

Determinación del desarrollo embrionario y las proporciones sexuales en la tortuga morrocoy de patas rojas (*Chelonoidis carbonarius*) a temperaturas de incubación masculinizantes

Juliana Gaviria Hernández, MV

Directora:

Claudia Patricia Ceballos Fonseca, MV, MSc, PhD. Grupo Genética, Mejoramiento y Modelación Animal (GaMMA), Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia

Comité Tutorial:

Vivian P. Páez, Biol, PhD. Grupo Herpetológico de Antioquia (GHA), Instituto de Biología, Universidad de Antioquia

Diber Marcela Ramírez, MV. Centro de Atención y Valoración del Área Metropolitana del Valle de Aburrá (CAV)

Trabajo presentado para optar al título de Magíster en Ciencias Veterinarias

Modalidad Investigación
Facultad de Ciencias Agrarias
Escuela de Medicina Veterinaria
Universidad de Antioquia

2019

Tabla de contenido

1. Resumen	5
1.1. Abstract.....	7
2. Introducción	8
3. Objetivos.....	10
3.1. Objetivo general	10
3.2. Objetivos específicos	10
4. Hipótesis	11
4.1. Hipótesis nula:.....	11
4.2. Hipótesis alternas:.....	11
5. Marco Teórico	12
6. Métodos	15
6.1. Recolección, morfometría e incubación de huevos.....	15
6.2. Levante y monitoreo de las crías:	16
6.3. Sexaje y dimorfismo sexual:.....	17
6.4. Mecanismo de determinación del sexo:	19
7. Resultados.....	20
7.1. Incubación y eclosión.....	20
7.2. Efecto materno sobre las crías.....	20
7.3. Efecto de la temperatura sobre la forma	20
7.4. Sexaje	21
7.5. Efecto del sexo sobre la forma o dimorfismo sexual	21
7.6. Norma de reacción térmica	22
8. Discusión	23
9. Conclusiones	26
10. Referencias	27
11. Anexos	45
Anexo 1.....	45

Lista de Tablas

Tabla 1. Promedios del peso (g) y medidas lineales corporales (mm y cm) de <i>Chelonoidis carbonarius</i> a diferentes edades, y discriminado por temperatura de incubación. Abreviaturas: LRC = Largo recto caparazón, ARC = Ancho recto caparazón, AltoC = Alto caparazón, LCC = Largo curvo caparazón, ACC = Ancho curvo caparazón y LCP = Largo curvo plastrón. Las letras diferente indican diferencias significativas entre temperaturas, letras iguales indican que no existe diferencias.	33
Tabla 2. Desarrollo embrionario y éxito de eclosión de los huevos de <i>Chelonoidis carbonarius</i> obtenidos en este estudio discriminando por temperatura de incubación. .	35
Tabla 3. Análisis de varianza de la forma del plastrón en función del sexo y de la madre.	36
Tabla 4. Análisis de varianza de la forma de la muesca anal en función del sexo y de la madre.	37
Tabla 5. Análisis de varianza de la forma del plastrón en función de la temperatura. ...	38
Tabla 6. Análisis de varianza de la forma de la muesca anal en función de la temperatura.	39

Lista de Figuras

Figura 1. Fotografías de ovario (izquierda) y testículo (derecha), obtenida durante necropsia a través de estereoscopio.....	40
Figura 2. Localización de puntos de referencia fijos (puntos negros) y deslizantes (puntos blancos) en el plastrón (izquierda) y muesca anal (derecha) de tortugas morrocoy de patas rojas (<i>Chelonoidis carbonarius</i>).	41
Figura 3. Norma de reacción térmica para <i>Chelonoidis carbonarius</i> estimada teniendo en cuenta los tratamientos 24, 26 y 28°C (a) y adicionando la información obtenida por Hernández- Montoya et al. 2017 a los 29°C (b).	42
Figura 4. Ilustraciones de la forma promedio del plastrón de machos y hembras a los 7 días, con una magnificación 2 veces su tamaño normal (2x). Los machos tienen una amplitud mayor en la zona pectoral y las hembras presentan mayor amplitud en la zona pélvica.	43
Figura 5. Ilustraciones de la forma promedio de la muesca anal de machos y hembras a los 7 días, 1 mes y 2 mes, con una magnificación 2 veces su tamaño normal (2x). Las hembras tienen una muesca anal más angosta relativo a los machos.	44

1. Resumen

La tortuga morrocoy de patas rojas, *Chelonoidis carbonarius*, es una especie Vulnerable a nivel nacional principalmente debido a la extracción de individuos silvestres para usarlos como mascotas. Una alternativa para su conservación son los programas de reproducción con fines de repoblación, lo cual requiere conocer su mecanismo de determinación sexual. En un estudio previo se evaluó el efecto de tres temperaturas de incubación (29, 31 y 33°C) en la determinación del sexo y se encontró que 31 y 33°C fueron letales, y 29°C produjo 100% hembras, con un 52% de éxito de eclosión. Estos resultados confirman que la especie tiene un mecanismo de determinación sexual basado en la temperatura, pero se desconoce el rango de temperaturas transicionales que producen machos y hembras, y las temperaturas 100% masculinizantes. Esperando abarcar estas temperaturas desconocidas para estimar la norma de reacción térmica, se incubaron 160 huevos de 47 nidos a 24, 26 y 28°C constantes (D.E. = 0,49, 0,22, 0,21°C respectivamente). El éxito de eclosión por incubadora fue de 55%, 53% y 60%, con un periodo de incubación extremadamente largo: 213, 164 y 138 días respectivamente. A los 75 neonatos obtenidos se les monitoreo el crecimiento mensualmente hasta los 8 meses. Una vez alcanzaron los 90 gramos, una muestra de las crías fue sexada por laparoscopia o por observación directa de gónadas. En caso de dudas se realizaron histologías de las gónadas para confirmar el sexo. En total se sexaron 9, 10 y 7 individuos de 24, 26 y 28 °C respectivamente, que representan el 33,3% del total de neonatos obtenidos. Las proporciones sexuales (% machos) obtenidas fueron 88,9% ($n_{machos} = 8$, $n_{hembras} = 1$), 60% ($n_{machos} = 6$, $n_{hembras} = 4$), y 0% ($n_{machos} = 0$, $n_{hembras} = 7$), de las mismas temperaturas. A partir de la norma de reacción térmica estimada se sugiere una temperatura pivotal de 26,1°C (D.E. = 0,6) y un rango de temperatura de transición entre 24,4 y 27,8°C, con un intervalo de confianza del 95%. En cuanto a la forma de los neonatos, se encontró dimorfismo sexual a los siete días en la forma del plastrón, y a los siete días, primer mes y segundo mes en la forma de la muesca anal. Para el resto de las edades no se encontró dimorfismo sexual significativos en las dos formas evaluadas. Futuros estudios podrían enfocarse en aumentar los porcentajes de eclosión, determinar la temperatura de incubación mínima viable (<24°C), y usar otras técnicas (e.g.,

morfometría geométrica en 3D) o partes del cuerpo para encontrar dimorfismo sexual temprano.

Palabras clave: Dimorfismo sexual Testudinidae, sexaje por morfometría geométrica.

1.1. Abstract

The red-footed tortoise, *Chelonoidis carbonarius*, is a Vulnerable species mainly due to the extraction of wild individuals for use as pets. An alternative for its conservation are reproduction programs to alleviate depleted populations, which requires a good understanding of its sex determination mechanism. In a previous study, the effect of three incubation temperatures (29, 31 and 33°C) on sex determination was evaluated and found that 31 and 33°C were lethal and 29°C produced 100% females with a 52% of hatching success. These results confirmed a temperature-based sex determination mechanism, but the range of transitional temperatures that produce males and females, and the 100% masculinizing temperatures were unknown. Expecting to fill in this knowledge gaps in the reaction norm of this species, 160 eggs of 47 nests were incubated at 24, 26 and 28°C constant (D.E. = 0,49, 0,22, 0,21°C respectively). The hatching success by temperature was 55%, 53% and 60%, with an extremely long incubation period: 213, 164 and 138 days respectively. The 75 neonates obtained were monitored monthly for 8 months. Once they reached approximately 90 grams, a sample of the offspring was sexed by laparoscopy or opportunistically by direct observation of gonads when they died. In case of sex uncertainty, the gonad was confirmed by histology. A total of 9, 10 and 7 individuals from 24, 26 and 28°C were sexed this way, which represented 33.3% of the total number of neonates obtained. The sexual proportions of males obtained were 88,9% ($n_{male} = 8$, $n_{female} = 1$), 60% ($n_{male} = 6$, $n_{female} = 4$), and 0% ($n_{male} = 0$, $n_{female} = 7$), of the same temperatures. From the estimated thermal reaction norm, the pivotal temperature estimated is 26,05°C (D.E. = 0,62) and the transition temperature range 24,44 to 27,77°C (C.I. = 95%). In terms of the sexual shape dimorphism significant differences were found only at 7 days in the plastron shape, and at 7 days, and first and second month in the anal notch shape. Future studies could focus on increasing hatching success, determining the minimum viable incubation temperature that was not determined in this study, and exploring other techniques (e.g., geometric morphometrics using 3D) or body parts to find early sexual shape dimorphism.

Keyword: Testudinidae sexual dimorphism, sexing by geometric mophometry.

2. Introducción

La tortuga morrocoy de patas rojas, *Chelonoidis carbonarius*, es una especie considerada Vulnerable a nivel nacional o global, o ambas según la UICN y la resolución 1912 de 2017 del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de Colombia. Además, se encuentra listada en el apéndice II de la CITES, la cual incluye especies no necesariamente amenazadas de extinción pero que podrían estarlo si su comercio no se controla. Esta tortuga está amenazada principalmente por la extracción generalizada de individuos de las poblaciones naturales para tenerlos como mascotas (Morales-Betancourt et al. 2015), pero también por la destrucción y fragmentación de su hábitat (Vargas-Ramírez et al. 2010). La información sobre su biología reproductiva y desarrollo embrionario es escasa, especialmente en lo referente a los mecanismos de determinación sexual, la cual es vital para establecer programas de conservación en cautiverio. Al respecto solo se conoce un estudio realizado recientemente en el cual se evaluaron los efectos de tres temperaturas de incubación (29, 31 y 33 °C) sobre la determinación del sexo y el desarrollo embrionario de *C. carbonarius* (Hernández-Montoya et al. 2017). En dicho estudio las temperaturas más altas (31 y 33 °C) fueron letales y sólo la temperatura más baja (29 °C) produjo neonatos viables que fueron 100% hembras, aunque con una mortalidad embrionaria del 52%. Estos resultados confirman que esta especie tiene un mecanismo de determinación del sexo basado en la temperatura, con hembras producidas a altas temperaturas (mecanismo DST-Ia). Desafortunadamente las temperaturas usadas en dicho estudio resultaron ser muy altas para la viabilidad del desarrollo embrionario, y por ello no se logró determinar el rango de transición en el cual se producen tanto machos como hembras, ni la temperatura pivotal a la cual se obtienen 50% machos y 50% hembras, ni las temperaturas a las cuales se producen 100% machos (temperaturas masculinizantes). Determinar estos parámetros es trascendental para poder reproducir la especie bajo condiciones controladas, produciendo las proporciones sexuales deseadas y con altas tasas de eclosión.

Por otro lado, las diferencias morfológicas entre machos y hembras de *C. carbonarius*, o dimorfismo sexual, solo son evidentes cuando los animales alcanzan la madurez sexual. Los machos son más grandes que las hembras, con un plastrón cóncavo, una escama supracaudal abombada que se extiende más allá del plastrón, una cola más larga y

gruesa, y con una escotadura anal con un ángulo más amplio y profundo que en las hembras (Pritchard y Trebbau, 1984). Estas diferencias no son observables a simple vista en individuos jóvenes, lo que dificulta el manejo en cautiverio con fines de repoblación. Con el presente estudio se espera avanzar en el conocimiento sobre el mecanismo de determinación del sexo de *C. carbonarius* y adicionalmente se realizará un análisis por morfometría geométrica para brindar una alternativa de sexaje temprano de los individuos mediante una técnica poco invasiva. La información obtenida será vital para diseñar y establecer programas de reproducción en sitios donde se requieran acciones de repoblación de esta tortuga colombiana, contribuyendo así a la conservación de la especie.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Contribuir al conocimiento de la biología reproductiva de la tortuga morrocoy de patas rojas (*Chelonoidis carbonarius*) llenando los vacíos sobre los parámetros de la norma de reacción térmica que intervienen en su mecanismo de determinación sexual. Adicionalmente, se estudiará si existe dimorfismo sexual temprano como alternativa de sexaje de esta especie.

3.2. Objetivos específicos

Determinar los parámetros de la norma de reacción térmica de *C. carbonarius*, que incluye: 1) temperaturas de incubación que producen 100% machos, 2) el rango de temperaturas transicionales que producen ambos sexos, y 3) la temperatura pivotal que produce igual proporción de sexos.

Determinar si existe dimorfismo sexual en el plastrón de los neonatos o jóvenes de *C. carbonarius* comparando la forma de machos y hembras por medio de morfometría geométrica, para así ofrecer una alternativa de sexaje no letal o invasiva a la comunidad académica.

4. Hipótesis

4.1. Hipótesis nula:

- Las variaciones de temperatura de incubación de los huevos de *C. carbonarius*, no afectan la determinación del sexo, ni el desarrollo embrionario.
- No hay dimorfismo sexual en neonatos o durante el primer año de vida de *C. carbonarius*.

4.2. Hipótesis alternas:

- Las temperaturas 24, 26 y 28 °C son temperaturas viables que incluyen, tanto la temperatura 100% masculinizante, el rango de temperatura de transición sexual (TRT), y la temperatura pivotal, donde se producen 50% hembras y 50% machos. Se propone este rango porque la temperatura superior viable es 29 °C (Hernández-Montoya et al 2017) y la temperatura inferior es compatible con base en la ecología de la especie (no con base en las temperaturas viables de otras especies de Testudinidae). *C. carbonarius* se encuentra en hábitats de bosque seco tropical y ocasionalmente se encuentra en bosques húmedos (Wang et al. 2011, Gallego-García et al. 2012), cuya temperatura anual media es de 25 °C (IAVH, 1998).
- Es posible estimar diferencias morfométricas entre machos y hembras crías o jóvenes de *C. carbonarius* usando morfometría geométrica. Específicamente, se espera encontrar un dimorfismo sexual similar al observado en adultos, pero menos marcado. Es decir, los machos presentarán: cintura estrecha, hombros anchos, muesca anal del plastrón con un ángulo más amplio que en la hembra, y/o escudos anales puntiagudos que se extienden hasta tocar las escamas marginales posteriores del caparazón (relativo a las hembras). Por otro lado, se espera que las hembras tengan escudos anales más cortos y redondeados (relativo a los machos) (Gallego-García et al. 2012).

5. Maco Teórico

De las 360 especies de tortugas identificadas actualmente a nivel mundial, Colombia posee 33 especies, de las cuales 5 son marinas y 28 continentales (Rhodin et al 2017, Rhodin et al. 2018). Entre las especies continentales se encuentra la tortuga morrocoy de patas rojas, *Chelonoidis carbonarius* (Cryptodira, Testudinidae) categorizada como Vulnerable según la resolución 1912 de 2017 del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible y Libro Rojo de Reptiles de Colombia (Morales-Betancourt et al. 2015). Así mismo *C. carbonarius* está listada en el apéndice II de CITES, el cual incluye especies no necesariamente amenazadas de extinción pero que podrían estarlo si su comercio no se controla.

La distribución natural de *C. carbonarius* va desde Panamá hasta Argentina incluyendo a Colombia, específicamente la costa Caribe y ambos lados de la cordillera oriental (Gallego-García et al. 2012). En Colombia se ha reportado en sabanas abiertas y bosques adyacentes (Castaño-Mora y Lugo 1981) lo que puede generar una buena estructura o diferenciación poblacional acorde a las regiones geográficas donde habita (Vargas-Ramírez et al. 2010). Morfológicamente se caracteriza por poseer un caparazón con 11 pares de escudos marginales (no presenta escama nugal), un escudo supracaudal, cuatro pares de escudos costales y cinco escudos vertebrales (Castaño-Mora y Lugo 1981).

Esta tortuga es de hábitos terrestres, diurna, solitaria, y omnívora, incluyendo en su dieta flores, frutos, carnes e incluso carroña. En su etapa adulta *C. carbonarius* exhibe dimorfismo sexual, siendo los machos más grandes que las hembras. El tamaño corporal máximo reportado es de 51 cm de largo recto de caparazón (Pritchard y Trebbau 1984), pero se ha reportado que en promedio los machos pueden tener 30.4 cm y las hembras 28.9 cm de largo recto de caparazón (Castaño-Mora y Lugo 1981). La tasa de crecimiento en cautiverio es fuertemente dependiente de la alimentación, siendo mucho más rápida cuando se suministra una dieta alta en proteína (Castaño-Mora 1985). Así mismo, se ha demostrado una asociación directa entre una dieta alta en proteína y un mejor

desempeño reproductivo, e.g., un tamaño y número de nidadas mayor (Hernández *et al.* 2000).

Además de la degradación o destrucción de sus hábitats naturales, la tortuga morrocoy de patas rojas ha sido fuertemente afectada por una alta presión de caza. En la mayoría de los casos son capturadas para ser mantenidas en las casas como mascotas, y aunque su caza es incidental se cree que hay cientos en cautiverio (Gallego-García *et al.* 2012). Adicionalmente, en los llanos orientales se ha reportado el consumo de su carne por el hombre (Echeverry *et al.* 2012, Gallego-García *et al.* 2012). La conservación de esta tortuga requiere entonces, entre otras acciones, de programas de reproducción en cautiverio con fines de repoblación para lo cual se requiere entender el mecanismo de reproducción que a la fecha ha sido poco estudiado. Hasta el 2014, se ha estudiado el mecanismo de determinación sexual de nueve de las 60 especies que forman la familia Testudinidae (The Tree of Sex Consortium, 2014). Para el caso de *Chelonoidis carbonarius* aún no se conocen todos los parámetros de la reacción térmica que intervienen en su mecanismo de determinación sexual. Sólo en el año 2016 se adelantó un estudio sobre la biología reproductiva de la tortuga morrocoy de patas rojas (Hernández-Montoya *et al.* 2017). En ese estudio se buscaba determinar si el mecanismo de determinación del sexo era dependiente de la temperatura, así como las temperaturas que producen 100% hembras, 100% machos, y el rango de transición (que produce tanto machos como hembras) incluyendo la temperatura pivotal que produce 50:50 machos: hembras. Dos de las tres temperaturas que se usaron en dicho estudio fueron letales (31 y 33 °C), mientras que la otra (29 °C) produjo 100% hembras, aunque con una mortalidad alta (50% aproximadamente). Estos resultados demuestran la alta variabilidad que puede haber entre especies de la misma familia (Testudinidae), e.g., en *Testudo graeca* de 30 a 35 °C produce 100% hembras y entre 26 y 29 °C produce 100% machos (Janzen y Paukstis, 1991), mientras que en *Gopherus Agassizzi* se produce 100% hembras a 32,8 a 35.3 °C y 100% machos a 25 a 30.6 °C (Burke *et al.* 1996), aunque esto puede ser explicado por el tipo de hábitat, ya que a diferencia de *C. carbonarius*, estas especies viven en ambientes desérticos y no en bosques tropicales. El presente estudio buscó complementar el estudio de Hernández-Montoya *et al.* (2017) evaluando el efecto de

temperaturas inferiores a 29 °C sobre la determinación del sexo y el desarrollo embrionario. Para este fin se usaron temperaturas de incubación de 24, 26 y 28 °C esperando que incluyeran temperaturas tanto feminizantes como masculinizantes.

Por otro lado, determinar el sexo de los neonatos o jóvenes a simple vista es difícil porque no presentan caracteres sexuales secundarios evidentes. Las diferencias morfométricas entre machos y hembras de *C. carbonarius* solo son evidentes cuando alcanzan la madurez sexual (Pritchard y Trebbau, 1984). Esto pasa aproximadamente a los 5 años, cuando alcanzan una longitud recta del plastrón entre 20 y 26 cm, y aparece la forma cóncava del plastrón en los machos, que facilita la monta de la hembra (Gallego-García *et al.* 2012). Existen varias técnicas de sexaje en jóvenes, pero pueden ser altamente invasivas, entre ellas están la histología de las gónadas post mortem (Endringer *et al.* 2015), o la observación de las gónadas por medio de la laparoscopia (Eckert *et al.* 1999). Sin embargo, existe una herramienta útil y poco invasiva para detectar el dimorfismo sexual en etapas tempranas: la morfometría geométrica (MG). Esta técnica consiste en la cuantificación de la forma promedio (de plastrón o caparazón) de una muestra de machos y hembras con sexo conocido a partir de laparoscopias o histología de gónadas en caso de muerte incidental. Una vez se conozca el sexo de estos individuos, se estima el sexo de los individuos con sexo desconocido. La cuantificación de la forma del cuerpo, el plastrón en este caso, se hace a partir de fotografías digitales a las cuales se les digitaliza unos puntos de referencia y cuyas coordenadas se convierten en las variables de forma luego de correr una superimposición de Procrustes (Rohlf y Slice, 1990). Esta herramienta es poco invasiva, y ha sido efectiva para determinar el sexo en etapas tempranas de varias especies de tortugas: *Chrysemys picta*, *Podocnemis expansa*, *Chelydra serpentina*, *P. lewyana* (Valenzuela *et al.* 2004, Ceballos y Valenzuela 2011, Ceballos *et al.* 2014, Gómez-Saldarriaga *et al.* 2016).

6. Métodos

En este trabajo se sigue la metodología usada en Hernández-Montoya et al. 2017 en cuanto a la recolección y manipulación de huevos para poder obtener resultados comparables.

6.1. Recolección, morfometría e incubación de huevos

Se recolectaron 160 huevos de 47 nidos de *C. carbonarius*, entre los 0 a 7 días después de su postura, con un tamaño promedio de 3.5 huevos (D.E. = 1.3; rango = 1-8 huevos). La recolección se realizó entre octubre y diciembre de 2017 en Puerto Perales, Antioquia. Esta colección pertenece a un hogar de paso de tortugas provenientes del tráfico de animales silvestres, y fue la misma que donó los huevos para el estudio de Hernández y colaboradores (2017). En el momento de la colecta los huevos fueron marcados individualmente con el indicativo del nido, que correspondía a la identificación de la madre y el número según el orden de colecta, para poder hacer el monitoreo durante la eclosión y su crecimiento. Los huevos fueron transportados al Instituto de Biología de la Universidad de Antioquia en neveras de icopor y usando como substrato vermiculita humedecida a una proporción 1:2 de vermiculita: agua destilada (Páez et al. 2009, Kuchling et al. 2013, Hernández-Montoya et al. 2017). Cada huevo se limpió con hipoclorito diluido en agua al 1% para su desinfección de hongos o bacterias, luego se pesó con una balanza de 1.000 g (precisión de 0.1 g), y se midió su diámetro mayor y menor (los huevos son ovalados) con un pie de rey electrónico (precisión de 0,01 mm). El peso promedio de los huevos fue de 54.6 g (D.E.= 7.9; rango= 32.1-70 g) y el diámetro promedio fue de 46.1 mm (D.E. = 2.5; rango = 38.3-50.8 mm). Posteriormente fueron asignados de manera aleatoria a tres temperaturas constantes de incubación: 54 huevos a 24.3 (\pm 0.5), 55 huevos a 26 (\pm 0.2) y 51 huevos a 27.9 °C (\pm 0.2). Los huevos se incubaron en contenedores plásticos con una cama de sustrato de vermiculita humedecida a una proporción 1:2 de vermiculita: agua destilada. La humedad del sustrato se mantuvo durante todo el periodo de incubación mediante una reposición semanal de la pérdida de agua por evaporación. Simultáneamente las cajas fueron rotadas dentro de las incubadoras para compensar por posibles variaciones de temperatura al interior de

cada incubadora. El desarrollo embrionario se supervisó cada dos semanas revisando la viabilidad de los embriones a contra luz en cuarto oscuro y se descartaron los huevos con mal olor, crecimiento de hongos, o bacterias en la cáscara. Del total de huevos colectados, el 83.7% ($n = 134$) presentó signos de desarrollo embrionario durante la incubación, los huevos restantes no presentaron la aparición de la mancha blanca que indica su fertilidad, ni la aparición de circulación vitelina, por lo tanto, fueron descartados.

Para determinar si la temperatura de incubación afectaba el periodo de incubación de los huevos se usó un modelo lineal usando la función “lm” del paquete stats en ambiente R (www.r-project.org). Posteriormente, si el modelo era significativo, se realizaron comparaciones pareadas (entre las tres temperaturas) para determinar cuáles eran diferentes mediante la función “pairwise.t.test” del paquete geomorph.

6.2. Levante y monitoreo de las crías:

El momento del nacimiento de las crías fue determinado a partir del día de eclosión (emergencia del neonato de la cáscara), este evento se usó para calcular la edad de los neonatos. Una vez se absorbía el vitelo y cicatrizaba el ombligo las crías se sacaban de la incubadora (rango = 1 - 6 días). Después del séptimo día de la eclosión cada cría fue pesada, medida y fotografiada, procedimiento que se repitió mensualmente durante todo el tiempo de levante de las crías necesario para la maduración de las gónadas. Las medidas que se tomaron fueron: largo recto del caparazón (LRC), largo curvo del caparazón (LCC), ancho recto del caparazón (ARC), ancho curvo del caparazón (ACC), largo recto del plastrón (LRP), largo curvo del plastrón (LCP) y alto de la concha (AltoC) (Tabla 1). Las crías obtenidas en el estudio ($n = 75$) fueron trasladadas al Zoológico Santa Fe de Medellín hasta los 8 meses de edad en promedio, tiempo en el que alcanzaron los 90 g de peso aproximadamente y podían ser sexadas (Hernández-Montoya et al. 2017). Los neonatos fueron ubicados en un espacio adaptado con sol y sombra, y separados del resto de ejemplares de la colección del zoológico. La oferta de agua fue *ad libitum* constante y la dieta fue basada en frutas, plantas, carne cruda una vez a la semana y calcio en polvo una vez a la semana.

6.3. Sexaje y dimorfismo sexual:

Una muestra de las crías se sexó por laparoscopia una vez alcanzaron los 8 meses de edad, y el resto de las crías se esperaba sexar por morfometría geométrica. Este procedimiento sin embargo, no se realizó porque se obtuvieron resultados inconsistentes, ver sección de resultados. Para determinar el número de crías para sexar por laparoscopias, se utilizó la fórmula para encontrar el tamaño de muestra en una población finita, con un porcentaje de confiabilidad del 85% y un margen de error del 15% (Jaramillo, 2009).

Para realizar las laparoscopias se usó un endoscopio rígido (Storz Hopkins® 30°, 1.9 mm de diámetro) conectado a una luz fría (Storz®) (Hernández-Montoya et al. 2017). La anestesia usada fue ketamina a 60 mg/kg combinada con diazepam a 0,5 mg/kg intramuscular, con una suplementación con ketamina a 25 mg/kg y diazepam a 0,5 mg/kg vía intravenosa a los 10 minutos. Según el tamaño de las crías, cuando no era posible tener acceso venoso, se aplicaba la dosis de suplementación vía intramuscular. Adicionalmente, se usó analgesia local con lidocaína (2 mg/kg) (Carpenter y Marion, 2017). La incisión de 2 mm se realizó en el pliegue del costado inguinal izquierdo para introducir el laparoscopio y visualizar las gónadas. Posteriormente se suturó con Vicryl 4.0 y se monitorearon hasta la recuperación de la anestesia. Finalmente se aplicó antiinflamatorio (ketoprofeno a razón de 2.2 mg/kg) y antibiótico (amoxicilina 10 mg/kg) ambas por vía intramuscular. En forma oportunista, las tortugas que murieron durante el proceso de levante o postoperatorio, se sexaron por medio de observación directa de gónadas bajo estereoscopio, y en caso de dudas se realizaron histologías para confirmación (Figura 1).

Para sexar los individuos por medio de morfometría geométrica se hizo una cuantificación de la forma del plastrón. El plastrón fue elegido porque es más aplanado y las fotografías, que son en dos dimensiones, capturan bien las formas aplanadas. Así mismo, el caparazón fue descartado porque su forma de domo no sería adecuadamente capturada con fotografías. Todos los individuos se fotografiaron mensualmente para registrar los cambios en la forma durante los primeros 8 meses. Posteriormente se digitalizaron 23

puntos de referencia (landmarks) fijos en el plastrón completo, y 7 puntos fijos y 8 puntos deslizantes alrededor de la muesca anal (Figura 2). Con estos datos se realizó un Análisis Generalizado de Procrustes que consiste en correr una superimposición de los puntos de referencia de las fotos bajo un sistema de coordenadas geométricas o plano cartesiano, mientras que se mantiene constante los efectos de posición, orientación y escala del animal en cada foto (Rohlf y Slice, 1990). De esta superimposición se obtiene una matriz de coordenadas que se usan como la variable forma, y un vector que es el tamaño centroide (distancia promedio desde el centro de gravedad de los puntos de referencia hasta los puntos de referencia). Este último se usa como indicador del tamaño del individuo y se diferencia de las medidas lineales tradicionales (LRC, LCC, etc.) en que su cálculo incluye información de la forma del cuerpo (Bookstein, 1991). La digitalización de las coordenadas se realizó con la serie de software TPS (TPS Util, TPS Digit) (Rohlf, 2015), y la superimposición de Procrustes con la función "gpagen" (disponible en el paquete geomorph, Adams *et al.* 2019). La función gpagen tiene la ventaja que calcula distancias de Procrustes entre los individuos (en lugar de calcular las distancias entre todas las coordenadas de los puntos de referencia), lo cual permite correr ANOVAS de Procrustes, muy útil en estudios que tienen pocos individuos en relación al número alto de variables como este.

Para determinar si existen diferencias sexuales significativas en la forma de las crías se usó la función "lm.rpp" (Linear Model Evaluation with Randomized Residuals in a Permutation Procedure), disponible en el paquete RRPP (Collyer y Adams 2018), en ambiente R. Esta función ajusta un modelo lineal generalizado usando el sexo como factor (variable independiente), la forma como variable respuesta (dependiente), y la madre (efecto materno) como covariable (forma~sexo+madre). En esta función los coeficientes del modelo son estimados por 10.000 permutaciones de los residuos. La estadística no paramétrica es preferida porque los datos usados en este estudio no tienen una distribución normal. En caso de encontrar dimorfismo sexual significativo entre los animales sexados por laparoscopias, se usará la función "classify" (en paquete geomorph, Adams *et al.* 2019) para sexar los animales de sexo desconocido. Adicionalmente, el efecto de la temperatura de incubación y el efecto materno en la forma

del plastrón y la muesca anal de los neonatos, fue evaluado durante el crecimiento de las crías mediante un modelo de análisis de varianza de Procrustes, con la función “lm.rpp” (Linear Model Evaluation with Randomized Residuals in a Permutation Procedure), disponible en el paquete RRPP (Collyer y Adams 2018), en ambiente R.

6.4. Mecanismo de determinación del sexo:

Con la información de los sexos conocidos y las temperaturas promedio reales experimentadas por los huevos, se calculó la norma de reacción térmica usando la función “tsd” (Estimate the parameters that best describe temperature-dependent sex determination, Girondot, 1999), disponible en el paquete Embryogrowth (Girondot y Kaska, 2014) en ambiente R. Esta función usa el número de hembras y machos (variable independiente) en cada temperatura constante promedio (variable dependiente), obteniendo los parámetros faltantes del mecanismo de determinación del sexo de *C. carbonarius* con un intervalo de confianza del 95%. Esto incluye las temperaturas de transición, que incluyen desde el 5% al 95 % de cada sexo, la temperatura pivotal, y las temperaturas 100% masculinizantes y feminizantes.

7. Resultados

7.1. Incubación y eclosión

Se recolectaron 160 huevos de 47 nidos, pertenecientes a 42 hembras. En total presentaron signos de desarrollo embrionario 135 huevos, de los cuales eclosionó exitosamente el 55.9% ($n = 75$) (tabla 2), sin diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p = 0.54$). El periodo de incubación promedio fue de 213 días (D.E. = 41.2, rango = 178-251) a 24°C, 164 (D.E. = 13.6, rango = 150-202) a 26°C y 138 días (D.E. = 13.9, rango = 120-171) a 28°C respectivamente.

Los resultados presentaron una distribución normal y se encontraron diferencias significativas en la duración del periodo de incubación asociadas a los tratamientos de temperaturas ($F_{1,70} = 296.44$, $p < 0.001$). Al realizar las comparaciones pareadas se comprobó que todos los tratamientos son significativamente diferentes entre sí: 24 es diferente de 26°C ($p < 0.001$), 24 de 28°C ($p < 0.001$), y 26 de 28°C ($p < 0.001$).

7.2. Efecto materno sobre las crías

Al analizar el efecto del nido de origen se encontró un efecto significativo sobre el peso de las crías ($F_{10,14} = 3.745$, $p < 0.021$), sugiriendo un efecto materno. Este efecto materno no fue observado en la forma del plastrón (Tabla 3) ni en la muesca anal (Tabla 4) a ninguna edad analizada. La única excepción fue un efecto materno significativo a los 2 meses de edad ($F_{30,70} = 1.560$, $p < 0.006$) en la forma de la muesca anal.

Por otro lado, el peso de las madres no tuvo efecto sobre el peso de las crías, es decir, madres más pesadas no produjeron crías más pesadas ($F_{1,23} = 0.645$, $p = 0.430$). Sin embargo, madres más largas (largo recto del caparazón, LRC), sí produjeron huevos más grandes y crías más largas con respecto al largo recto del caparazón ($F_{1,23} = 5.763$, $p < 0.025$).

7.3. Efecto de la temperatura sobre la forma

El efecto de la temperatura de incubación en la forma del plastrón de los neonatos fue significativo al mes, a los 3 meses y a los 5 meses (Tabla 5), encontrando que las crías

incubadas a 28 °C presentaban la zona pélvica más amplia y la pectoral más estrecha que los incubados a 24°C. El efecto de la temperatura en la forma de la muesca anal fue significativo a los 7 días, al mes y a los 4 meses (Tabla 6), con una muesca anal más angosta a 28 grados y más amplia a los 24 °C. Sin embargo, a pesar de encontrar diferencias significativas, el efecto es débil y no es consistente durante el crecimiento.

7.4. Sexaje

Del total de las 75 crías obtenidas, se determinó el sexo del 33.3% de estos ($n = 26$); es decir, 9, 10 y 7 individuos de 24, 26 y 28 °C respectivamente. Este sexaje se realizó por medio de laparoscopías ($n = 16$), y en caso de muerte por diferentes causas durante el levante se realizó por necropsia ($n = 10$). A las crías que murieron durante el postoperatorio ($n = 5$), se les realizó necropsia para verificar nuevamente el sexo (Figura 2). En los casos en que no se pudo diferenciar las gónadas macroscópicamente el sexo fue confirmado por histología. Del total de animales sexados se obtuvo las siguientes proporciones sexuales (% machos): 88.9% (8 machos y 1 hembra) de 24 °C, 60% (6 machos y 4 hembras) de 26°C, y 0% (7 hembras y 0 machos) de 28°C.

Uno de los objetivos de este trabajo era sexar los animales (de sexo desconocido) a partir de la forma de los animales de sexo conocido (sexados con laparoscopias o necropsias) por medio de morfometría geométrica. Sin embargo, al predecir los sexos de esta manera se obtuvieron resultados inconsistentes en el tiempo, es decir, algunos individuos clasificados como machos a los 7 días, eran clasificados como hembras (o viceversa) al mes siguiente. Por esta razón la determinación de la norma de reacción térmica (ver sección 7.7) se realizó sólo con los animales de sexo conocido (sexados por laparoscopias y necropsias).

7.5. Efecto del sexo sobre la forma o dimorfismo sexual

El dimorfismo sexual en la forma del plastrón fue significativo sólo a los 7 días ($F_{1, 24} = 3.360$, $p < 0.005$), posteriormente no hubo diferencias. Al nacimiento, los machos tenían una zona pectoral más amplia que la zona pélvica, mientras que las hembras tenían una

zona pectoral más angosta que la zona pectoral (Figura 4). El dimorfismo sexual en la forma de la muesca anal fue significativo sólo a los 7 días ($F_{1, 24} = 2.467$, $p < 0.042$), al mes ($F_{1, 24} = 2.603$, $p < 0.035$) y a los dos meses de edad ($F_{1, 24} = 2.603$, $p < 0.035$) (Figura 5, tablas 3 y 4).

7.6. Norma de reacción térmica

Al estimar la norma de reacción térmica a partir de la proporción de sexos conocidos y las temperaturas promedio reales registradas en cada incubadora, se encontró que la temperatura pivotal = 26.09°C (D.E. = 0.69), y el rango de temperaturas de transición (RTT) = 24.13 a 28.05°C, (intervalo de confianza, I.C. = 95%, Figura 3a). Adicionalmente, para obtener datos más completos sobre la especie, se estimó una segunda norma de reacción térmica teniendo en cuenta también los datos obtenidos por Hernández-Montoya y colaboradores (2017), que fue de 100% ($n = 20$) hembras a 27.9 °C. Con esta información se estimó que la temperatura pivotal = 26.05°C (D.E. = 0.62), el RTT = 24.44 a 27.77°C (I.C. = 95%), y la temperatura 100% feminizante = 27.9°C (Figura 3b). La temperatura 100% masculinizante no fue encontrada en este estudio, aunque se encontró una producción de 88.9% de machos a 24°C.

8. Discusión

En este estudio se sugiere que el mecanismo de determinación sexual de *C. carbonarius* es de tipo Ia, en el cual temperaturas altas producen hembras y temperaturas bajas producen machos. Específicamente, los huevos incubados entre 24 y 29 °C producen crías viables (este estudio y Hernández-Montoya et al. 2017), siendo el límite superior viable 29 °C (Hernández-Montoya et al. 2017), pero el límite inferior viable se desconoce puesto que temperaturas inferiores a 24 °C no han sido evaluadas. Es importante conocer la temperatura mínima a la que se producen crías viables para descartar la posibilidad de un mecanismo de determinación sexual tipo II, en el cual se producen hembras a temperaturas altas y bajas, y machos a temperaturas intermedias (Ewert et al. 1994). Sin embargo, esta posibilidad es baja teniendo en cuenta que otras especies de Testudinidae tienen un mecanismo de determinación sexual del tipo Ia (Hernández-Montoya et al. 2017), con temperaturas 100% masculinizantes, pivotaes y 100% feminizantes aún mayores a las encontradas en este estudio. Un ejemplo son las especies *Gopherus agazzi* (Spotila et al. 1994, Burke et al. 1996), *G. polyphemus* (Demuth, 2001) y *Malacochersus tornieri* (Ewert et al. 2004) con temperaturas 100% masculinizantes = 25-30.6°C, 26° C y 27-29°C respectivamente; temperaturas pivotaes = 31-32°C, 29-32°C y 29.8°C respectivamente, y temperaturas 100% feminizantes = 32.8-35.3°C, 32-34°C y 32°C respectivamente. Estas últimas temperaturas están incluso muy por encima de la temperatura superior viable para *C. carbonarius* (>29°C, Hernández-Montoya et al. 2017).

Al analizar la variación de la forma del plastrón y la muesca anal según el sexo solo se presentan diferencias significativas a los 7 días para el plastrón y en la muesca anal a los 7 días, 1 mes y 2 meses. Esta significancia no perduró con la edad, y al tratar de hacer la predicción del sexo, con base a las edades que presentaron significancia, se encontraron individuos clasificados como hembras o machos a los 7 días, y con sexo contrario al mes siguiente. Por esta razón la predicción del sexo mediante morfometría geométrica en *C. carbonarius* no se pudo realizar como se había pensado (Figura 2). Este hallazgo difiere a lo encontrado en otras especies de tortugas como *Chrysemys picta*, *Trachemys scripta*, *Chelydra serpentina*, *Podocnemis expansa* y *P. lewyana* (Valenzuela et al. 2004, Myers et al. 2007, Ceballos y Valenzuela, 2011, Ceballos et al.

2014, Gómez-Saldarriaga *et al.* 2016) en las cuales sí se encontraron diferencias significativas tanto en la forma del plastrón, como en la muesca anal según el sexo, al nacer y durante el crecimiento hasta los 7 meses. Esta diferencia podría ser explicada por la relación que hay entre la forma del cuerpo de las especies acuáticas (como las mencionadas arriba), y las especies terrestres (como *C. carbonarius*) con su ecología y mecanismos evolutivos (Bonnet *et al.* 2010). En las tortugas acuáticas el macho presenta una forma del caparazón más aplanada que la hembra, lo cual permite que los machos sean hidrodinámicos y tengan mayor movilidad durante la época reproductiva. En las especies terrestres, además de que el caparazón es más alto y convexo que en las acuáticas, en los machos el caparazón es aún más alto y el plastrón es mucho más cóncavo que en las hembras, lo cual facilita el acople con el caparazón de la hembra durante la cópula. Adicionalmente, la forma del caparazón facilita que los machos se levanten más rápidamente en caso de voltearse de manera accidental durante la cópula (Bonnet *et al.* 2010). Asimismo, los machos sexualmente maduros de *C. carbonarius* presentan la escama supracaudal del caparazón muy abombada que se extiende más allá del borde más posterior del plastrón (Pritchard y Trebbau, 1984).

Estas particularidades en el dimorfismo sexual de *C. carbonarius* sugieren explorar otras alternativas de dimorfismo sexual en la forma de neonatos y jóvenes. Un ejemplo podría ser evaluar la distancia del borde posterior del plastrón al borde más posterior del caparazón, así como la forma del espacio que queda entre dichos bordes. Otra opción sería analizar fotografías en 3D con morfometría geométrica para buscar diferencias entre la forma más convexa del caparazón y más cóncava del plastrón de los machos en relación a las hembras. Igualmente se debe explorar si existe dimorfismo sexual en el tamaño del cuerpo (LRC, ARC, etc.) de machos y hembras neonatos y jóvenes, aunque se ha comprobado que el tamaño de los adultos es más variable que la forma, debido a presiones externas (ambiente, densidad) experimentadas por cada población. Este es el caso de especies como *Testudo hermanni* y *T. graeca*, en las que las hembras son más largas que los machos (Djordjevic *et al.* 2011, mientras que en *T. marginata* los machos son más largos que las hembras (Willemsen y Hailey, 2003, Kaddour *et al.* 2008).

Otro resultado importante de este trabajo fue el bajo porcentaje de eclosión observado (<56%) que también se observó en Hernández-Montoya et al. 2017. Es posible que este resultado se vea mediado por procesos como la estivación embrionaria (Rafferty y Reina 2012), o por el estado nutricional de las madres, que puede disminuir la viabilidad de los huevos (Hernández, 1997). Otro factor que puede afectar el éxito de la eclosión es el porcentaje de humedad, ya que esta especie habita en zonas boscosas y escoge lugares para desovar bajo sombra, con la humedad necesaria para el desarrollo de los embriones durante los meses de sequía (Hernández, 1997). La humedad del sustrato de incubación de huevos de *C. carbonarius* más adecuada no ha sido estudiada, aunque se sabe que especies que habitan en ecosistemas similares, como la *Chelonoidis chilensis*, requieren una humedad ambiental del 95% durante la incubación (Romito et al. 2015). En este estudio, se usó un sustrato de vermiculita: agua de 1:2 (Páez et al. 2009, Kuchling et al. 2013, Hernández-Montoya et al. 2017), sin embargo, la humedad misma no fue estimada.

9. Conclusiones

Con los resultados obtenidos en este estudio se obtuvo la norma de reacción térmica para *C. carbonarius*, incluyendo las temperaturas 100% feminizantes, temperatura pivotal y el rango de temperaturas transicionales. Las temperaturas que componen la norma de reacción térmica de esta especie son las más bajas dentro de Testudinidae, sin embargo, *C. carbonarius* parece seguir el mismo patrón de determinación sexual de su familia, DST-Ia. A pesar de que la temperatura 100% masculinizante no estuvo en el rango de temperaturas evaluadas, esta debe estar muy cerca de los 24°C. Se espera que la norma de reacción térmica estimada sea útil para producir las proporciones sexuales deseadas en futuros programas de conservación en cautiverio. Por otro lado, las diferencias en la forma de la muesca anal y del plastrón asociadas al sexo fueron levemente significativa, se diluyeron a partir del tercer mes de edad, y no fueron consistentes en el tiempo por lo que no se recomiendan usar para predecir el sexo de neonatos con sexo desconocido. Por esto se sugiere explorar otras partes del cuerpo o combinaciones del plastrón con el caparazón.

10. Referencias

- ADAMS, D. C., COLLYER, M. L. y KALIONTZOPOULOU, A. 2019. Geomorph: Software for geometric morphometric analyses. R package version 3.1.0. <https://cran.r-project.org/package=geomorph>
- BOOKSTEIN, F.L. 1991. Morphometric tools for landmark data. Cambridge: Cambridge Press.
- BONNET, X., DELMAS, V., EL-MOUDENB, H., SLIMANI, T., STERIJOVSKI, B. y KUCHLING, G. 2010. Is sexual body shape dimorphism consistent in aquatic and terrestrial chelonians? *Zoology*, 113: 213–220.
- BURKE, R.L., EWERT, M.A., MCLEMORE, J.B., AND JACKSON, D.R. 1996. Temperature-dependent sex determination and hatching success in the gopher tortoise (*Gopherus polyphemus*). *Chelonian Conservation and Biology* 2:86–88.
- CASTAÑO-MORA, O.V. 1985. Notas adicionales sobre la reproducción y el crecimiento de los morrocoyes (*Geochelone carbonaria* y *G. denticulata*, Testudines, Testudinidae). Lozanía:1-5.
- CASTAÑO-MORA, O.V. y LUGO, R.M. 1981. Estudio comparativo del comportamiento de dos especies de morrocoy *Geochelone carbonaria* y *Geochelone denticulata* y aspectos comparables de su morfología externa. *Cespedesia* 10: 37-38.
- CARPENTER, J. Y MARION, C. 2017. Exotic Animal Formulary 5th Edition. 776 p.
- CEBALLOS, C.P. y VALENZUELA, N. 2011. The role of sex-specific plasticity in shaping sexual dimorphism in a long-lived vertebrate, the Snapping turtle *Chelydra serpentina*. *Evolutionary Biology* 38:153–181.
- CEBALLOS, C.P., HERNÁNDEZ, O.E. y VALENZUELA, N. 2014. Divergent sex-specific plasticity in long-lived vertebrates with contrasting sexual dimorphism. *Evolutionary Biology* 41:81–98. Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES). *Chelonoidis carbonarius*. <https://cites.org/esp/node/20625>. Publicado 2017. Acceso 23 julio 2017.

- COLLYER, M.L. y ADAMS, D.C. 2018. RRPP: An r package for fitting linear models to high-dimensional data using residual randomization. *Methods In Ecology and Evolution*, 9: 1772 –1779.
- DJORDJEVI, S., DJURAKI, M., GOLUBOVI, A., AJTI, R., TOMOVI, L., TOMOVI, L. y BONNET, X. 2011. Sexual body size and body shape dimorphism of *Testudo hermanni* in central and eastern Serbia. *Amphibia-Reptilia*, 32: 445-458.
- 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.
- ECHEVERRY, A.M., GUZMÁN, A., STEVENSON, P. y CORTÉS-DUQUE, J. 2012. *Chelonoidis denticulata* (Linnaeus 1766). En: Páez, V. P., M. A. Morales-Betancourt, C. A. Lasso, O. V. Castaño-Mora y B. C. Bock (Editores). V. Biología y Conservación de las Tortugas Continentales de Colombia. Serie Editorial Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH). Bogotá, D. C., Colombia. 416 p.
- ECKERT, K. L., Bjorndal, K. A., Abreu-Grobois, F. A. y Donnelly, M. (Editors). 1999. Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication.4: 5.
- ENDRINGER, F., RODRIGUES, A., PEREIRA, E., BRETAS, G., DAVEL, V., DIAS, P., COUTINHO, D., UGGERE, T. y LENZ, D. 2015. A hematologic and biochemical profile on 3 month old hatchlings of *Lepidochelys olivacea*. *Comparative Clinical Pathology*. 5p.
- EWERT, M. A., JACKSON, D. R. y NELSON, C. E. 1994. Patterns of temperature-dependent sex determination in turtles. *Journal of Experimental Zoology*, 270(1): 3–15.
- EWERT, M.A., HATCHER, R.E., AND GOODE, J.M. 2004. Sex determination and ontogeny in *Malacochersus tornieri*, the pancake tortoise. *Journal of Herpetology* 38:291–295.
- GALLEGO-GARCÍA, N., CARDENAS-ARÉVALO, G. y CASTAÑO-MORA, O.V. 2012. *Chelonoidis carbonarius* (Spix 1824). En: Páez, V. P., M. A. Morales-Betancourt, C. A.

- Lasso, O. V. Castaño-Mora y B. C. Bock (Editores): 406-411. V. Biología y Conservación de las Tortugas Continentales de Colombia. Serie Editorial Recursos Hidrobiológicos y Pesqueros Continentales de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH). Bogotá, D. C., Colombia.
- GIRODONT, M. 1999. Statistical description of temperature-dependent sex determination using maximum likelihood. *Evolutionary Ecology Research* 1:479-486.
- GIRODONT, M. y KASKA, Y. 2014. A model to predict the thermal reaction norm for the embryo growth rate from field data. *Journal of Thermal Biology*. 45: 96-102.
- GÓMEZ-SALDARRIAGA C., VALENZUELA, N. y CEBALLOS, C.P. 2016. Effects of Incubation Temperature on Sex Determination in the Endangered Magdalena River Turtle, *Podocnemis lewyana*. *Chelonian Conservation and Biology*, 15(1): 43–53.
- HERNÁNDEZ, O. 1997. REPRODUCCIÓN Y CRECIMIENTO DEL MORROCOY, *Geochelone (Chelonoidis) carbonaria* (Spix, 1824) (REPTILIA, TESTUDINIDAE). *Biollania*, 13: 165-183.
- HERNÁNDEZ, P. y BOEDE, E. 2000. Efecto de la alimentación sobre el crecimiento y producción de huevos de *Geochelone (Chelonoidis) carbonaria* (SPIX,1824) bajo condiciones de cautiverio. *Acta Biológica Venezuela*, 20(2):37-43.
- HERNÁNDEZ-MONTOYA, V., PÁEZ, V. y CEBALLOS, C.P. 2017 Effects of temperature on sex determination and embryonic development in the Red-footed Tortoise, *Chelonoidis carbonarius*. *Chelonian Conservation and Biology*, 16(2): 164-171.
- INSTITUTO ALEXANDER VON HUMBOLDT, IAVH. 1998. El Bosque seco Tropical (Bs-T). Programa de Inventario de la Biodiversidad Grupo de Exploraciones y Monitoreo Ambiental GEMA en Colombia: 1.
- JANSEN, F. y PAUKSTIS, G. 1991. Environmental sex determination in reptiles: ecology, evolution, and experimental design. *The Quarterly Review of Biology*, 66(2): 149-179.
- JARAMILLO, F.J. 2009. Tamaño apropiado de muestra para obtención de conclusiones válidas en una investigación. <https://www.ceipa.edu.co/lupa/index.php/lupa/article/view/96/186>. Publicado 2009. Acceso 21 mayo 2018

- KADDOUR, K. B., MOUDEN, E. H., SLIMANI, T., BONNET, X. y LAGARDE, F. 2008. Sexual Dimorphism in the Greek Tortoise: A Test of the Body Shape Hypothesis. *Chelonian Conservation and Biology*, 7(1):21-27.
- KUCHLING, G., GOODE, E. y PRASCHAG, P. 2013. Endoscopic imaging of gonads, sex ratio and temperature-dependent sex determination in juvenile captive-bred radiated tortoises, *Astrochelys radiata*. *Chelonian Research Monographs*, 6:113 -118.
- MYERS, E.M., TUCKER, J.K y CHANDLER, C.H. 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.
- MORALES-BETANCOUR, M., LASO, C., PÁEZ, B. y BOCK, B. (Ed). 2015. Libro Rojo de Reptiles de Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH), Universidad de Antioquia. Bogotá, D.C., Colombia:258.
- MONSINJON, J., JRIBI, I., HAMZA, A., OUERGHI, A., KASKA, Y. y GIRONDOT, M. 2017. *Chelonian Conservation and Biology*, 16 (2): 172 -179.
- PÁEZ, V.P., CORREA, J.C., CANO, A.M. y BOCK, B.C. 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*, 4:698–704.
- PRITCHARD, P.C y TREABBAU, P. 1984. The turtles of Venezuela. Contribution to Herpetology, Number 2. Society for the Study of Amphibians and Reptiles: 468.
- Resolución 1912 de 2017. Diario Oficial No 50.364 de 22 de septiembre de 2017. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Colombia.
- RHODIN, A., IVERSON, J., BOUR, R., FRITZ, U., GEORGES, A., SHAFFER, H. y VAN DIJK, P. 2017. Turtles of the world Annotated Checklist and Atlas of Taxonomy, Synonymy, Distribution, and conservation Status (8th Ed.). *Chelonian Research Monographs*, Number 7. Published by Chelonian Research Foundation and Turtle Conservancy in association with IUCN/SSC Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group, Turtle Conservation Fund, Global Wildlife Conservation, Conservation

International, and International Union for Conservation of Nature / species Survival Commission Turtle Taxonomy Working Group.

RHODIN, A., STANFORD, C., VAN DIJK, P.P., EISEMBERG, C., LUISELLI, L., MITTERMEIER, R., HUDSON, R., HORNE, B., GOODE, E., KUCHLING, G., WALDE, A., BAARD, E., BERRY, K., BERTOLERO, A., BLANCK, T., BOUR, R., BUHLMANN, K., CAYOT, L., COLLETT, S., CURRYLOW, S., DAS, I., DIAGNE, T., ENNEN, J., FORERO-MEDINA, G., FRANKEL, M., FRITZ, U., GARCÍA, G., GIBBONS, J., GIBBONS, P., SHIPING, G., GUNTORO, J., HOFMEYR, M., IVERSON, J., KIESTER, A., LAU, M., LAWSON, D., LOVICH, J., MOLL, E., PÁEZ, V., PALOMO-RAMOS, R., PLATT, PLATT, S., PRITCHARD, P., QUINN, H., RAHMAN, S.C., RANDRIANJAFIZANAKA, S.T., SCHAFFER, J., SELMAN, W., SHAFFER, H.B., SHARMA, D., HAITAO, S., SINGH, S., SPENCER, R., STANNARD, K., SUTCLIFFE, S., THOMSON, S. y VOGT, R. 2018. Global Conservation Status of Turtles and Tortoises (Order Testudines). *Chelonian Conservation and Biology*, 17(2): 135–161.

ROHLF, F.J. 2015. The tps series of software. *Hystrix*, 26 (1):1-4p.

ROHLF, F. J. y SLICE, D.1990. Extensions of the procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology*, 39(1): 40–59.

ROMITO, M. L., PARACHÚ, M. V. y IMHOF, A. 2015. Growth and reproduction of *Chelonoidis chilensis* (REPTILIA, TESTUDINIDAE) in captivity. *Scientia Interfluvius* 6 (1-2): 64-73.

SPOTILA, J.R., ZIMMERMAN, L.C., BINCKLEY, C.A., GRUMBLES, J.S., ROSTAL, .C., LIST, A., JR., BEYER, E.C., PHILLIPS, K.M. y KEMP, S.J. 1994. Effects of incubation conditions on sex determination, hatching success, and growth of hatchling desert tortoises, *Gopherus agassizii*. *Herpetological Monographs* 8:103–116.

THE TREE OF SEX CONSORTIUM. 2014. Data from: Tree of sex: a database of sexual 407 systems. Dryad Data Repository.

VALENZUELA, N., ADAMS, D., BOWDEN, R. y GAUGER, A. 2004. Geometric Morphometric Sex Estimation for Hatchling Turtles: A Powerful Alternative for Detecting Subtle Sexual Shape Dimorphism. *Copeia*, 4: 735-742.

- VARGAS-RAMIRÉZ, M., MARAN, J. y FRITZ, U. 2010. Red And yellow-footed tortoises, *Chelonoidis carbonaria* and *C. denticulata* (Reptilia: Testudines: Testudinidae), in South American savannahs and forest: do their phylogeographies reflect distinct habitats? *Organisms Diversity & Evolution*, 10: 161-172.
- WANG, E., DONATTI, C., FERREIRA, V., RAIZER, J. y HIMMELSTEIN, J. 2011. Food habits and notes on the biology of *Chelonoidis carbonaria* (SPIX 1824) (TESTUDINIDAE, CHELONIA) in the southern pantanal, Brazil. *South American Journal of Herpetology*, 6: 11-19.
- WILLEMSEN, R.E. y HAILEY, A. 2003. Sexual dimorphism of body size and shell shape in European tortoises. *The Zoological Society of London Printed in the United Kingdom*, 260: 353–365.

Tablas

Tabla 1. Promedios del peso (g) y medidas lineales corporales (mm y cm) de *Chelonoidis carbonarius* a diferentes edades, y discriminado por temperatura de incubación. Abreviaturas: LRC = Largo recto caparazón, ARC = Ancho recto caparazón, AltoC = Alto caparazón, LCC = Largo curvo caparazón, ACC = Ancho curvo caparazón y LCP = Largo curvo plastrón. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre temperaturas, letras iguales indican que no existen diferencias.

	Peso g	LRC Mm	ARC mm	LRP Mm	AltoC mm	LCC cm	ACC cm	LCP Cm
7 días								
24°C	42.01 ± 9.27 ^a	55.19 ± 5.05 ^a	45.87 ± 3.72 ^a	48.08 ± 4.34 ^a	28.69 ± 2.11 ^a	6.56 ± 0.68 ^a	7.04 ± 0.68 ^a	4.94 ± 0.47 ^a
26°C	39.15 ± 5.62 ^a	52.81 ± 3.20 ^a	44.91 ± 2.60 ^a	46.49 ± 3.55 ^a	28.63 ± 1.39 ^a	6.49 ± 0.34 ^a	7.13 ± 0.41 ^a	4.73 ± 0.37 ^a
28°C	38.64 ± 6.42 ^a	52.28 ± 3.52 ^a	44.01 ± 2.65 ^a	46.27 ± 2.89 ^a	29.17 ± 1.39 ^a	6.50 ± 0.30 ^a	7.07 ± 0.46 ^a	4.98 ± 0.47 ^a
1 mes								
24°C	50.5 ± 7.27 ^a	59.93 ± 4.00 ^a	50.21 ± 3.03 ^a	53.25 ± 2.92 ^a	30.40 ± 1.45 ^a	7.22 ± 0.47 ^a	7.68 ± 0.52 ^a	5.36 ± 0.26 ^a
26°C	48.93 ± 11.04 ^a	58.81 ± 5.25 ^a	48.83 ± 4.18 ^a	51.41 ± 4.95 ^a	30.35 ± 1.76 ^a	7.10 ± 0.65 ^a	7.63 ± 0.59 ^a	5.28 ± 0.55 ^a
28°C	45.53 ± 8.15 ^a	57.30 ± 3.86 ^a	47.27 ± 3.06 ^a	50.33 ± 3.42 ^a	29.53 ± 1.69 ^a	7.09 ± 0.48 ^a	7.49 ± 0.57 ^a	5.26 ± 0.41 ^a
2 meses								
24°C	53.38 ± 6.67 ^a	62.42 ± 2.85 ^a	51.50 ± 2.12 ^a	54.51 ± 2.27 ^a	31.52 ± 1.29 ^a	7.52 ± 0.36 ^a	7.92 ± 0.39 ^a	5.54 ± 0.25 ^a
26°C	59.10 ± 12.32 ^a	64.10 ± 4.97 ^a	53.05 ± 3.60 ^a	52.64 ± 9.29 ^a	31.68 ± 2.06 ^a	7.83 ± 0.58 ^a	8.37 ± 0.58 ^a	5.83 ± 0.49 ^a
28°C	55.23 ± 11.58 ^a	62.91 ± 4.95 ^a	51.54 ± 3.50 ^a	54.97 ± 3.85 ^a	31.47 ± 1.83 ^a	7.61 ± 0.57 ^a	8.17 ± 0.60 ^a	5.67 ± 0.50 ^a
3 meses								
24°C	56.73 ± 8.70 ^a	64.85 ± 2.79 ^a	53.08 ± 2.73 ^a	55.97 ± 3.00 ^a	32.27 ± 1.55 ^a	7.76 ± 0.49 ^a	8.15 ± 0.48 ^a	5.60 ± 0.32 ^a

26°C	63.07 ± 13.19 ^a	66.77 ± 4.91 ^a	54.84 ± 3.89 ^a	57.63 ± 4.60 ^a	33.10 ± 1.99 ^a	8.10 ± 0.64 ^a	8.62 ± 0.68 ^b	5.88 ± 0.53 ^a
28°C	63.23 ± 12.92 ^a	66.19 ± 4.99 ^a	53.77 ± 3.63 ^a	57.21 ± 4.38 ^a	32.60 ± 2.26 ^a	8.11 ± 0.60 ^a	8.56 ± 0.68 ^{ab}	5.89 ± 0.49 ^a
4 meses								
24°C	56.79 ± 8.89 ^a	64.82 ± 2.85 ^a	53.09 ± 2.80 ^a	56.01 ± 3.06 ^a	32.32 ± 1.57 ^a	7.75 ± 0.49 ^a	8.17 ± 0.47 ^a	5.60 ± 0.33 ^a
26°C	63.067 ± 13.19 ^a	66.77 ± 4.91 ^a	54.84 ± 3.89 ^a	57.63 ± 4.60 ^a	33.10 ± 1.99 ^a	8.10 ± 0.64 ^a	8.62 ± 0.68 ^a	5.88 ± 0.53 ^a
28°C	63.23 ± 12.92 ^a	66.19 ± 4.99 ^a	53.77 ± 3.63 ^a	57.21 ± 4.38 ^a	32.60 ± 2.26 ^a	8.11 ± 0.60 ^a	8.56 ± 0.68 ^a	5.89 ± 0.49 ^a
5 meses								
24°C	57.48 ±12.90 ^a	65.90 ± 5.06	54.56 ± 4.00	56.96 ± 4.90	32.23 ± 2.24 ^a	8.09 ± 0.60	8.41 ± 0.68 ^a	5.86 ± 0.48 ^a
26°C	63.7 ± 15.80 ^b	68.14 ± 5.22	55.51 ± 4.02	58.47 ± 4.50	33.09 ± 2.25 ^{ab}	8.33 ± 0.70	8.71 ± 0.68 ^{ab}	6.01 ± 0.48 ^a
28°C	67.95 ± 12.46 ^b	69.01 ± 4.36	56.05 ± 3.02	59.60 ± 3.56	33.98 ± 2.38 ^b	8.49 ± 0.52	8.95 ± 0.58 ^b	6.07 ± 0.36 ^a
6 meses								
24°C	54.97 ± 8.81 ^a	65.71 ± 3.15 ^a	54.07 ± 2.60 ^a	56.50 ± 3.09 ^a	31.94 ± 1.54 ^a	8.08 ± 0.50 ^a	8.38 ± 0.51 ^a	5.85 ± 0.39 ^a
26°C	65.92 ± 13.13 ^a	68.50 ± 4.82 ^{ab}	56.06 ± 3.60 ^a	58.84 ± 4.53 ^{ab}	33.124 ± 2.08 ^{ab}	8.40 ± 0.56 ^{ab}	8.87 ± 0.55 ^{ab}	6.04 ± 0.48 ^a
28°C	66.53 ± 14.49 ^a	69.62 ± 4.48 ^b	56.28 ± 3.34 ^a	60.12 ± 4.13 ^b	33.91 ± 2.51 ^b	8.57 ± 0.59 ^b	9.10 ± 0.59 ^b	6.15 ± 0.43 ^a

Tabla 2. Desarrollo embrionario y éxito de eclosión de los huevos de *Chelonoidis carbonarius* obtenidos en este estudio discriminando por temperatura de incubación.

	24°C (n = 54)	26°C (n = 55)	28°C (n = 51)	Total (n = 160)
Huevos con signos de desarrollo embrionario	n = 49 (90,7%)	n = 45 (81,8%)	n = 40 (78,4%)	n = 134 (83,7%)
Huevos que eclosionaron	n = 27 (55,1%)	n = 24 (53,3%)	n = 24 (60%)	n = 75 (55,9%)

Tabla 3. Análisis de varianza de la forma del plastrón en función del sexo y de la madre.

	GL	SC	MS	R ²	F	Z	P
Plastrón, 7 días:							
Sexo	1	0.004	0.004	0.131	3.360	2.816	0.005*
Madre	14	0.016	0.001	0.519	0.951	-0.299	0.618
Residuales	9	0.011	0.001	0.351			
Total	24	0.031					
Plastrón, 1 mes:							
Sexo	1	0.001	0.001	0.042	1.004	0.198	0.401
Madre	14	0.015	0.001	0.577	0.974	-0.142	0.555
Residuales	9	0.010	0.001	0.381			
Total	24	0.025					
Plastrón, 2 meses							
Sexo	1	0.001	0.001	0.040	0.803	-0.227	0.570
Madre	14	0.013	0.001	0.507	0.721	-1.345	0.907
Residuales	9	0.012	0.001	0.452			
Total	24	0.026					
Plastrón, 3 meses							
Sexo	1	0.001	0.001	0.044	0.854	-0.094	0.521
Madre	13	0.013	0.001	0.494	0.739	-1.090	0.856
Residuales	9	0.012	0.001	0.462			
Total	23	0.026					
Plastrón, 4 meses							
Sexo	1	0.001	0.001	0.035	0.673	-0.544	0.694
Madre	12	0.012	0.001	0.491	0.776	-0.931	0.819
Residuales	9	0.011	0.001	0.474			
Total	22	0.024					
Plastrón, 5 meses							
Sexo	1	0.001	0.001	0.025	0.409	-1.457	0.938
Madre	11	0.011	0.001	0.488	0.729	-1.077	0.851
Residuales	8	0.011	0.001	0.487			
Total	20	0.022					

* Significativo

Tabla 4. Análisis de varianza de la forma de la muesca anal en función del sexo y de la madre.

	GL	SC	MS	R ²	F	Z	P
Plastrón, 7 días							
Sexo	1	0.006	0.006	0.098	2467.00	1675.00	0.042*
Madre	14	0.033	0.002	0.541	0.968	-0.168	0.565
Residuales	9	0.022	0.002	0.359			
Total	24	0.062					
Plastrón, 1 mes							
Sexo	1	0.005	0.005	0.079	2603.00	1750.00	0.035*
Madre	14	0.041	0.003	0.644	1499.00	1630.00	0.519
Residuales	9	0.017	0.002	0.276			
Total	24	0.064					
Plastrón, 2 meses							
Sexo	1	0.005	0.005	0.079	2603.00	1750.00	0.035*
Madre	14	0.041	0.003	0.644	1499.00	1630.00	0.519
Residuales	9	0.017	0.002	0.276			
Total	24	0.064					
Plastrón, 3 meses							
Sexo	1	0.004	0.004	0.060	1605.00	0.988	0.167
Madre	13	0.036	0.003	0.601	1231.00	0.734	0.239
Residuales	9	0.020	0.002	0.338			
Total	23	0.059					
Plastrón, 4 meses							
Sexo	1	0.005	0.005	0.073	22174.00	14074.00	0.077
Madre	12	0.039	0.003	0.631	15995.00	16129.00	0.054
Residuales	9	0.018	0.002	0.296			
Total	22	0.062					
Plastrón, 5 meses							
Sexo	1	0.003	0.003	0.046	12926.00	0.605	0.287
Madre	11	0.037	0.003	0.672	17335.00	157083.00	0.059
Residuales	8	0.016	0.002	0.282			
Total	20	0.055					

Tabla 5. Análisis de varianza de la forma del plastrón en función de la temperatura.

	GL	SC	MS	R ²	F	Z	P
Plastrón, 7 días							
Temperatura	1	0.001	0.001	0.009	0.666	-0.786	0.790
Residuos	70	0.092	0.001	0.991			
Total	71	0.093					
Plastrón, 1 mes							
Temperatura	1	0.003	0.003	0.036	2.581	2.452	0.014*
Residuos	70	0.076	0.001	0.964			
Total	71	0.079					
Plastrón, 2 meses							
Temperatura	1	0.001	0.001	0.010	0.725	-0.551	0.715
Residuos	69	0.071	0.001	0.990			
Total	70	0.071					
Plastrón, 3 meses							
Temperatura	1	0.006	0.006	0.091	6.796	4.560	0.001*
Residuos	68	0.064	0.001	0.909			
Total	69	0.070					
Plastrón, 4 meses							
Temperatura	1	0.001321	0.0013207	0.01953	1.3347	0.86743	0.183
Residuos	67	0.066301	0.0009896	0.98047			
Total	68	0.067621					
Plastrón, 5 meses							
Temperatura	1	0.005941	0.0059413	0.09011	6.4372	4.4518	0.001*
Residuos	65	0.059993	0.000923	0.90989			
Total	66	0.065934					

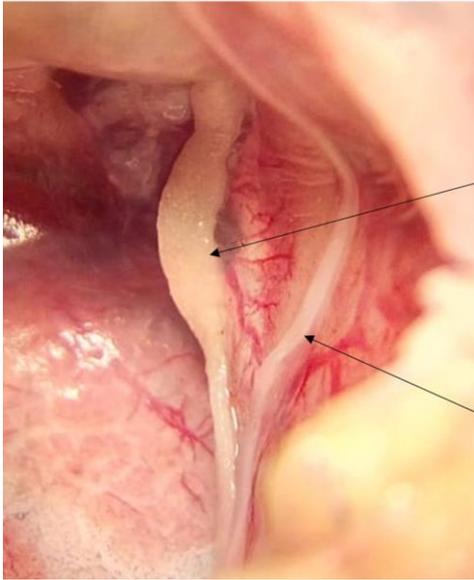
Tabla 6. Análisis de varianza de la forma de la muesca anal en función de la temperatura.

	GL	SC	MS	R ²	F	Z	P
Muesca anal, 7 días							
Temperatura	1	0.010	0.010	0.051	3.792	2.370	0.010*
Residuos	70	0.179	0.003	0.949			
Total	71	0.189					
Muesca anal, 1 mes							
Temperatura	1	0.008	0.008	0.040	2.918	2.013	0.017*
Residuos	70	0.181	0.003	0.960			
Total	71	0.188					
Muesca anal, 2 meses							
Temperatura	1	0.003	0.003	0.017	1.198	0.558	0.307
Residuos	69	0.184	0.003	0.983			
Total	70	0.187					
Muesca anal, 3 meses							
Temperatura	1	0.004	0.004	0.021	1.458	0.873	0.204
Residuos	68	0.178	0.003	0.979			
Total	69	0.182					
Muesca anal, 4 meses							
Temperatura	1	0.007691	0.007691	0.03968	2.7686	1.8889	0.021
Residuos	67	0.186126	0.002778	0.96032			
Total	68	0.193818					
Muesca anal, 5 meses							
Temperatura	1	0.004285	0.004285	0.02477	1.6509	1.0653	0.149
Residuos	65	0.168730	0.002595	0.97523			
Total	66	0.173015					

Figuras

Figura 1. Fotografías de ovario (izquierda) y testículo (derecha), obtenida durante necropsia a través de estereoscopio.

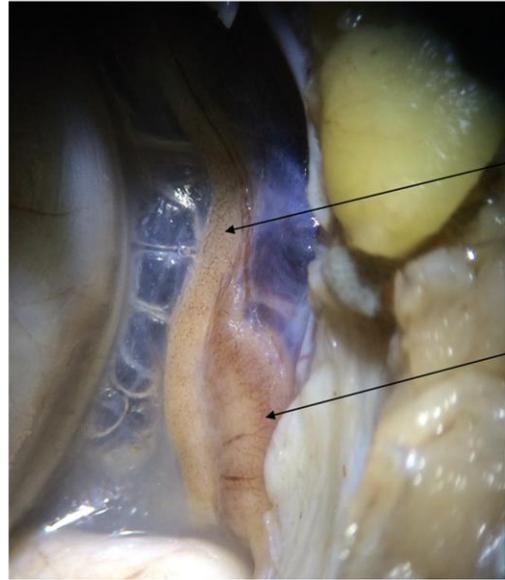
H3: Individuo de 28°C, 6 meses
Peso: 94,6gr



Ovario
Presenta folículos
Sin irrigación

Oviducto
Bien
desarrollado,
delgado y
alargado.

J5: Individuo de 26°C, 5 meses
Peso: 99,2gr



Testículo
Con irrigación.
no hay
presencia de
oviducto

Riñón

Figura 2. Localización de puntos de referencia fijos (puntos negros) y deslizantes (puntos blancos) en el plastrón (izquierda) y muesca anal (derecha) de tortugas morrocoy de patas rojas (*Chelonoidis carbonarius*).

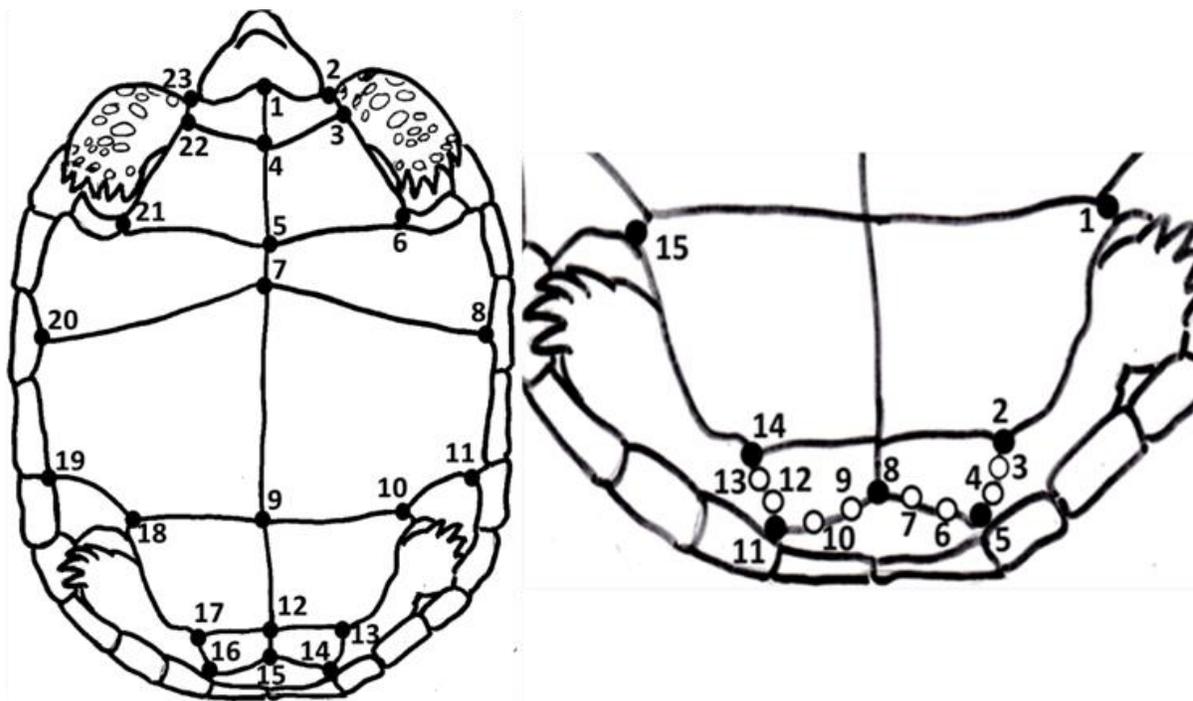


Figura 3. Norma de reacción térmica para *Chelonoidis carbonarius* estimada teniendo en cuenta los tratamientos 24, 26 y 28°C (a) y adicionando la información obtenida por Hernández- Montoya et al. 2017 a los 29°C (b).

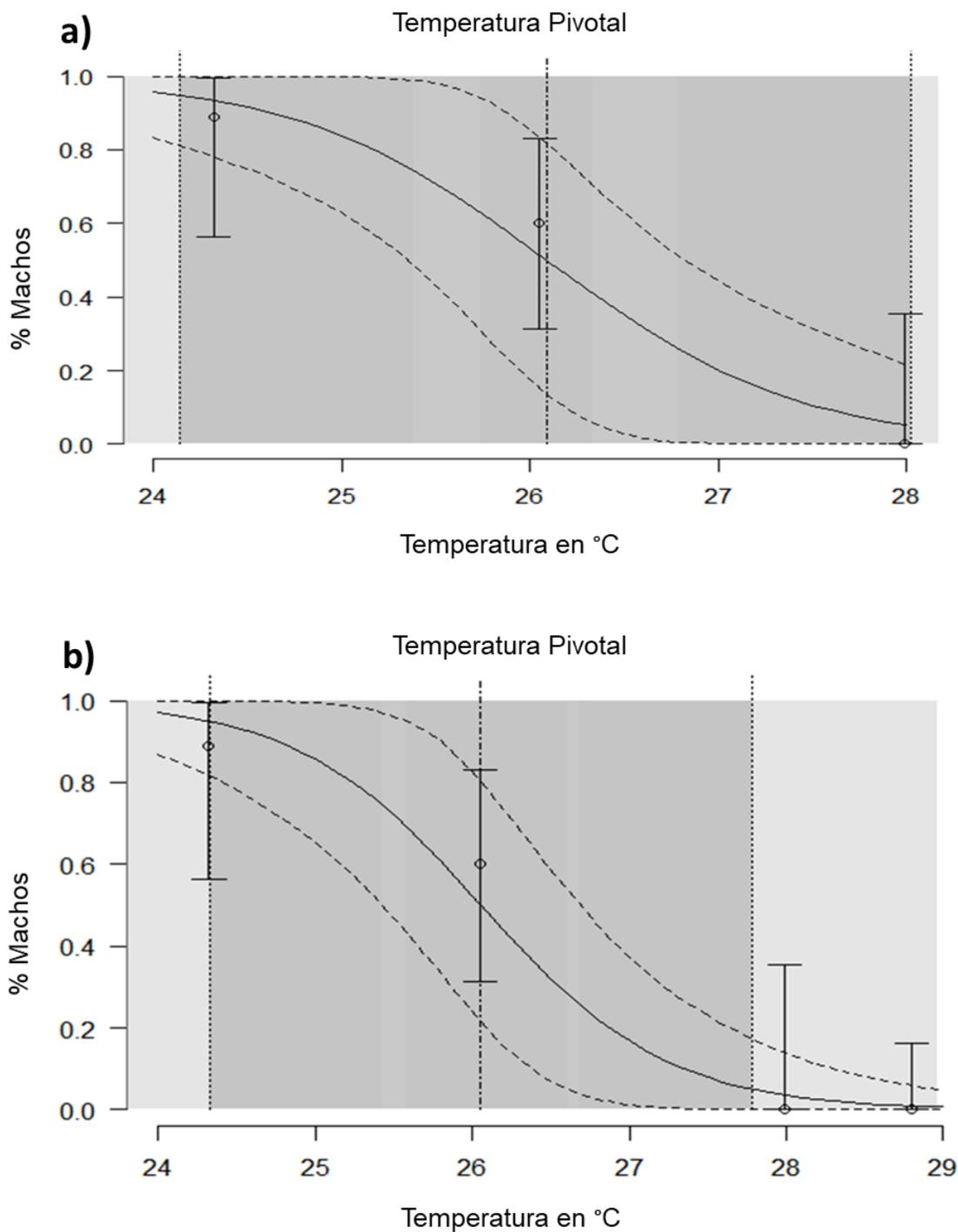
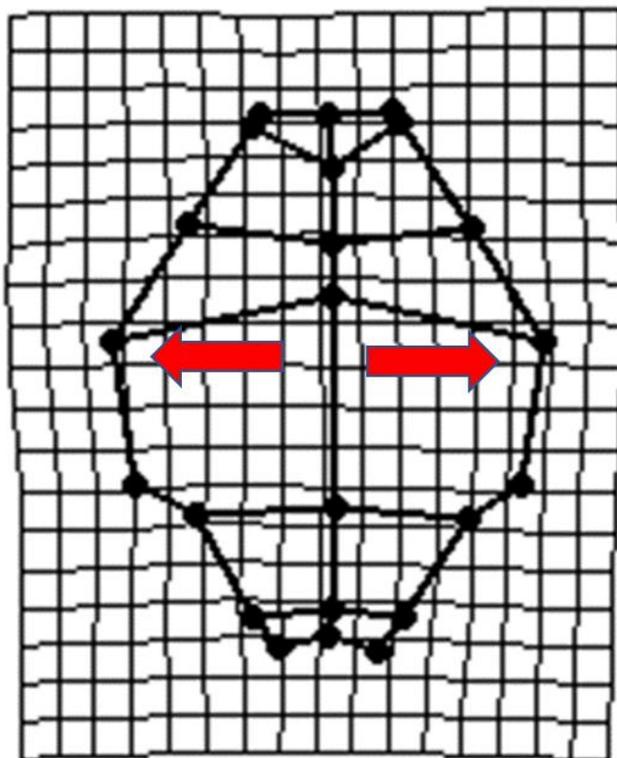


Figura 4. Ilustraciones de la forma promedio del plastrón de machos y hembras a los 7 días, con una magnificación 2 veces su tamaño normal (2x). Los machos tienen una amplitud mayor en la zona pectoral y las hembras presentan mayor amplitud en la zona pélvica.

Machos, 7 días, 2x



Hembras, 7 días, 2x

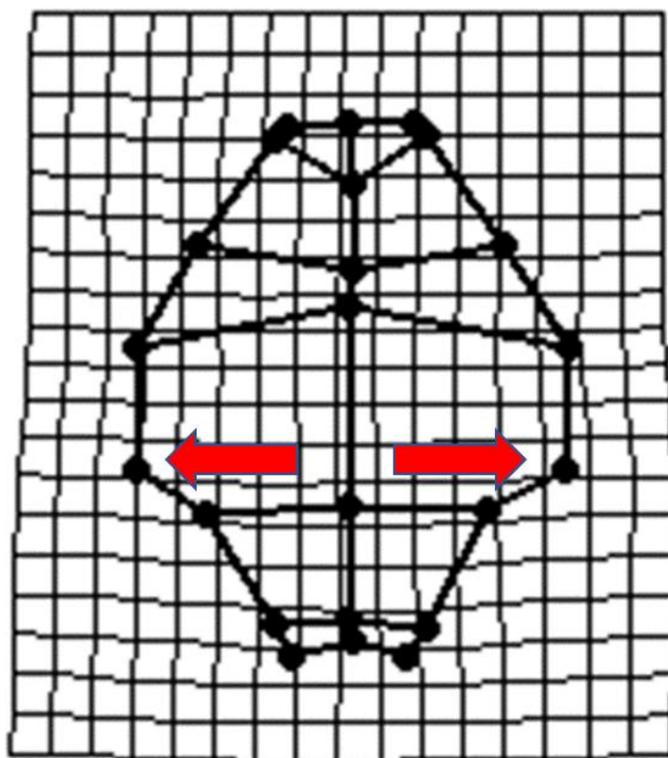
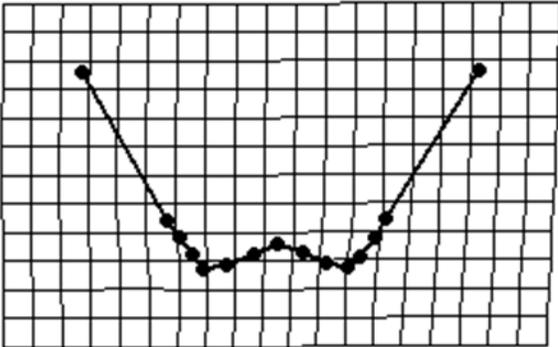
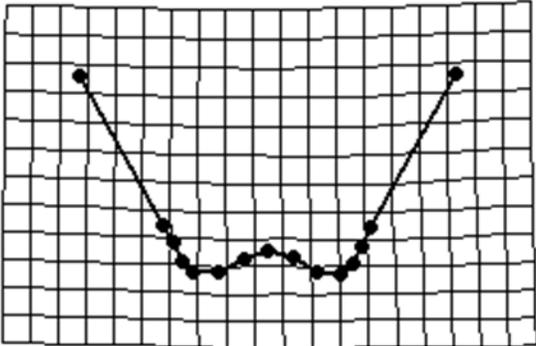


Figura 5. Ilustraciones de la forma promedio de la muesca anal de machos y hembras a los 7 días, 1 mes y 2 mes, con una magnificación 2 veces su tamaño normal (2x). Las hembras tienen una muesca anal más angosta relativo a los machos.

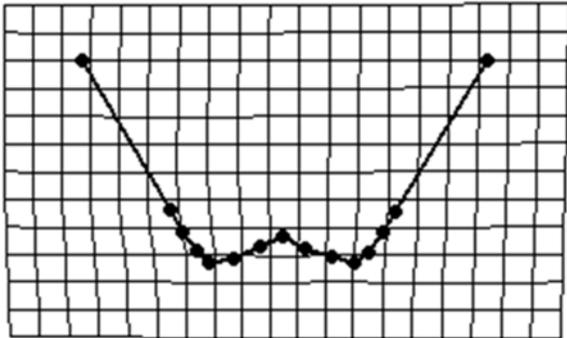
Macho, 7 días, 2x



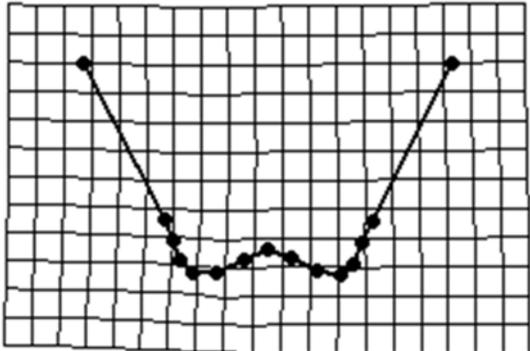
Hembra, 7 días, 2x



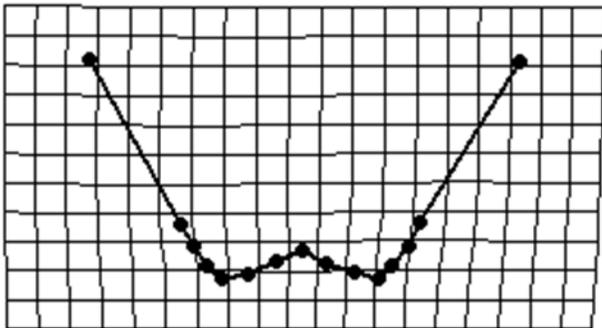
Macho, 1 mes, 2x



Hembra, 1 mes, 2x



Machos, 2 meses, 2x



Hembra, 2 meses, 2x



11. Anexos

Anexo 1. Reglamento de la revista *Chelonian Conservation and Biology* (CCB) en su idioma original (inglés), donde va a ser sometido el artículo producto del trabajo de investigación.

CCB INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Manuscripts prepared without careful attention to journal format will be returned without review for reformatting. Authors who seek to publish in *Chelonian Conservation and Biology* must adhere to the instructions below. Also, please note that for authors with access to institutional funds, CCB charges \$100 per journal page for each published article. The Foundation depends on the payment of page charges to offset the cost of publication. Authors wishing to have page charges discounted or waived should make such requests at the time of initial manuscript submission.

Open Access: Open access charges for CCB articles are \$1,500 for articles that are 1–4 published pages and \$2,000 for articles that are 5 or more published pages. Page charges are waived for all authors paying for open access; additional charges, e.g., color figures and excessive page proof changes, are the financial responsibility of the authors. Journal articles are posted at CRF Online Journals (www.chelonianjournals.org) and BioOne (www.bioone.org). Whereas page charges are billed after publication, open access fees will be billed prior to publication and the article will be made open access after payment has been processed. Articles published open access in CCB will be published under a Creative Commons CC-BY-NC-SA license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), which means the article may be reused with proper attribution for non-commercial use. Any remix or transformed version of the content must be distributed under the same license as the original.

Submission: Submit manuscripts via email to CCB Executive Editor Jeffrey Seminoff (ccbjournal@gmail.com).

Manuscript File: Only electronic submissions will be considered for publication. Manuscripts should be submitted as Microsoft Word files via email attachment; please do not mail printed copies of the manuscript.

Copyright: It is a prerequisite that submitted manuscripts have not been published elsewhere and are not simultaneously submitted to other journals. By submitting a manuscript, the authors agree that the copyright for their article is transferred to the publisher (except for employees of the United States Government) if and when the article is accepted for publication. All submissions must be accompanied by a filled out and signed copy of the Copyright Assignment and Author Disclosure Form. This form can be downloaded from the journal website:

http://www.chelonianjournals.org/page/author_instructions

Contact Information: Each manuscript must include full names and complete addresses (including email address) of all authors, in addition to the phone and fax numbers of the senior or designated corresponding author.

Language: Contributions are acceptable in English only, but at the author's discretion may include a pertinent foreign language translation of the Abstract as a summary following the article. Articles with numerous English spelling and/or grammatical errors will be promptly returned to authors and not considered for publication.

Species Names: Common names should not be capitalized, and are not required to follow any standardized naming conventions (e.g., U.S. herpetological associations' "official" common names); they should represent common usage in the area of study (local vernacular names are acceptable) and/or be given in English as a reasonably commonly used name (see <http://www.iucn-tftsg.org/checklist/>). Scientific names are required and should follow the most recent checklist published by the Turtle Taxonomy Working Group of the IUCN Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group (<http://www.iucn-tftsg.org/checklist/>). Should an author wish to use a scientific name that is different from the name in the checklist, a footnote at first usage should briefly indicate the rationale for the different usage, with supporting citations where appropriate.

Formatting: All manuscript pages must be numbered and double-spaced, including text, literature cited, tables, and figure legends. All text lines must be left justified and numbered to facilitate the review process. All text font must be in 12 pt. Times or Times New Roman. All figures must use a sans serif font for all figure text (e.g., Arial). Statistical Notation: Preferred common statistical notation includes n , p , t , r , F , and χ^2 . For the last two, degrees of freedom should be indicated with subscript numbers, e.g., $F_{3,18} = 3.48$ and $\chi^2_{23} = 4.51$. Mean values can be preceded by “mean = ” or “ $\bar{x} =$ ”.

Abbreviations: Standard abbreviations should be used for common metric measurements (e.g., mm, cm, m, km, g, kg, ml, l, m², ha) and the following units of time: sec (seconds), min (minutes), hrs (hours, including time of day, e.g., 0900 hrs), and yrs (years).

Sections and Headings for Articles: Full-length Articles must be accompanied by a detailed Abstract and a list of Key Words to summarize the results and conclusions, and must be separated into logical sections, such as Introduction (no heading), Methods, Results, Discussion, Acknowledgments, and Literature Cited. Additional or different sections or subheadings may be utilized as applicable at the discretion of the author. Articles are generally more than 5000 words. Headings should be centered and boldface in ALL CAPS (except Acknowledgments, which should be in SMALL CAPS). Subheadings should be indented, italicized, and followed by a period and an em dash (—), with spaces before and after the em dash.

Shorter Contributions: Notes, Field Reports, Commentaries, and Reviews must be accompanied by a short 2–3 sentence Abstract (but no Key Words) and may or may not be separated into sections (see previous item) as necessary. These submissions are generally fewer than 4000 words. The Editors reserve the right to designate individual contributions as either an Article or a Note.

Accents and Diacritical Marks: Careful attention should be paid to accents and diacritical marks on foreign words, both in the text of a contribution and in foreign-language citations in the Literature Cited section.

Acknowledgments: Acknowledgments should be brief. Funding agencies should be listed, as appropriate. If permits were necessary for the study, the permit numbers must be cited with reference to the issuing agency. For studies that required surgery, anesthesia, or unusual or invasive manipulation of study animals, authors must provide acknowledgment that appropriate Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) approval (or similar local ethical approval in foreign countries) was granted along with details of the institution providing authorization. Failure to do so will necessitate editorial rejection of the submission without additional review.

Animal Welfare Policy and Permitting: All manuscripts that report on studies of live animals must include the appropriate information on their ethical treatment of animals as per guidelines recognized by a major scientific society (e.g., <http://www.asih.org/sites/default/files/documents/resources/guidelinesherpsresearch2004.pdf>) and/or as prescribed after formal review by an Institutional Animal Care and Use Committee or IACUC. Manuscripts that do not fully document adherence to norms of animal welfare will be rejected. In addition, the Acknowledgments section must include the numbers of all collection or research permits required at the study location, export and import permits needed to move specimens across country borders, and IACUC approval for the care of animals and study procedures used. Submitted studies that deviate from acceptable practices will be rejected.

Tables, Figures, and Appendices: Each table, each figure, and each appendix should appear on a separate page embedded in the Word file following the Literature Cited. Captions for tables and appendices should appear above and captions for figures should appear below. Figure captions for photos should include designation of the photographer. Text footnotes are not acceptable except as necessary in Tables and under “Species Names” above.

Figures for Publication: Line drawings and photographs should be submitted as electronic .jpg or .tif files. Low-resolution files may be submitted initially, although higher-resolution files will be required for final acceptance.

Color Photo and Figure Costs: Requests for the use of color photos in individual articles are encouraged if authors agree to absorb the actual costs involved, currently \$600 for the first color figure and \$450 for each additional color figure in the hard-copy version; color figures in the PDF version are \$75 per figure.

Cover Photograph: Authors are encouraged to submit high-quality color digital photos of their study species to be considered for the journal cover photo. One illustration per issue will often be chosen for the cover color photograph. The photo chosen for the cover illustration need not be identical to a formal illustration from an article, but may simply represent an unusually attractive or interesting photo of the species in question.

In-Text Citations: All articles must be fully referenced and citations in a string must be chronological and separated by semicolons: (Williams 1950; Carr et al. 1974; Wermuth and Mertens 1977). Authors' first names in the Literature Cited section should only be given as initials. Multiple citations by the same author should be separated by a comma rather than a semicolon: (e.g., Williams 1950, 1957; Ernst 1971a, 1971b).

Literature Cited: Citation format for references should be as follows, providing full journal citations without abbreviations and authors names and initials in the SMALL CAPS (not ALL CAPS) font. A hanging indent should be used without extra line spaces between citations. Multiple citations to the works of a single author should be spelled out in full each time, i.e., a line should not replace the author's name in the second and subsequent citations. All authors' names, including second and subsequent authors, are given last name first, then initials. An en dash (–) is used to separate page numbers, issue numbers are not included for consecutively numbered volumes of periodicals, and there are no spaces in the volume number and page number portion of a cited journal article. Citations

with two or more authors have all authors listed last name first and separated by commas: DODD, C.K., JR., FRANZ, R., AND SMITH, L.L. 2012. Title. Reference. There is no comma following the first author's initials for a citation with two authors: SOUZA, F.L. AND ABE, A.S. 1995. Journal article: GAFFNEY, E.S. 1979. Comparative cranial morphology of recent and fossil turtles. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 164:65–376. Book: COGGER, H.G. 1975. *Reptiles and Amphibians of Australia*. Sydney: A.H. and A.W. Reed, 660 pp. Chapter in an edited volume: PRITCHARD, P.C.H. 1979. Taxonomy, evolution, and zoogeography. In: Harless, M. and Morlock, H. (Eds.). *Turtles: Perspectives and Research*. New York: John Wiley and Sons, pp. 1–42. Thesis or dissertation: LAHANAS, P.N. 1982. Aspects of the life history of the southern black-knobbed sawback, *Graptemys nigrinoda delticola*. MS Thesis, Auburn University, Auburn, AL. Web page: IUCN RED LIST OF THREATENED SPECIES. 7 July 2007. Loggerhead turtle (*Caretta caretta*). <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/4615/0> (11 October 2009). Unpublished Report: MORTIMER, J.A. 1990. Recommendations for the management of the green turtle (*Chelonia mydas*) population nesting at the Turtle Islands of Sarawak. WWF Report, 25 pp.

Submission of Revised Manuscript: Authors receiving notification of acceptance, or those being invited to submit a revised manuscript for additional review have 3 months (90 days) to submit their revised manuscripts. If not submitted within this time frame, manuscripts may be subject to re-enter the review pool and be treated as a new submission.

Revisions: Revisions should not be made in proofs; more than five changes in proofs other than correction of printer's and editor's errors will be charged to authors at the rate of \$5.00 per correction. Authors are invoiced for line charges and figure remakes; until invoices are paid, subsequent manuscripts from delinquent authors will not be considered for review in any Allen Press publication.

Submission of Final Accepted Manuscript: Authors submitting final accepted manuscripts are requested to submit all text components in a single .doc or .docx file. All figures must be submitted as individual .jpg or .tif files of at least 300 dpi resolution.

Printing Costs: There is a US\$100 charge per printed page that will be invoiced to authors as soon as the article appears on the website as 'on-line first' or published in the print version.

AUTHORS WHO WISH TO HAVE PAGE CHARGES DISCOUNTED OR WAIVED SHOULD MAKE SUCH REQUESTS AT THE TIME OF MANUSCRIPT SUBMISSION.

Instructions Revised December 2017