



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**¿Son *Kinosternon scorpioides* y
Kinosternon leucostomum (Testudines:
Kinosternidae) complejos de especies?:
Evaluación usando marcadores
mitocondriales y nucleares y un amplio
muestreo geográfico**

Jhon Sebastián Briceño-Zea

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Biología
Bogotá, Colombia
2022

¿Son *Kinosternon scorpioides* y *Kinosternon leucostomum* (Testudines: Kinosternidae) complejos de especies?: Evaluación usando marcadores mitocondriales y nucleares y un amplio muestreo geográfico

Jhon Sebastián Briceño-Zea

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias - Biología

Director:
Mario Vargas-Ramírez. Ph.D.
Profesor Asistente
Instituto de Genética

Grupo de Investigación:
Grupo Biodiversidad y Conservación Genética

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Área curricular de Biología
Bogotá, Colombia
2022

” ...Amor para la mama, amor para la chamba, y paz para el que se fue.

Salud por esta grada, por el que está o estaba, gracias por su acto de fe...”

Uno – Ali A.K.A. Mind

Agradecimientos

- A la vida, que ante las dificultades siempre se ha mostrado flexible.
- A mis padres, por darme la vida y el apoyo en cada etapa de esta.
- A mi hermano, por guiarme y aconsejarme a lo largo de este camino.
- Al profesor Mario Vargas-Ramírez, que ha sido el guía en este largo proceso, quien no perdió la confianza en mí aún en los momentos más duros; y su grupo de investigación, que me acogió con calidez recién empezando mi camino científico.
- A todos los profesores que me acompañaron durante mi proceso formativo, algunos de los cuales hoy ya no están físicamente, pero sí a través de un enorme legado académico y personal.
- A mis compañeros y compañeras de vida, quienes aún están y quienes ya se fueron, pero que han hecho parte importante de lo que soy.

Resumen

El desarrollo de investigaciones en sistemática molecular (i.e. genética de poblaciones, filogenética y filogeografía) se ha beneficiado del avance en las técnicas de secuenciación recientes, las cuales ofrecen la posibilidad de obtener secuencias de ADN de manera económica y rápida. El análisis adecuado de estas secuencias enmarcado en disciplinas como la filogenética molecular y la filogeografía, han incrementado el conocimiento acerca de las relaciones evolutivas de linajes genéticos a nivel intra e interespecíficos, patrones de distribución geográfica de dichos linajes, e identificación de posibles procesos que formaron estos patrones. Adicionalmente, estos análisis se han convertido en herramienta fundamental de la taxonomía integrativa, complementando análisis provenientes de otras líneas de evidencia como por ejemplo la morfología y la bioacústica. La taxonomía integrativa se ha utilizado generalmente para evaluar especies ampliamente distribuidas, la cuales pueden constituir complejos de especies. Este es el caso de las tortugas continentales semiacuáticas neotropicales *Kinosternon leucostomum* y *Kinosternon scorpioides* (Testudines: Kinosternidae), cuyas extensas distribuciones y su presencia en diferentes hábitats, impulsan la hipótesis de que existe variación genética interespecífica no reconocida entre las poblaciones a lo largo de sus rangos de distribución, pudiendo corresponder con varios linajes evolutivos dentro de cada taxón. En esta investigación se obtuvieron y analizaron secuencias de tres genes mitocondriales (12s, 16s y Cytb) y siete fragmentos nucleares (BDNF, CMOS, HMGB, ODC, R35, RAG1, RAG2) de individuos provenientes de gran parte del rango de distribución de las dos especies en el neotrópico con los siguientes objetivos: 1. Evaluar si existe variación genética interespecífica no reconocida, 2. Evaluar las relaciones evolutivas entre linajes detectados, 3. determinar la distribución geográfica de estos posibles linajes y 4. Establecer inferencias taxonómicas comparando los resultados con la clasificación taxonómica actual. Los análisis filogenéticos (Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud), además de Análisis de Componentes Principales y redes de Máxima Parsimonia de haplotipos, revelaron patrones de diferenciación genética contrastantes para cada especie. Para *K. scorpioides* se identificó una fuerte estructura genética compuesta de varios linajes evolutivos independientes. Para *K. leucostomum* no se identificó estructura genética, constituyendo un solo linaje evolutivo con algunas diferencias geográficas. Se discute acerca de las causas y consecuencias de estos patrones en un contexto filogenético, filogeográfico y taxonómico. Adicionalmente se discute acerca de las consecuencias de estos resultados para la conservación de las dos especies.

Palabras clave: Filogenética, filogeografía, tortugas continentales, mtDNA, nuDNA, complejo de especies, especiación críptica.

Abstract

The growth of research in molecular systematics (i.e., population genetics, phylogenetics and phylogeography) has benefited from advances in recent sequencing techniques, which offer the possibility of obtaining DNA sequences economically and rapidly. Adequate analysis of these sequences in disciplines such as molecular phylogenetics and phylogeography has increased knowledge about the evolutionary relationships of genetic lineages at intra- and interspecific levels, patterns of geographic distribution of these lineages, and identification of possible processes that formed these patterns. Additionally, these analyses have become a fundamental tool for integrative taxonomy, complementing analyses from other lines of evidence such as morphology and bioacoustics. Integrative taxonomy has generally been used to evaluate widely distributed species, which may constitute species complexes. This is the case of the neotropical semi-aquatic continental turtles *Kinosternon leucostomum* and *Kinosternon scorpioides* (Testudines: Kinosternidae), whose wide distributions and presence in different habitats, support the hypothesis that there is unrecognized interspecific genetic variation among populations throughout their distribution ranges, which may correspond to several evolutionary lineages within each taxon. In this research, sequences of three mitochondrial genes (12s, 16s and Cytb) and seven nuclear loci (BDNF, CMOS, HMGB, ODC, R35, RAG1, RAG2) were obtained and analyzed from individuals from a large part of the distribution range of the two species in the neotropics with the following goals: 1. To evaluate if there is unrecognized interspecific genetic variation, 2. To evaluate the evolutionary relationships between detected lineages, 3. to determine the geographic distribution of these possible lineages and 4. to establish taxonomic inferences by comparing the results with the current taxonomic classification. Phylogenetic analyses (Bayesian Inference and Maximum Likelihood), in addition to Principal Component Analysis and Maximum Parsimony networks of haplotypes revealed contrasting patterns of genetic differentiation for each species. For *K. scorpioides*, a strong genetic structure composed of several independent evolutionary lineages was identified. For *K. leucostomum* no genetic structure was identified, constituting a single evolutionary lineage with some geographic differences. The causes and consequences of these patterns are discussed in a phylogenetic, phylogeographic and taxonomic context. In addition, the consequences of these results for the conservation of the two species are discussed.

Key words: Phylogenetics, phylogeography, continental turtles, mtDNA, nuDNA, species complex, cryptic speciation.

Contenido

1. Introducción.....	1
2. Artículo 1	4
3. Discusión final	93
4. Conclusión	98
5. Bibliografía.....	99

1. Introducción

La posibilidad de obtener secuencias de ADN de manera económica y rápida debido al avance en las técnicas de secuenciación, sumado a avances en el procesamiento de la información, le han conferido a los análisis filogenéticos basados en métodos probabilísticos una gran popularidad. Hoy día este tipo de análisis son rutinariamente usados no solo para inferir las historias evolutivas de diferentes grupos de organismos a escala intra e inter poblacional (sistemática molecular), sino también para responder preguntas aplicadas a otras áreas del conocimiento, que van desde la inmunología, la epidemiología y la conservación, hasta la biología evolutiva del desarrollo (conocida como evodevo) y la paleoecología (Horiike, 2016; Lamsdell et al., 2017; Morrison, 2011; Ramsuran et al., 2017; Van Regenmortel, 2011).

El análisis adecuado de secuencias de ADN enmarcado en disciplinas como la filogenética molecular y la filogeografía, han incrementado el conocimiento acerca de las relaciones evolutivas de linajes genéticos intra e interespecíficos en especies de interés, así como la determinación de patrones de distribución geográfica de dichos linajes e identificación de posibles procesos que formaron estos patrones. Adicionalmente, estos análisis se han convertido en herramienta fundamental de la taxonomía integrativa y han sido claves para resolver incógnitas taxonómicas que otras estrategias, por ejemplo, basadas solamente en morfología, no habían podido solucionar (Bryson et al., 2012; Davis et al., 2016; Loc-Barragán et al., 2020; Mendoza-Henao et al., 2020; Spinks and Shaffer, 2009; Vargas-Ramírez et al., 2020, 2013, 2010; Weinell and Bauer, 2018).

La taxonomía integrativa se ha utilizado generalmente como herramienta para evaluar especies ampliamente distribuidas, las cuáles pueden constituir complejos de especies. La falta de conocimiento o la especiación críptica han sido las causas más comunes de esta situación. Este es el caso de las tortugas continentales neotropicales semiacuáticas *Kinosternon leucostomum* y *Kinosternon scorpioides* (Testudines: Kinosternidae), cuyas extensas distribuciones y presencia en diferentes hábitats, impulsan la hipótesis de que existe variación genética no reconocida entre las poblaciones a lo largo de sus rangos de distribución, pudiendo corresponder a varios linajes evolutivos dentro de cada taxón.

Comúnmente denominadas como de pantano, tapaculos, tortuga caja o almizcleras, la familia de tortugas acuáticas y semiacuáticas de la familia Kinosternidae se distribuye por el continente americano desde las zonas templadas del centro y sur de Norteamérica, hasta las praderas y selvas tropicales de Suramérica (Rueda-Almonacid et al., 2007). Sus relaciones filogenéticas han sido objeto de debate en diferentes ocasiones. Usando datos morfológicos, se consideró la parafilia del género *Kinosternon* con respecto a *Sternotherus* (Kinosterninae) (Seidel et al., 1986), lo cuál sería posteriormente revatido por una filogenia propuesta a partir de datos morfológicos y aloenzimáticos combinados (Iverson, 1991). Posteriormente, análisis filogenéticos moleculares fueron llevados a cabo mediante el análisis filogenético de secuencias de varios marcadores mitocondriales (Citocromo B y RNA ribosomales 12S y 16S) y nucleares (C-mos, RAG1 y RAG2), incluyendo 28 especies reconocidas que componen la familia. Estos análisis revelaron resultados inesperados, llevando a la elevación de Staurotypinae y Kinosterninae al nivel de familia (Staurotypidae y Kinosternidae, respectivamente); esta última conformada por los géneros *Sternotherus*, *Kinosternon* y *Cryptochelys* (Iverson et al., 2013). Esta nueva clasificación fue refutada por Spinks et al. (2014), argumentando un sesgo hacia la información suministrada por el DNA mitocondrial, por lo que incluyendo un mayor número de fragmentos nucleares (15 fragmentos, 10305 pares de bases pb en total), recuperando nuevamente los géneros tradicionales *Sternotherus* y *Kinosternon* para la subfamilia Kinosterninae.

En medio de la discusión taxonómica que deriva de la historia evolutiva de toda la familia y especialmente del género *Kinosternon*, destacan los taxones nominales *K. leucostomum* y *K. scorpioides*; especies ampliamente distribuidas para las que se ha documentado la suficiente variación morfológica y ecológica como para poder encontrar múltiples taxones en la categoría de especies (Cabrera & Colantonio, 1997; Berry & Iverson., 2001a, 2001b; McCranie, 2008; Iverson, 2010).

Kinosternon leucostomum se encuentra en Belize, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Panamá y Perú. Posee un caparazón liso, abombado y con una coloración entre café y amarillento, además de algunas diferencias que incluyen una cola más larga y un caparazón más alargado y menos ancho en los machos (Berry & Iverson, 2001b). De hábitos semiacuáticos, llega a registrarse en aguas salobres y estuarios, pero prefiriendo pozos y pantanos de aguas mansas y turbias con abundante vegetación acuática. También se han encontrado individuos en tierra firme muy lejos del agua, pudiendo algunas veces estar en los bosques ribereños o enterrados entre el fango y las raíces del pasto (Páez et al, 2012). Sus amenazas van desde la fragmentación de hábitat, desecación de humedales y contaminación de cuerpos de agua, hasta ser comercializada ilegalmente como mascota y para consumo humano (Ardila-

Marulanda et al., 2016; Corredor-Londoño et al., 2007; Rueda-Almonacid et al., 2007).

Kinosternon scorpioides abarca desde México hasta el norte de Argentina, siendo actualmente reconocida como la especie de tortuga más ampliamente distribuida en el neotrópico (Rhodin, et al., 2021). Habita cuerpos de agua permanentes y semipermanentes, sean de tipo léntico o lótico, prefiriendo aguas oscuras de fondos lodosos aislados de causas principales, siendo frecuente encontrarla caminando en las orillas de los cuerpos de agua durante las noches y en el día en época de lluvias (Pritchard and Trebbau, 1984; Stafford and Meyer, 2000). Se distribuye por Argentina, Belice, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guayana Francesa, Guatemala, Guyana, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, El Salvador, Suriname, Trinidad y Venezuela. Su principal amenaza es la destrucción y degradación de hábitat, donde las actividades humanas han alterado por completo los ecosistemas dulceacuícolas (Berry et al. 2012). Aunque no es muy apetecida para consumo por cuenta del hedor intenso producido por sus glándulas de almizcle, si es aprovechada como alimento en algunas regiones de México, Colombia, Venezuela, Brasil y Perú (Pritchard and Trebbau, 1984, Rueda-Almonacid, 2007).

Debido a que las tortugas continentales neotropicales *Kinosternon leucostomum* y *Kinosternon scorpioides* presentan extensas distribuciones estando presentes en diferentes hábitats, se ha planteado la hipótesis de que existe variación genética no reconocida entre las poblaciones a lo largo de sus rangos de distribución, pudiendo corresponder con varios linajes evolutivos independientes dentro de cada taxón. Con los objetivos de: 1. evaluar la hipótesis antes enunciada, 2. determinar la distribución geográfica de estos posibles linajes y 3. Comparar la clasificación actual de cada taxon (basada principalmente en morfología), con la variación genética detectada, en esta investigación se obtuvieron y analizaron secuencias de tres genes mitocondriales (12s, 16s y Cytb) y siete loci nucleares (BDNF, CMOS, HMGB, ODC, R35, RAG1, RAG2) de individuos provenientes de gran parte del rango de distribución de las dos especies en el neo trópico. Específicamente, se llevaron a cabo análisis filogenéticos de Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud usando diferentes combinaciones de datos (mitocondrial, nuclear y combinada), además de Análisis de Componentes Principales, distancias genéticas y redes de haplotipos de Máxima Parsimonia.

La evaluación en estas dos especies cobra especial relevancia no solo para entender la historia evolutiva de los linajes, sus patrones y posibles procesos de formación, sino porque en el contexto actual de pérdida de diversidad, son urgentemente necesarias las medidas que mitiguen esta pérdida. Los quelonios (Orden Testudines), corresponden a uno de los grupos de

vertebrados más amenazados debido su vulnerabilidad frente a amenazas como la degradación de hábitat, explotación, tráfico de especies y el cambio climático (Berriozabal-Islas et al., 2020; Butler, 2019; Carter and Janzen, 2021; Fritz et al., 2010; Mothes et al., 2020; Rueda-Almonacid et al., 2007; Páez et al, 2012). Los resultados de esta investigación deben servir como punto de partida para establecer estrategias de conservación de los posibles diferentes linajes evolutivos identificados (sensu Moritz, 1994).

Así, este trabajo aborda una metodología mediante la cual se pretende responder las siguientes preguntas generales: ¿Son *Kinosternon leucostomum* y *Kinosternon scorpoides* complejos de especies? ¿Cuáles son las relaciones filogenéticas de linajes identificados entre y dentro del género? Se presenta una sección, en formato de artículo científico, donde se revisa la taxonomía actual del género, se presentan los resultados obtenidos y se discute acerca de las causas y consecuencias de los patrones encontrados en un contexto filogenético, filogeográfico y taxonómico. Adicionalmente se discute acerca de las consecuencias de estos resultados para la conservación de las dos especies.

2. Artículo científico

¿Son *Kinosternon scorpioides* y *Kinosternon leucostomum* (Testudines: Kinosternidae) complejos de especies?: Evaluación usando marcadores mitocondriales y nucleares y un amplio muestreo geográfico.

Are *Kinosternon scorpioides* and *Kinosternon leucostomum* (Testudines: Kinosternidae) species complexes? Evaluation using mitochondrial and nuclear markers and wide geographic sampling.

Jhon Sebastián Briceño Zea

Grupo Biodiversidad y Conservación Genética, Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia. Carrera 45 # 26-85, Bogotá, Colombia.
jsbricenoz@unal.edu.co

Mario A. Vargas-Ramírez

Estación de Biología Tropical Roberto Franco (EBTRF), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia

Grupo Biodiversidad y Conservación Genética, Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia.

Carrera 45 # 26-85, Bogotá, Colombia.

maavargasra@unal.edu.co

RESUMEN

Las tortugas continentales neotropicales *Kinosternon leucostomum* y *Kinosternon scorpioides* presentan extensas distribuciones estando presentes en diferentes hábitats y exhibiendo diferencias morfológicas geográficas. Por lo anterior, se ha planteado la hipótesis de que existe variación genética no reconocida entre las poblaciones a lo largo de sus rangos de distribución, pudiendo corresponder con varios linajes dentro de cada taxón. Con los objetivos de: 1. evaluar la hipótesis antes enunciada, 2. dilucidar las relaciones evolutivas entre posibles linajes para cada especie y 3. comparar la clasificación actual de cada taxón (basada principalmente en morfología), con la variación genética detectada, en esta investigación se obtuvieron y analizaron secuencias de tres genes mitocondriales (12s, 16s y Cytb; 2134 pares de bases pb) y siete loci nucleares (BDNF, CMOS, HMGB, ODC, R35, RAG1, RAG2; 5303 pb) de individuos provenientes de gran parte del rango de distribución de las dos especies en el neo trópico. Los análisis filogenéticos y filogeográficos revelaron para *K. scorpioides* una fuerte estructura genética compuesta de varios linajes evolutivos independientes presentes en centro y sur américa. Para *K. leucostomum* no se identificó estructura genética, constituyendo un solo linaje evolutivo con algunas diferencias geográficas. Se discute acerca de las causas y consecuencias de estos patrones genéticos en un contexto filogenético, filogeográfico y taxonómico. Los linajes identificados para *K. scorpioides* corresponden a Unidades Evolutivas Significativas (ESU's sensu Moritz, 1994). Estos resultados son cruciales para futuros planes de conservación, especialmente teniendo en cuenta el vacío general que hay sobre la biología y ecología de cada linaje independiente, sumado a su vulnerabilidad por cuenta de amenazas latentes como la pérdida de hábitat y el cambio climático.

Palabras clave: Filogenética, Filogeografía, Tortugas continentales, mtDNA, nuDNA, complejo de especies, especiación críptica.

ABSTRACT

The neotropical continental turtles *Kinosternon leucostomum* and *Kinosternon scorpioides* are widely distributed, occur in different habitats, and exhibit geographic morphological differences. Therefore, it has been hypothesized that there is unrecognized genetic variation among populations all along their distribution ranges, which may correspond to multiple lineages within each taxon. With the goals of: 1. evaluating the above hypothesis, 2. elucidating the evolutionary relationships among the possible lineages of each species, and 3. comparing the current classification of each taxon (based primarily on morphology), with the genetic variation detected in this research, the sequences of three mitochondrial genes (12s, 16s and Cytb; 2134 base pairs bp) and seven nuclear loci (BDNF, CMOS, HMGB, ODC, R35, RAG1, RAG2; 5303 bp) were obtained and analyzed from individuals from a large part of the distribution range of the two species in the neotropics. Phylogenetic and phylogeographic analyses revealed for *K. scorpioides* a strong genetic structure composed of multiple independent evolutionary lineages present in Central and South America. For *K. leucostomum* no genetic structure was identified, constituting a single evolutionary lineage with some geographic differences. The causes and consequences of these genetic patterns are discussed in a phylogenetic, phylogeographic and taxonomic context. The lineages identified for *K. scorpioides* correspond to Evolutionarily Significant Units (ESU's sensu Moritz, 1994). These results are crucial for future conservation plans, especially considering the general lack of information on the biology and ecology of each independent lineage, in addition to their vulnerability due to latent threats such as habitat loss and climate change

Key words: Phylogenetics, Phylogeography, Continental turtles, mtDNA, nuDNA, species complex, cryptic speciation.

1. INTRODUCCIÓN

Las especies ampliamente distribuidas comúnmente están sometidas a una serie de ambientes geográficos heterogéneos, cuyos factores bióticos y abióticos pueden variar espacial y temporalmente, llevando a que las poblaciones exhiban variación entre sí. Esta variación determina grupos genéticos los cuales, en algunos casos son utilizados para designación de subespecies (Ennen et al., 2014). Esta es una característica de los denominados complejos de especies, clústeres cuyas similitudes morfológicas les confieren la clasificación de una única especie, pero cuyas variadas y complejas historias naturales, que a su vez se ven reflejadas en profunda diferenciación genética, motivan el replanteamiento de esta clasificación.

La insuficiencia de la morfología u otras líneas de evidencia individuales como única fuente de información, llevó a la integración e implementación de otras líneas de evidencia en la delimitación de especies y el discernimiento de la variación intrínseca a estas. Es así como la taxonomía integrativa se refiere al uso de diferentes líneas de evidencia (i.e. análisis de datos moleculares, morfológicos, bioacústicos, químicos, etc.) para tomar decisiones sistemáticas y taxonómicas con mayor objetividad. El uso de datos de secuencias de ADN mitocondriales y nucleares como base de análisis filogenéticos basados en métodos probabilísticos han complementado el uso de otras líneas de evidencia dentro de la taxonomía integrativa. Estos análisis han sido ampliamente utilizados para inferir las historias evolutivas de diferentes grupos taxonómicos, incluyendo complejos de especies, cuyas relaciones y distribuciones no habían sido claramente establecidas con

base exclusivamente en morfología (Bryson et al., 2012; Davis et al., 2016; Loc-Barragán et al., 2020; Mendoza-Henao et al., 2020; Spinks & Shaffer, 2009; Vargas-Ramírez et al., 2020, 2013, 2010; Weinell & Bauer, 2018). Esto resulta clave no solo por la historia evolutiva en sí, sino en el contexto actual, para reconocer objetivamente la diversidad biológica y así justificar medidas que mitiguen la pérdida acelerada de esta.

Este tipo de investigaciones son particularmente necesarias y pertinentes los quelonios (Orden Testudines), debido a su bajo conocimiento y su alta vulnerabilidad frente a amenazas como la explotación y consumo por parte de comunidades humanas, la degradación de hábitat y el cambio climático (Berriozabal-Islas et al., 2020; Butler, 2019; Carter & Janzen, 2021; Fritz et al., 2010; Mothes et al., 2020; Páez-Nieto, et al. 2012). Aunque a nivel mundial son reconocidas 356 especies de este grupo, 60 se reconocen como politípicas, representando 122 taxones adicionales (Berry & Iverson, 2001a, 2001b; Rueda-Almonacid et al., 2007). Los quelonios representa uno de los grupos vertebrados más amenazados del mundo, donde solo en el territorio nacional colombiano cerca del 45% de los 34 de taxones que lo habitan, se encuentran en alguna categoría de amenaza de la UICN (Vu = Vulnerable, EN = En peligro y CR = En peligro crítico), existiendo una insuficiencia de datos que dificulta el ejercicio de categorización en un 20% adicional (Morales-Betancourt et al., 2015).

Con base en los resultados de investigaciones en filogenética molecular se han propuesto para conservación conceptos como Unidades Evolutivas Significativas (ESU, por sus siglas en ingles *sensu* Moritz, 1994), priorizando el componente

genético de la biodiversidad en los esfuerzos de conservación, independiente de si su taxonomía refleja o no la historia evolutiva del grupo en cuestión. El concepto de ESU ha sido utilizado para reconocer linajes independientes a nivel intraespecífico y para proponer acciones de conservación en diferentes grupos (Mendoza-Henao et al., 2020; Shaffer et al., 2007; Vargas-Ramírez et al., 2013, 2010; Vargas-Ramírez & Moreno-Arias, 2014).

Comúnmente denominadas como de pantano, tapaculos, tortuga caja o almizcleras, la familia *Kinosternidae*, de tortugas acuáticas y semiacuáticas, se distribuye por el continente americano desde las zonas templadas del centro y sur de Norteamérica, hasta las praderas y selvas tropicales de Suramérica (Rueda-Almonacid et al., 2007). En la actualidad se reconoce que esta familia incluye la subfamilia *Staurotypinae*, compuesta por los géneros *Staurotypus* (dos especies) y *Claudius* (monotípico); y la subfamilia *Kinosterninae*, que agrupa los géneros *Sternotherus* (cuatro especies) y *Kinosternon* (21 especies, incluyendo las más recientemente descritas *K. vogti* [López-Luna et al., 2018, 2021] y *K. cora* [Loc-Barragán et al., 2020], no incluidas en este estudio).

En cuanto a sus relaciones filogenéticas, estas han sido objeto de debate en diferentes ocasiones. En un principio se consideró la parafilia del género *Kinosternon* con respecto a *Sternotherus* (*Kinosterninae*) con base en datos morfológicos (Seidel et al., 1986), tesis que fue revaluada con una filogenia propuesta a partir de datos morfológicos y aloenzimáticos combinados (Iverson, 1991). Posteriormente, dichas relaciones fueron nuevamente consideradas

mediante el análisis de secuencias de varios marcadores mitocondriales (Cytb y RNA ribosomales 12S y 16S) y nucleares (C-mos, RAG1 y RAG2), llevando a la elevación de Staurotypinae y Kinosterninae al nivel de familia (Staurotypidae y Kinosternidae, respectivamente), esta última conformada por los géneros *Sternotherus*, *Kinosternon* y *Cryptochelys* (Iverson et al., 2013). Sin embargo, este último cambio fue rebatido por Spinks et al. (2014) argumentando un sesgo hacia la información suministrada por el DNA mitocondrial, por lo que formuló una nueva hipótesis filogenética incluyendo un mayor número de loci nucleares (AHR, AIING, BDNF, BMP2, HMGB2, HNFL, NB22519, P26S4, PAX, R35, RAG, TB01, TB29, ZFHX1B, 10305 pb en total), recuperando nuevamente como grupos hermanos los géneros tradicionales *Sternotherus* y *Kinosternon* (este último recuperado como monofilético), incluidos nuevamente en la subfamilia Kinosterninae.

Los complejos *Kinosternon leucostomum* y *Kinosternon scorpioides*

En medio de la discusión taxonómica que deriva de la historia evolutiva de toda la familia y especialmente del género *Kinosternon*, destacan los taxones nominales *K. leucostomum*, compuesto por las subespecies *K. l. postinguinale* y *K. l. leucostomum*; y *K. scorpioides*, compuesto por las subespecies *K. s. scorpioides*, *K. s. albogulare* y *K. s. cruentatum* (pese a la incertidumbre sobre la posición taxonómica de *K. abaxillare*, tratada en ocasiones como especie independiente o como subespecie de *K. scorpioides* [Iverson 2017], esta será incluida en los análisis a llevarse a cabo). Estas dos especies se encuentran ampliamente distribuidas, para las que se ha documentado variación morfológica y de hábitat

que llevan a sospechar que corresponden a complejos de especies (Acuña-Mesen, 1994; Acuña-Mesen & Marquez B., 1993; Berry, 1978; Berry & Iverson, 2001a, 2001b).

Por un lado, *Kinosternon scorpioides* abarca desde México hasta el norte de Argentina, siendo actualmente reconocida como la especie de tortuga más ampliamente distribuida en el neotrópico (Rhodin, et al., 2021). Habita cuerpos de agua permanentes y semipermanentes, sean de tipo léntico o lótico, prefiriendo aguas oscuras de fondos lodosos aislados de causas principales, siendo frecuente encontrarla caminando en las orillas de los cuerpos de agua durante las noches y en el día en época de lluvias (Pritchard and Trebbau, 1984; Stafford and Meyer, 2000). *Kinosternon s. scorpioides* se distribuye por Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Guayana Francesa, Guyana, Panamá, Paraguay, Perú, Suriname, Trinidad y Venezuela. A su vez, *K. s. albogulare* se encuentra en Colombia (en el Archipiélago de San Andrés, Providencia y Santa Catalina), Costa Rica, El Salvador, Honduras, Nicaragua y Panamá. Finalmente, *K. s. cruentatum* habita en Belice, Guatemala, Honduras y México. La principal amenaza de estas tortugas es la destrucción y degradación de hábitat, donde las actividades humanas han alterado por completo los ecosistemas dulceacuícolas (Berry et al. 2012). Adicionalmente, aunque no es muy apetecida para consumo por cuenta del hedor intenso producido por sus glándulas de almizcle, si es aprovechada como alimento en algunas regiones de México, Colombia, Venezuela, Brasil y Perú (Pritchard and Trebbau, 1984, Rueda-Almonacid, 2007).

Considerando su gran distribución, la tortuga Casquito o Tapaculo no se encuentra incluida en ninguna categoría de amenaza de la UICN, siendo clasificada como “Preocupación menor” (LC), ni ha sido incluida en algún apéndice CITES. No obstante, en Colombia, *K. s. albogulare* (conocida como Swanka) es considerada como Vulnerable (VU D2) por cuenta de su reducida distribución y el alto grado de transformación de su hábitat (Forero-Medina et al. 2015). La especie posee un caparazón ovalado con tres quillas longitudinales moderadas o bien definidas, es levemente deprimido y también consta de 22 escamas marginales, ocho costales y cinco vertebrales. Su color presenta variación geográfica incluyendo colores marrones claros y oscuros, oliva y negro (Berry & Iverson, 2001a; Berry J, 1978; Giraldo et al., 2012). Sus relaciones evolutivas han sido abordadas en las reconstrucciones filogenéticas mencionadas, y aunque en la actualidad se reconocen las tres subespecies con características morfológicas diferenciales (Berry & Iverson, 2011; Berry et al. 2012), las aproximaciones moleculares coinciden en definir a la especie como no monofilética, difiriendo las respectivas agrupaciones taxonómicas, pero destacando la necesidad de ampliar el muestreo en todo el espectro geográfico de su distribución, con el fin de incluir la mayor variabilidad genética posible.

Por otra parte, *Kinosternon leucostomum leucostomum* se encuentra distribuida en Belize, Guatemala, Honduras, México y Nicaragua, mientras que *K. l. postinguinale* se encuentra distribuida en Colombia, Costa Rica, Ecuador, Nicaragua, Panamá y Perú. Posee un caparazón liso carente de quillas (o una

apenas visible), abombado y con una coloración entre café y amarillo, que consta de 22 escamas marginales, ocho costales y cinco vertebrales. Adicionalmente, se ha reportado que este tiende a ser más alargado y menos ancho en los machos (Berry & Iverson, 2001b; McCranie, 2018). En general, esta especie es de hábitos semiacuáticos, llega a registrarse en aguas salobres y estuarios, pero prefiriendo pozos y pantanos de aguas mansas y turbias con abundante vegetación acuática. También se han encontrado individuos en tierra firme muy lejos del agua, pudiendo algunas veces estar en los bosques ribereños o enterrados entre el fango y las raíces del pasto (Páez-Nieto, et al., 2012). Sus amenazas van desde la fragmentación de hábitat, desecación de humedales y contaminación de cuerpos de agua, hasta ser comercializada ilegalmente como mascota y para su consumo (Ardila-Marulanda et al., 2016; Corredor-Londoño et al., 2007; Rueda-Almonacid et al., 2007). Su posición dentro del género (y dentro de la familia) fue abordada en el trabajo de Iverson et al., (2013), quienes sugiriendo grandes cambios a la filogenia clásica reasignaron la especie al género *Cryptochelys*, propuesta que fue reevaluada en la posterior reconstrucción filogenética realizada por Spinks et al., (2014) basada exclusivamente en marcadores nucleares, volviendo a la clasificación anterior. Al respecto, autores como Ceballos et al. (2016) señalaron el sesgo de estos estudios hacia la información de las poblaciones de la subespecie *K. l. leucostomum*, existiendo un gran vacío en lo que corresponde a su distribución hacia el sur de Centroamérica y Suramérica (incluyendo *K. l. postinguinale*), por lo que como señalaran Iverson y colaboradores (2013), destaca la necesidad de incluir una mayor cantidad de

marcadores informativos junto con un muestreo geográfico más amplio que incluya zonas de traslape de las subespecies.

En este estudio se obtuvieron y analizaron secuencias de DNA de tres genes mitocondriales (12S, 16S y Cytb) y siete loci nucleares (C-mos, R35, RAG1, RAG2, HMGB, BDNF y ODC) de individuos de las especies *Kinosternon scorpioides* y *Kinosternon leucostomum* provenientes de un muestreo geográfico amplio, incluyendo diferentes poblaciones naturales, con los siguientes objetivos:

1. evaluar la hipótesis de que existe variación genética no reconocida entre las poblaciones de las dos especies a lo largo de sus rangos de distribución, pudiendo corresponder con varios linajes dentro de cada taxón, 2. dilucidar las relaciones evolutivas entre posibles linajes para cada especie, 3. determinar la distribución geográfica de estos posibles linajes y 4. Comparar la clasificación actual de cada taxón (basada principalmente en morfología), con la variación genética detectada.

2. MÉTODOS

2.1 Procedimientos de laboratorio

Para la realización de este estudio se obtuvieron tejidos de 31 individuos de *Kinosternon leucostomum* sensu lato y 85 de *Kinosternon scorpioides* sensu lato de gran parte de sus rangos de distribución (Anexo 1). Los tejidos provinieron del Banco de ADN y tejidos de la Biodiversidad (BTBC) del Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia y del Banco de Tejidos del Museo de Zoología Senckenberg, Dresden, Alemania. De estos tejidos se extrajo ADN a partir del cual

se amplificaron fragmentos correspondientes a siete marcadores moleculares; tres fragmentos de genes mitocondriales Cytb (1181 bp), 12s (404 bp) y 16s (549 bp) y los siete loci nucleares BDNF (686 bp), CMOS (604 bp), HMGB (582 bp), ODC (571 bp), R35 (1137 bp), RAG1 (1103 bp) y RAG2 (dos fragmentos de 693 bp y 1191 bp, respectivamente) (Anexo 1).

Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo con un volumen total de reacción de 25 μ l que contenían 20-40 ng de DNA, 1 unidad Taq polimerasa (Bioron GmbH, Ludwigshafen, Germany), el correspondiente buffer recomendado por el fabricante (Completo, 10x, MgCl₂ incluido), 0.2 μ M de cada dNTP (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany) y 0.4 μ M de cada primer correspondiente (Anexo 2). Las condiciones de ciclo térmico utilizado en cada una de las reacciones se describen en el Anexo 3. En los casos en los que la calidad o la cantidad de muestra inicial no fueran óptimas, las PCR se llevaron a cabo usando AccuStart™ II GelTrack™ PCR SuperMix (Quanta BioSciences, Inc., Gaithersburg, MD, USA; modificación al protocolo: dilución Taq-Mix 1:2) con un volumen total de reacción de 25 μ l, conteniendo 20-40 ng de DNA y 0.4 μ M de cada primer correspondiente (Anexo 2). Las condiciones de cada termociclo se presentan en el Anexo 3. Los productos de cada PCR fueron purificados usando el reactivo ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA; dilución 1:20; modificación al protocolo: 30 min a 37 °C, 15 min a 80 °C). Las reacciones de secuenciación fueron realizadas usando el kit de secuenciación BigDye Terminator v3.1 (Applied

Biosystems) en las siguientes condiciones: Denaturación inicial a 96° por 1 min, seguida por 25 ciclos con denaturación a 96°C por 10 segundos, un anillamiento a 50°C por 5 segundos y un período de elongación a 60°C por 75 segundos. Los productos de estas reacciones de secuenciación fueron purificados utilizando el kit de 96 pozos de Performa® DTR V3 (Edge Biosystems, Gaithersburg, MD, USA) conteniendo 400 µl Sephadex™ (GE Healthcare; solución 1:20) en cada pozo. Las respectivas secuencias fueron obtenidas usando el secuenciador de DNA ABI 3730 (Applied Biosystems). Para este fin, los productos a secuenciar fueron diluidos en factor 1:2 en 0.1 mM EDTA (Roth). Las secuencias finales fueron editadas y alineadas usando bioedit 7.0.9.0 0 (Hall, 1999).

2.2 Alineamientos mitocondriales y nucleares

Los alineamientos fueron completados con secuencias correspondientes a cada marcador, provenientes de 17 especies restantes que componen el género *Kinosternon*. Se incluyeron además secuencias representantes de cada especie de los demás géneros que constituyen la familia: *Sternotherus* (Kinosterninae), *Staurotypus* y *Claudius* (Staurotypinae). Adicionalmente, como grupo externo se incluyeron en los análisis las especies *Dermatemys mawii* (Dermatemydidae), *Graptemys pseudogeographica* (Deirochelyinae, Emydidae), *Emys orbicularis* (Emydinae, Emydidae) y *Chelydra serpentina* (Chelydridae). Estas secuencias fueron obtenidas de GenBank (Anexo 4).

2.3 Análisis filogenéticos

Antes de realizar los análisis filogenéticos, se determinó el modelo de evolución de nucleótidos que mejor se ajustaba a cada marcador, así como sus respectivas particiones, usando el software PartitionFinder 2.1.1 (Lanfear, et., 2016), utilizando el Criterio de Información Bayesiana (BIC por sus siglas en inglés) como criterio de selección, con base en los siguientes esquemas de partición: 1. sin partición, 2. partición por fragmento de DNA (cada fragmento de gen separado) y 3. máxima partición (i.e. cada posición de cada codón codificante corresponde a una partición diferente). Los modelos de evolución para cada fragmento y sus esquemas de partición de codones son detallados en la Tabla 1.

Posteriormente y aplicando estos modelos, las relaciones filogenéticas fueron evaluadas mediante un análisis de inferencia bayesiana (IB) y un análisis de máxima verosimilitud (ML), llevados a cabo utilizando MrBayes 3.2.1 (Ronquist et al., 2012) y IQTREE (Nguyen et al., 2015), respectivamente. Para cada análisis, los datos fueron concatenados en tres bloques: 1. incluyendo los marcadores mitocondriales (2134 bp), 2. incluyendo los marcadores nucleares (5303 bp) y 3. incluyendo todos los marcadores mtADN + nADN (evidencia completa de 7437 bp). Adicionalmente, se llevaron a cabo análisis bayesianos exploratorios con cada loci individual. Para cada análisis bayesiano, dos análisis paralelos fueron llevados a cabo con cada matriz, cada uno utilizando cuatro cadenas de Markov por 50 millones de generaciones, incluyendo un muestreo de árboles cada 1000 generaciones, de los cuales los primeros 125 mil fueron descartados (burn-in

25%). Para evaluar la convergencia de los análisis se utilizó el software TRACER 1.7.1 (Rambaut et al., 2018). El árbol consenso se obtuvo usando TreeAnnotator v1.10.4 (Drummond & Rambaut, 2007) y para su visualización se utilizó el programa FigTree 1.4.4 (Rambaut, 2018). Para el análisis de máxima verosimilitud se utilizaron las mismas particiones indicadas por PartitionFinder. El soporte de los nodos se calculó a través de 1000 réplicas de Bootstrap. En cada caso, los valores de soporte fueron interpretados así: IB: bajo <85%, medio 85%>, robusto >95%; ML: bajo <70%, medio >70%, robusto >85%.

2.4 Redes de haplotipos y diferenciación genética

Para evaluar las relaciones no dicotómicas entre haplotipos y para determinar la cantidad de alelos compartidos entre poblaciones, se calcularon redes de parsimonia utilizando: 1. los fragmentos de gen mitocondriales concatenados (con los individuos que contaran con los tres fragmentos disponibles) y 2. cada loci nuclear individual, colapsando las secuencias en sus respectivos haplotipos mitocondriales o nucleares. Para este análisis se utilizó el paquete Pegas disponible para CRAN R (Knaus et al., 2020; Templeton et al., 1992). Adicionalmente, para evaluar posible diferenciación genética fuera de un contexto filogenético se llevaron a cabo análisis de componentes principales (PCA) utilizando el paquete Adegenet (Jombart, 2015), disponible para CRAN R, de la siguiente manera: 1. con los marcadores mitocondriales concatenados (separados por taxón nominal), 2. con los marcadores nucleares concatenados (separados por taxón nominal), y 3. con los marcadores nucleares individuales (*K*.

leucostomum + *K. scorpioides*). Los nucleótidos faltantes o ambiguos fueron reemplazados por la media de las frecuencias alélicas en cada caso.

2.5 Distancias genéticas

Para evaluar la diferenciación genética entre linajes identificados dentro de cada taxon nominal, se calcularon las distancias genéticas para el gen Cytb. Para esto se usó el Software MEGA X v. 10.2.4 (Kumar et al., 2018) utilizando el modelo de distancias p no corregidas, considerando un modelo de sustitución que incluye transiciones y transversiones. Adicionalmente, para el análisis se asumió que las tasas evolutivas entre los diferentes sitios se modelan mediante una distribución uniforme y se utilizó el método de Bootstrap con 1000 réplicas como estimador de varianza.

3. RESULTADOS

3.1 Análisis filogenéticos

Los análisis individuales de los fragmentos mitocondriales 12S y 16S no fueron filogenéticamente concluyentes, obteniéndose múltiples politomías al interior de la familia Kinosternidae (no se muestran los árboles). Por el contrario, el árbol basado en el fragmento Cytb reveló una marcada estructura genética al interior de *K. scorpioides* y una débil estructura para *K. leucostomum* (Fig. S1 y S2). Por otro lado, los árboles filogenéticos nucleares individuales fueron poco informativos y solo las filogenias obtenidas utilizando los loci HMGB y RAG2 recuperaron la monofilia recíproca de los géneros *Kinosternon* y *Sternotherus* (Fig. S3 y S4). Las

demás filogenias nucleares individuales mostraron mínima resolución (no se muestran los árboles).

El árbol filogenético obtenido con la matriz mitocondrial concatenada reveló resultados similares que los análisis usando el Cytb, pero con mayor soporte de los nodos. El árbol filogenético mitocondrial reveló la existencia de dos grandes clados dentro de Kinosterninae, exhibiendo parafilia del género *Kinosternon* con respecto al género *Sternotherus* (Fig. 1). Sin embargo, las filogenias obtenidas utilizando los marcadores nucleares concatenados y la evidencia completa mtADN+nADN (Fig. 3 y 4, respectivamente) exhibieron monofilia recíproca débil a moderada entre los géneros *Sternotherus* (IB PP=91, ML BP=98) y *Kinosternon* (IB PP=61, ML BP=76). La filogenia completa separó este último género en los mismos dos grandes grupos revelados por la filogenia mitocondrial concatenada, pero exhibiendo monofilia recíproca entre los dos géneros. El primer grupo incluye las especies *K. herrerae*, *K. creaseri*, *K. acutum*, *K. angustipons*, *K. dunnii* y el clado correspondiente a *K. leucostomum* (IB PP=1, ML BP=61). El segundo grupo incluye las especies *K. flavescens*, *K. subrubrum*, *K. baurii*, *K. durangoense*, *K. stejnegeri*, *K. alamosae*, *K. sonoriense*, *K. chimalhuaca*, *K. hirtipes*, *K. oaxacae*, *K. integrum* y el grupo *K. scorpioides* sensu lato (IB PP=1, ML BP=37).

3.2 *Kinosternon leucostomum*

Las 26 secuencias mitocondriales concatenadas representaron siete conjuntos de haplotipos (numerados consecutivamente con números romanos I-VII, Fig. 2 y 5). Tanto los árboles filogenéticos obtenidos del análisis de las secuencias

mitocondriales concatenadas como del marcador Cytb recuperaron al grupo *leucostomum* como monofilético, obteniéndose estos grupos de haplotipos con un soporte de medio a robusto dentro de una politomia (Fig. S1 y S2), por lo que no fueron concluyentes con las relaciones de parentesco entre estos.

La distribución geográfica de estos haplotipos fue: los grupos I y II se registraron en Centroamérica (Guatemala Honduras y Nicaragua), mientras que los grupos restantes se registraron todos en Suramérica: Cuenca Alta del río Magdalena (III) y cuencas del río Sinú, Medio y Bajo Magdalena (IV-VII), todos en Colombia (Fig. 6).

3.2.1 Redes de haplotipos, diferenciación y distancias genética

Las agrupaciones filogeográficas establecidas fueron parcialmente soportadas por los análisis de estructura y distancia genética. Por un lado, los análisis de componentes principales realizados de manera independiente con la matrices mitocondriales y nucleares revelaron la existencia de al menos dos clústeres correspondientes con las agrupaciones centro y suramericana (Fig. S5). En el caso del PCA mitocondrial, un tercer clúster correspondiente a los individuos de la cuenca alta del río Magdalena fue identificado.

Las relaciones no dicotómicas entre los haplotipos mitocondriales evaluada a través de redes de parsimonia revelaron una débil estructuración en todo el clado *leucostomum* (Fig. 8). La red de haplotipos reveló que los grupos I y II (Centroamérica) se encuentran más estrechamente relacionados con el grupo de

haplotipos VI (Medio Magdalena, 5 y 9 pasos mutacionales respectivamente), que entre sí. Los demás haplotipos se encuentran entre 1 y 6 pasos mutacionales de diferencia del mismo haplotipo VI. Los haplotipos nucleares mostraron poca correspondencia con los linajes mitocondriales, predominando la existencia de haplotipos nucleares compartidos por los diferentes linajes (Fig. S6). Únicamente las redes basadas en los fragmentos HMGB y R35 (Fig. S6 C y G, respectivamente), formaron clústeres de alelos nucleares con cierta dominancia de linajes centroamericanos y suramericanos, respectivamente.

Las distancias p no corregidas calculadas a partir del fragmento Cytb con base en cada grupo de haplotipos (Tabla 2, expresadas en porcentajes) fueron coherentes con esta poca diferenciación. Dichas distancias oscilaron entre 0.09% entre los grupos V y VI, y 0.93% entre los grupos II y V. La distancia entre los grupos centroamericanos fue de 0.82%, y su distancia al grupo de haplotipos más cercano (VI) fue de 0.41% y 0.60%, respectivamente. La distancia entre los grupos de distribución colombiana osciló entre 0.26% entre los grupos IV y VI, y 0.56% entre los grupos III y V. Por otra parte, las distancias genéticas al interior de cada uno de los grupos oscilaron entre 0%, en el grupo II, y 0.28% en el grupo III. En contraste, las distancias genéticas de cada grupo con los taxones *K. angustipons* y *K. durni*, reconocidos filogenéticamente como más cercanos a *K. leucostomum*, oscilaron entre 9.16% y 9.58%. La distancia entre estas dos especies fue de 5.25%.

3.3 *Kinosternon scorpioides sensu lato.*

Los análisis filogenéticos basados en los marcadores mitocondriales (concatenados y Cytb, respectivamente) revelaron las relaciones entre los 49 haplotipos identificados, numerados consecutivamente en números romanos VIII-XV y agrupados en ocho linajes denominados con base en su distribución geográfica (Fig. 2 y Fig. S2). Estos linajes tuvieron valores de medio a buen soporte de sus nodos y fueron separados en dos clados principales centro y suramericano (Fig. 2), éste último con un mejor soporte (PP>0.9).

Dentro del clado centroamericano se encuentran dos sub clados: el primero exhibiendo con buen soporte a *K. oaxacae* como hermano del grupo *abaxillare* (haplotipo VIII, encontrado en Guatemala; ML:0.93; PP:97). Adicionalmente, el grupo *scorpioides HN* (haplotipo IX, distribuido al SW de Honduras) y la especie *K. integrum* fueron reveladas como especies hermanas sucesivas del clado (*K. oaxacae* + *abaxillare*. Fig. 2). El segundo subclado está compuesto por una politomía que incluye los linajes *cruentatum* (haplotipo X, encontrado en Guatemala), *albogulare* (haplotipo XI, distribuido en Costa Rica, Honduras y archipiélago de San Andrés), más tres secuencias cuyos haplotipos no pudieron ser identificados por información incompleta, denominadas *K. scorp.* CH5691, *K. scorp.* MTD094 MX y *K. s. cruen.* HBS11939 (Fig. 2). El clado suramericano agrupa los linajes transandinos y cisandinos, divididos a su vez en tres subclados. Los dos primeros subclados corresponden a los linajes cisandinos (no monofiléticos), identificados en los sistemas de los ríos Cayenne (Guayana

Francesa), Suriname (Suriname) y la región del Gran Chaco (Paraguay) en el caso del grupo *cisandino I*; y el sistema del río Orinoco (Orinoquia colombiana) para el caso del grupo *cisandino II*. El tercer subclado incluye el linaje transandino, distribuidos en los sistemas de los ríos Magdalena, Cauca, y Sinú, los cuales exhibieron una estructuración geográfica NE/SW, por lo que se denominaron por separado *transandino I* y *transandino II*, respectivamente.

Aunque las agrupaciones de haplotipos propias de cada linaje se mantuvieron en el análisis de la evidencia completa (mtDNA + nDNA), esta reveló algunas diferencias en las relaciones entre los linajes y los soportes de sus nodos (Fig. 5).

3.3.1 Estructura y distancia genética

El análisis de componentes principales realizado con la información de cada genoma concatenado (mitocondrial, Fig. 7; nuclear, Fig. 10) revelaron la existencia de cuatro grupos ligeramente solapados (A-D) que se correspondieron parcialmente con la agrupación de haplotipos basada en la filogenia mitocondrial: grupos *cruentatum* y *albogulare* (A), grupo *scorpioides HN* (B), grupos *cis-Andinos* (C), grupos *trans-Andinos* (D). Estas agrupaciones fueron parcialmente correspondidas con la información de los marcadores individuales BDNF y R35 (Fig. S9), los cuales coincidieron con la formación de clústeres correspondientes con los principales clados dentro de *K. scorpioides* (BDNF: separó los clados centro y suramericano, este último en grupos *cisandino* y *transandino*; R35: separó los clados centro y suramericano).

La conformación de estos linajes fue soportada por la evaluación de las relaciones no dicotómicas en redes de parsimonia con base en el conjunto mitocondrial de datos (Fig. 8). En este se encontró evidencia que soporta la distante relación entre los linajes centroamericanos *scorpioides HN*, *cruentatum* y *albogulare* (entre 37 y 47 pasos mutacionales), incluyendo al grupo *abaxillare*, el cual se recoge más cercano a los linajes suramericanos (56 pasos mutacionales), que a los anteriores. Dentro de estos grupos suramericanos, en los linajes cisandinos y sus respectivos haplotipos se encontraron entre 21 y 33 pasos mutacionales. Los linajes transandinos (I y II) formaron grupos de haplotipos separados por 7 pasos mutacionales, estando más cercanos entre sí que de cualquier otro linaje.

Sin embargo, la correspondencia entre los haplotipos nucleares por locus y estos linajes mitocondriales fue variable, siendo los marcadores BDNF y R35 los más informativos. En estos, se revelaron haplotipos exclusivos de linajes mitocondriales, así como clústeres de haplotipos nucleares con dominancia de linajes mitocondriales según su distribución (i.e. Clado centroamericano, Clado suramericano: grupos *cisandino* o *transandino*. Fig. S7). Los demás marcadores mostraron poca estructuración generalizada (Fig. S8).

En las distancias p no corregidas calculadas con base en el fragmento del gen *Cytb* (Tabla. 3), se reveló una distancia genética que oscila entre 2.86% entre los grupos centroamericanos *albogulare* y *cruentatum*, y 4.45% entre los grupos centroamericanos *abaxillare* y *cruentatum*.

Por su parte, la distancia entre los grupos suramericanos obtuvo valores menores generalizados, oscilando entre 0.60% entre los linajes *transandino I* y *transandino*

II; 2.61% entre los linajes *cisandino I* y *cisandino II* y 2.23-2.30% entre los linajes *transandinos* y *cisandinos*. Las divergencias al interior de los grupos suramericanos oscilaron entre 0.26% (grupo *transandino II*) y 1.75% (grupo *cisandino II*).

Estos valores contrastan con los obtenidos para las especies *K. oxacae* y *K. integrum*, dos taxones filogenética y sistemáticamente reconocidos que hacen parte de este clado *scorpioides* sensu lato, y cuya distancia genética fue de 3.58%.

4. DISCUSIÓN

4.1 Linajes mitocondriales refutan la taxonomía tradicional

Los resultados mitocondriales obtenidos posicionan con buen soporte el clado *leucostomum* sensu lato en un clado distinto al clado *scorpioides* sensu lato+*Sternotherus*. Esto coincide con lo reportado previamente por Iverson et al. (2013) para esta relación, obteniéndose valores de soporte más robustos. Estos autores propondrían este primer clado como el nuevo género *Cryptochelys*, incluyendo las especies *leucostomum*, *herrerai*, *acutum*, *creaseri*, *angustipons* y *dunni* (IB PP=1, ML BP=97); y el segundo, *Sternotherus*+*Kinosternon* sensu stricto (IB PP=0,95, ML BP= 92). Sin embargo, este resultado debe tomarse con precaución, pues ya se han documentado eventos evolutivos como la captura e introgresión de haplotipos mitocondriales en especies divergentes, llevando a que la información de este genoma pueda ser sesgada (Hillis, 2019). De hecho, esta clasificación sería refutada en las filogenias de marcadores nucleares concatenados y la totalidad de los marcadores concatenados (Fig. 3 y Fig. 4 respectivamente), las

cuales respaldan la propuesta de Spinks et al. (2014) en la que se exhibe la monofilia recíproca entre los géneros *Sternotherus* (BI PP=91, ML BP=98) y *Kinosternon* (BI PP=61, ML BP=76).

Esta filogenia mitocondrial también coincidió con otros árboles previos en aspectos como la no monofilia de las especies del género *Staurotypus*, y dentro de Kinosterninae, la no monofilia de la especie *S. minor* y el interior del grupo *subrubrum* (que incluye las especies *baurii*, *flavescens*, *subrubrum* y *steindachneri*) (Scott et al., 2018; Serb et al., 2001). También se obtuvo una relación cercana entre las especies *K. chimalhuaca* y *K. hirtipes*, constituyendo estas el grupo hermano de *K. sonoriense* (obtenida no monofilética en la filogenia construida con la evidencia total), rechazando la relación de esta última con *oaxacae* e *integrum*, como habría reportado Spinks (2014).

En cuanto a *K. leucostomum* y *K. scorpioides*, estos dos taxones han sido divididos en dos y tres subespecies, respectivamente, principalmente con base en la combinación de caracteres asociados con la forma, tamaño y composición del plastrón y el caparazón, además de patrones de coloración, unión de los escudos y otros caracteres merísticos (Berry & Iverson, 2001a; 2001b). Sin embargo, de manera distintiva para cada especie, los resultados aquí obtenidos contradicen esta organización taxonómica.

4.2 *Kinosternon leucostomum*

Por un lado, sobre *K. leucostomum* se denota su poca estructura genética a lo

largo de su rango de distribución. Aunque se logró recuperar la monofilia del taxón nominal, la evidencia sobre la separación entre los clados Norte/Sur en la que estudios basados en morfología y algunas aproximaciones moleculares previas coinciden y que dan soporte a las subespecies actualmente descritas *K. l. leucostomum* y *K. l. postinuginale* (Berry & Iverson, 2001a; Iverson, 1991; Ramírez-Guerra, 2016), no fue tan clara.

Las redes de parsimonia construidas con los grupos de haplotipos mitocondriales identificados fueron parcialmente correspondientes con varias de las poblaciones previamente señaladas por Berry J, (1978): La distribución del haplotipo I corresponde con las poblaciones E, F y G, distribuidas en los sistemas de los ríos Motagua, Ulua y Patuca (Guatemala y Honduras), respectivamente; el haplotipo II se distribuye por la costa de Mosquitos (Nicaragua), donde fuera identificado el fenotipo intermedio de las dos subespecies; mientras que los cinco haplotipos transandinos suramericanos exhiben distribución concordante con la población U, identificada en el sistema del río Magdalena (Colombia). Sin embargo, ninguna filogenia logró recuperar grupos genéticos completamente coincidentes con la separación de subespecies propuesta por Berry (1978).

Sobre la posición filogenética de estas dos subespecies, Ramírez-Guerra (2016) reportó dos escenarios posibles, donde su evidencia mitocondrial sugiere que *K. l. postinuginale* exhibe parafilia con respecto a *K. l. leucostomum*, mientras que su evidencia nuclear respalda la monofilia recíproca de estas. Al respecto, los resultados obtenidos en esta investigación son coincidentes con el primer

supuesto, pero aumentando el número de nodos en el clado, dando lugar a una extensa politomía. Dentro de esta se encuentran los grupos centroamericanos (incluidas las muestras de *K. l. leucostomum* utilizadas por Ramírez-Guerra [2016]) y los diferentes haplotipos suramericanos, cuyas relaciones de parentesco no fueron establecidas.

Este escenario de poca divergencia entre poblaciones se soporta también en las distancias p no corregidas calculadas para el fragmento Cytb, parámetro que ha sido ampliamente utilizado en la identificación de linajes evolutivos en quelonios, así como en otros grupos de vertebrados (Bhaskar & Mohindra, 2019; Cocca et al., 2018; Kartavtsev, 2011) (Cocca et al., 2018; Ennen et al., 2014; Petzold et al., 2014; Vargas-Ramírez et al. 2013, Vargas-Ramírez et al., 2020). En estas se determinaron valores de distancia <1%, reflejando divergencias mucho menores con respecto a otras especies congéneres (incluyendo *K. scorpoides*) y similares a los exhibidos por linajes de quelonios estrechamente relacionadas entre sí y por patrones de diferenciación intraespecífica (Vargas-Ramírez et al., 2013; Wong et al., 2010).

Teniendo en cuenta la ausencia de una barrera geográfica conspicua que limite eficientemente el flujo genético entre poblaciones (la región baja de centroamérica, desde el Este de Nicaragua hasta Panamá, ha sido descrita como un importante corredor de herpetofauna, tanto de grupos propios del norte que migran al sur, como en sentido contrario [Bryson et al., 2012; Cocca et al., 2018; Mata-Silva et al., 2019; Phillips et al., 2015; Savage, 1966]), es posible que la

variación en la cuál se sustenta la diferenciación taxonómica de estas subespecies sea explicada desde la perspectiva de una variación geográfica en forma de clina y no de una divergencia genética como resultado del aislamiento reproductivo de las poblaciones, como se esperaba. No se descarta que otro factor para la baja diferenciación poblacional sea una posible dispersión reciente de poblaciones provenientes de Centroamérica hacia el sur.

4.3 La tortuga Tapaculo *Kinosternon scorpioides* representa un complejo de especies

Por su rápida evolución, el DNA mitocondrial ha sido ampliamente utilizado como criterio para establecer límites entre especies cercanas. Sin embargo, dada su herencia materna también ha sido criticado por no reflejar la “verdadera” historia evolutiva de las especies (Rubinoff & Holland, 2005; Will & Rubinoff, 2004). Por esto, se ha hecho común la inclusión de información nuclear en los diferentes estudios filogeográficos, mostrando utilidad en evidenciar eventos como el flujo genético entre poblaciones y el descubrimiento de linajes crípticos en grupos de amplia distribución; fenómeno documentado en diferentes grupos de vertebrados (pero no exclusivamente), incluyendo aves (Battey & Klicka, 2017; Zhang et al., 2019), peces (Dias et al., 2019; Ríos et al., 2017), mamíferos (Hu et al., 2020; Juste et al., 2018; Morales-Martínez et al., 2021), anfibios y reptiles (Bryson et al., 2012; Padial & De La Riva, 2009; Phillips et al., 2015). Puntualmente en quelonios, linajes crípticos han sido identificados en diferentes taxones, incluyendo las especies *Pelomedusa subrufa* (Vargas-Ramírez et al., 2010; Wong et al., 2010),

Chelus fimbriatus (Vargas-Ramírez et al., 2020), y en los géneros *Cyclemys* (Fritz et al., 2008) y *Emys* (Fritz et al., 2005).

En ese mismo sentido, los diferentes resultados obtenidos respaldan la existencia de cuatro linajes centroamericanos y tres suramericanos, los cuales según las diferentes líneas de evidencia (soporte filogenético, estructura y distancias genéticas) legitiman la revisión taxonómica, pudiendo ser compatibles con la clasificación de especies independientes.

El primer linaje identificado incluye únicamente la agrupación *cruentatum*, distribuido en Guatemala (una muestra del departamento de Suchitepéquez y dos muestras de procedencia desconocida dentro del país). El segundo linaje corresponde al grupo *abaxillare*, recuperado como hermano de *K. oaxacae*, relación concordante con lo sugerido por Iverson et al., (2013), quien señala que la distribución de *K. abaxillare* se restringe al sistema del río Grijalva (en su recorrido por la Depresión de Chiapas), aislado de los demás linajes identificados para dicha Sierra y los altiplanos de Chiapas (México), Guatemala y Honduras. Este grupo (*abaxillare+oaxacae*) se recoge como el grupo hermano del tercer linaje identificado, denominado *scorpioides HN*, registrado hacia el sureste de la Sierra Madre de Chiapas en los sistemas de los ríos Lempa y Ulúa (Cordillera Sur de Honduras) que desembocan en el Océano Pacífico y el Mar Caribe, respectivamente. Juntos, este conjunto constituye el hermano sucesivo de *K. integrum*. El último linaje centroamericano corresponde al denominado linaje *albogulare*, distribuido principalmente en la parte alta de la costa de Mosquitos

(Departamento Gracias a Dios, Honduras) y el archipiélago de San Andrés y Providencia en Colombia. Adicionalmente, dentro de este linaje se encontró un grupo de haplotipos (XIa y XIb) de distribución en la vertiente pacífica continental (Costa Rica) que vale la pena estudiar a profundidad, pues su separación del resto de haplotipos del linaje presenta un soporte considerable, además de mostrar una acumulación de más de 20 pasos mutacionales entre sí, y al haplotipo más cercano dentro del mismo linaje mitocondrial (XIc) (Fig. 8).

Los linajes restantes, todos de distribución suramericana, se dividen en dos linajes cisandinos parafiléticos con respecto al último de ellos, el cual posee distribución transandina. Tanto análisis filogenéticos como redes de parsimonia coinciden en posicionar estos grupos como linajes independientes.

El primer linaje suramericano *cisandino I* se distribuye en la ecorregión Amazónica, mientras que el segundo linaje *cisandino II* se encontró en individuos de distribución en la ecorregión orinocense (Fig. 9). Es posible que el origen de estos linajes esté relacionado con la formación de la cuenca del Orinoco en el Mioceno tardío debido al levantamiento del Arco de Vaupés, como ha sido sugerido para la tortuga *Chelus orinocensis* recientemente descrita y otros organismos acuáticos de ambas ecorregiones (Vargas-Ramírez et al., 2020 y referencias citadas en este estudio). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que esta divergencia haya estado influenciada por las fluctuaciones ecológicas que tuvieron lugar durante el Pleistoceno, producto de los ciclos glaciales e interglaciales que caracterizaron en gran medida el clima cuaternario Kukla &

Cílek, 1996).

Finalmente, el último linaje incluye los individuos de distribución transandina, con dominancia de haplotipos según el sistema fluvial: Al noreste de la distribución, en las cuencas bajas de los ríos Cauca y Magdalena domina el grupo de haplotipos *transandino I*; mientras que, al suroeste de la región muestreada, en las cuencas de los ríos Sinú y Cauca domina el grupo *transandino II*.

Estas agrupaciones en los diferentes linajes fueron validadas a través de las distancias genéticas del Cytb (Tabla 3), estrategia ampliamente utilizada en diferentes grupos, incluidos quelonios, y que supone que las distancias serían iguales o mayores a las distancias entre especies cercanas del mismo género (>~3%) para el caso de especies distintas; siendo menores (<~3%) para los casos de variación intraespecífica. De esta manera, las distancias genéticas de los linajes suramericanos fueron menores al 3% en el Cytb (de 2.23 a 2.61%); lo que, de la mano con la presencia de haplotipos únicos nucleares, ofrecen evidencia de que su divergencia correspondería a diferentes linajes evolutivos independientes, comparable a nivel de subespecies. Con esto, se confirmó la considerable diferenciación genética que sugiere la distinción taxonómica, además de la divergencia menor entre los haplotipos transandinos (0,6%), sugiriendo una diferencia filogeográfica intraespecífica.

4.4 Divergencia entre grupos centroamericanos y suramericanos

Los patrones de distribución de la diversidad de herpetofauna en el continente

americano ya han sido objeto de estudio, logrando identificarse atributos geográficos que han funcionado como barreras que condicionan, de una u otra forma, la separación y permanencia de clados centroamericanos y suramericanos, y dentro de estos la conformación de diferentes grupos.

Por un lado, la geografía de las tierras altas centrales de Guatemala y Honduras condicionan el aislamiento de los linajes identificados para la parte alta de centroamerica (*albogulare*, *scorpioides HN* y *cruentatum*). Estas formaciones, localizadas en la triple conjunción de las placas tectónicas de Cocos, del Caribe y de Norte América, y cuyo origen aún se encuentra en discusión (Witt et al., 2012), han condicionado la historia evolutiva de varios organismos, siendo considerada un punto con altos niveles de endemismo para diferentes grupos biológicos (Iverson et al., 2015; Johnson, 1990; Rocha-Méndez et al., 2019).

El linaje correspondiente al grupo *albogulare* se distribuye en las tierras bajas del Pacífico costarricense y el Atlántico nicaragüense, región que hace parte de la zona de intercambio de fauna entre el núcleo centroamericano y el territorio continental suramericano, a través de la conexión del puente que forman Costa Rica y Panamá, además de encontrarse una población en el archipiélago de San Andrés y Providencia. En esta región fueron descritas poblaciones que exhiben características fenotípicas intermedias entre las poblaciones adyacentes al norte y sur de la distribución (Berry, 1978). Según la red de parsimonia mitocondrial, los haplotipos de este linaje efectivamente son intermedios entre los linajes centro y suramericanos, pero la distancia entre estos y la poca representación de esta

región en los muestreos sugieren la necesidad de estudios más profundos. Los resultados disponibles indican, adicionalmente, que no hay diferencias genéticamente marcadas entre las poblaciones continentales y la población insular, apoyando la hipótesis de origen introducido en este lugar (Forero-Medina et al. 2007).

Por otra parte, el patrón más visible en los linajes suramericanos es la separación de los linajes *cis* y *transandinos*, evidente en la mayoría de los análisis adelantados. Esta importante barrera, la Cordillera de los Andes, ha creado condiciones geográficas y climáticas variables para cada vertiente del sistema, no solo longitudinal sino altitudinalmente, dejando su huella filogeográfica y favoreciendo el aislamiento y la divergencia evolutiva en varios grupos biológicos, incluyendo mamíferos (Morales-Martínez et al., 2021; Pine et al., 2012), aves (Avenidaño et al., 2013; Brumfield & Capparella, 1996; Cadena et al., 2016) anfibios (Kieswetter & Schneider, 2013; Padial & De La Riva, 2009) y otros reptiles (Frost et al., 2001; Hernández Morales et al., 2020; Torres-Carvajal & Lobos, 2014; Vargas-Ramírez & Moreno-Arias, 2014).

Esta separación fue soportada incluso por información nuclear en las redes de haplotipos (BDNF, Fig. S7), sugiriendo que estas poblaciones han estado aisladas el tiempo suficiente para acumular un leve grado de divergencia nuclear, evidenciada en la existencia de haplotipos únicos para cada vertiente del sistema montañoso.

Aunque los haplotipos cisandinos provenientes de las ecorregiones orinocense y

amazónica aparecieron bien diferenciados, es necesario ampliar el muestreo en gran parte de sus distribuciones para determinar si estos son exclusivos de cada ecorregión, o si por el contrario hay simpatría entre ellas y una posible hibridación

No obstante, como se mencionó anteriormente, este patrón de divergencia orinocense-amazónico puede interpretarse de diferentes formas:

Por un lado, Vargas-Ramírez y colaboradores (2020) describieron recientemente la nueva especie de tortuga matamata *Chelus orinocensis*, restringida para el sistema del río Orinoco (separándola de la especie amazónica *Chelus fimbriatus* con base en análisis morfológicos y genómicos [taxonomía integrativa]), demostrando que es posible que la separación de estos haplotipos (linajes) haya estado influenciada por la formación de la cuenca del Orinoco durante el Mioceno tardío (hace ~10.5 millones de años, Cooper et al., 1995), y mantenida por las características diferenciales bióticas y abióticas que contribuyen a moldear el camino evolutivo de los linajes que habitan cada ecorregión.

Por otro lado, podría considerarse que el grado de divergencia, así como las distancias genéticas entre los haplotipos identificados, sugieren una separación más reciente. Esta pudo ser influenciada por las fluctuaciones ecológicas consecuencia de los ciclos glaciales e interglaciales ocurridos durante el Pleistoceno (hace ~2.8 millones de años y finalizando hace ~12 mil años, Berger, 1990; Kukla & Cílek, 1996), factor que ha sido considerado previamente como influyente en los patrones de distribución y diversificación de otros grupos biológicos sudamericanos (ver Whinnett et al., 2005; Quijada-Mascareñas et al.,

2007; Vargas-Ramírez et al., 2010; Davis et al., 2016; Brusquetti et al., 2019).

Esta última interpretación se suma al debate en torno a la hipótesis de refugios inicialmente propuesta por Haffer (1969), quien sugiere que estas fluctuaciones condujeron a ciclos de expansión y retracción del bosque amazónico, generando parches de bosque que funcionaran como “refugios”, favoreciendo la divergencia de las especies que les habitaban a través del aislamiento geográfico. Sin embargo, esta propuesta ha sido criticada en las últimas décadas, principalmente a partir de evidencia paleoecológica que rechaza la propuesta de parches de bosque en una matriz de sabana durante este período, un pilar de esta hipótesis (ver Bush & Oliviera, 2006; pero ver D’Apolito et al., 2013).

Pese a esto, la propuesta se mantiene vigente con sus múltiples adaptaciones, en gran medida porque la diversidad amazónica puede ser el resultado de múltiples factores actuando en diferentes instancias temporales (divergencias precedentes al Pleistoceno que se profundizaron durante este período), incluyendo los cambios ligados a los ciclos glaciales – interglaciales (además de otros aspectos asociados al clima Cuaternario, detalles en Baker et al., 2020), con la contribución de mecanismos de diversificación tanto alopátricos como parapátricos en diferentes taxones (Rocha & Kaefer, 2019).

En cualquier caso, para establecer con claridad el tiempo de existencia de estos, y los demás linajes identificados, es necesario realizar un análisis más profundo (reloj molecular), teniendo en cuenta el registro fósil de la mano del amplio muestreo sugerido previamente.

A diferencia de los anteriores, los grupos transandinos tuvieron un muestreo que permitió detectar ciertos patrones de estructuración poblacional. Aunque las filogenias coinciden en separar el linaje *transandino I* del resto de clados que componen el linaje *transandino II*, las redes de haplotipos nucleares no mostraron patrón alguno sobre la existencia de haplotipos únicos en cada sistema de drenaje. Esta discordancia entre la información mitocondrial y nuclear puede estar evidenciando flujo genético remanente (actual o pasado), lo que ayudaría a explicar el patrón de distribución de los haplotipos en las ciénagas del caribe colombiano. Esta región presenta períodos estacionales de inundaciones y sequías, permitiendo la conectividad por la captura de cuerpos de agua durante períodos de inundación, facilitando el flujo genético estacional. Por el contrario, también hay que tener en cuenta las bajas tasas de movimiento reportadas para la especie (Berry & Iverson, 2001a; Giraldo et al., 2012; Swarth, 2010), lo que podría condicionar en sentido contrario limitando el flujo y manteniendo la estructuración, explicando en cierta medida el patrón de distribución parapátrica de los linajes transandinos, los cuales presentan una persistencia en las cuencas del Bajo Cauca y Bajo Magdalena (*trans I*) y la cuenca del Río Sinú y Bajo Cauca (*trans II*).

4.5 Lo que dicen otras líneas de evidencia

Algunos estudios y anotaciones se han llevado a cabo sobre la ecología, morfología y reproducción de varias poblaciones (*in situ*, en cautiverio y en colecciones) a lo largo de toda la distribución de *K. scorpioides* (Acuña-Mesen &

Marquez B., 1993; Cáceres-Martínez et al., 2017; Pereira et al., 2019; Rocha & Molina, 1990; Viana et al., 2014). Al respecto, Iverson (2010) realizó una caracterización de su biología reproductiva con énfasis en poblaciones de México y Belize (*K. s. cruentatum*), comparando con otras poblaciones suramericanas. Primero, las poblaciones a lo largo de la costa pacífica de México y Guatemala presentan un tamaño corporal similar a aquellas del otro lado de la Sierra Madre de Chiapas, en la península de Yucatán, siendo estos organismos de talla más pequeña que aquellos de poblaciones suramericanas. Adicionalmente se ha reportado una relación entre el tamaño corporal y el tamaño de la puesta de huevos, por lo que las anidadas de estos últimos organismos también suelen ser más pequeñas.

Sobre las poblaciones distribuidas en la Sierra Madre de Chiapas, compatible con el lugar donde se identificó el linaje *abaxillare*, se ha determinado que no hay una variación marcada respecto de las poblaciones anteriores, aunque se ha registrado un ligero mayor tamaño en las hembras (Acuña-Mesen & Marquez B., 1993; Ceballos et al., 2016; Iverson, 2010; Márquez, 1995). Sin embargo, la evidencia aquí obtenida sobre su posición filogenética dentro del género, sumado a su distribución restringida a la Depresión de Chiapas, una planicie bordeada por la Sierra Madre y las Montañas del Norte, lo que configura un aislamiento geográfico y genético, respalda la idea de autonomía evolutiva de *K. scorpioides* y su categorización como especie independiente.

Las poblaciones al occidente del Istmo (occidente de Panamá hasta Honduras),

cuya distribución es compatible con el linaje *albogulare*, han sido diferenciadas por alcanzar tallas más grandes que las poblaciones Yucatecas, y a diferencia de estas, tienen un dimorfismo sexual con mayor tamaño en los machos (Acuña-Mesen & Marquez B., 1993; Berry J, 1978; Iverson, 2010). Adicionalmente se registraron diferencias en la configuración y tamaño del caparazón en los individuos que habitan esa región, compatible con la distribución del linaje *albogulare*, siendo este más alargado e hidrodinámico en las zonas de Bosque Húmedo Tropical (vertiente Caribe, donde se identificaron los haplotipos XIc-XIf), y más redondeado en las zonas de Bosque Seco Tropical (vertiente Pacífico, donde se identificaron los haplotipos XIa-XIb) (Acuña-Mesen & Marquez B., 1993).

Los resultados de este estudio identificaron que los haplotipos para el Chaco Boreal están dentro del rango descrito para la previamente reconocida subespecie *K. s. seriei*, y las muestras de Surinam corresponden a la localidad más cercana disponible de Pará, Brasil, donde fuera descrita *K. s. carajasensi*. No obstante, una revisión morfométrica de las subespecies suramericanas descritas hasta entonces, realizada por Cabrera & Colantonio (1997), concluyó principalmente el rechazo a la separación de estas subespecies, señalando que no había evidencia suficiente para separarlas de *K. s. scorpioides*. Cada una de estas subespecies fue definida principalmente con base en el tamaño de su cuerpo y el aislamiento geográfico, pues los demás caracteres diagnóstico establecidos por Freiberg (1936) y Cunha (1970) fueron desestimados en dicha revisión.

4.6 Implicaciones para la taxonomía y conservación

Este estudio reveló la composición genética para las especies *K. leucostomum* y *K. scorpioides* en gran parte de sus extensas distribuciones, encontrando diferentes patrones en cada una; existencia de varios linajes evolutivos independientes para *K. scorpioides* y presencia de diferenciación filogeográfica para *K. leucostomum*. Estos resultados tienen implicaciones tanto para la sistemática general de cada taxón, sugiriendo la necesidad de una revisión en sus clasificaciones internas, como en la conservación de la diversidad genética para cada uno:

Por un lado, aunque para el grupo *K. leucostomum* no se encontró una estructuración tan evidente que revelara la existencia de linajes independientes que se correspondieran con las subespecies actualmente aceptadas, si hay evidencia de una distribución alopátrica de haplotipos con cierta diversificación hacia su distribución suramericana. Esto indica la existencia de un corredor que permite (o permitió recientemente) el flujo genético, el cuál debería ser conservado con el fin de mantener los niveles de diversidad de la especie.

Por otro lado, para el caso de *K. scorpioides* estos resultados revelaron la existencia de siete linajes evolutivos independientes, los cuales corresponderían a Unidades Evolutivas Independientes (ESU por sus siglas en inglés sensu Moritz, 1994). Si bien esto es insuficiente para impulsar cambios definitivos en la sistemática del taxón, si sugieren que debe prestarse especial atención a los límites entre subespecies, especialmente en Suramérica, donde se encontraron

diferencias genéticas que cuestionan la definición de la única subespecie *K. s. scorpioides*.

Adicionalmente, la importancia de estas ESU se realiza en el contexto de las amenazas que enfrenta la especie a nivel local y global, demostrando que los esfuerzos de conservación no deberían enfocarse en solo una parte de su área de distribución, si no en el rango de cada linaje identificado. Sin embargo, teniendo en cuenta que no se cuenta con información suficiente para cada linaje, se requieren investigaciones dirigidas a la biología reproductiva, demografía y ecología de estas, con el fin evaluar objetivamente el impacto de las diferentes amenazas a nivel local, incluyendo la actividad humana directa o indirecta.

Finalmente, aunque por cuenta de sus amplias distribuciones, ninguno de los grupos taxonómicos presenta una categorización de amenaza a nivel global; *K. leucostomum* está categorizada por la IUCN como Low Concern (LC) y *K. scorpioides* aún no está evaluada, aunque la subespecie *K. s. albogulare* está catalogada como Vulnerable para Colombia. A pesar de lo anterior, las dos especies afrontan varias las amenazas incluyendo la degradación de hábitat, la cacería para consumo humano y especialmente, el cambio climático pues es sabido que las especies de este género poseen la determinación sexual con base en la temperatura de incubación de los huevos (Vogt & Flores-Villela, 1992). Esto lleva a prestar especial atención al estado de las poblaciones naturales para cada linaje, pues para muchas de estas existe un gran vacío de información.

REFERENCIAS

Acuña Mesen, R., Marquez B., C., 1993. El dimorfismo sexual de *Kinosternon scorpioides* (Testudines: Kinosternidae) en Palo Verde, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 41, 261–265. <https://doi.org/10.15517/rbt.v41i2.23360>

Ardila-Marulanda, M., De La Ossa V., J., De La Ossa-Lacayo, A., 2016. Uso de quelonios continentales en el golfo de Morrosquillo, Sucre, Colombia. *Rev. Colomb. Cienc. Anim. - RECIA* 8, 361. <https://doi.org/10.24188/recia.v8.n0.2016.392>

Avendaño, J.E., Cortés-Herrera, J.O., Briceño-Lara, E.R., Rincón-Guarín, D.A., 2013. Crossing or bypassing the Andes: a commentary on recent range extensions of cis-Andean birds to the West of the Andes of Colombia. *Orinoquia* 17, 207–214.

Backström, N., Fagerberg, S., Ellegren, H., 2008. Genomics of natural bird populations: A gene-based set of reference markers evenly spread across the avian genome. *Mol. Ecol.* 17, 964–980. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03551.x>

Baker, P.A.; Sherilyn, C.F.; Battisti, D.S.; Dick, C.W.; Vargas, O.M., Asner, G.P., Matin, R.E., Wheatley, A., Prates, I., 2020. Beyond Refugia: New Insights on Quaternary Climate Variation and the Evolution of Biotic Diversity in Tropical South America. In V. Rull, A. C. Carnaval (eds.), *Neotropical Diversification: Patterns and Processes*, Fascinating Life Sciences (1st ed., pp. 54-71). Springer, Cham.

Barley, A.J., Spinks, P.Q., Thomson, R.C., Shaffer, H.B., 2010. Fourteen nuclear genes provide phylogenetic resolution for difficult nodes in the turtle tree of life. *Mol. Phylogenet. Evol.* 55, 1189–1194. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.11.005>

Battey, C.J., Klicka, J., 2017. Cryptic speciation and gene flow in a migratory songbird Species Complex: Insights from the Red-Eyed Vireo (*Vireo olivaceus*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 113, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.05.006>

Berger, W.H., 1990. The younger dryas cold spell - a quest for causes. *Global and Planetary Change*, 3(3), 219–237. doi:10.1016/0921-8181(90)90018-8

Berriozabal-Islas, C., Ramírez-Bautista, A., Torres-Ángeles, F., Mota Rodrigues, J.F., Macip-Ríos, R., Octavio-Aguilar, P., 2020. Climate change effects on turtles of the genus *Kinosternon* (Testudines: Kinosternidae): an assessment of habitat suitability and climate niche conservatism. *Hydrobiologia* 847, 4091–4110. <https://doi.org/10.1007/s10750-020-04402-y>

Berry J, F., 1978. Variation and systematics in the *Kinosternon scorpioides* and *K. leucostomum* complexes (Reptilia: Testudines: Kinosternidae) of Mexico and Central. University of Utah.

Berry, J.F., Iverson, J.B., 2001a. *Kinosternon scorpioides*. *Cat. Am. Amphib. Reptil.* doi:10.15781/T2GB1XN2W

Berry, J.F., Iverson, J.B., 2001b. *Kinosternon leucostomum*. Cat. Am. Amphib. Reptil. doi:10.15781/T2M32NF5J

Berry, J. F., J. B. Iverson y G. Forero-Medina. 2012. *Kinosternon scorpioides* (Linnaeus 1766). Pp. 340-348. En: Páez-Nieto V. P., Morales-Betacourt M. A., Lasso C. A., Castaño-Mora O.V., B.B. (1ª Ed.), 2012. *Biología y Conservación de Las Tortugas Continentales de Colombia*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH).

Bhaskar, R., Mohindra, V., 2019. Phylogenetic relationships among Indian freshwater turtles (family Trionychidae and Geoemydidae) with special reference to *Lissemys punctata*, inferred from mitochondrial cytochrome b gene sequences. *Meta Gene* 22, 100610. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2019.100610>

Brumfield, R.T., Capparella, A.P., 1996. Historical diversification of birds in Northwestern South America: A molecular perspective on the role of vicariant events. *Evolution* (N. Y). 50, 1607–1624. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1996.tb03933.x>

Brusquetti, F., Netto, F., Baldo, D., Haddad, C., 2019. The influence of Pleistocene glaciations on Chacoan fauna: genetic structure and historical demography of an endemic frog of the South American Gran Chaco. *Biological Journal of the Linnean Society*, 126(3), 404-616. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/bly203>

Bryson, R.W., García-Vázquez, U.O., Riddle, B.R., 2012. Diversification in the Mexican horned lizard *Phrynosoma orbiculare* across a dynamic landscape. *Mol.*

Phylogenet. Evol. 62, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.09.007>

Bush, M.B., Oliveira, P.E. 2006. The rise and fall of the Refugial Hypothesis of Amazonian speciation: a paleoecological perspective. *Biota Neotropica*, 6(1). doi:10.1590/S1676-06032006000100002

Butler, C.J., 2019. A review of the effects of climate change on chelonians. *Diversity* 11. <https://doi.org/10.3390/d11080138>

Cabrera, M.R., Colantonio, S.E., 1997. Taxonomic Revision of the South American Subspecies of the Turtle *Kinosternon scorpioides*. *Soc. Study Amphib. Reptil.* 31, 507–513.

Cáceres-Martínez, C.H., Acevedo Rincón, A.A., Sierra Leal, J.A., González-Maya, J.F., 2017. *Kinosternon scorpioides scorpioides* (Testudines: kinosternidae): nuevo reporte en el Nororiente de Colombia. *Acta Biol. Colomb.* 22, 242–245. <https://doi.org/10.15446/abc.v22n2.59804>

Cadena, C.D., Pedraza, C.A., Brumfield, R.T., 2016. Climate, habitat associations and the potential distributions of Neotropical birds: Implications for diversification across the Andes. *Rev. la Acad. Colomb. Ciencias Exactas, Físicas y Nat.* 40, 275. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.280>

Carter, A.L., Janzen, F.J., 2021. Predicting the effects of climate change on incubation in reptiles: methodological advances and new directions 1–10. <https://doi.org/10.1242/jeb.236018>

Ceballos, C.P., Zapata, D., Alvarado, C., Rincón, E., 2016. Morphology, Diet, and Population Structure of the Southern White-lipped Mud Turtle *Kinosternon leucostomum postinguinale* (Testudines: Kinosternidae) in the Nus River Drainage, Colombia. *J. Herpetol.* 50, 374–380. <https://doi.org/10.1670/15-035>

Chiari, Y., Vences, M., Vieites, D.R., Rabemananjara, F., Bora, P., Ramilijaona Ravoahangimalala, O., Meyer, A., 2004. New evidence for parallel evolution of colour patterns in Malagasy poison frogs (*Mantella*). *Mol. Ecol.* 13, 3763–3774. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02367.x>

Cocca, W., Rosa, G.M., Andreone, F., Aprea, G., Bergò, P.E., Mattioli, F., Mercurio, V., Randrianirina, J.E., Rosado, D., Vences, M., Crottini, A., 2018. The herpetofauna (Amphibia, crocodylia, squamata, testudines) of the isalo massif, southwest madagascar: Combining morphological, molecular and museum data. *Salamandra* 54, 178–200.

Cooper, M.A., Addison, F.T., Alvarez, R., Coral, M., Graham, R.H., Hayward, A.B., Howe, S., Martinez, J., Naar, J., Peñas, R., Pulham, A.J., Taborda, A., 1995. Basin development and tectonic history of the Llano Basin, Eastern Cordillera, and middle Magdalena Valley, Colombia. *AAPG Bull.* 79, 1421–1444.

Cordero, G.A., Reeves, R., Swarth, C.W., 2012. Long distance aquatic movement and home-range size of an eastern mud turtle, *Kinosternon subrubrum*, population in the Mid-Atlantic Region of the United States. *Chelonian Conserv. Biol.* 11, 121–124. <https://doi.org/10.2744/CCB-0874.1>

Corredor-Londoño, G.A., Kattan, G., Galvis-Rizo, C.A., Amorocho, D., 2007. Tortugas del Valle del Cauca. Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca, Cali.

Crawford, N.G., Parham, J.F., Sellas, A.B., Faircloth, B.C., Glenn, T.C., Papenfuss, T.J., Henderson, J.B., Hansen, M.H., Simison, W.B., 2015. A phylogenomic analysis of turtles. *Mol. Phylogenet. Evol.* 83, 250–257. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.10.021>

D'Apolito, C., Absy, M.L., Latrubesse, E.M. 2013. The Hill of Six Lakes revisited: new data and re-evaluation of a key Pleistocene Amazon site. *Quaternary Science Reviews*, 76, 140–155. doi:10.1016/j.quascirev.2013.07.013

Davis, M.A., Douglas, M.R., Collyer, M.L., Douglas, M.E., 2016. Deconstructing a species-complex: Geometric morphometric and molecular analyses define species in the Western Rattlesnake (*Crotalus viridis*). *PLoS One* 11, 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146166>

Dias, R.M., Lima, S.M.Q., Mendes, L.F., Almeida, D.F., Paiva, P.C., Britto, M.R., 2019. Different speciation processes in a cryptobenthic reef fish from the Western Tropical Atlantic. *Hydrobiologia* 837, 133–147. <https://doi.org/10.1007/s10750-019-3966-z>

Dutcher, K.E., Vandergast, A.G., Esque, T.C., Mittelberg, A., Matocq, M.D., Heaton, J.S., Nussear, K.E., 2020. Genes in space: what Mojave desert tortoise genetics can tell us about landscape connectivity. *Conserv. Genet.* 21, 289–303.

<https://doi.org/10.1007/s10592-020-01251-z>

Ennen, J.R., Kalis, M.E., Patterson, A.L., Kreiser, B.R., Lovich, J.E., Godwin, J., Qualls, C.P., 2014. Clinal variation or validation of a subspecies? A case study of the *graptemys nigrinoda* complex (testudines: Emydidae). *Biol. J. Linn. Soc.* 111, 810–822. <https://doi.org/10.1111/bij.12234>

Fritz, U., Fattizzo, T., Guicking, D., Tripepi, S., Pennisi, M.G., Lenk, P., Joger, U., Wink, M., 2005. A new cryptic species of pond turtle from southern Italy, the hottest spot in the range of the genus *Emys* (Reptilia, Testudines, Emydidae). *Zool. Scr.* 34, 351–371. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2005.00188.x>

Fritz, U., Gong, S., Auer, M., Kuchling, G., Schneewei, N., Hundsdörfer, A.K., 2010. The world's economically most important chelonians represent a diverse species complex (Testudines: Trionychidae: *Pelodiscus*). *Org. Divers. Evol.* 10, 227–242. <https://doi.org/10.1007/s13127-010-0007-1>

Fritz, U., Guicking, D., Auer, M., Sommer, R.S., Wink, M., Hundsdörfer, A.K., 2008. Diversity of the Southeast Asian leaf turtle genus *Cyclemys*: How many leaves on its tree of life? *Zool. Scr.* 37, 367–390. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2008.00332.x>

Frost, D.R., Rodrigues, M.T., Grant, T., Titus, T.A., 2001. Phylogenetics of the lizard genus *Tropidurus* (Squamata: Tropiduridae: Tropidurinae): Direct optimization, descriptive efficiency, and sensitivity analysis of congruence between molecular data and morphology. *Mol. Phylogenet. Evol.* 21, 352–371.

<https://doi.org/10.1006/mpev.2001.1015>

Fujita, M.K., Engstrom, T.N., Starkey, D.E., Shaffer, H.B., 2004. Turtle phylogeny: Insights from a novel nuclear intron. *Mol. Phylogenet. Evol.* 31, 1031–1040.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2003.09.016>

Giraldo, F., Garcés-Restrepo, F.M., Carr, J.L., 2012. *Kinosternon scorpioides*, in: Páez-Nieto V. P., Morales-Betacourt M. A., Lasso C. A., Castaño-Mora O.V., B.B. (Ed.), *Biología y Conservación de Las Tortugas Continentales de Colombia*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH).

Haffer, J. 1969. Speciation in Amazonian Forest Birds. *Science*, 165(3889), 131–137. doi:10.1126/science.165.3889.131

Hall, T., 1999. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*

Hernández Morales, C., Sturaro, M.J., Nunes, P.M.S., Lotzkat, S., Peloso, P.L.V., 2020. A species-level total evidence phylogeny of the microteiid lizard family Alopoglossidae (Squamata: Gymnophthalmoidea). *Cladistics* 36, 301–321.
<https://doi.org/10.1111/cla.12407>

Hillis, D.M., 2019. Species delimitation in herpetology. *J. Herpetol.* 53, 3–12.
<https://doi.org/10.1670/18-123>

Hu, Y., Thapa, A., Fan, H., Ma, T., Wu, Q., Ma, S., Zhang, D., Wang, B., Li, M., Yan, L., Wei, F., 2020. Genomic evidence for two phylogenetic species and long-

term population bottlenecks in red pandas. *Sci. Adv.* 6, 1–11.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.aax5751>

Iverson, J.B., 1991. Phylogenetic hypotheses for the evolution of modern kinosternine turtles. *Herpetol. Monogr.* 5, 1–27. <https://doi.org/10.2307/1466974>

Iverson, J.B., 2010. Reproduction in the red-cheeked mud turtle (*Kinosternon scorpioides cruentatum*) in Southeastern Mexico and Belize, with comparisons across the species range. *Chelonian Conserv. Biol.* 9, 250–261.
<https://doi.org/10.2744/CCB-0827.1>

Iverson, J.B., Brown, R.M., Akre, T.S., Near, T.J., Le, M., Thomson, R.C., Starkey, D.E., 2007. In Search of the Tree of Life for Turtles. *Defin. Turt. Divers. Proc. a Work. Genet. Ethics, Taxon. Freshw. Turtles Tortoises* 85–106.

Iverson, J.B., Le, M., Ingram, C., 2013. Molecular phylogenetics of the mud and musk turtle family Kinosternidae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 69, 929–939.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.06.011>

Iverson, J.D., Mata-Silva, V., García, E., Wilson, L.D., 2015. The herpetofauna of Chiapas, Mexico: composition, distribution, and conservation 271–329.

Johnson, J.D., 1990. Biogeographic Aspects of the Herpetofauna of the Central Depression of Chiapas, México, with Comments on Surrounding Areas 35, 268–278.

Jombart, T., 2015. An introduction to adegenet 2.0.0. R Package.

Juste, J., Ruedi, M., Puechmaille, S.J., Salicini, I., Ibáñez, C., 2018. Two New Cryptic Bat Species within the *Myotis nattereri* Species Complex (Vespertilionidae, Chiroptera) from the Western Palaearctic. *Acta Chiropterologica* 20, 285–300. <https://doi.org/10.3161/15081109ACC2018.20.2.001>

Kartavtsev, Y.P., 2011. Divergence at Cyt-b and Co-1 mtDNA genes on different taxonomic levels and genetics of speciation in animals. *Mitochondrial DNA* 22, 55–65. <https://doi.org/10.3109/19401736.2011.588215>

Kieswetter, C.M., Schneider, C.J., 2013. Phylogeography in the northern Andes: Complex history and cryptic diversity in a cloud forest frog, *Pristimantis w-nigrum* (Craugastoridae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 69, 462–468. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.08.007>

Knaus, B., Winter, D., Paradis, E., Jombart, T., Kamvar, Z.N., Knaus, B., Schliep, K., Alastair, P., Winter, D., 2020. Package ‘*pegas*’.

Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S. V., Paabo, S., Villablanca, F.X., Wilson, A.C., 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 6196–6200. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6196>

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

Lanfear, R., Frandsen, P. B., Wright, A. M., Senfeld, T., Calcott, B., 2016. PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Mol. Biol. Evol.* <https://doi.org/dx.doi.org/10.1093/molbev/msw260>

Leaché, A.D., McGuire, J.A., 2006. Phylogenetic relationships of horned lizards (Phrynosoma) based on nuclear and mitochondrial data: Evidence for a misleading mitochondrial gene tree. *Mol. Phylogenet. Evol.* 39, 628–644. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2005.12.016>

Loc-Barragán, J.A., Reyes-Velasco, J., Woolrich-Piña, G.A., Grünwald, C.I., Venegas de Anaya, M., Rangel-Mendoza, J.A., López-Luna, M.A., 2020. A new species of mud turtle of genus kinosternon (Testudines: Kinosternidae) from the pacific coastal plain of northwestern Mexico. *Zootaxa* 4885, 509–529. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4885.4.3>

López-Luna, M.A., Cupul-Magaña, F.G., Escobedo-Galván, A.H., González-Hernández, A.J., Centenero-Alcalá, E., Rangel-Mendoza, J.A., Ramírez-Ramírez, M.M., Cazares-Hernández, E. 2018. A Distinctive New Species of Mud Turtle from Western México. *Chelonian Conservation and Biology*, 17(1), 2–13. [doi:10.2744/CCB-1292.1](https://doi.org/10.2744/CCB-1292.1)

López-Luna, M.A., Venegas-Anaya, M., Cupul-Magaña, F.G., Rangel-Mendoza, J.A., Escobedo-Galván, A.H. 2021. Mitochondrial DNA data support the recognition of the mud turtle, *Kinosternon vogti* (Cryptodira: Kinosternidae).

Chelonian Conservation and Biology, 20(1), 97-102. <https://doi.org/10.2744/CCB-1387.1>

Maddison, W., Knowles, L., 2006. Inferring phylogeny despite incomplete lineage sorting. *Syst. Biol.* 55, 21–30. <https://doi.org/10.1080/10635150500354928>

Márquez, C., 1995. Historia natural y dimorfismo sexual de la tortuga *Kinosternon scorpioides* en Palo Verde Costa Rica. *Rev. Ecol. Latino-Americana* 2, 37–44.

Mata-Silva, V., DeSantis, D.L., García-Padilla, E., Johnson, J.D., Wilson, L.D., 2019. The endemic herpetofauna of Central America: A casualty of anthropocentrism. *Amphib. Reptil. Conserv.* 13, 1–64.

McCormack, J.E., Hird, S.M., Zellmer, A.J., Carstens, B.C., Brumfield, R.T., 2013. Applications of next-generation sequencing to phylogeography and phylogenetics. *Mol. Phylogenet. Evol.* 66, 526–538. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.12.007>

McCranie, J.R. 2018. The Lizards, Crocodiles, and Turtles of Honduras. Systematics, Distribution, and Conservation. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*, 1–129. doi:10.3099/0027-4100-15.1.1

Mendoza-Henao, A.M., Arias, E., Townsend, J.H., Parra-Olea, G., 2020. Phylogeny-based species delimitation and integrative taxonomic revision of the *Hyalinobatrachium fleischmanni* species complex, with resurrection of *H. viridissimum* (Taylor, 1942). *Syst. Biodivers.* 0, 1–21. <https://doi.org/10.1080/14772000.2020.1776781>

Morales-Betancourt, M.A., Lasso, C.A., Páez, V.P., Bock, B.C., 2015. Libro rojo de reptiles de Colombia., in: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt, p. 247.

Morales-Martínez, D.M., Rodríguez-Posada, M.E., Ramírez-Chaves, H.E., 2021. Erratum to: A new cryptic species of yellow-eared bat *Vampyressa melissa* species complex (Chiroptera: Phyllostomidae) from Colombia. *J. Mammal.* <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyab016>

Morales-Verdeja, S.A., Vogt, R.C., 1997. Terrestrial movements in relation to aestivation and the annual reproductive cycle of *Kinosternon leucostomum*. *Copeia* 1997, 123–130. <https://doi.org/10.2307/1447847>

Mothes, C.C., Howell, H.J., Searcy, C.A., 2020. Habitat suitability models for the imperiled wood turtle (*Glyptemys insculpta*) raise concerns for the species' persistence under future climate change. *Glob. Ecol. Conserv.* 24, e01247. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2020.e01247>

Nascimento, F.F., Reis, M. Dos, Yang, Z., 2017. A biologist's guide to Bayesian phylogenetic analysis. *Nat. Ecol. Evol.* 1, 1446–1454. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0280-x>

Nguyen, L.T., Schmidt, H.A., Von Haeseler, A., Minh, B.Q., 2015. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 32, 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>

Padial, J.M., De La Riva, I., 2009. Integrative taxonomy reveals cryptic Amazonian species of *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae). *Zool. J. Linn. Soc.* 155, 97–122. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2008.00424.x>

Páez-Nieto V. P., Morales-Betacourt M. A., Lasso C. A., Castaño-Mora O.V., B.B. (1ª Ed.), 2012. *Biología y Conservación de Las Tortugas Continentales de Colombia*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH).

Pereira, L.A., Santos, E.M. Dos, Tchaicka, L., De Sousa, A.L., 2019. Population analysis of *Kinosternon scorpioides* using SSR markers. *AIP Conf. Proc.* 2186, 1–5. <https://doi.org/10.1063/1.5138059>

Pérez-Pérez, A., López-Moreno, A.E., Suárez-Rodríguez, O., Rheubert, J.L., Hernández-Gallegos, O., 2017. How far do adult turtles move? Home range and dispersal of *Kinosternon integrum*. *Ecol. Evol.* 7, 8220–8231. <https://doi.org/10.1002/ece3.3339>

Petzold, A., Vargas-Ramírez, M., Kehlmaier, C., Vamberger, M., Branch, W.R., Du Preez, L., Hofmeyr, M.D., Meyer, L., Schleicher, A., Široký, P., Fritz, U., 2014. A revision of African helmeted terrapins (Testudines: Pelomedusidae: Pelomedusa), with descriptions of six new species. *Zootaxa* 3795, 523–548. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3795.5.2>

Phillips, J.G., Deitloff, J., Guyer, C., Huetteman, S., Nicholson, K.E., 2015. Biogeography and evolution of a widespread Central American lizard species

complex: *Norops humilis*, (Squamata: Dactyloidae). *BMC Evol. Biol.* 15, 20–24.
<https://doi.org/10.1186/s12862-015-0391-4>

Pine, R.H., Timm, R.M., Weksler, M., 2012. A newly recognized clade of trans-Andean *Oryzomyini* (Rodentia: Cricetidae), with description of a new genus. *J. Mammal.* 93, 851–870. <https://doi.org/10.1644/11-MAMM-A-012.1>

Praschag, P., Hundsdörfer, A.K., Fritz, U., 2007. Phylogeny and taxonomy of endangered South and South-east Asian freshwater turtles elucidated by mtDNA sequence variation (Testudines: Geoemydidae: *Batagur*, *Callagur*, *Hardella*, *Kachuga*, *Pangshura*). *Zool. Scr.* 36, 429–442. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2007.00293.x>

Pritchard, P.C., Trebbau, P., 1984. Turtles of Venezuela. *Soc. Study Amphib. Reptil.* 403.

Quijada-Mascareñas, J, Ferguson, J.E., Pook, C.E., Salomão M.G., Thorpe, R.S., Wüster, W., 2007. Phylogeographic patterns of trans-Amazonian vicariants and Amazonian biogeography: the Neotropical rattlesnake (*Crotalus durissus* complex) as an example. 34(8), 1296–1312. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2007.01707.x>

Rambaut, A., 2018. FigTree.

Rambaut, A., Drummond, A.J., Xie, D., Baele, G., Suchard, M.A., 2018. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Syst. Biol.* 67, 901–

904. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>

Ramírez-Guerra, N., 2016. Caracterización filogenética de la tortuga Tapaculo *Kinosternon leucostomum postinguinale* (Testudines: Kinosternidae) (MSc Thesis). Universidad de Antioquia.

Rhodin, A.G.J., Iverson, J.B., Bour, R., Fritz, U., Georges, A., Shaffer, H.B., van Dijk, P.P., 2021. Turtles of the World: Annotated Checklist and Atlas of Taxonomy, Synonymy, Distribution, and Conservation Status (9th Ed.). Chelonian Research Foundation & Turtle Conservancy.
<https://doi.org/10.3854/crm.8.checklist.atlas.v9.2021>

Ríos, N., Bouza, C., Gutiérrez, V., García, G., 2017. Species complex delimitation and patterns of population structure at different geographic scales in Neotropical silver catfish (*Rhamdia*: Heptapteridae). *Environ. Biol. Fishes* 100, 1047–1067.
<https://doi.org/10.1007/s10641-017-0622-1>

Rocha-Méndez, A., Sánchez-González, L.A., González, C., Navarro-Sigüenza, A.G., 2019. The geography of evolutionary divergence in the highly endemic avifauna from the Sierra Madre del Sur, Mexico. *BMC Evol. Biol.* 19, 1–21.
<https://doi.org/10.1186/s12862-019-1564-3>

Rocha D.G., Igor K., 2019. What has become of the refugia hypothesis to explain biological diversity in Amazonia?. *Ecology and Evolution*, 9, 4302-4309.
[doi:10.1002/ece3.5051](https://doi.org/10.1002/ece3.5051)

Rocha, M.B. da, Molina, F. de B., 1990. Reproductive Biology of *Kinosternon scorpioides* (Testudines: Kinosternidae) in Captivity. *Tortoises & Turtles*.

Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. Mrbayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61, 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>

Rubinoff, D., Holland, B.S., 2005. Between two extremes: mitochondrial DNA is neither the panacea nor the nemesis of phylogenetic and taxonomic inference. *Syst. Biol.* 54, 952–961. <https://doi.org/10.1080/10635150500234674>

Rueda-Almonacid, J. V, Carr, J., Mittermeier, R., Rodríguez-Mahecha, J. V, Mast, R., Vogt, R., Rhodin, A., Velasquez, J., Rueda, J.N., Mittermeier, C., 2007. *Las Tortugas y los Cocodrilianos de los Países Andinos del Trópico*.

Savage, J.M., 1966. The Origins and History of the Central American Herpetofauna. *Copeia* 1966, 719. <https://doi.org/10.2307/1441404>

Scott, P.A., Glenn, T.C., Rissler, L.J., 2018. Resolving taxonomic turbulence and uncovering cryptic diversity in the musk turtles (*Sternotherus*) using robust demographic modeling. *Mol. Phylogenet. Evol.* 120, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.11.008>

Serb, J.M., Phillips, C.A., Iverson, J.B., 2001. Molecular phylogeny and biogeography of *Kinosternon flavescens* based on complete mitochondrial control

region sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 18, 149–162.

<https://doi.org/10.1006/mpev.2000.0858>

Shaffer, B.H., FitzSimmons, N.N., Georges, A., Rhodin, A.G.J., 2007. *Defining Turtle Diversity*, Chelonian Research Monographs.

Slavenko, A., Itescu, Y., Ihlow, F., Meiri, S., 2016. Home is where the shell is: Predicting turtle home range sizes. *J. Anim. Ecol.* 85, 106–114.

<https://doi.org/10.1111/1365-2656.12446>

Spinks, P.Q., Shaffer, H.B., 2007. Conservation phylogenetics of the Asian box turtles (*Geoemydidae*, *Cuora*): Mitochondrial introgression, numts, and inferences from multiple nuclear loci. *Conserv. Genet.* 8, 641–657.

<https://doi.org/10.1007/s10592-006-9210-1>

Spinks, P.Q., Shaffer, H.B., 2009. Conflicting mitochondrial and nuclear phylogenies for the widely disjunct emys (*testudines: emydidae*) species complex, and what they tell us about biogeography and hybridization. *Syst. Biol.* 58, 1–20.

<https://doi.org/10.1093/sysbio/syp005>

Spinks, P.Q., Thomson, R.C., Gidiş, M., Bradley Shaffer, H., 2014. Multilocus phylogeny of the New-World mud turtles (*Kinosternidae*) supports the traditional classification of the group. *Mol. Phylogenet. Evol.* 76, 254–260.

<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.03.025>

Spinks, P.Q., Thomson, R.C., Pauly, G.B., Newman, C.E., Mount, G., Shaffer,

H.B., 2013. Misleading phylogenetic inferences based on single-exemplar sampling in the turtle genus *Pseudemys*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 68, 269–281. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.03.031>

Spitzweg, C., Vamberger, M., Ihlow, F., Fritz, U., Hofmeyr, M.D., 2020. How many species of angulate tortoises occur in Southern Africa? (Testudines: Testudinidae: Chersina). *Zool. Scr.* 49, 412–426. <https://doi.org/10.1111/zsc.12418>

Stafford, P., Meyer, J., 2000. *A Guide to the Reptiles of Belize*. The Natural History Museum, London, United Kingdom, and Academic Press, San Diego, California, United States.

Swarth, C.W., 2010. Notes on the Movement and Aquatic Behavior 26, 233–235.

Templeton, A.R., Crandall, K.A., Sing, C.F., 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132, 619–633. <https://doi.org/10.1093/genetics/132.2.619>

Torres-Carvajal, O., Lobos, S.E., 2014. A new species of alopoglossus lizard (Squamata, Gymnophthalmidae) from the tropical Andes, with a molecular phylogeny of the genus. *Zookeys* 120, 105–120. <https://doi.org/10.3897/zookeys.410.7401>

Túnez, J.I., Cappozzo, H.L., Pavés, H., Albareda, D.A., Cassini, M.H., 2013. The role of Pleistocene glaciations in shaping the genetic structure of South American

fur seals (*Arctocephalus australis*). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 47(2), 139–152.

<https://doi.org/10.1080/00288330.2012.753463>

Vargas-Ramírez, M., Caballero, S., Morales-Betancourt, M.A., Lasso, C.A., Amaya, L., Martínez, J.G., das Neves Silva Viana, M., Vogt, R.C., Farias, I.P., Hrbek, T., Campbell, P.D., Fritz, U., 2020. Genomic analyses reveal two species of the matamata (Testudines: Chelidae: *Chelus* spp.) and clarify their phylogeography. *Mol. Phylogenet. Evol.* 148, 106823.

<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2020.106823>

Vargas-Ramírez, M., Carr, J.L., Fritz, U., 2013. Complex phylogeography in *Rhinoclemmys melanosterna*: conflicting mitochondrial and nuclear evidence suggests past hybridization (Testudines: Geoemydidae). *Zootaxa* 3670, 238.

<https://doi.org/10.11646/zootaxa.3670.2.8>

Vargas-Ramírez, M., Maran, J., Fritz, U., 2010. Red- And yellow-footed tortoises, *Chelonoidis carbonaria* and *C. denticulam* (Reptilia: Testadines: Testudinidae), in South American savannahs and forests: Do their phylogeographies reflect distinct habitats? *Org. Divers. Evol.* 10, 161–172. <https://doi.org/10.1007/s13127-010-0016-0>

Vargas-Ramírez, M., Moreno-Arias, R., 2014. Unknown evolutionary lineages and population differentiation in *Anolis heterodermus* (Squamata: Dactyloidae) from the Eastern and Central Cordilleras of Colombia Revealed by DNA Sequence

Data. *South Am. J. Herpetol.* 9, 131–141. <https://doi.org/10.2994/SAJH-D-13-00013.1>

Vargas-Ramírez, M., Vences, M., Branch, W.R., Daniels, S.R., Glaw, F., Hofmeyr, M.D., Kuchling, G., Maran, J., Papenfuss, T.J., Šíroký, P., Vieites, D.R., Fritz, U., 2010. Deep genealogical lineages in the widely distributed African helmeted terrapin: Evidence from mitochondrial and nuclear DNA (Testudines: Pelomedusidae: Pelomedusa subrufa). *Mol. Phylogenet. Evol.* 56, 428–440. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.03.019>

Viana, D.C., Rui, L.A., Santos, A.C. dos, Miglino, M.A., Assis Neto, A.C. de, Araujo, L.P.F., Oliveira, A.S., Sousa, A.L., 2014. Seasonal morphological variation of the vas deferens of scorpion mud turtle (*Kinosternon scorpioides*). *Biota Neotrop.* 14. <https://doi.org/10.1590/1676-06032014006413>

Vogt, R.C., Flores-Villela, O., 1992. Effects of Incubation Temperature on Sex Determination in a Community of Neotropical Freshwater Turtles in Southern Mexico. *Herpetol. J.* 48, 265–270.

Weinell, J.L., Bauer, A.M., 2018. Systematics and phylogeography of the widely distributed African skink *Trachylepis varia* species complex. *Mol. Phylogenet. Evol.* 120, 103–117. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.11.014>

Will, K.W., Rubinoff, D., 2004. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. *Cladistics* 20, 47–55. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2003.00008.x>

Witt, C., Brichau, S., Carter, A., 2012. New constraints on the origin of the Sierra Madre de Chiapas (south Mexico) from sediment provenance and apatite thermochronometry. *Tectonics* 31, 1–15. <https://doi.org/10.1029/2012TC003141>

Whinnett, A., Zimmermann, M., Willmott, K. R., Herrera, N., Mallarino, R., Simpson, F., Joron, M., Lamas, G., Mallet, J. 2005. Strikingly variable divergence times inferred across an Amazonian butterfly 'suture zone'. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1580), 2525–2533. doi:10.1098/rspb.2005.3247

Wong, R.A., Fong, J.J., Papenfuss, T.J., 2010. Phylogeography of the African Helmeted Terrapin, *Pelomedusa subrufa*: Genetic Structure, Dispersal, and Human Introduction. *Proc. Calif. Acad. Sci. Ser. 4*, 575–585.

Zhang, D., Tang, L., Cheng, Y., Hao, Y., Xiong, Y., Song, G., Qu, Y., Rheindt, E., Alström, P., Jia, C., Lei, F., 2019. “ghost Introgression” As a Cause of Deep Mitochondrial Divergence in a Bird Species Complex. *Mol. Biol. Evol.* 36, 2375–2386. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz170>

Tabla 1. Modelos de evolución de nucleótidos aplicados a cada codón de cada fragmento.

Gene	1	2	3
12s	GTR+G		
16s	GTR+I+G		
Cytb	HKY+I+G	GTR+I+G	GTR+G
BDNF	K80		
C-mos	K80	K80	J&C
HMGB	J&C	F81	HKY+G
ODC	HKY	HKY	J&C
R35	HKY+G		
RAG1	K80	F81	F81
RAG2	HKY+G	HKY+G	HKY

Tabla 2. Valores medios de distancias p no corregidas (porcentajes) calculadas entre y dentro de los linajes mitocondriales de *Kinosternon leucostomum* (I-VII) y las especies cercanas *K. angustipons* y *K. durni*, basado en el fragmento Cytb. Bajo la diagonal, porcentajes de divergencia; sobre la diagonal, desviación estándar (bootstrap de 1000 réplicas). En la diagonal, divergencia interna de cada (promedio \pm SE).

<i>K. leucostomum</i>	I	II	III	IV	V	VI	VII	<i>K. ang.</i>	<i>K. dun</i>
I	0.24 \pm 0.09	0,24	0,15	0,18	0,19	0,15	0,18	0,93	0,91
II	0,82	0	0,24	0,26	0,28	0,22	0,27	0,96	0,91
III	0,46	0,76	0.28 \pm 0.13	0,18	0,20	0,15	0,18	0,95	0,92
IV	0,49	0,85	0,48	0.24 \pm 0.09	0,19	0,15	0,17	0,94	0,90
V	0,55	0,93	0,56	0,42	---	0,08	0,18	0,94	0,91
VI	0,41	0,60	0,32	0,26	0,09	---	0,15	0,95	0,91
VII	0,56	0,92	0,55	0,41	0,49	0,33	0.15 \pm 0.08	0,95	0,90
<i>K. angustipons</i>	9,16	9,33	9,39	9,33	9,33	9,43	9,58	---	0,73
<i>K. durni</i>	9,37	9,23	9,39	9,33	9,33	9,42	9,42	5,25	---

Tabla 3. Valores medios de distancias p no corregidas (porcentajes) calculadas entre y dentro de los linajes mitocondriales de *Kinosternon scorpioides* (VIII-XIX) y las especies cercanas *K. oaxacae* y *K. integrum*, basado en el fragmento Cytb. Bajo la diagonal, porcentajes de divergencia; sobre la diagonal, desviación estándar (Bootstrap de 1000 réplicas). En la diagonal, divergencia interna de cada clado (promedio \pm SE).

<i>K. scorp.</i>	<i>abaxilare</i>	<i>scorp. HN</i>	<i>cruentatum</i>	<i>albogulare</i>	<i>cis I</i>	<i>cis II</i>	<i>trans I</i>	<i>trans II</i>	<i>K. oax.</i>	<i>K. int.</i>
<i>abaxilare</i>	1.29 \pm 0.34	0,56	0,54	0,52	0,57	0,55	0,55	0,56	0,58	0,58
<i>scorpioides HN</i>	4,22	0.59 \pm 0.21	0,48	0,46	0,56	0,52	0,53	0,54	0,53	0,56
<i>cruentatum</i>	4,45	3,69	1.91 \pm 0.31	0,36	0,51	0,49	0,48	0,49	0,57	0,54
<i>albogulare</i>	4,37	3,42	2,86	1.28 \pm 0.18	0,50	0,47	0,48	0,49	0,56	0,49
<i>cisandino I</i>	4,30	4,13	4,18	3,86	0,68 \pm 0.13	0,38	0,38	0,40	0,63	0,59
<i>cisandino II</i>	4,49	4,32	4,41	4,09	2,61	1.75 \pm 0.30	0,36	0,36	0,64	0,59
<i>transandino I</i>	3,98	3,74	3,79	3,52	2,23	2,25	1.14 \pm 0.07	0,18	0,64	0,53
<i>transandino II</i>	4,11	3,96	3,80	3,73	2,30	2,30	0,60	0.26 \pm 0.10	0,64	0,54
<i>K. oaxacae</i>	3,50	2,82	3,54	3,53	3,91	4,44	3,72	3,64	---	0,57
<i>K. integrum</i>	4,74	4,06	4,55	3,79	4,55	5,01	3,78	3,90	3,58	1.03 \pm 0.24

Fig. 1. Árbol filogenético obtenido de los análisis de las secuencias mitocondriales concatenadas. Los linajes dentro de *K. scorpioides* se identifican con colores diferentes. Los soportes de los nodos corresponden a probabilidad posterior (izquierda) y Bootstrap (derecha). Los asteriscos indica nodos con máximo soporte. Los grupos externos fueron removidos.

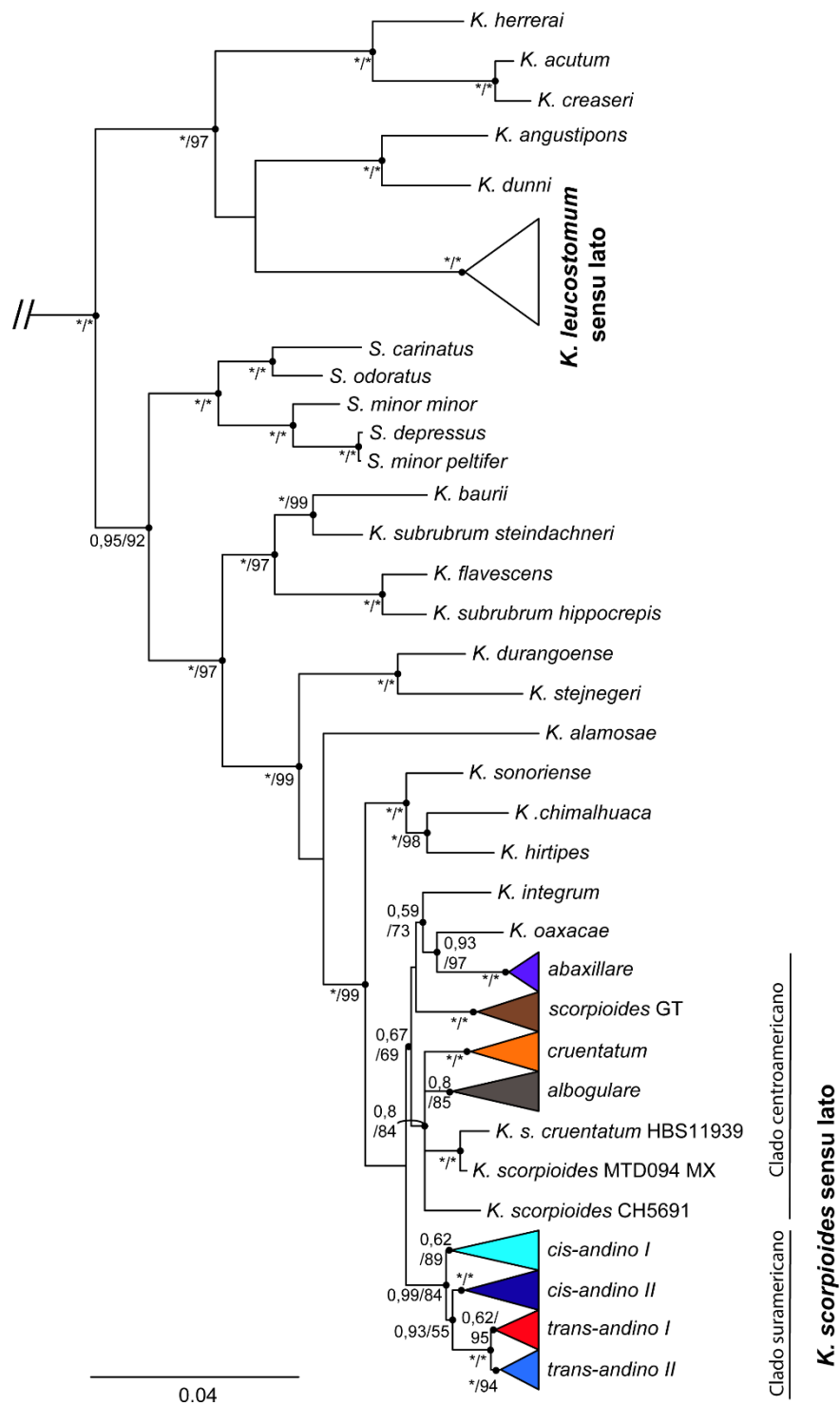


Fig. 2. Detalle de las especies de estudio en el árbol filogenético Bayesiano obtenido de analizar las secuencias mitocondriales. Izquierda *K. leucostomum*, derecha *K. scorpioides*. Para *K. leucostomum* los haplogrupos se identifican con diferentes colores. Para *K. scorpioides* los linajes se identifican con colores diferentes y código respectivo. Los soportes de los nodos corresponden a probabilidad posterior. Los asteriscos indica nodos con máximo soporte. Terminales sin numeración romana corresponden a aquellos con información insuficiente para determinar haplotipos mitocondriales. Los grupos externos fueron removidos.

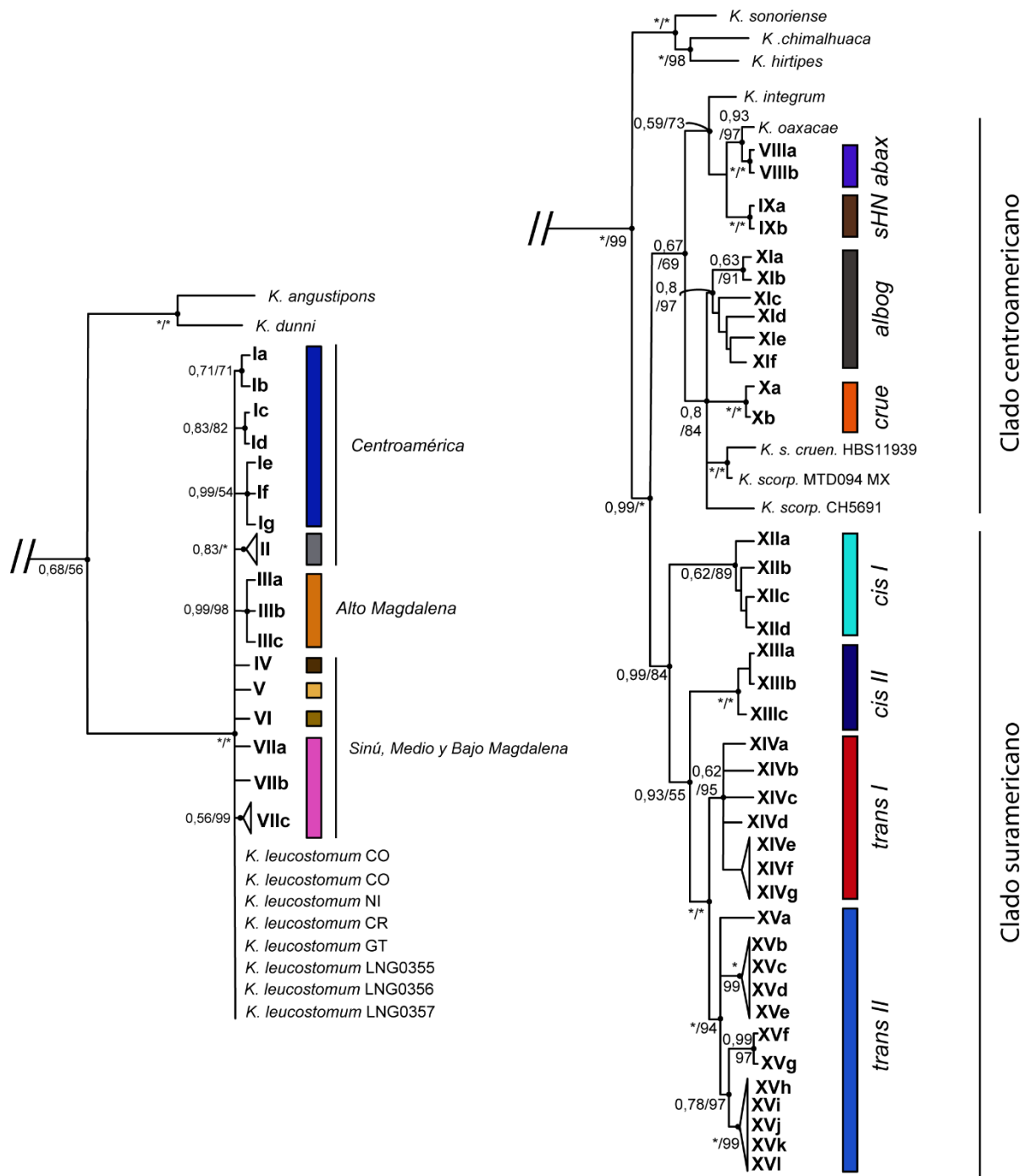


Fig. 3. Árbol filogenético Bayesiano obtenido de los análisis de las secuencias nucleares concatenadas. Los soportes de los nodos corresponden a probabilidad posterior (izquierda) y Bootstrap (derecha). Los asteriscos indica nodos con máximo soporte. Terminales sin numeración romana corresponden a aquellos con información insuficiente para determinar haplotipos mitocondriales. Los grupos externos fueron removidos.

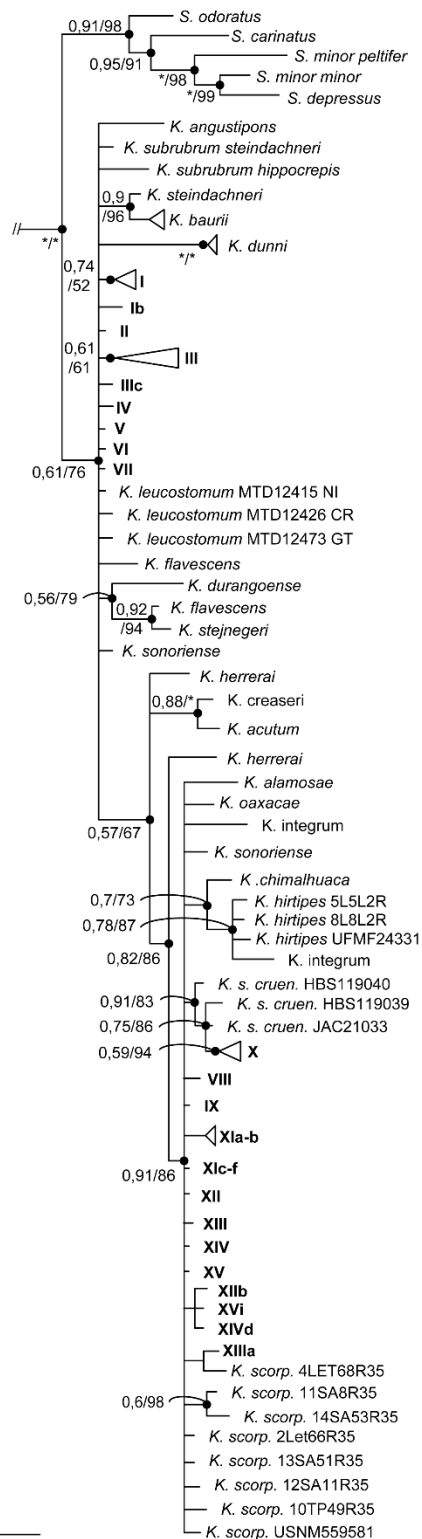


Fig. 4. Árbol filogenético Bayesiano obtenido de los análisis de las secuencias mitocondriales y nucleares concatenadas (evidencia completa). Los linajes dentro de *K. scorpioides* se identifican con colores diferentes de acuerdo a los linajes mitocondriales. Los grupos externos fueron removidos. Los soportes de los nodos corresponden a probabilidad posterior (izquierda) y Bootstrap (derecha). El asterisco indica máximo soporte del nodo.

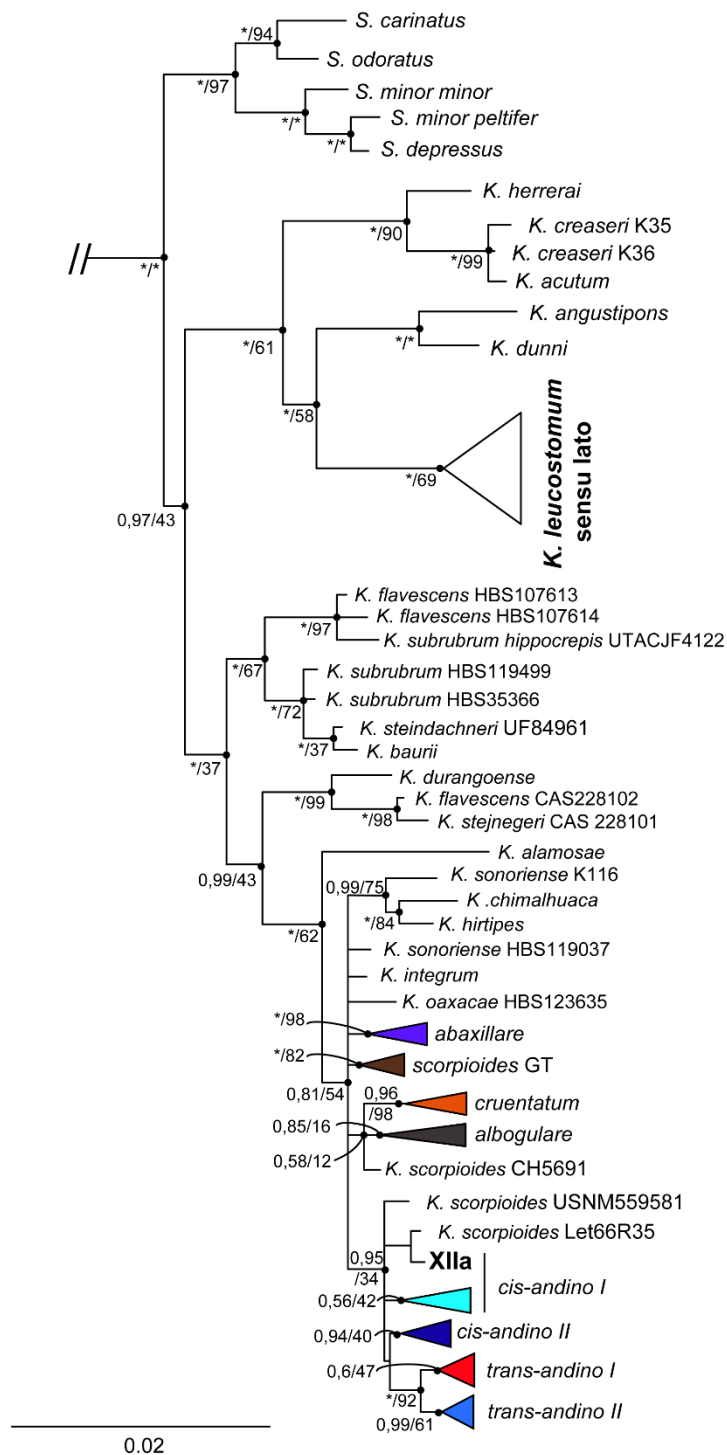


Fig. 5. Detalle de las especies de estudio en el árbol filogenético obtenido de analizar las secuencias mitocondriales y nucleares concatenadas (evidencia completa). Izquierda *K. leucostomum*, derecha *K. scorpioides*. Para *K. leucostomum* los haplogrupos se identifican con diferentes colores correspondiendo a haplotipos mitocondriales. Para *K. scorpioides* los linajes se identifican con colores correspondientes a clados mitocondriales y código respectivo. Los soportes de los nodos corresponden a probabilidad posterior. Los asteriscos indica nodos con máximo soporte. Terminales sin numeración romana corresponden a aquellos con información insuficiente para determinar haplotipos mitocondriales. Los grupos externos fueron removidos.

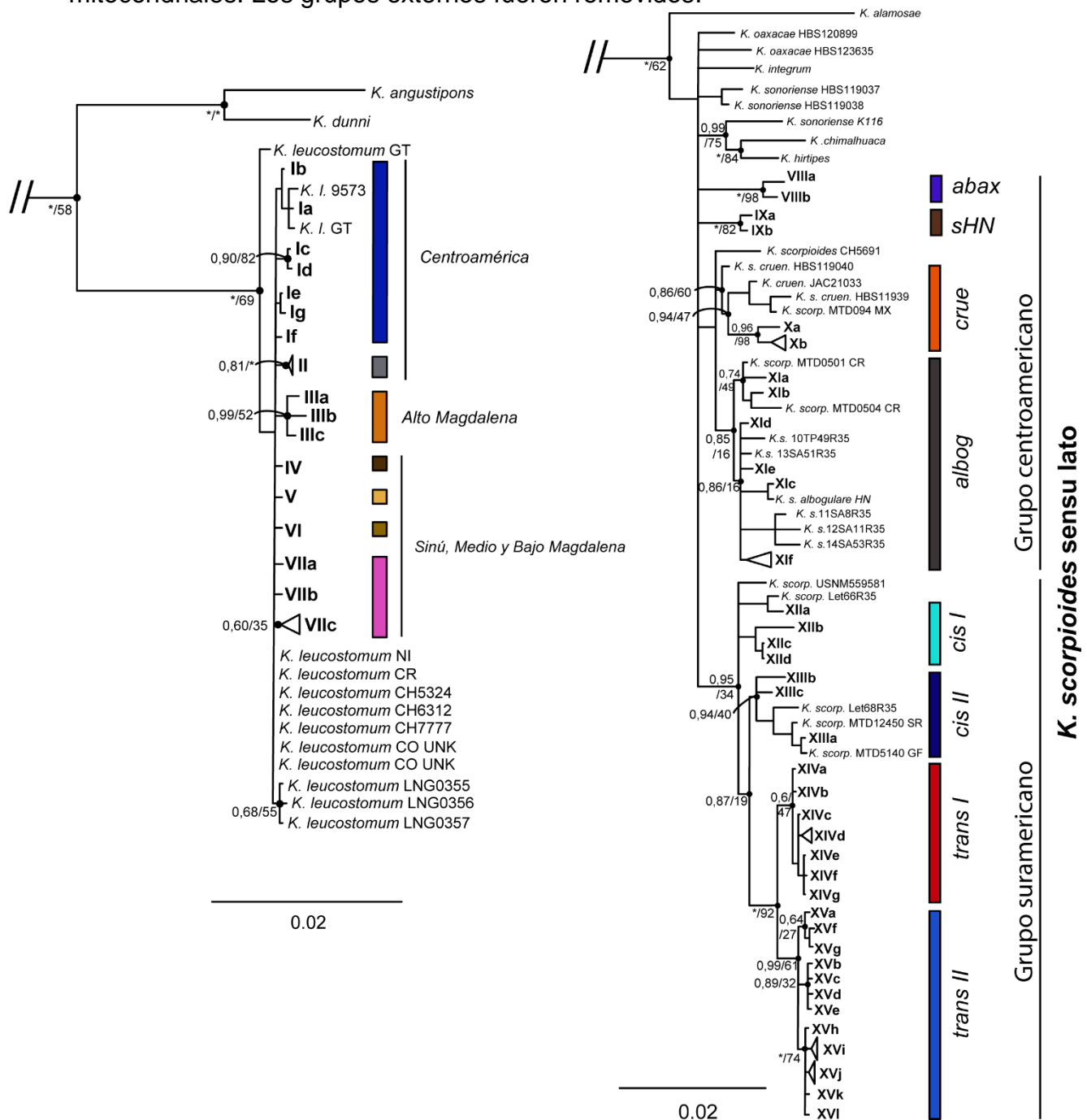


Fig. 6. Sitios de muestreo para *Kinosternon leucostomum*. Los códigos de color corresponden a los clados mitocondriales.

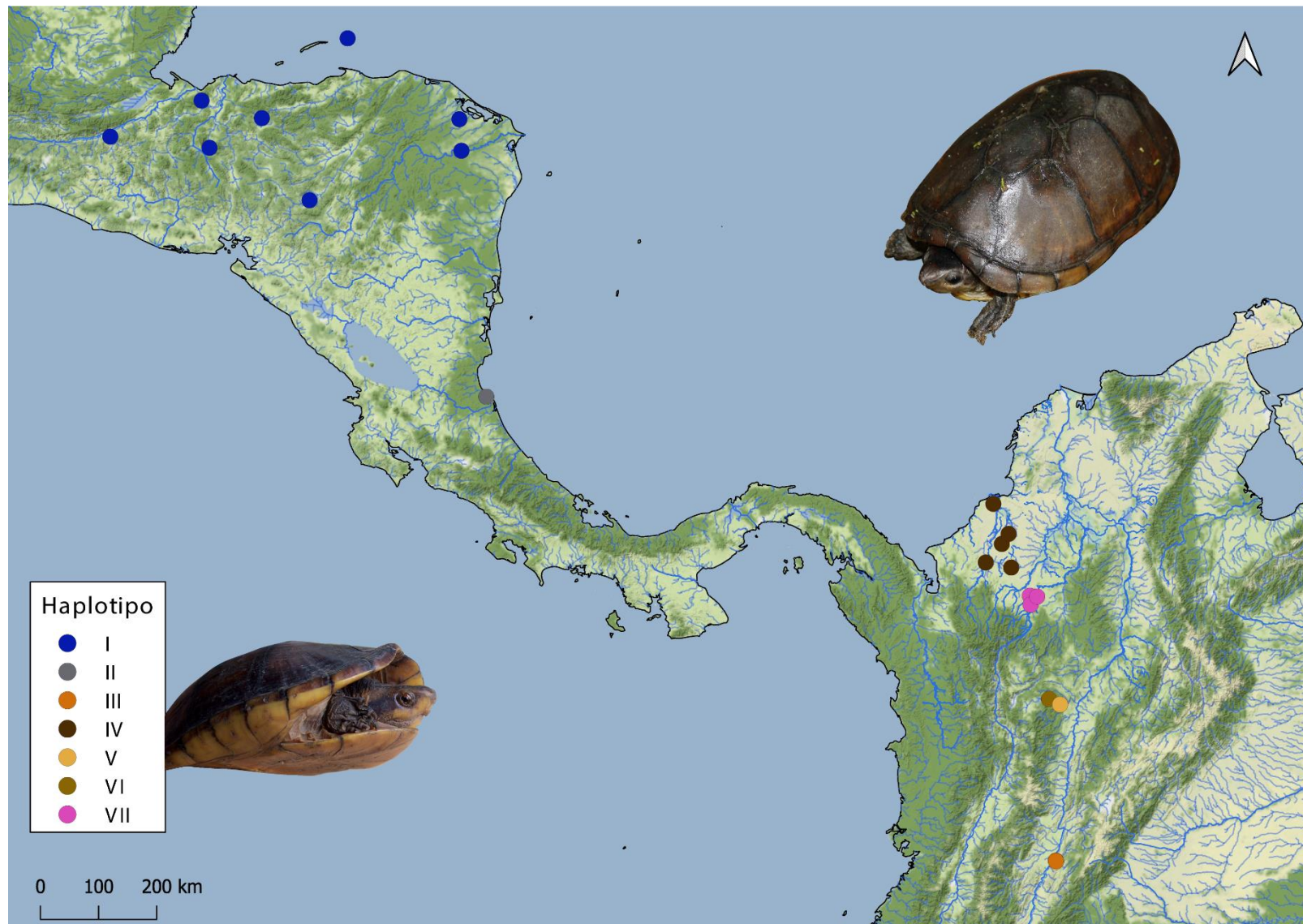


Fig. 7. Análisis de componentes principales llevado a cabo con las muestras mitocondriales concatenadas de ambos *Kinosternon scorpioides*. Los grupos de haplotipos están indicados con las letras A-D (ver texto).

MARCADORES MITOCONDRIALES

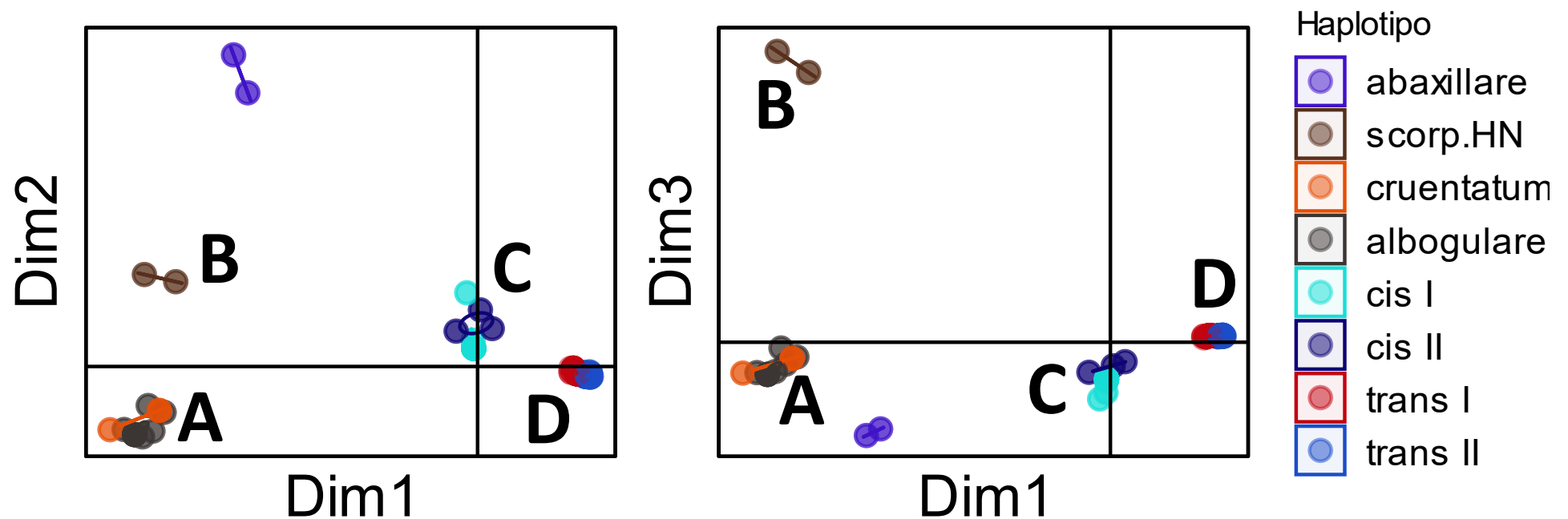
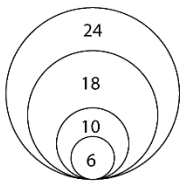
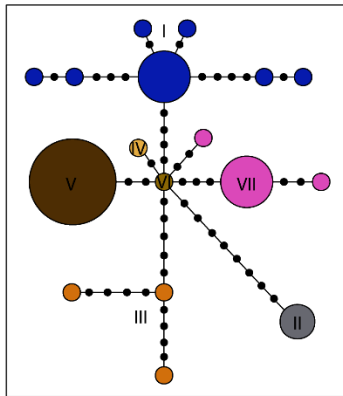


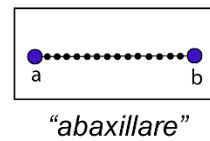
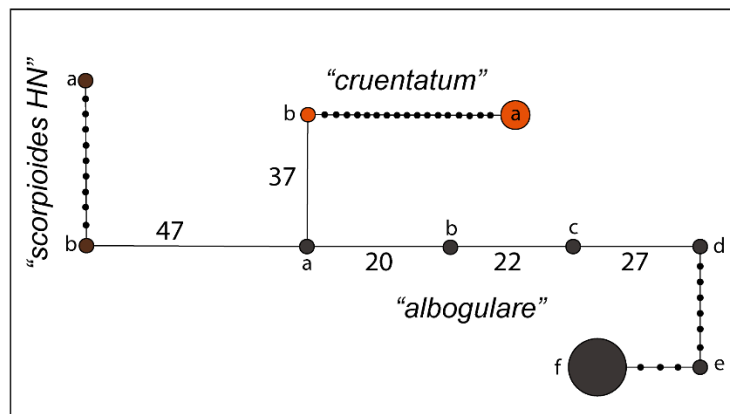
Fig. 8. Red de parsimonia de haplotipos mitocondriales de las dos especies *K.leucostomum* y *K. scorpioides* con base en 2134 bp de mtDNA. Códigos de color como en la Figura 1. El tamaño de los círculos indica la frecuencia del haplotipo, mientras que cada círculo negro entre estos representa haplotipos perdidos. Cada línea entre haplotipos represente un paso mutacional. Números junto a las líneas entre clústeres indican las mínimas diferencias corregidas entre estos.

Kinosternon leucostomum



Kinosternon scorpioides

Linajes Centroamericanos



Linajes Suramericanos

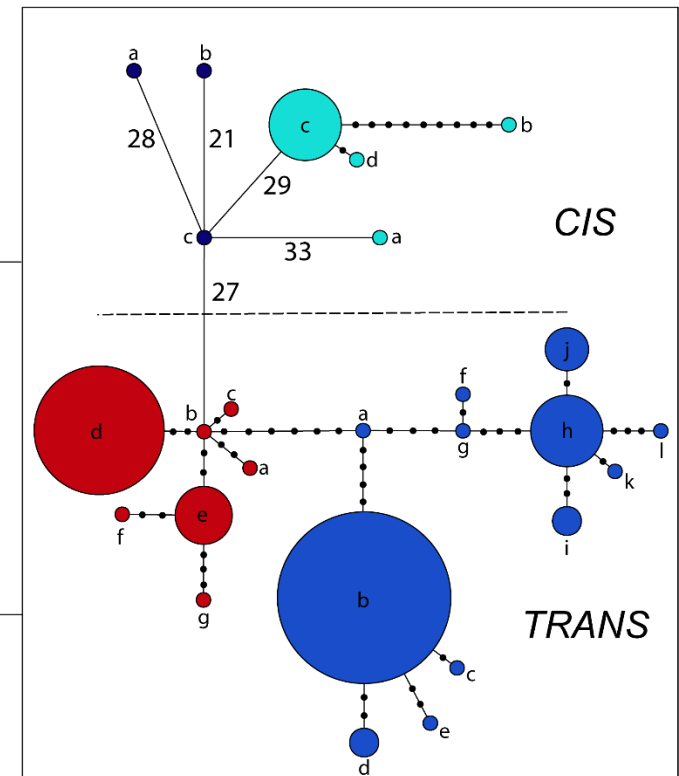


Fig. 9. Sitios de muestreo para *Kinosternon scorpioides*. Los códigos de color corresponden a los clados mitocondriales.

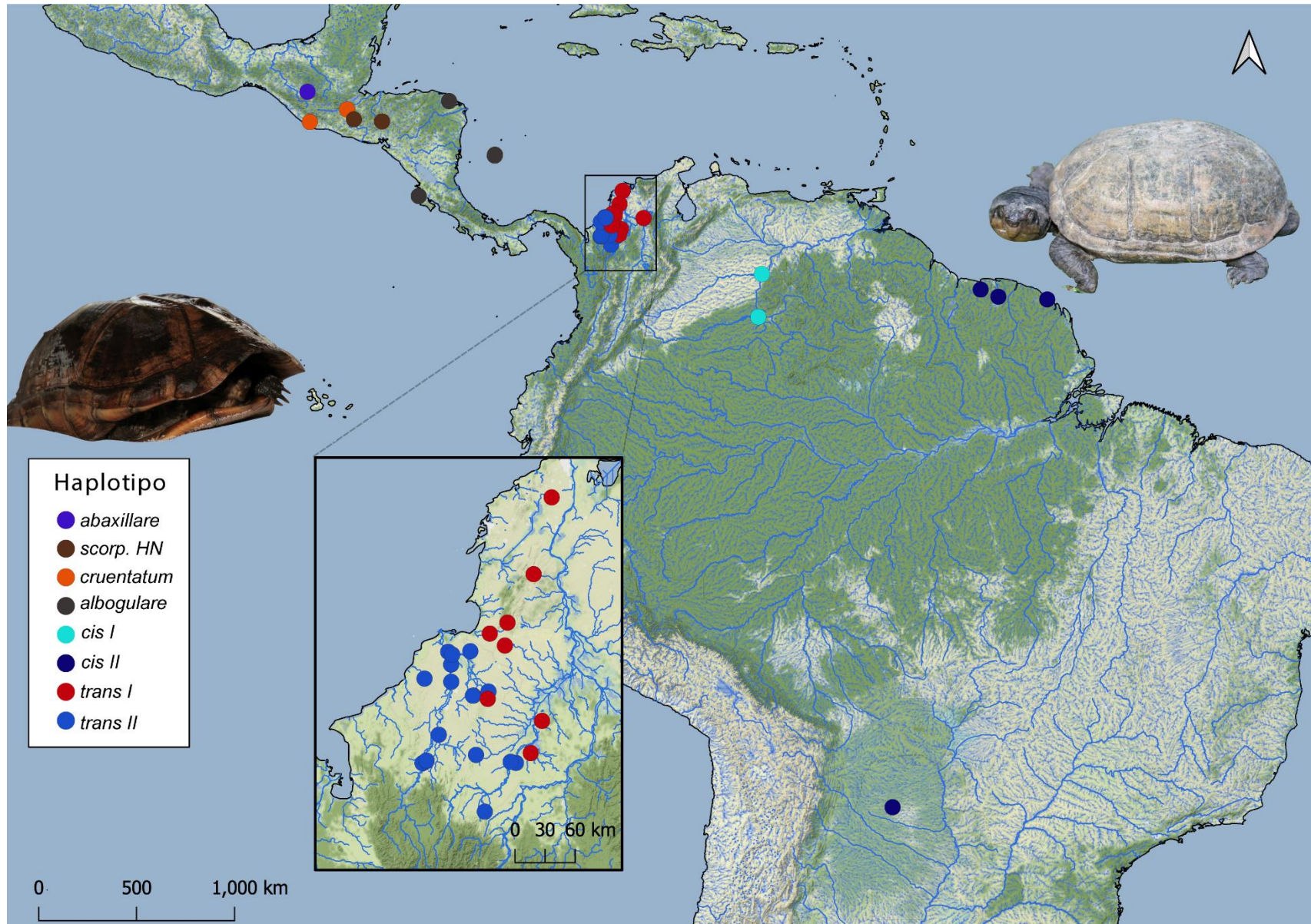


Fig. 10. Análisis de componentes principales llevado a cabo con las muestras nucleares concatenadas de *Kinosternon scorpioides*.

MARCADORES NUCLEARES

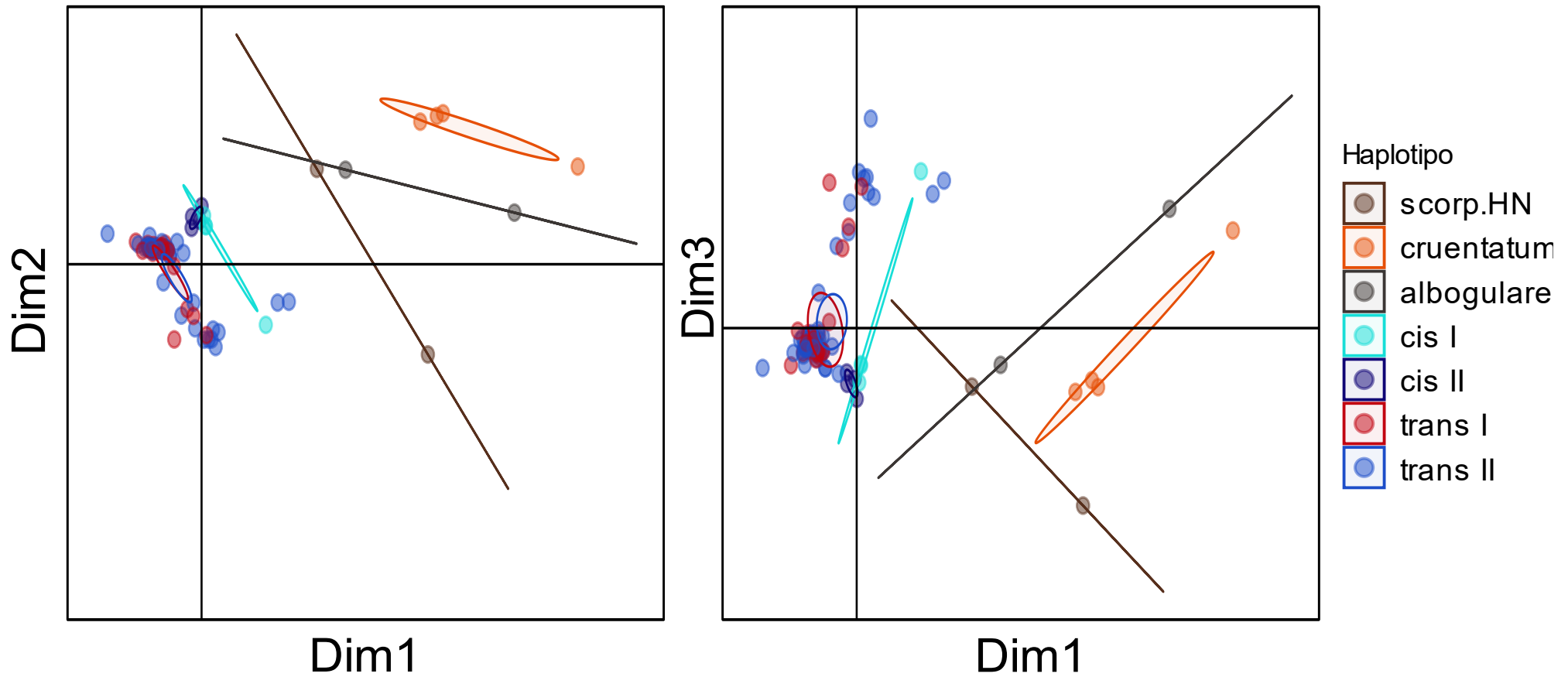


Fig. S1. Árbol bayesiano obtenido de los análisis de las secuencias de Cytb. Los linajes dentro de *K. scorpioides* se identifican con colores diferentes. Los soportes de los nodos corresponden a probabilidad posterior. Los asteriscos indica nodos con máximo soporte. Los grupos externos fueron removidos.

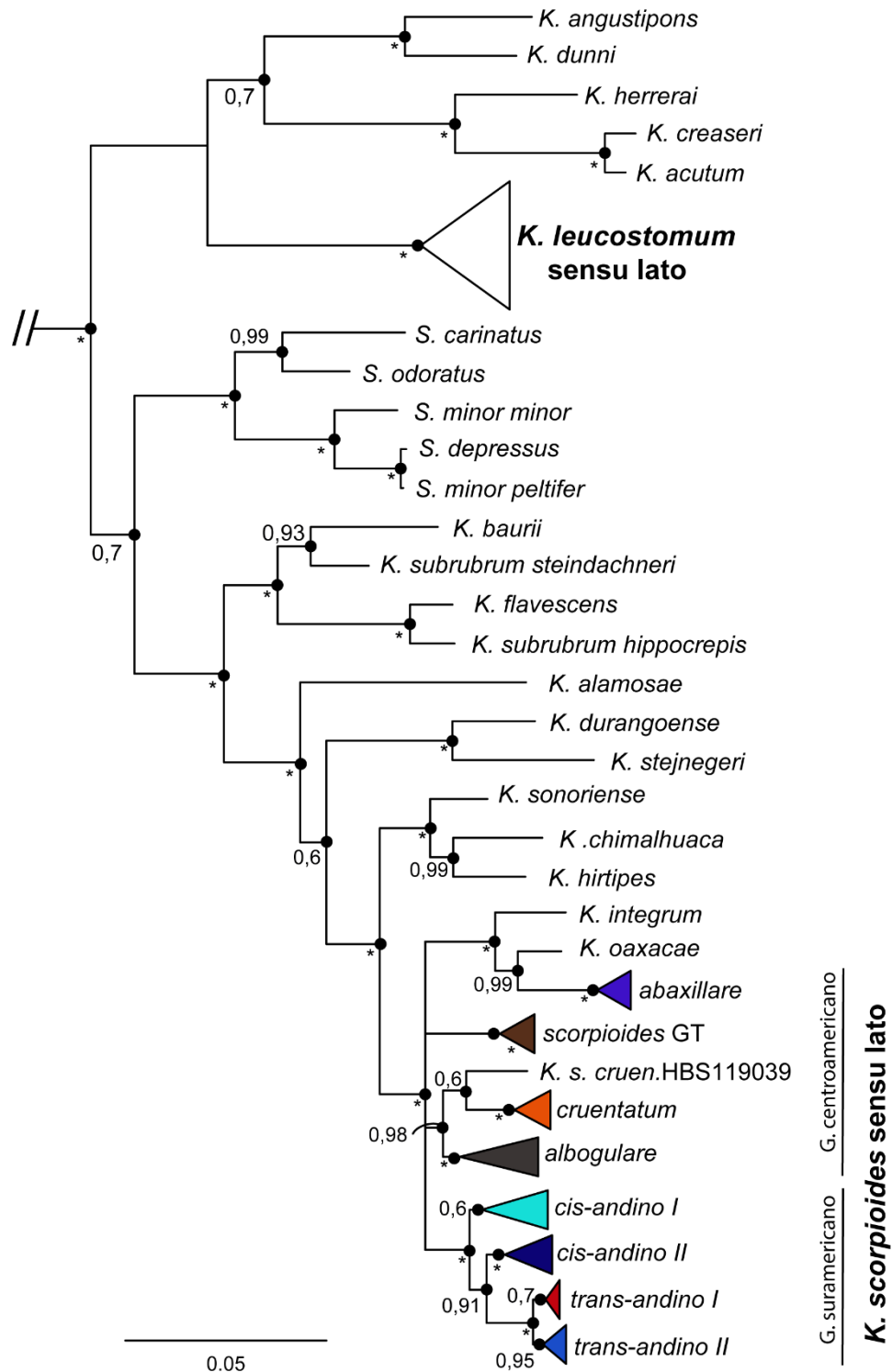


Fig. S2. Detalle de las especies de estudio en el árbol filogenético obtenido de analizar las secuencias de Cytb; a la izquierda *K. leucostomum*, a la derecha *K. scorpioides*. Para *K. leucostomum* los haplogrupos se identifican con diferentes colores. Para *K. scorpioides* los linajes se identifican con colores diferentes y código respectivo. Los soportes de los nodos corresponden a probabilidad posterior. Los asteriscos indica nodos con máximo soporte. Terminales sin numeración romana corresponden a aquellos con información insuficiente para determinar haplotipos mitocondriales. Los grupos externos fueron removidos.

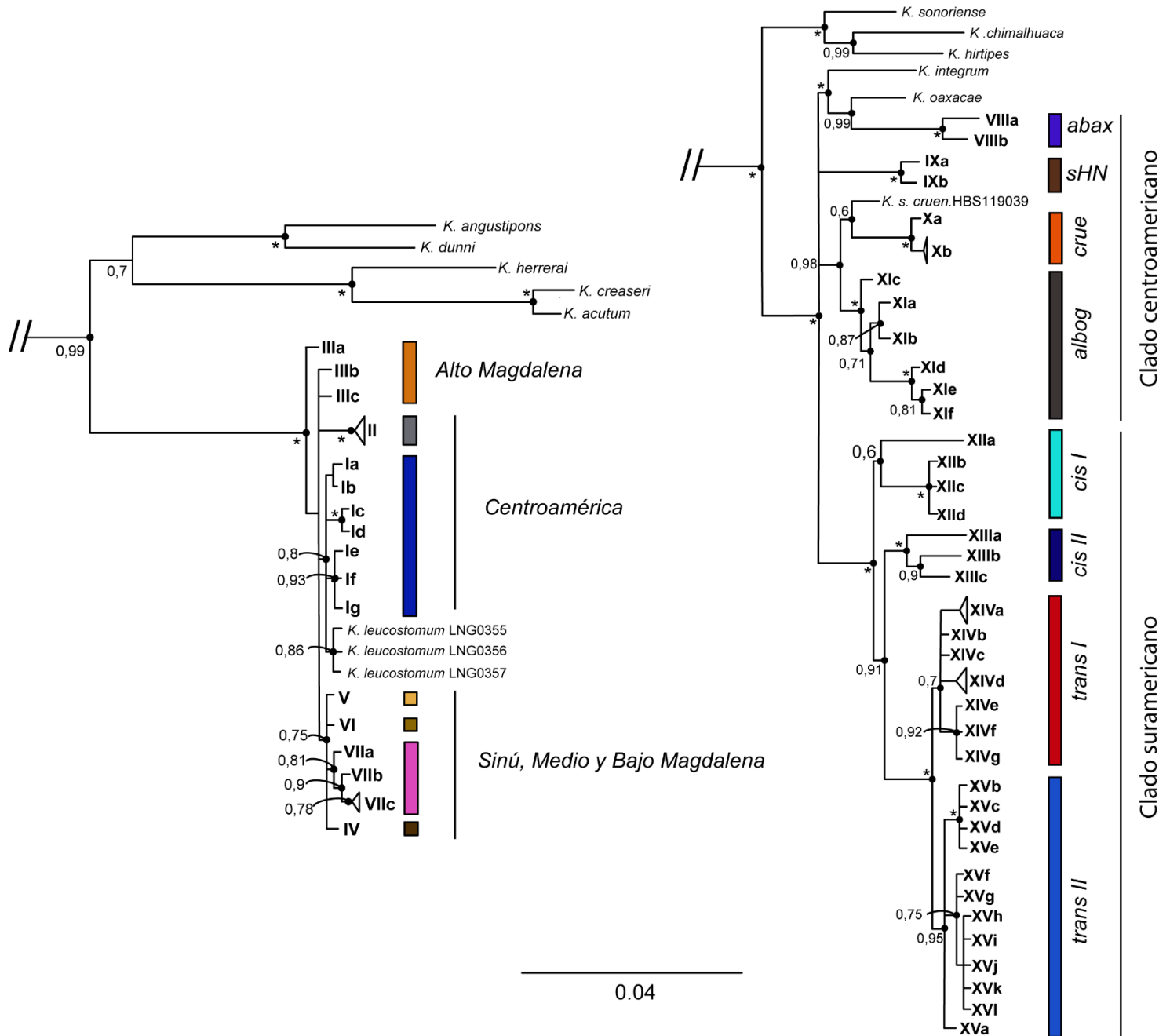


Fig. S3. Árbol filogenético Bayesiano obtenido de los análisis de las secuencias del locus nuclear HMGB. Los soportes de los nodos corresponden a probabilidad posterior. Los asteriscos indican nodos con máximo soporte. Terminales sin numeración romana corresponden a aquellos con información insuficiente para determinar haplotipos mitocondriales. Los grupos externos fueron removidos.

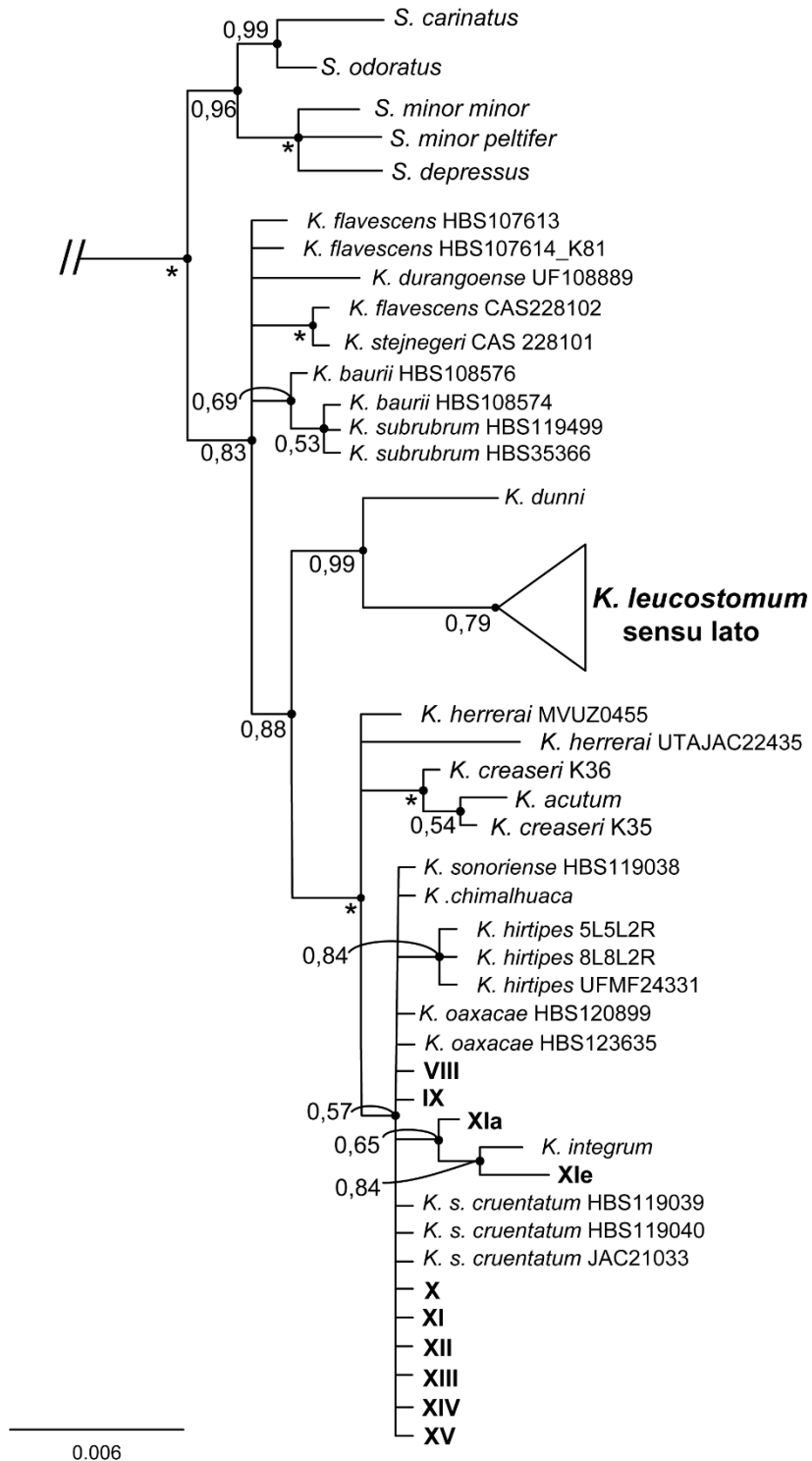


Fig. S4. Árbol filogenético Bayesiano obtenido de los análisis de las secuencias de RAG2. A la derecha la indicación en color del haplotipo correspondiente a cada grupo. Los soportes de los nodos corresponden a probabilidad posterior. El asterisco indica máximo soporte del nodo. Terminales sin numeración romana corresponden a aquellos con información insuficiente para determinar haplotipos mitocondriales. Los grupos externos fueron removidos.

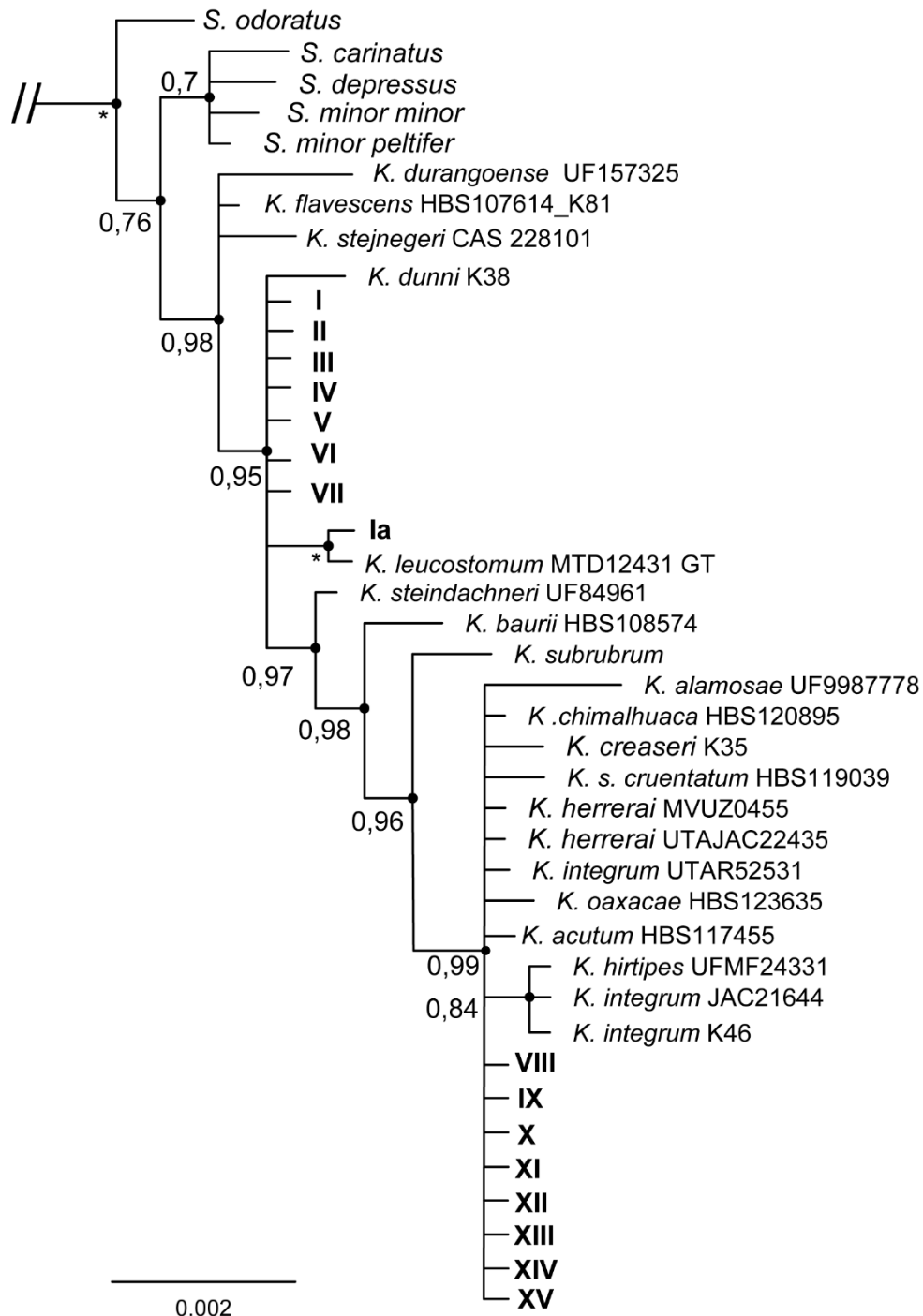


Fig. S5. Análisis de componentes principales llevado a cabo con las muestras mitocondriales (A) y nucleares (B) concatenadas de *Kinosternon leucostomum* disponibles.

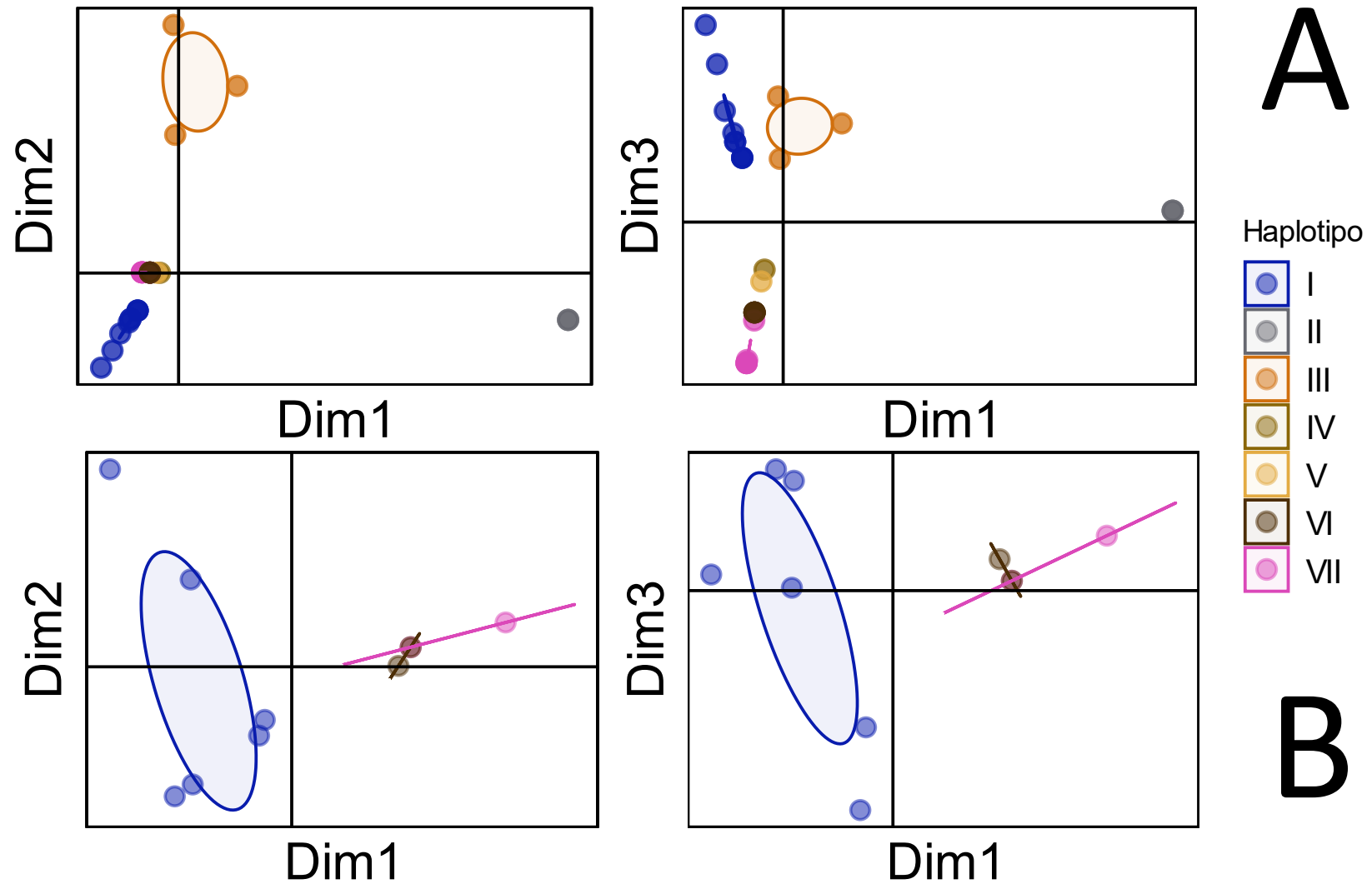


Fig. S6. Redes de parsimonia de haplotipos nucleares de la especie *K. leucostomum*. A) BDNF; B) CMOS; C) HMGB; D) ODC; E) RAG1; F) RAG2. Códigos de color como en la Figura 1. El tamaño de los círculos indica la frecuencia del haplotipo, mientras que cada círculo negro entre estos representa haplotipos perdidos. Cada línea entre haplotipos represente un paso mutacional. Números junto a las líneas entre clústeres indican las mínimas diferencias corregidas entre estos.

Kinosternon leucostomum

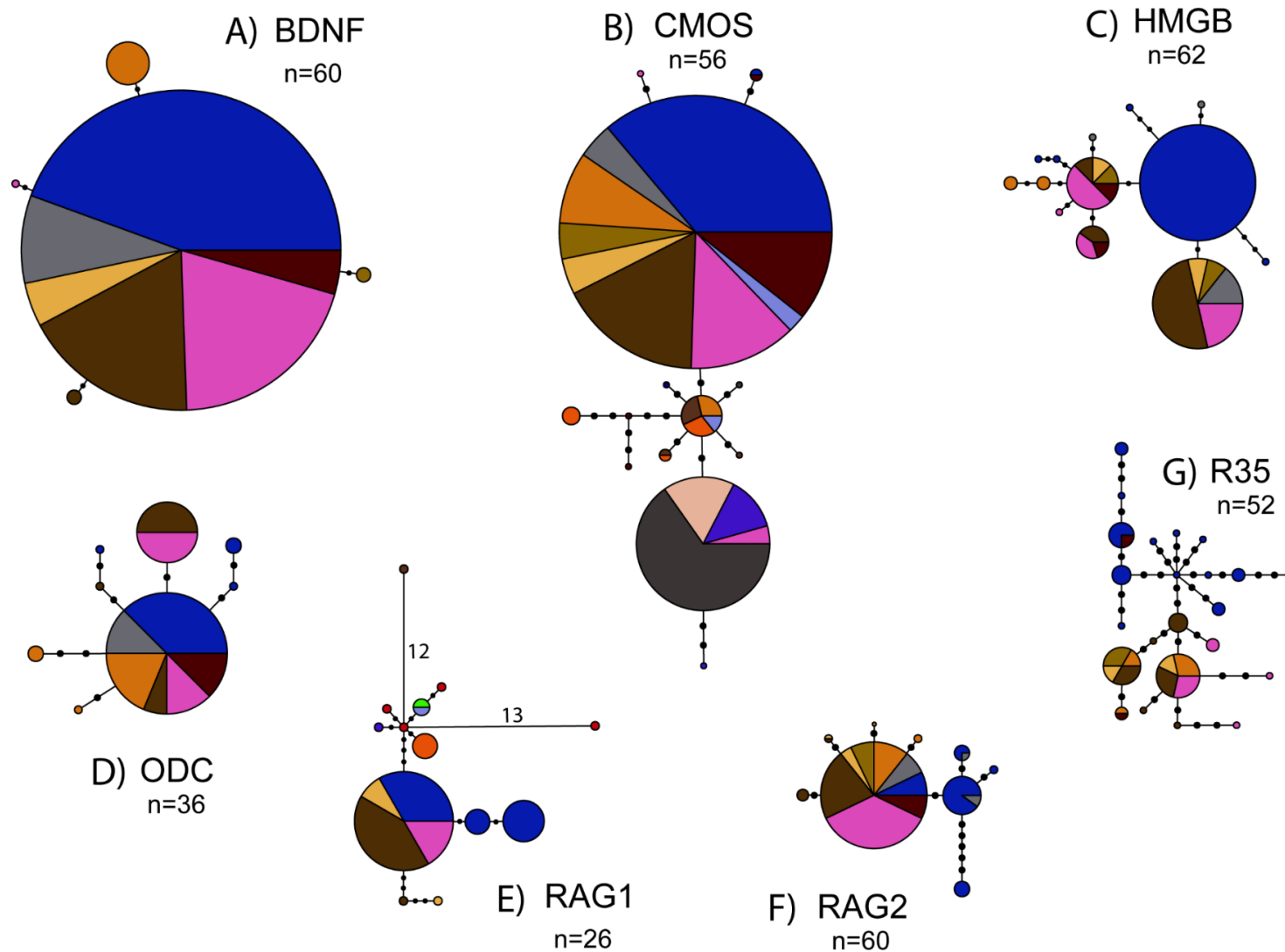


Fig. S7. Redes de parsimonia de haplotipos nucleares de los fragmentos A) BDNF y B) R35 de la especie *K. scorpioides*. Códigos de color como en la Figura 1 y subsecuentes figuras. El tamaño de los círculos indica la frecuencia del haplotipo, mientras que cada círculo negro entre estos representa haplotipos perdidos. Cada línea entre haplotipos represente un paso mutacional.

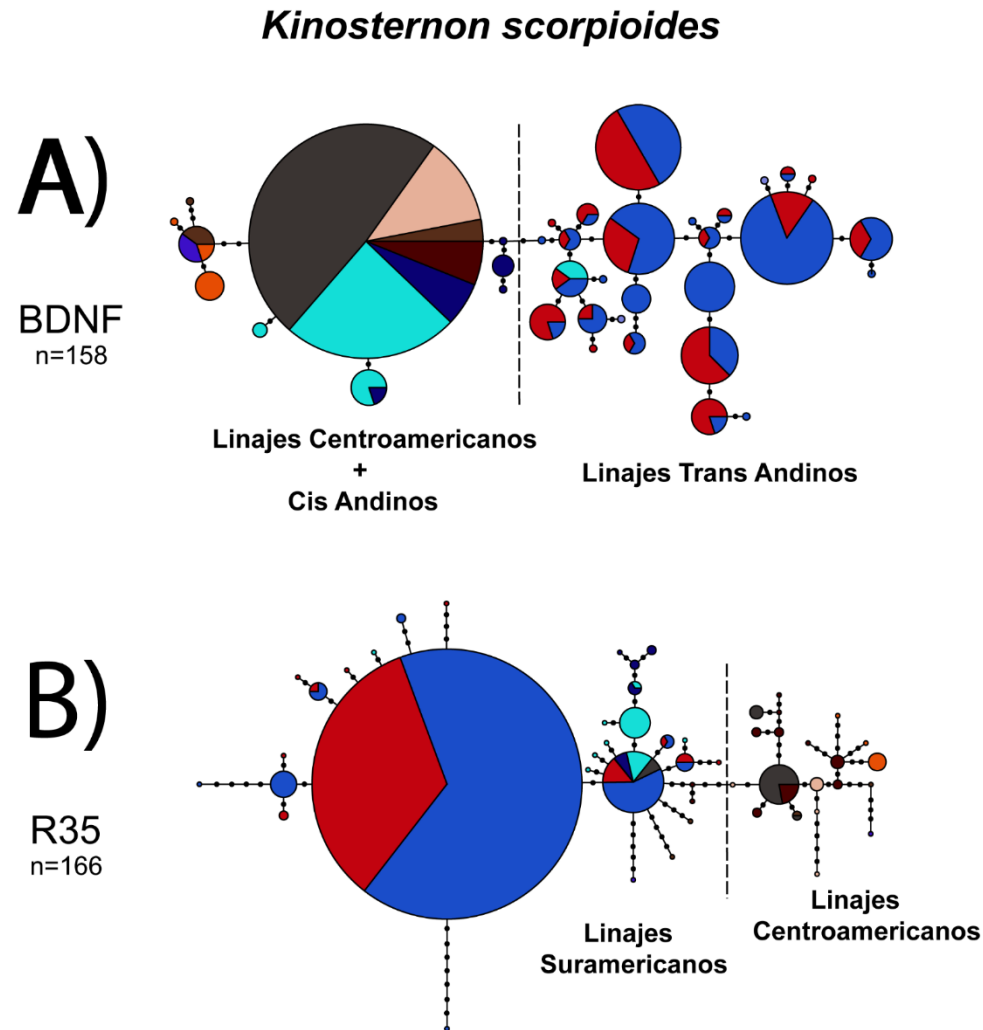


Fig. S8. Redes de parsimonia de haplotipos nucleares de la especie *K. scorpioides* de los fragmentos A) RAG2; B) HMGB; C) CMOS; D) ODC; E) RAG1. Códigos de color como en la Figura 1 y subsecuentes figuras. El tamaño de los círculos indica la frecuencia del haplotipo, mientras que cada círculo negro entre estos representa haplotipos perdidos. Cada línea entre haplotipos represente un paso mutacional.

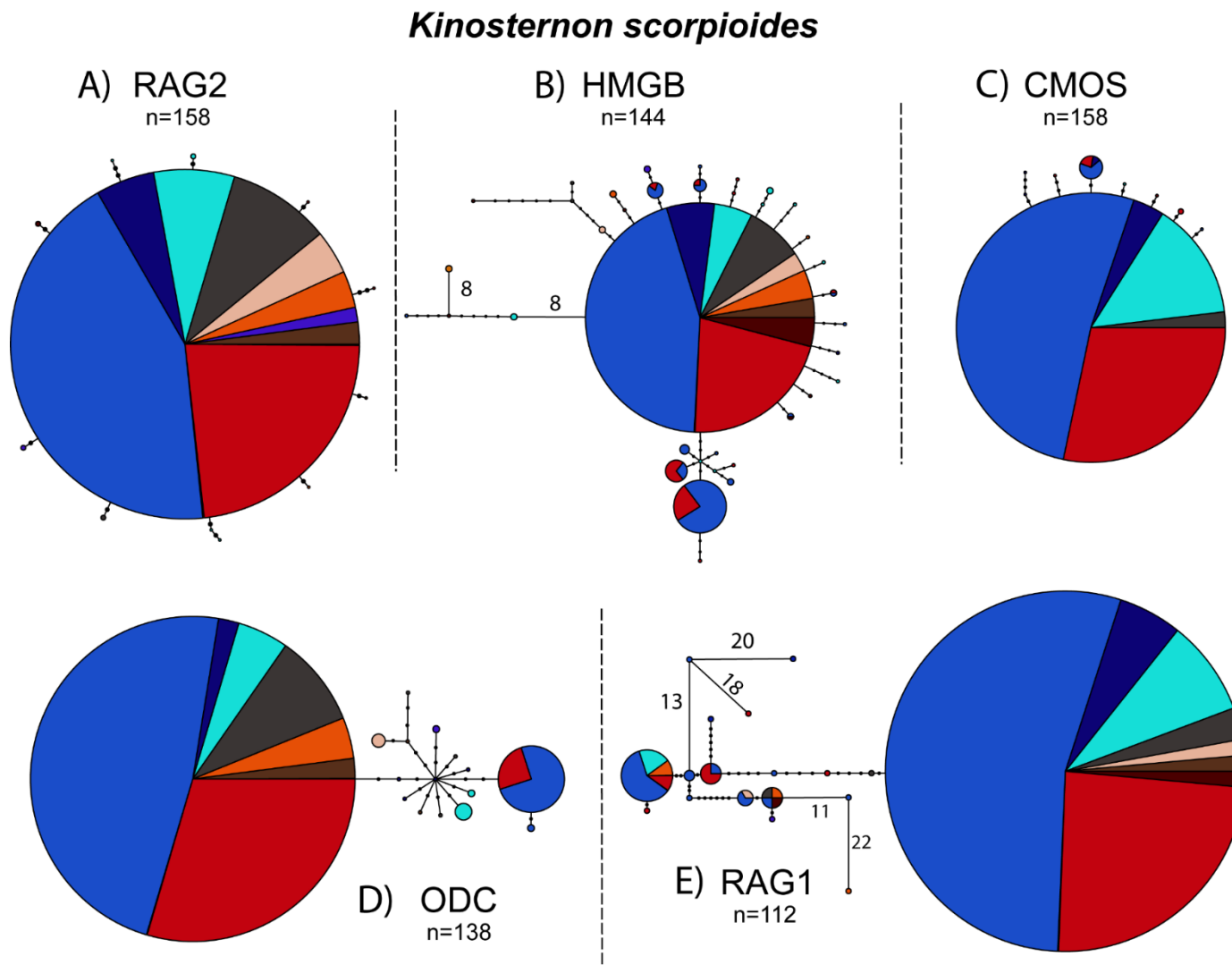
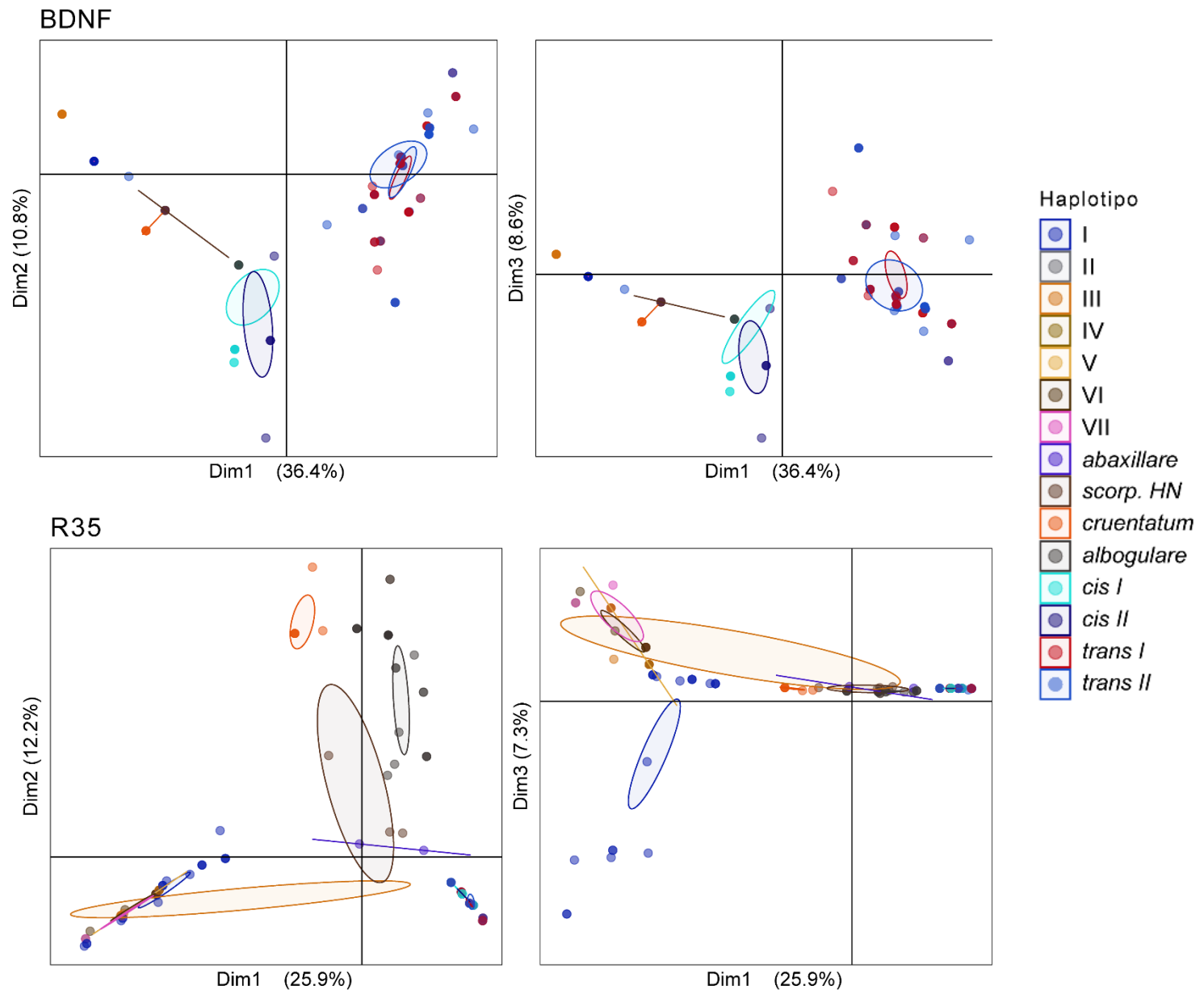


Fig. S9. Análisis de componentes principales de los fragmentos BDNF y R35 utilizando las secuencias de ambos taxones nominales *Kinosternon leucostomum* y *Kinosternon scorpioides*.



Anexo 2. Primers utilizados en esta investigación.

Gen	Primer	Secuencia (5'- 3')	Referencia
12S	L1091	AAAAAGCTTCAAACCTGGGATTAGATACCCCACTA T	(Kocher et al., 1989)
	H1478	TGACTGCAGAGGGTGACGGGCGGTGTGT	(Kocher et al., 1989)
16S	AR	CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT	Palumbi et al. (1991)
	BR	CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T	Palumbi et al. (1991)
RAG1	MartFL1	AGCTGCAGYCARTAYCAYAARATGTA	e
	AmpR1	AACTCAGCTGCATTKCCAATRTCA	Chiari et al. (2004)
CMOS	C-mos1	GCCTGGTGCTCCATCGACTGGGATCA	(Iverson et al., 2007)
	C-mos3	GTAGATGTCTGCTTTGGGGGTGA	Le et al. (2006)
Cytb	CytbG	AACCATCGTTGTWATCAACTAC	(Spinks and Shaffer, 2007)
	mt-f-na3	AGGGTGGAGTCTTCAGTTTTTGGTTTACAAGAC CAATG	(Praschag et al., 2007)
	Cytb-TCA-int-for	TCAGTDGAYAAYGCMACCCT	Sin publicar
	Cytb-GTT-int- rev	GTTTGATCCAGTTTCGTGGA	Sin publicar
ODC	OD-F	GACTCCAAAGCAGTTTGTCTGTCTCAGTGT	Friesen e al. (1999)
	OD-R	TCTTCAGAGCCAGGGAAGCCACCACCAAT	Friesen e al. (1999)
BDNF	BDNF-F	GACCATCCTTTTCCTKACTATGGTTATTTACTACT T	(Leaché and McGuire, 2006)
	BDNF-R	CTATCTTCCCCTTTTAATGGTCAGTGTACAAAC	Leaché and McGuire (2006)
HMGB2	NB17483_fmod	GAAATGTGGTCTGARCAGTC	(Backström et al., 2008)
	NB17483_r2	GGCRCGRTATGCWGCAATATC	(Barley et al., 2010)
R35	R35Ex1	ACGATTCTCGCTGATTCTTGC	(Fujita et al., 2004)
	R35Ex2	GCAGAAAACCTGAATGTCTCAAAGG	Fujita et al. (2004)
	R35-GCA-int-for	GGAAAGGATAAATAACAAAGG	Sin publicar
	R35-GCT-int- rev	GCTGACTCCATACACATC	Sin publicar
RAG2	F2-1 (Rag2)	TTCCAGAGCTTCAGGATGG	Le et al. (2006)
	R2-1(Rag2)	CAGTTGAATAGAAAGGAACCCAAGT	Le et al. (2006)

Anexo 3. Condiciones de termociclo para cada PCR.

12S		16S		RAG1		CMOS	
94° C	5'	94°C	5'	94° C	5'	94° C	5'
94° C	30''	94°C	30''	94° C	30''	94° C	30'
52° C	30''	50°C	30''	56° C	35''	56° C	30'
72° C	45''	72°C	1'	72° C	1'30''	72° C	45'
72° C	10'	72°C	10'	72° C	10'	72° C	10'
Cytb		ODC/BDNF/HMGB		R35/RAG2			
94° C	5'	94°C	5'	94° C	5'		
94° C	30''	94°C	30''	94° C	30''		
56° C	45''	60°C	35''	60° C	35''		
72° C	1'30''	72°C	1'30''	72° C	1'30''		
72° C	10'	72°C	10'	72° C	10'		

Anexo 4. Números de acceso de GenBank de las secuencias utilizadas en este estudio.

ID	Número de acceso GenBank									
	12S	16S	Cytb	CMOS	R35	RAG2	HMGB	BDNF	ODC	RAG1
Chelydra_serpentina	JN860636.1	JQ920370.1								
Claudius_angustatus_HBS121589					MT961249.2		MT965511.1	MT958851.3		
Claudius_angustatus_UTAR43959_K12	KF301255.1	KF301323.1	KF301358.1	KF301289.1	KJ582916.1	KF301222.1	KJ582703.1	KJ582609.1		KF301393.1
Dermatemys_mawii_HBS116865					MT961282.1		MT965017.1	MT958848.1		
Dermatemys_mawii_HBS116867_M162	KF301254.1	KF301322.1	AY678313.1	KF301288.1	MT961283.1	KF301221.1	MT965016.1	MT958849.1		MT961768.1
Emys_orbicularis	AB090021.1	AB090049.1	HQ681920.1		GQ896241.1				GQ895980.1	KY762180.1
Graptemys_p_pseudogeographica	U81322.1	JN860637.1	EU787025.1	HE590444.1	JN860605.1	HE590561.1		MT959015.1	HE590473.1	HE590531.1
K_acutum_HBS117455_K34					MT961399.1		MT965254.1	MT958890.1		MT961882.1
K_acutum_K33	KF301263.1	KF301331.1	KF301366.1	KF301297.1		KF301230.1				KF301400.1
K_amosae_UF99877-78	KF301265.1	KF301333.1	KF301368.1	KF301299.1		KF301232.1				KF301402.1
K_angustipons_UU3766		KF301334.1	KF301369.1	KF301300.1						
K_baurii_HBS108574_HBS16366					MT961402.1		MT965253.1	MT958872.1		MT961885.1
K_baurii_HBS108576								QQX06710.1		QQX08337.1
K_chimalhuaca_HBS120895			KF301372.1	KF301303.1	MT961406.1	KF301235.1	KJ582709.1	MT958894.1		MT961887.1
K_creaseri_K35	KF301269.1	KF301338.1	KF301373.1	KF301304.1	MT961405.1	KF301236.1	MT965255.1	KJ582616.1		MT961888.1
K_creaseri_K36							MT965527.1	KJ582617.1		MT961889.1
K_cruentatum_HBS119039_UTAR50302					MT961424.1		MT965260.1	MT958876.1		MT961903.1
K_cruentatum_HBS119040			KF301387.1		KJ582944.1		KJ582731.1	KJ582637.1		KJ582988.1
K_cruentatum_JAC21033					MT961426.1			MT958878.1		MT961905.1
K_dunni_K38	KF301270.1	KF301339.1	KF301374.1	KF301305.1	MT961407.1	KF301237.1	MT965487.1	KJ582619.1		KF301407.1
K_dunni_MF24134					MT961408.1		MT965486.1	MT958881.1		
K_durangoense_UF108889					MT961409.1		MT965245.1	MT958882.1		MT961891.1

K_durangoense_UF157325	KF301271.1	KF301340.1	KF301375.1	KF301306.1	MT961410.1	KF301238.1	MT965244.1	MT958883.1		MT961892.1
K_flavescens_CAS228102					MT451988.1		GU085592.1	GU085554.1		
K_flavescens_HBS107613					MT961411.1		MT965251.1	MT958858.1		MT961893.1
K_flavescens_HBS107614_K81	KF301272.1	KF301341.1	KF301376.1	KF301307.1	MT961412.1	KF301239.1	KJ582717.1	MT958859.1		KF301409.1
K_herrerai_MVUZ0455	KF301274.1	KF301343.1	KF301378.1	KF301309.1	MT961414.1	KF301241.1	MT965258.1	MT958860.1		
K_herrerai_UTAJAC22435	KF301273.1	KF301342.1	KF301377.1	KF301308.1	MT961413.1	KF301240.1	KJ582718.1	KJ582624.1		KF301410.1
K_hirtipes_5L5L2R					MT961415.1		MT965499.1	MT958897.1		MT961896.1
K_hirtipes_8L8L2R					MT961416.1		MT965488.1	MT958895.1		MT961897.1
K_hirtipes_UFMF24331_UF40410	KF301275.1	KF301344.1	KF301379.1	KF301310.1	MT961417.1	KF301242.1	MT965514.1	MT958896.1		KF301412.1
K_integrum_JAC21644_UTAR51954					MT961418.1			MT958892.1		MT961898.1
K_integrum_K46	KF301276.1	KF301345.1	KF301380.1	KF301311.1	MT961419.1	KF301243.1				KF301413.1
K_leucostomum_CH5324		MH140785.1								
K_leucostomum_CH6312		MH140787.1								
K_leucostomum_CH7777		MH140786.1								
K_leucostomum_USNM559573					MT961420.1		MT965247.1	MT958874.1		MT961899.1
K_leucostomum_USNM559575_UTA-JAC22365					MT961421.1		MT965246.1	MT958875.1		MT961900.1
K_oaxacae_HBS120899					MT961422.1		MT965485.1	MT958884.1		MT961901.1
K_oaxacae_HBS123635_JVRskin	KF301280.1	KF301349.1	KF301384.1	KF301315	MT961423.1	KF301247.1	MT965257.1	MT958893.1		MT961902.1
K_scorpoides_abaxillare_UTAR52532	KF301281.1	KF301350.1	KF301385.1	KF301316.1		KF301248.1				KF301417.1
K_scorpoides_albogulare_REL041	KF301282.1	KF301351.1	KF301386.1	KF301317.1		KF301249.1				KF301418.1
K_scorpoides_CH5691		MH140788.1								
K_scorpoides_USNM559581					MT961427.1		MT965495.1	MT958870.1		MT961906.1
K_scorpoides_UTAR55533_K100	KF301284.1	KF301353.1	KF301388.1	KF301319.1		KF301251.1				KF301420.1
K_sonoriense_HBS119037					MT961429.1		MT965540.1	MT958885.1		MT961908.1
K_sonoriense_HBS119038					MT961430.1		MT965259.1	MT958889.1		MT961909.1
K_sonoriense_K116	KF301285.1	KF301354.1	KF301389.1							KF301421.1
K_steindachneri_UF84961	KF301287.1	KF301356.1	KF301391.1	KF301321.1		KF301253.1				KF301423.1
K_stejnegeri_CAS228101_TCWC72419	KF301266.1	KF301335.1	KF301370.1	KF301301.1	MT961400.1	KF301233.1	MT965248.1	MT958888.1		MT961883.1

K_subrubrum hippocrepis_UTACJF4122	KF301286.1	KF301355.1	KF301390.1	KF301320.1		KF301252.1				KF301422.1
K_subrubrum_HBS119499					MT961432.1		MT965252.1	MT958873.1		
K_subrubrum_HBS35366					MT961431.1		MT965249.1	MT958887.1		MT961910.1
Staurotypus_salvinii_HBS108669					MT961630.1		MT965510.1	MT958855.1		MT962060.1
Staurotypus_salvinii_HBS117456_K32	KF301256.1	KF301324.1	KF301359.1	KF301290.1	MT961631.1	KF301223.1	MT965414.1	MT958853.1		MT962061.1
Staurotypus_triporcatus_HBS117468_Near2005					MT961632.1		MT965238.1	MT958856.1		AY687909.1
Staurotypus_triporcatus_HBS117914_K45	KF301257.1	KF301325.1	KF301360.1	KF301291.1	MT961633.1	KF301224.1	MT965509.1	MT958854.1		MT962063.1
Staurotypus_triporcatus_Honda2002	AB090018.1	AB090046.1								
Staurotypus_triporcatus_HBS16258_UTA52026								AY988084.1		
Sternotherus_carinatus_RCT21_K1E	KF301258.1	KF301326.1	KF301361.1	KF301292.1	MT961634.1	KF301225.1	MT965415.1	MT958866.1		MT962064.1
Sternotherus_carinatus_RCT222_ANUM26080325	JN860640.1		JN860673.1		MT961635.1		MT965243.1	MT958867.1		MT962065.1
Sternotherus_depressus_HBS116244					MT961636.1		MT965242.1	MT958868.1		MT962066.1
Sternotherus_depressus_HBS116246_M125	KF301259.1		KF301362.1	KF301293.1	MT961637.1	KF301226.1	MT965241.1	MT958869.1		MT962067.1
Sternotherus_minorminor_RCT53_UF80827	KF301260.1	KF301328.1			MT961638.1		MT965239.1	MT958864.1		MT965239.1
Sternotherus_minor_RCT60_K13	KF301261.1	KF301329.1			MT961639.1		MT965240.1			MT962069.1
Sternotherus_odoratus_CAS214343_Near2005					MT961640.1		MT965462.1	MT958865.1		MT962070.1
Sternotherus_odoratus_CAS255136_So14002_S97		MT137283.1								
Sternotherus_odoratus_HBS23287_UTAR54409					MT961641.1		MT965468.1	MT958863.1		MT962071.1

3. Discusión final

Kinosternon leucostomum sensu lato

Estudios basados en morfología y algunas aproximaciones moleculares previas coinciden, con cierta ambigüedad, en la separación de este taxón en dos subespecies morfológicamente distinguibles *K. l. leucostomum* y *K. l. postinguinale* (Berry & Iverson, 2001b; Iverson, 1991; Ramírez-Guerra, 2016).

Kinosternon leucostomum leucostomum Duméril y Bibron en Duméril y Duméril, 1851: Localidades tipo “N.-Orléans; Mexique; Rio-Sumasinta (Amér. centr.)” Restringida a “Rio Usumacinta, El Peten, Guatemala” por Schmidt (1941); y a “Cosamaloapam, Veracruz, Mexico” por Smith & Taylor (1950). Se encuentra principalmente en los sistemas de drenaje de la costa del Golfo de México (al sur de la Sierra Volcánica Transversal), Belice, Guatemala, Honduras y Nicaragua (Berry J, 1978; Rhodin, et al., 2021).

Kinosternon leucostomum postinguinale Cope, 1887: Localidades tipo: “Vallee de La Madeleine (N. Grenada; Santa Fe de Bogota (N. Grenada)”; “Tierra Calliente of Costa Rica at Sipurio, on the east coast” por Cope (1885); y “Peña Lisa, Condota, Colombia”, por Boulenger (1913). Distribuida principalmente por los sistemas de drenaje del Caribe, desde el río San Juan y el Lago de Nicaragua (frontera entre Nicaragua y Costa Rica), los sistemas de los ríos Atrato y Magdalena, en Colombia; y los sistemas de drenaje del Pacífico asociados a las grandes penínsulas de Centroamérica, recorriendo el pacífico colombiano hasta el sistema del río Daule,

Ecuador.

Aunque las redes de parsimonia construidas con los grupos de haplotipos mitocondriales identificados fueron, en cierta medida, concordantes con varias de las poblaciones individualizadas por Berry J, (1978), mostrando una tendencia a la distribución de haplotipos en Norte/Sur, ninguna de las filogenias calculadas logró recuperar clados concordantes con estas subespecies. De hecho, tampoco se logró establecer las relaciones entre los grupos de haplotipos, lo que denota su bajo grado de diferenciación pese a incluirse muestras de los extremos de su distribución.

Otra estrategia muy utilizada para establecer límites entre grupos taxonómicos, incluyendo quelonios, es el cálculo de las distancias p del fragmento Cytb (Cocca et al., 2018; Ennen et al., 2014; Petzold et al., 2014; Vargas-Ramírez et al., 2020). Si bien no existe un umbral específico para determinar especies diferentes con este parámetro (Petzold et al., 2014), pues depende del grupo de trabajo y su historia evolutiva, se encontraron valores $<1\%$, reflejando divergencias mucho menores con respecto a otras especies congéneres (incluso *K. scorpioides*) y similares a los exhibidos por otros grupos de quelonios estrechamente relacionadas entre sí (Vargas-Ramírez et al., 2013; Wong et al., 2010). A diferencia de estos resultados, los clústeres identificados en los PCA nucleares, aunque con muestras limitadas (concatenado *K. leucostomum* e individual de R35), fueron coherentes con esta separación de linajes.

Esta incongruencia entre información de diferentes genomas ha sido atribuida a las diferentes causas, incluyendo la existencia de linajes incompletamente separados, como resultado de nodos con rápida o casi simultánea diversificación, o como resultado de procesos de introgresión (Crawford et al., 2015; Vargas-Ramírez et al., 2013; Fritz et al., 2010; Maddison and Knowles, 2006). Aun teniendo en cuenta que diferenciar entre estas potenciales causas es difícil, se sugiere el remanente flujo genético como una de sus principales causas, teniendo en cuenta la evidencia

actual sobre la existencia de un importante corredor biológico en gran parte de su zona de distribución.

Kinosternon scorpioides sensu lato

Desde su descripción, esta especie ha sido reconocida como un taxón con considerable variación morfológica por toda su distribución, siendo un grupo en el que han sido identificadas varias subespecies cuyo estatus taxonómico ha estado en constante discusión (Berry & Iverson, 2001a; Berry J, 1978; Cabrera and Colantonio, 1997; Giraldo et al., 2012). Hasta la realización de este trabajo, tres subespecies son consideradas, siendo *K. abaxillare* recientemente debatida como especie independiente, por cuenta de su mayor cercanía al taxón filogenéticamente reconocido *K. oaxacae*, más que a cualquier otro taxón del género (Iverson et al., 2013; Rhodin, et al., 2021).

Kinosternon scorpioides cruentatum Duméril y Bibron en Duméril y Duméril, 1851: Localidades tipo “Amér. septentr.” Restringida a “San Mateo del Mar, Oaxaca, Mexico” por Smith & Taylor (1950); “Mexico.” Restringida a “San Mateo del Mar, Oaxaca, Mexico” por Smith & Taylor (1950; “Mexico.” Restringida a “San Mateo del Mar, Oaxaca, Mexico” por Smith & Taylor (1950). Aunque su principal área de distribución se encuentra en las tierras bajas del Golfo de México y la Península de Yucatán, tiene poblaciones en la vertiente pacífica de México (estados de Chiapas y Oaxaca), Honduras y Guatemala (Berry J, 1978; Rhodin, et al., 2021).

Kinosternon scorpioides albogulare Duméril and Bocourt, 1870: Localidad tipo “S. Jose (Costa Rica)”. Su mayor distribución comprende todos los sistemas de drenaje de la vertiente pacífica de El Salvador, Honduras, Nicaragua, Costa Rica y Panamá (Península de Azuero). También tiene poblaciones en los drenajes caribeños del nororiente de Honduras y Nicaragua (Tierras bajas de Mosquito), los drenajes de los lagos de Xolotlán y Cocibolca y el Archipiélago de San Andrés, Colombia (Berry J, 1978; Rhodin, et al., 2021).

Kinosternon scorpioides scorpioides Linnaeus, 1766: Localidades tipo: “Surinami”, Restringida a “Surinam” por Fritz and Havaš (2007); “Bolivien...Chaco...Villa Montes” (Bolivia) por Müller & Hellmich (1936); “El Tabacal, Argentina” por Freiberg (1936); “Panama Railroad, Canal Zone” por Schmidt (1946); “Compartimento da serra dos Carajás (serra Norte) Pará” (Brasil) por Cunha (1970). Su distribución comienza en la vertiente Pacífica de Centroamérica, en los drenajes de la península de Azuero y el Istmo de Panamá, extendiéndose y teniendo su principal distribución en Suramérica. Allí se encuentra principalmente en las costas y drenajes del Caribe, el Atlántico y la Amazonia, extendiéndose hasta el Chaco de Argentina, Bolivia y Paraguay, siendo ausente en la vertiente Pacífica de la Cordillera Occidental (Berry J, 1978; Rhodin, et al., 2021).

No obstante, los resultados acá obtenidos dan cuenta de la existencia de más linajes, siendo congruentes los distintos análisis en la existencia de siete grupos, que bien podrían incentivar una revisión que incluya diferentes fuentes de información (taxonomía integrativa) para esclarecer con exactitud a cuantos taxones independientes corresponden, así como sus respectivas áreas de distribución.

Si bien las relaciones entre estos grupos obtenidas a partir de la combinación de marcadores mitocondriales y nucleares no fueron completamente concluyentes, fueron congruentes con la estructuración de los grupos de haplotipos a lo largo del área de distribución. De esta forma, dentro de lo que actualmente se considera la distribución de cada subespecie, estos siete grupos se distribuyen así: En la distribución de *K. s. cruentatum* se encuentra el haplotipo X (*cruentatum*); en área de distribución de *K. s. albogulare*, se encuentra el haplotipo VIII (*abaxillare*), cuyo clado es compartido con el haplotipo IX (*scorpioides HN*) y las especies *K. integrum* y *K. oaxacae* (confirmando lo propuesto por Iverson et al., (2013) sobre la relación de este último con *K. abaxillare*); dentro de la distribución de *K. s. scorpioides* la existencia de tres grupos, dos cisandinos y uno transandino, que presentara

estructuración genética entre los sistemas de los ríos Sinú, Cauca y Magdalena, según las redes de parsimonia mitocondrial, donde vale la pena profundizar para determinar si puede asumirse esta como evidencia para la clasificación de grupos independientes.

La validación de estos linajes a través de las distintas estrategias como las distancias genéticas del Cytb, aunque criticadas, entre otras cosas, por su sesgo genómico (herencia materna) y la dificultad de establecer umbrales, corroboraron estas agrupaciones, obteniéndose distancias superiores a las distancias entre especies cercanas del mismo género ($> \sim 3\%$) e inferiores al interior de cada grupo ($< \sim 3\%$), soportando la reconsideración de las subespecies.

Aunque impulsar cambios taxonómicos exclusivamente con base de evidencia genética es cuestionable, especialmente tratándose de un solo genoma, que la información mitocondrial fuera dirigida hacia la separación consistente de estos linajes, a diferencia de la información nuclear, sumado a la existencia comprobada de barreras al flujo genético (según patrones de distribución encontrados en otras especies neotropicales) supone entonces la existencia de linajes que representan unidades evolutivas significativas (en sentido de Moritz, 1994) que vale la pena estudiar en detalle, esto con el fin de reclasificar la especie con base en la significancia evolutiva de sus diferencias internas, haciendo uso de información morfológica y genética, en lugar de solo una de estas fuentes informativas.

4. Conclusión

Aunque discordantes, la información mitocondrial y nuclear analizada está aportando valiosa evidencia en la búsqueda de resolución filogenética interna de los taxones nominales *Kinosternon leucostomum* y *Kinosternon scorpioides*. Teniendo en cuenta las bajas tasas de movimiento y la alta afinidad por sus hábitats (reportadas en general para toda la familia Kinosternidae, especialmente para especies de hábitos semiacuáticos del género *Kinosternon*) (Morales-Verdeja and Vogt, 1997; Pérez-Pérez et al., 2017; Slavenko et al., 2016; Swarth, 2010), las características morfológicas y ecológicas reportadas para cada subespecie o población, y las nuevas líneas de evidencia molecular, estos resultados están en desacuerdo con la taxonomía tradicional de dichas especies: En *K. leucostomum* por falta de variación genética evidente, mientras que en *K. scorpioides* por la existencia de esta, soportando la potencial existencia de diferentes linajes que, en mayor o menor medida, divergen entre sí.

Esto sugiere que se debe revisar la sistemática de estos grupos con mayor profundidad, combinando la taxonomía integrativa y otras estrategias, como el modelamiento de distribución o la filogenómica (McCormack et al., 2013; Scott et al., 2018; Weinell and Bauer, 2018); e incluyendo, en lo posible, un análisis de Reloj Molecular Relajado usando evidencia fósil; esto con el fin, no solo de resolver estas filogenias problemáticas, sino darle un contexto temporal sus divergencias evolutivas, donde ya se cuenta con evidencia de posibles eventos como la separación incompleta de linajes, la introgresión mitocondrial y la retención de haplotipos ancestrales.

5. Bibliografía

Ardila-Marulanda, M., De La Ossa V., J., & De La Ossa-Lacayo, A. (2016). Uso de quelonios continentales en el golfo de Morrosquillo, Sucre, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, 8, 361.
<https://doi.org/10.24188/recia.v8.n0.2016.392>

Berriozabal-Islas, C., Ramírez-Bautista, A., Torres-Ángeles, F., Mota Rodrigues, J. F., Macip-Ríos, R., & Octavio-Aguilar, P. (2020). Climate change effects on turtles of the genus *Kinosternon* (Testudines: Kinosternidae): an assessment of habitat suitability and climate niche conservatism. *Hydrobiologia*, 847(19), 4091–4110.
<https://doi.org/10.1007/s10750-020-04402-y>

Berry J, F. (1978). *Variation and systematics in the Kinosternon scorpioides and K. leucostomum complexes (Reptilia: Testudines: Kinosternidae) of Mexico and Central*. University of Utah.

Bryson, R. W., García-Vázquez, U. O., & Riddle, B. R. (2012). Diversification in the Mexican horned lizard *Phrynosoma orbiculare* across a dynamic landscape. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62(1), 87–96.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.09.007>

Butler, C. J. (2019). A review of the effects of climate change on chelonians. *Diversity*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/d11080138>

Cabrera, M. R., & Colantonio, S. E. (1997). Taxonomic Revision of the South American Subspecies of the Turtle *Kinosternon scorpioides*. *Society for the Study of Amphibians and Reptiles*, 31(4), 507–513.

Carter, A. L., & Janzen, F. J. (2021). *Predicting the effects of climate change on incubation in reptiles: methodological advances and new directions*. 1–10. <https://doi.org/10.1242/jeb.236018>

Cocca, W., Rosa, G. M., Andreone, F., Aprea, G., Bergò, P. E., Mattioli, F., Mercurio, V., Randrianirina, J. E., Rosado, D., Vences, M., & Crottini, A. (2018). The herpetofauna (Amphibia, crocodylia, squamata, testudines) of the isalo massif, southwest madagascar: Combining morphological, molecular and museum data. *Salamandra*, 54(3), 178–200.

Corredor-Londoño, G. A., Kattan, G., Galvis-Rizo, C. A., & Amorocho, D. (2007). *Tortugas del Valle del Cauca*. Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca.

Crawford, N. G., Parham, J. F., Sellas, A. B., Faircloth, B. C., Glenn, T. C., Papenfuss, T. J., Henderson, J. B., Hansen, M. H., & Simison, W. B. (2015). A phylogenomic analysis of turtles. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 83, 250–257. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.10.021>

Davis, M. A., Douglas, M. R., Collyer, M. L., & Douglas, M. E. (2016). Deconstructing a species-complex: Geometric morphometric and molecular analyses define species in the Western Rattlesnake (*Crotalus viridis*). *PLoS ONE*, 11(1), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146166>

Ennen, J. R., Kalis, M. E., Patterson, A. L., Kreiser, B. R., Lovich, J. E., Godwin, J., & Qualls, C. P. (2014). Clinal variation or validation of a subspecies? A case study of the *graptemys nigrinoda* complex (testudines: Emydidae). *Biological Journal of*

the Linnean Society, 111(4), 810–822. <https://doi.org/10.1111/bij.12234>

Fritz, U., Gong, S., Auer, M., Kuchling, G., Schneewei, N., & Hundsdörfer, A. K. (2010). The world's economically most important chelonians represent a diverse species complex (Testudines: Trionychidae: Pelodiscus). *Organisms Diversity and Evolution*, 10(3), 227–242. <https://doi.org/10.1007/s13127-010-0007-1>

Giraldo, F., Garcés-Restrepo, F. M., & Carr, J. L. (2012). Kinosternon scorpioides. In B. B. Páez-Nieto V. P., Morales-Betacourt M. A., Lasso C. A., Castaño-Mora O.V. (Ed.), *Biología y Conservación de las Tortugas Continentales de Colombia*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH).

Horiike, T. (2016). An Introduction to Molecular Phylogenetic Analysis. *Reviews in Agricultural Science*, 4, 36–45. https://doi.org/10.7831/ras.4.0_36

Iverson, J. B. (1991). Phylogenetic hypotheses for the evolution of modern kinosternine turtles. *Herpetological Monographs*, 5, 1–27. <https://doi.org/10.2307/1466974>

Lamsdell, J. C., Congreve, C. R., Hopkins, M. J., Krug, A. Z., & Patzkowsky, M. E. (2017). Phylogenetic Paleoecology: Tree-Thinking and Ecology in Deep Time. *Trends in Ecology and Evolution*, 32(6), 452–463. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2017.03.002>

Loc-Barragán, J. A., Reyes-Velasco, J., Woolrich-Piña, G. A., Grünwald, C. I., de Anaya, M. V., Rangel-Mendoza, J. A., & López-Luna, M. A. (2020). A new species of mud turtle of genus kinosternon (Testudines: Kinosternidae) from the pacific coastal plain of northwestern Mexico. *Zootaxa*, 4885(4), 509–529. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4885.4.3>

Mendoza-Henao, A. M., Arias, E., Townsend, J. H., & Parra-Olea, G. (2020). Phylogeny-based species delimitation and integrative taxonomic revision of the *Hyalinobatrachium fleischmanni* species complex, with resurrection of *H. viridissimum* (Taylor, 1942). *Systematics and Biodiversity*, 0(0), 1–21. <https://doi.org/10.1080/14772000.2020.1776781>

Morrison, D. A. (2011). Phylogenetic analysis of pathogens. In *Genetics and Evolution of Infectious Diseases* (First Edit, Issue December 2010). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384890-1.00008-X>

Mothes, C. C., Howell, H. J., & Searcy, C. A. (2020). Habitat suitability models for the imperiled wood turtle (*Glyptemys insculpta*) raise concerns for the species' persistence under future climate change. *Global Ecology and Conservation*, 24, e01247. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2020.e01247>

Petzold, A., Vargas-Ramírez, M., Kehlmaier, C., Vamberger, M., Branch, W. R., Du Preez, L., Hofmeyr, M. D., Meyer, L., Schleicher, A., Široký, P., & Fritz, U. (2014). A revision of African helmeted terrapins (Testudines: Pelomedusidae: Pelomedusa), with descriptions of six new species. *Zootaxa*, 3795(5), 523–548. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3795.5.2>

Pritchard, P. C., & Trebbau, P. (1984). Turtles of Venezuela. *Society for the Study of Amphibians and Reptiles*, 403.

Ramírez-Guerra, N. (2016). *Caracterización filogenética de la tortuga Tapaculo Kinosternon leucostomum postinguinale (Testudines: Kinosternidae) (MSc Thesis)*. Universidad de Antioquia.

Ramsuran, V., Hernández-Sánchez, P. G., O'hUigin, C., Sharma, G., Spence, N., Augusto, D. G., Gao, X., García-Sepúlveda, C. A., Kaur, G., Mehra, N. K., & Carrington, M. (2017). Sequence and Phylogenetic Analysis of the Untranslated

Promoter Regions for HLA Class I Genes. *The Journal of Immunology*, 198(6), 2320–2329. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601679>

Rhodin, A. G. J., Iverson, J. B., Bour, R., Fritz, U., Georges, A., Shaffer, H. B., & van Dijk, P. P. (2021). *Turtles of the World: Annotated Checklist and Atlas of Taxonomy, Synonymy, Distribution, and Conservation Status (9th Ed.)*. Chelonian Research Foundation & Turtle Conservancy. <https://doi.org/10.3854/crm.8.checklist.atlas.v9.2021>

Rueda-Almonacid, J. V, Carr, J., Mittermeier, R., Rodríguez-Mahecha, J. V, Mast, R., Vogt, R., Rhodin, A., Velasquez, J., Rueda, J. N., & Mittermeier, C. (2007). *Las Tortugas y los Cocodrilianos de los Países Andinos del Trópico*.

Seidel, M. E., Iverson, J. B., & Adkins, M. D. (1986). Biochemical Comparisons and Phylogenetic Relationships in the Family Kinosternidae (Testudines). *Copeia*, 1986(2), 285. <https://doi.org/10.2307/1444989>

Spinks, P. Q., & Shaffer, H. B. (2009). Conflicting mitochondrial and nuclear phylogenies for the widely disjunct emys (testudines: emydidae) species complex, and what they tell us about biogeography and hybridization. *Systematic Biology*, 58(1), 1–20. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syp005>

Stafford, P., & Meyer, J. (2000). *A Guide to the Reptiles of Belize*. The Natural History Museum, London, United Kingdom, and Academic Press, San Diego, California, United States.

Van Regenmortel, M. H. V. (2011). Virus Species. In *Genetics and Evolution of Infectious Diseases* (First Edit). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384890-1.00001-7>

Vargas-Ramírez, M., Caballero, S., Morales-Betancourt, M. A., Lasso, C. A., Amaya, L., Martínez, J. G., das Neves Silva Viana, M., Vogt, R. C., Farias, I. P., Hrbek, T., Campbell, P. D., & Fritz, U. (2020). Genomic analyses reveal two species of the matamata (Testudines: Chelidae: *Chelus* spp.) and clarify their phylogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 148(April), 106823. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2020.106823>

Vargas-Ramírez, M., Carr, J. L., & Fritz, U. (2013). Complex phylogeography in *Rhinoclemmys melanosterna*: conflicting mitochondrial and nuclear evidence suggests past hybridization (Testudines: Geoemydidae). *Zootaxa*, 3670(2), 238. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3670.2.8>

Vargas-Ramírez, M., Maran, J., & Fritz, U. (2010). Red- And yellow-footed tortoises, *Chelonoidis carbonaria* and *C. denticulam* (Reptilia: Testadines: Testudinidae), in South American savannahs and forests: Do their phylogeographies reflect distinct habitats? *Organisms Diversity and Evolution*, 10(2), 161–172. <https://doi.org/10.1007/s13127-010-0016-0>

Weinell, J. L., & Bauer, A. M. (2018). Systematics and phylogeography of the widely distributed African skink *Trachylepis varia* species complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 120, 103–117. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.11.014>

Wong, R. A., Fong, J. J., & Papenfuss, T. J. (2010). Phylogeography of the African Helmeted Terrapin, *Pelomedusa subrufa*: Genetic Structure, Dispersal, and Human Introduction. *PROCEEDINGS OF THE CALIFORNIA ACADEMY OF SCIENCES Series*, 4(12), 575–585.