizar, seleccionar, extraer y sintetizar la información. Cuando corresponda se describirán los métodos estadísticos con detalle suficiente como para permitir a los lectores el acceso a la información original y verificar los resultados. Siempre que sea posible, se cuantificarán y presentarán los hallazgos con indicación apropiada del margen de error o la fiabilidad (como por ejemplo los intervalos de confianza). Evite apoyarse únicamente en las pruebas de hipótesis estadísticas, como el uso de valores "p" puesto que omite información cuantitativa y cualitativa importante. Justifique la elección de los individuos que participan en la investigación, detalle la aleatorización, informe sobre las posibles complicaciones de la intervención, número de observaciones, pérdida de individuos, (tales como las bajas en un ensayo clínico). Siempre que sea posible, las referencias sobre el diseño del estudio y los métodos estadísticos serán de trabajos vigentes, mejor que de los originales donde se describieron por primera vez. Si se han utilizado programas informáticos indique y referencie el origen y permiso de uso.

ÉTICA

Los autores deben ser conscientes de cumplir con las mejores prácticas en ética de la publicación específicamente con respecto a la autoría (por ejemplo, evitar el fantasma o la autoría de invitados), la duplicación del resultados publicados, el plagio, la manipulación de las cifras, esgrimir los conflictos de intereses y seguir las políticas de investigación ética de acuerdo con el Comité de Ética en Publicación (COPE): <http://publicationethics.org/>

Investigación con humanos, animales y plantas

Indique en la sección de Materiales y Métodos si se siguieron las normas éticas cuando se trate de estudios o recolectas que requieran de aprobación por parte de un Comité o Entidad (institucional o regional), encargados de supervisar los proyectos de investigación. No emplee, nombres propios, ni las iniciales, ni el número de historia clínica de pacientes. Cuando se realicen experimentos con animales, se indicará claramente si se han seguido las directrices de la institución o de un consejo de investigación nacional, o se ha tenido en cuenta alguna ley nacional sobre cuidados y usos de animales de laboratorio. De preferencia coloque los datos fecha y número del acta o resoluciones. Los autores deben estar en condiciones de presentar, previa petición, una declaración del comité de ética de la investigación, o de la junta de revisión institucional o de la autoridad correspondiente, con la aprobación de la investigación y el nombre de la institución y los números de permisos debe ser proporcionada en la presentación del manuscrito.

Ejemplo de declaración de aprobación ética: Este estudio se llevó a cabo en estricta conformidad con las recomendaciones de (colocar nombre de la guía seguida). El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad Nacional de Colombia (Número de permiso: 27-2956). Se ha hecho todo lo posible para minimizar el sufrimiento durante el sacrificio de los individuos mediante (descripción procedimientos realizados).

Para manuscritos que incluyan resultados donde se requiere del envío de ejemplares a colecciones biológicas, es requisito indicar los números de colección y datos de los recolectores, indicar los datos del lugar donde se depositaron o consultaron los especímenes o ejemplares (*vouchers*). Para el caso de tejidos congelados depositados en colecciones, así como de secuencias de ADN depositadas en bases de datos, se deberán incluir también los números de acceso. Indicar el número del permiso de recolecta y/o acceso a recursos genéticos del material cuando sea pertinente.

Disponibilidad de datos

Acta Biológica Colombiana requiere que los autores permitan acceso sin restricciones a un mínimo de los datos subyacentes a los hallazgos descritos en el manuscrito completo. La publicación está condicionada al acuerdo de los autores a poner a libre disposición de cualquier material e información que se describen en la publicación que se solicite razonablemente por otros (puesta en común de datos y metadatos, materiales y software).

La revista define como el "conjunto mínimo de datos" en el conjunto de datos utilizados para llegar a las conclusiones extraídas en el manuscrito con los metadatos y métodos relacionados, y todos los datos adicionales necesarios para replicar los hallazgos de los estudios reportados en su totalidad. Descripciones de datos, métodos y resultados básicos del estudio deben ser incluidos dentro del documento principal. ABC no acepta las referencias a los "datos no presentados". Los editores y los revisores pueden requerir tipos de datos particulares para determinados artículos. Los autores que tienen conjuntos de datos demasiado grandes para compartir a través de repositorios o archivos cargados deben comunicarse con la revista relevante para el consejo editorial.

Al someter un manuscrito en línea, los autores deberán presentar una declaración de disponibilidad de datos que describe el cumplimiento de las políticas de ABC. Si el artículo es aceptado para su publicación, la declaración de disponibilidad de los datos será publicada como parte del artículo final. La negativa a compartir los datos y metadatos y procedimientos de acuerdo con esta política relacionada será motivo de rechazo.

Si un nuevo software o un nuevo algoritmo es fundamental para un documento aceptado en Acta Biológica Colombiana, los autores deben confirmar que el software se ajuste a la definición de código abierto y hayan depositado los elementos en un archivo de software libre, y que se incluye en la presentación como información de apoyo.

RESULTADOS

Se presentarán en un orden lógico y se destacarán o resumirán solo las observaciones relevantes. La información contenida en el texto no debe estar repetida en tablas y figuras.

DISCUSIÓN

Se destacarán los aspectos nuevos y relevantes del estudio. Hay que evitar repetir de forma detallada información u otro material ya facilitado en las secciones Introducción o Resultados. Se establecerán nuevas hipótesis cuando estén claramente justificadas. Cuando sea conveniente se incluirán recomendaciones con referencia al tema investigado.

CONCLUSIONES

Debe aparecer mínimo un párrafo con las conclusiones y se vincularán a los objetivos del estudio y se evitará realizar afirmaciones no cualificadas y que no estén plenamente respaldadas por los datos. Evite colocarla enumeradas o en frases sueltas.

AGRADECIMIENTOS

Mencione las fuentes de financiación de los proyectos de investigación y/o apoyos recibidos para la realización del estudio (becas, equipos, reactivos, etc.). Puede nombrarse a aquellas personas que hayan prestado su ayuda intelectual al trabajo pero cuyas contribuciones no justifiquen la autoría y se describirá la contribución llevada a cabo, por ejemplo, "asesoría científica", "revisión crítica del proyecto de investigación", "recolección de datos".

Conflicto de Intereses

Acta Biológica Colombiana se compromete a garantizar que la presentación de la investigación este libre de sesgos tanto como le sea posible observar. La revista y sus editores deben tomar en cuenta todos los intereses que compiten durante el proceso de revisión y asegurar que cualquier asunto relevante se declare en el artículo publicado.

La revista define un conflicto de interés como cualquier asunto que interfiera o razonablemente se podría percibir como una interferencia, en la presentación completa y objetiva, la revisión por pares, toma de decisiones editoriales, o la publicación de artículos de investigación presentados a la revista. Los conflicto de intereses pueden ser de naturaleza financiera y no financiera, profesional o personal, y pueden surgir en relación con una organización u otra persona.

Por lo tanto, Acta Biológica Colombiana tiene los siguientes requisitos:

Todos los involucrados en la autoría, financiación, revisión y la toma de decisiones de redacción de los artículos presentados, o los lectores que quieran comentar sobre los artículos publicados, deben declarar cualquier conflicto de interés pertinente.

1. Los autores deben declarar todos los intereses en conflicto pertinentes para su consideración durante el proceso de revisión.
2. Los editores y los revisores deben declarar sus propios conflictos de intereses y si es necesario descalificarse a sí mismos de la participación en la evaluación de un manuscrito.
3. Cualquier lector que comenta los trabajos publicados en Acta Biológica Colombiana debe declarar sus conflictos de intereses en el momento de la publicación de sus comentarios y/o calificación de los mismos.

No se publica ningún artículo enviado a Acta Biológica Colombiana hasta que la declaración de intereses en conflicto se ha presentado para todos los autores. Los editores pueden solicitar una aclaración sobre las declaraciones. El papel de todas las fuentes de financiación en el trabajo debe ser descrito y los autores deben declarar explícitamente si el donante se involucró en: diseño del estudio, recolección, análisis e interpretación de datos, redacción del documento, y/o la decisión de presentar para su publicación. Si el donante estaba involucrado, el papel/contribución debe ser descrito de manera explícita.

La revista ABC puede optar por no publicar un artículo si considera que los intereses en conflicto declarados por los autores o financiadores podrían haber puesto en peligro la objetividad o la validez de la investigación, análisis o interpretaciones en el papel. Acta Biológica Colombiana no publica artículos de investigación si los editores son conscientes de existencia de conflicto de interés que podrían introducir un sesgo o una percepción razonable de imparcialidad. La no declaración de conflicto de intereses puede resultar en el rechazo inmediato del manuscrito. Si un interés en conflicto sale a la luz después de la publicación, la revista ABC emitirá una corrección formal o retracción, según el caso.

REFERENCIAS

Utilice las citas estrictamente necesarias. Antes de enviar el manuscrito **por favor revise que todas las citas que aparecen en el texto concuerden con las presentadas en esta sección y que se encuentren correctamente escritas en todo el manuscrito.**

Es conveniente evitar citar como referencia los resúmenes presentados en congresos u otras reuniones. Las alusiones a trabajos admitidos para su publicación pero aún no publicados deberán aparecer como "En prensa" indicando el nombre de la revista; los autores deberán obtener permiso escrito para citar estos trabajos así como tener constancia de que están admitidos para su publicación. Cuando sea estrictamente necesario la información no publicada deberá aparecer como "observaciones no publicadas" y siempre con consentimiento escrito por parte de los responsables de la fuente de información.

En la medida de lo posible, se evitará utilizar expresiones como "comunicación personal", a menos que lo citado suministre información esencial que no se pueda obtener de fuentes

publicadas, en cuyo caso el nombre de la persona y la fecha en que se efectuó la comunicación deberán constar entre paréntesis en el texto.

Las citas en el texto se escriben así:

Apellido e iniciales del nombre de todos los autores. Ordene la bibliografía alfabéticamente, comenzando por el apellido del primer autor.

Un autor: Lozano (1995) o (Lozano, 1995)

Dos autores: Lozano y Barrera (1994) o (Lozano y Barrera, 1994). Para conectar los apellidos en caso de dos autores, use para artículos en español “y” y en inglés “and”, no debe utilizarse el símbolo “&”.

Más de dos autores: Lozano *et al.*, (1993) o (Lozano *et al.*, 1993). Colocar solo apellidos del primer autor, seguido por “et al” (usar itálica para *et al.*).

Los artículos aceptados pero aún no publicados:

Jones y Smith (en prensa) o (Jones y Smith, en prensa).

Cuando se colocan varias citas para una misma idea debe realizarse en orden cronológico, y cada una de las citas separadas por punto y coma. Cuando se trata de varias referencias en el texto se deben citar en orden cronológico (de la más antigua a la más reciente).

EJEMPLO:

(Clement y Grant, 1990a; Clement y Grant, 1990b; Wang y Morales, 2007; Wang y Morales, 2009; Mena-Segovia *et al.*, 2009; Barroso-Chinea *et al.*, 2011).

FORMATO DE REFERENCIAS

Las Referencias deben ser organizadas alfabéticamente de acuerdo con el primer apellido del primer autor y en orden cronológico. Se debe anotar el apellido y las iniciales del nombre de todos los autores separados por coma (verifique que sean idénticos y en el mismo orden, tal cual aparecen en la publicación original). Seguido del título, la revista (abreviada sin puntos), el año;volumen(número o issue);páginas. (SIN ESPACIOS).

Si una publicación cuenta con un identificador digital de objeto (DOI, del inglés digital object identifier), se debe incluir el respectivo DOI en la referencia.

Ejemplos:

-Menos de seis autores: se incluyen todos los autores.

NILSSON S, ARUP V, BARANOWSKI R, EKMONS S. Tree-Dependent Lichens and Beetles as Indicators in Conservation Forest. *Conserv Biol.* 1994;9(5):1208-1215.

-Más de seis autores: incluir hasta los seis primeros autores y a continuación escribir *et al.* Se deberán escribir en abreviatura los títulos de las revistas según el estilo empleado en NCBI-

Journals: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=journals> También se encuentran disponibles abreviaturas de títulos de revistas científicas en: ISI Journal Title Abbreviations, Web of Science Help, Journal Title Abbreviations Caltech Library.

EJEMPLOS:

ACTA BOTANICA MEXICANA abreviatura Acta Bot Mex. (sin puntos, solo al final)

JOURNAL OF TROPICAL ECOLOGY abreviatura J Trop Ecol.

JOURNAL OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY abreviatura J Am Oil Chem Soc.

Libros y otras monografías

Autores de libros

DARNELL J, LODISH H, BALTIMORE D. Biología celular y molecular. 5 ed. Barcelona: Editorial Labor S.A.; 1988. p. 255-256

Nota. **Colocar el número exacto de las páginas consultadas.** En caso consulta de un libro completo indicar el número total de páginas.

Editor(es), compilador(es) como autores

PANKBURST C, DOUBE BM, GUPTA VV, editores. Biological Indicators or Soil Health. New York: CAB Internacional; 1997. p. 14-18

Organización como autor y editor

FUNDACIÓN NATURA. Plan integral para la conservación biológica y el desarrollo sostenible en el municipio de Encino, Santander. Encino: Fundación Natura, Alcaldía Municipal de Encino; 2000. p. 26-29

Autores de capítulo de libro

JONES C, MCSHEA WJ, CONROY MJ, KUNZ TH. Capturing Mammals. En: Wilson DE, Cole FR, Nichols JD, Rudran R, Foster MS, editores. Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Mammals. Washington and London: Smithsonian Institution Press; 1996. p. 53-78.

Tesis doctoral (o similar)

BECERRA MT. Influencia del disturbio antrópico sobre las comunidades de pequeños mamíferos de bosque seco tropical (tesis de maestría). Bogotá: Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia; 1999. p. 78-96

Diccionarios y obras de consulta similares

Stedman's Medical Dictionary. 26th ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1995. Apraxia; p. 119-20.

Mapas

Zonas de vida o formaciones vegetales de Colombia, [mapa de vegetación]. Instituto Geográfico Agustín Codazzi, Subdirección Agrológica; 1977.

Material no publicado

En prensa

LESHNER AI. Molecular Mechanisms of Cocaine Addiction. N Engl J Med. En prensa. 2014.

Material Informático

Artículo de revista en formato electrónico

MORSE SS. Factors in the Emergence of Infectious Diseases. Emerg Infect Dis [serial online] 1995 Jan- Mar. Disponible en: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>. Citado 5 Jun 1996.

Archivos de ordenador

Hemodynamics III: The Ups and Downs of Hemodynamics [programa de ordenador]. Versión 2.2. Orlando (FL): Computerized Educational Systems; 1993.

TABLAS Y FIGURAS

Todas las ilustraciones incluyendo fotos, diagramas, mapas y gráficas, se clasifican como figuras. **El número total de figuras y tablas no debe ser superior a cinco (5)**. Deben usarse figuras como alternativa a las tablas; evite redundancia entre tablas, figuras y texto, deben usarse estrictamente las necesarias para explicar el argumento del trabajo. Éstas deben estar al final del manuscrito word y **adicionalmente ser enviadas por separado en cualquiera de los formatos de imagen (.jpg .tiff)**, de excelente calidad, con una resolución mínima de 300 dpi y con un tamaño de 15 -20 cm. Las figuras normales se reducirán a un ancho de 6-12 cm por lo que las rotulaciones deben ser fáciles de leer, incluso después de esta reducción. Para versión online se aceptarán las figuras a color y su publicación no tendrá ningún costo, sin embargo también deben enviarse la versión blanco y negro para el formato impreso. La publicación a color de figuras en la versión impresa será financiada por el/los autor(es). Si ha realizado tablas o figuras en excel, recibimos de preferencia los archivos generados directamente por el excel o PDFs de alta calidad de los mismos. No envíe figuras en power-point.

Títulos y explicaciones detalladas de las figuras se incluirán en las leyendas y no en las propias tablas o figuras. Las leyendas ser lo suficientemente descriptivas.

La rotulación de cada tabla debe ir a la cabeza de la misma; evite opciones con degradación de color, sombreados, exceso de líneas, distintos tipos de fondos y margen en todos los bordes. Las explicaciones y abreviaturas no estándar irán en notas al pie de la tabla o figura. Se identificarán

las medidas estadísticas de dispersión tales como la desviación estándar y el error estándar de la media. Distinga entre títulos de columnas y los datos.

Si se incluyen dibujos o esquemas estos deben ser presentados de manera profesional; no se admite la rotulación a mano alzada o mecanografiada. Las letras, números y símbolos deberán ser claros y uniformes. Las fotografías tomadas a través de un microscopio o estereoscopio deberán tener indicadores internos de escala, la barra de la escala debe estar situada en la esquina inferior derecha de la figura. Los símbolos, flechas, o letras empleados en este tipo de fotografías deberán contrastar claramente con el fondo. La escala interna e identificación del método de tinción empleado en las fotomicrografías deben expresarse en la leyenda de la figura.

Evite figuras pequeñas aisladas: agrupe dibujos o fotografías relacionadas en figuras compuestas rotuladas con letras (Fig. 1a, Fig. 3b, etc.). Si un artículo contiene tablas o figuras reproducidas (así sean del mismo autor), es obligación declarar el origen y presentar permiso para utilizarlas. Es responsabilidad de los autores conseguir el correspondiente permiso.

PREPARACIÓN ENVÍO ONLINE

Por favor al realizar el envío online tenga en cuenta las siguientes recomendaciones:

Comentarios al editor (final PASO 1 en envío online). Enviar nombre y correo electrónico de cinco posibles evaluadores, estos deben haber publicado en los dos años anteriores al menos un artículo en otras revistas indexadas afines a la cobertura temática del manuscrito.

Autor (es). En el PASO 3 al momento de realizar el envío online tenga en cuenta enviar los datos de cada uno de los autores (nombre, apellidos, rango académico más elevado, filiación, ciudad, país y correo electrónico de preferencia institucional). Debe aparecer especificado el nombre y dirección electrónica del autor responsable de correspondencia.

Archivos complementarios. En el PASO 5 durante el envío online se deben adjuntar firmados los siguientes formatos: **authorship statement**, **conflicts of interest statement** y **copyright transfer agreement**, que se encuentran disponibles en la página web de la revista. Las tablas y figuras también deben ser enviadas como archivos complementarios.

ARTÍCULOS ACEPTADOS

El orden de publicación se hará en función de las fechas de recepción y aceptación de cada trabajo. Cuando el manuscrito es aceptado para publicación los autores son notificados y reciben los comentarios de los revisores y del correspondiente editor de sección, donde se indican y/o sugieren cambios que pueden ser menores o mayores en el manuscrito. La versión corregida debe ser enviada en el formato único de respuesta al editor (disponible en la página web de la revista) en el plazo estipulado por el editor. En la carta de respuesta al editor deben justificarse claramente los motivos por los cuales algunos cambios no son considerados en la

nueva versión del artículo y resaltar los cambios o correcciones que fueron aceptados en la nueva versión, tanto en el documento con control de cambios como en la respuesta al editor. Si la versión corregida no es recibida en la fecha estipulada se considerará como desistimiento y el trabajo será retirado del proceso editorial. Los trabajos rechazados no podrán ser resometidos.

Una vez la versión corregida es aceptada definitivamente para publicación puede ser modificada editorialmente para que cumplan con los requisitos de estilo de la revista. Los cambios editoriales se hacen para mejorar la redacción y evitar errores gramaticales. Los cambios editoriales serán enviados al autor de correspondencia para su aprobación.

Los autores de los trabajos aceptados deben indicar por lo menos dos autores que sean citados en su manuscrito, con su respectiva afiliación y correo electrónico. A ellos enviaremos copia de su manuscrito aceptado.

Acuerdo de acceso abierto

Tras la presentación de un artículo, se solicita a los autores que indiquen su acuerdo para cumplir con un acceso abierto Creative Commons 3.0 (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/es/deed.es_AR). Bajo los términos de esta licencia, los autores retienen la propiedad de los derechos de autor de sus artículos. Sin embargo, la licencia permite que cualquier usuario pueda descargar, imprimir, extraer, reutilizar, archivar y distribuir este artículo, siempre y cuando el crédito apropiado se da a los autores y la fuente de la obra. La licencia, asegura a los autores que el artículo estará disponible lo más ampliamente posible y que el artículo puede ser incluido en cualquier archivo científico, la revista gestiona la inclusión y difusión del texto completo a través del repositorio institucional de la Universidad Nacional de Colombia y en todas aquellas bases de datos especializadas que el editor considere adecuadas para su indexación con miras a incrementar la visibilidad de la revista.

Cambios en la autoría

Acta Biológica Colombiana sigue las directrices COPE que describe los cambios en la autoría. Si son necesarias algunas modificaciones en la lista de autores de un manuscrito después de la presentación inicial (pero antes de su publicación), el autor correspondiente debe ponerse primero en contacto con el personal de la revista y dar una razón clara para el cambio. Si el cambio en la lista autoría es apropiada y de acuerdo con las directrices dadas anteriormente, se le pedirá al autor correspondiente proporcionar una confirmación escrita de que todos los demás autores que aparecen en el manuscrito en ese momento dan consentimiento para el cambio. Cualquier individuo que solicite el autor correspondiente para ser añadido o eliminado de la lista de autores serán contactados por la revista.