

Factores ambientales y genéticos que influyen en la presencia de anomalías morfológicas en *Testudo graeca*.

Marina Moreno Fuentes

Tutores: Francisco Botella Robles, María Victoria Jiménez Franco,
Roberto Rodríguez Caro

Departamento de Biología Aplicada. Área de Ecología



Trabajo de Fin de Grado en Ciencias Ambientales.

Junio 2017.



RESUMEN:

Los factores que afectan a la aparición de anomalías en especies de vida silvestre son muy diversos, por lo que su estudio es importante para la conservación y gestión de las poblaciones. En este trabajo fin de grado se caracterizan los datos de las malformaciones encontradas en tortuga mora (*Testudo graeca*) a lo largo de diferentes años de censo recopilados por el Área de Ecología. Se realiza un análisis de las anomalías en función del tipo de malformación, de las características del individuo, de la diversidad genética y de la precipitación. De los resultados obtenidos se ha podido identificar que la frecuencia de malformaciones en tortuga mora es mayor en las placas marginales que en las vertebrales; que no existen diferencias significativas en cuanto al sexo o a la edad; y que aumenta la aparición de anomalías conforme nos alejamos del origen de expansión en la cuenca de Vera (Almería).

ABSTRACT:

The factors that affect the appearance of anomalies in wildlife species are very diverse, that is why it is really important to study them in order to preserve and manage the populations. In this final degree project are typified the malformation data found in the spur-thighed tortoise (*Testudo graeca*) compiled by the Ecology Department during the different years of census. An analysis of the anomalies of tortoises has been done considering the type of malformation, the characteristics of the individuals, genetic diversity and precipitation. From the obtained results we have identified that the frequency of malformations is bigger in the marginal scutes than in the vertebral ones; there are no significant differences regarding sex or age; and lastly, the appearance of anomalies rises according to the distance from the origin of the expansion in the basin of Vera (Almeria).

Índice

1. Introducción	2
2. Antecedentes y objetivos	8
3. Material y métodos	9
3.1. Sistema de estudio	9
3.2. Descripción de anomalías	11
3.3. Obtención de datos de campo	13
3.4. Descripción de los factores ambientales y genéticos	14
3.5. Análisis de datos	17
4. Resultados	18
4.1. Características de las anomalías	18
4.2. Descripción de anomalías según las características del individuo	19
4.3. Descripción de las anomalías por localización geográfica	22
4.4. Análisis de las anomalías en relación a la variabilidad genética de las poblaciones	23
4.5. Relación entre las anomalías y las variables climáticas	24
5. Discusión	26
6. Conclusiones y proyección futura	28
7. Agradecimientos	29
8. Bibliografía	30

1. Introducción

Cambio global y efectos en las poblaciones silvestres

Durante las últimas décadas se ha detectado un aumento muy significativo de la tasa de extinción de vertebrados a escala global. Entre los factores principales que amenazan la biodiversidad, se encuentran los cambios de uso del suelo y las variaciones climáticas (Sala et al., 2000). La intensificación agrícola, la urbanización y las infraestructuras viales conducen inevitablemente a la fragmentación de los hábitats e incrementan el aislamiento de las poblaciones, con consecuencias directas sobre su viabilidad al desencadenar procesos como la endogamia (pérdida de variabilidad genética). Por otro lado, las variaciones climáticas son producidas como consecuencia del cambio climático provocando alteraciones en la adecuación de las especies a sus áreas actuales de distribución. Es por ello que, desde la Biología de la Conservación, se tiene interés en el estudio de la distribución de las especies, su demografía, aspectos de comportamiento y de *fitness* (Hunter, 2006). El concepto de *fitness* hace referencia a la eficacia biológica de los individuos para sobrevivir y reproducirse, y se relaciona con características anatómicas, fisiológicas, comportamentales y relativas al ambiente. Estos aspectos nos van a permitir diagnosticar y evaluar las posibles amenazas, con la finalidad de establecer medidas de gestión y conservación de las poblaciones silvestres.

En el contexto de crisis global de biodiversidad actual, merecen una atención especial los reptiles. Recientemente, muchas especies de reptiles han sufrido un grave declive de sus poblaciones, una reducción drástica de su área de distribución e incluso, en algunos casos, se han extinguido (Marco, 2015). Los reptiles son especialmente sensibles a extinciones locales por su dificultad para la dispersión y recolonización. Esta limitación ecológica se debe a restricciones fisiológicas, la relativamente baja movilidad y la filopatria de este grupo. A su alta sensibilidad se suma el desconocimiento de las causas que provocan la mortalidad masiva, lo que plantea graves problemas a la hora de diseñar estrategias para su conservación. Las tortugas están entre los vertebrados más amenazados, con aproximadamente más de la mitad de las 300 especies conocidas amenazadas de extinción (Rhodin et al., 2011).

Los reptiles, como otros organismos, cuando se encuentran en condiciones subóptimas generadas por condiciones ambientales extremas o debido a la fragmentación de las poblaciones, pueden desarrollar caracteres anómalos, por exceder su capacidad de autorregulación al estrés. La presencia de anomalías, malformaciones o asimetrías en animales de vida silvestre puede servir como un indicador de la alteración en el desarrollo, una variable correlacionada con el *fitness* de las poblaciones (Velo-Antón et al., 2011). Una anomalía es una deformidad de la estructura del organismo o de alguna de sus partes, provocada por un proceso anormal del desarrollo, especialmente congénito

(Cuadro 1). Así, individuos de poblaciones con algún tipo de estrés normalmente presentan niveles más altos de anomalías que los individuos de poblaciones con carencia de estrés (Velo-Antón et al., 2011).

Cuadro 1. Ejemplo de anomalía.

Un ejemplo de anomalía es la polidactilia, una anomalía congénita que afecta a las extremidades provocando la aparición de un número mayor de dedos al normal de cada especie (Martínez Silvestre et al., 1997).



Polidactilia en un ejemplar de *Testudo graeca* observado en libertad en el sureste ibérico. Fuente: Marina Moreno Fuentes.

Existen factores intrínsecos (genéticos y fisiológicos) y extrínsecos (ambientales) que pueden afectar gravemente el proceso de desarrollo embrionario, pudiendo ser responsables de la aparición de ciertas anomalías (Moustakas-Verho et al., 2014). Durante dicho desarrollo embrionario, los factores ambientales desempeñan un papel importante en la formación de las crías, no solamente en la determinación del sexo, también en el crecimiento. De igual forma, sustancias contaminantes procedentes de actividades industriales y agrícolas que son incorporadas a las cadenas tróficas, pueden afectar y generar diversas anomalías en las tortugas (Bárceñas et al., 2009). Por ejemplo, los rasgos que son expresados en ambas partes de un organismo bilateral pueden desarrollarse de forma asimétrica entre los lados izquierdo y derecho (Rivera et al., 2008).

Según un estudio de Blaustein y colaboradores (2003), en Estados Unidos aparecieron malformaciones en anfibios, con una frecuencia anormalmente alta (muy superiores al 5%, el nivel máximo considerado normal). Estas malformaciones incluían infecciones en la piel, patas o dedos supernumerarios y ausencias o malformaciones de las patas traseras. Afectaron a más de 60 especies, y crearon gran alarma social al ser relacionadas con posibles alteraciones del medio, tales como un incremento de los niveles de radiación, el uso desmesurado de insecticidas o fertilizantes u otros agentes químicos. Esto indica que el estudio de las anomalías en animales salvajes puede ser el primer síntoma para evaluar como de saludables se encuentran las poblaciones, y detectar así factores intrínsecos o extrínsecos que les estén afectando. Si los factores son debidos a condiciones ambientales o contaminación, pueden ser además, un bioindicador del medio, con gran potencial para detectar de forma temprana posibles alteraciones ambientales con incidencia en la salud pública.

El estudio de los impactos generados por los humanos tanto indirectamente, (como la fragmentación y destrucción del hábitat) como directamente (recolección masiva de ejemplares) han sido estudiados en poblaciones de tortuga, al ser organismos de larga vida y baja capacidad de dispersión, como es el caso de *Testudo graeca* en el sureste peninsular. En este trabajo fin de grado, se realiza por primera vez una evaluación de las anomalías presentes en las placas del caparazón de tortuga mora en el sureste ibérico, estudiándolas en profundidad en función de las características del individuo, la diversidad genética y los factores meteorológicos.

Testudo graeca como modelo de estudio

La mayoría de reptiles, y en especial las tortugas, son excelentes modelos para estudiar variaciones en el desarrollo de su morfología, ya que las anomalías son fácilmente identificables en forma de malformaciones en el número de placas del caparazón (Figura 1) (Velo-Antón et al., 2011). Por esta razón, la especie elegida para realizar el estudio será la tortuga mora del sureste ibérico, ya que es una zona de estrés por sequía y existen grandes diferencias en cuanto a la diversidad genética entre poblaciones (Graciá, 2013). Son tres las causas más propuestas para dar respuesta al origen de estas malformaciones: condiciones de temperatura y restricciones de humedad en la incubación; condiciones de su ubicación geográfica en su distribución; y pérdida de diversidad genética (Velo-Antón et al., 2011).



Figura 1: Anomalía en el caparazón de un individuo de *Testudo graeca*: ausencia de placas vertebrales. Fuente: Marina Moreno Fuentes.

La tortuga mora pertenece al género *Testudo* y a la familia Testudinidae (tortugas terrestres). Las especies del género *Testudo* se reparten en una gran diversidad de hábitats: zonas de bosque claro, praderas, matorrales de estepa o matorrales subdesérticos en el sureste ibérico. Los principales factores de amenaza que afectan a la supervivencia y al *fitness* de las poblaciones de la especie en el sureste ibérico son:

- La pérdida y fragmentación de su hábitat. Este factor está considerado como una de las causas principales de la actual crisis de biodiversidad (Santos et al., 2006). Los ecosistemas áridos mediterráneos del sureste de la Península Ibérica contienen una excepcional concentración de especies y altos índices de endemismos. Paisajes y vegetación han evolucionado con prácticas agrícolas y ganaderas tradicionales, pero recientemente están siendo fuertemente modificados por distintos tipos de explotaciones (Peñas de Giles et al., 2006): cambios de usos del suelo, la construcción de nuevas infraestructuras y creación de nuevos regadíos. La pérdida y fragmentación de su hábitat es una amenaza ya que conlleva la parcelación del lugar con un gran grado de aislamiento (Álvarez-Romero et al., 2008), consecuencia muy grave ya que las tortugas presentan una capacidad de movimiento limitada.
- Erosión poblacional por extracción. El segundo factor de amenaza de la tortuga mora es consecuencia de su representación en nuestra cultura como especie doméstica o mascota. A pesar de su estado de protección, continúa capturándose para mantenerla en cautividad en patios y jardines. Este fenómeno de extracción está teniendo un importante efecto en las poblaciones naturales, originando una disminución demográfica (Ibáñez et al., 1989). Además, la cría en cautividad puede generar piramidismo, que consiste en una malformación del

caparazón de las tortugas terrestres que se manifiesta estructuralmente como un crecimiento vertical en pirámide de los escudos que lo conforman.

- Otros factores. Ante el problema de la cautividad de la tortuga mora, tradicionalmente se han llevado a cabo actuaciones de recogida de individuos cautivos para su suelta posterior en el medio natural. Este tipo de medidas con fines conservacionistas pero ineficazmente controladas, entrañan notables riesgos para las poblaciones silvestres, asociados a la transmisión de enfermedades como la rinitis crónica, y a la posible pérdida de características genéticas locales, a la vez que no afronta las principales amenazas de la especie anteriormente nombradas: pérdida de hábitat y captura de individuos (Giménez et al., 2004) También afectan negativamente a la especie perturbaciones como los incendios, las sequias y el cambio climático.

En base a controlar y regular estos factores, la legislación es un importante punto de apoyo. La tortuga mora es una especie amenazada en el sureste ibérico, cuyo marco legal de protección viene definido a diferentes escalas en el cuadro 2.

Cuadro 2. Marco legal de protección de *Testudo graeca* a diferentes escalas.

- A escala internacional, la especie aparece recogida en los anexos del Convenio CITES (Convenio sobre Comercio Internacional de Especies Amenazadas de la Fauna y Flora Silvestres), en el Convenio de Berna (Convenio sobre la conservación de la vida silvestre y del medio natural), y en la Lista Roja elaborada por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) en la cual aparece como especie Vulnerable.
- A escala europea, aparece en la Directiva 92/43/CEE del Consejo, relativa a la conservación de los hábitats naturales y de la fauna y flora silvestre, donde se la incluye en el Anexo II (especies animales y vegetales de interés comunitario para cuya conservación es necesario designar zonas de especial conservación o ZEC's) y en el Anexo IV (especies animales y vegetales que requieren una Protección estricta).
- A escala nacional, está incluida dentro de la normativa española en el catálogo Nacional de Especies Amenazadas, considerada de Interés Especial por el Real Decreto 439/1990. El libro rojo de los vertebrados de España la cataloga como especie En peligro.
- A escala autonómica, se define como Vulnerable en el Catálogo de Especies Amenazadas de la Región de Murcia que emana de la Ley de la Fauna Silvestre, Caza y Pesca fluvial (Ley 7/95). Las Islas Baleares disponen de un Plan de Conservación aprobado para la especie (BOIB núm. 112 de 1 de agosto de 2009). Mientras que el PN de Doñana cuenta con de un Programa de Seguimiento de Procesos y Recursos Naturales, y está catalogada como especie en Peligro de extinción en Almería por el Catálogo andaluz de especies amenazadas (Graciá et al. 2015).

Patrón de expansión de la especie de estudio

El origen de la población de tortuga mora en el sureste ibérico se dio hace unos 20000 años por la llegada de algunos individuos desde el norte de África (Graciá et al., 2013). Anteriormente, debido a la ausencia de registro fósil para *T. graeca* en el oeste de Europa y especialmente tras el trabajo de Álvarez et al. (2000), se extendió en el ámbito científico-conservacionista la consideración no contrastada de que la tortuga mora era una “especie introducida” en el sureste ibérico (Graciá, 2013).

El punto de llegada de la especie a esta población ha sido estudiado analizando las similitudes genéticas entre la población del norte de África y la población del sureste ibérico (Graciá, 2013). Se estima que ese punto inicial de la población se puede encontrar en la Cuenca de Vera y que a partir de ahí se ha expandido a lo largo de más de 60 kilómetros entre las provincias de Murcia y Almería. Al comparar entre sí las diferentes poblaciones del sureste ibérico, encontramos que la diversidad genética disminuía al aumentar la distancia a la cuenca de Vera (Graciá, 2013), siguiendo un patrón singular llamado *surfing genético* (Klopfstein et al., 2009).

La teoría del *surfing genético* ha sido descrita a partir de simulaciones y estudios para expansiones naturales de especies con baja densidad y poca capacidad de dispersión (Excoffier et al., 2009). Según este concepto, sólo las variantes genéticas situadas en el frente de avance de la expansión colonizan el nuevo territorio (Hallatschek et al., 2007). Así, a medida que avanza la expansión se pierde diversidad genética, se generan gradientes e incluso sectores homogéneos y se alcanzan fuertes diferencias en poco espacio. Por azar, algunas variantes genéticas que eran raras al inicio pueden volverse frecuentes en lugares distantes del foco de expansión, del mismo modo que otras inicialmente frecuentes pueden llegar a desaparecer. La dispersión de la tortuga mora en el sureste ibérico probablemente presentó estas características, por lo que la estructura espacial de esta población constituye uno de los primeros ejemplos de *surfing genético* en vertebrados (Graciá et al., 2013).

2. Antecedentes y objetivos

Se han realizado algunos estudios internacionales sobre anomalías en diferentes especies de tortugas terrestres y marinas (Velo-Antón et al., 2011; Buica et al., 2014; Loehr, 2016), pero no se había realizado hasta ahora un análisis de las malformaciones que posee la tortuga mora en el sureste ibérico. Por ello, y gracias a los datos de campo y datos genéticos recopilados sobre *T. graeca* por el Área de Ecología de la Universidad Miguel Hernández de Elche desde hace más de diez años, se ha podido realizar un estudio de las anomalías que posee esta especie en las provincias de Murcia y Almería.

El objetivo principal del presente trabajo es analizar las anomalías morfológicas que poseen las poblaciones de *T. graeca* en el sureste ibérico y los factores que influyen en ellas. Los objetivos específicos son:

- Describir los tipos de anomalías y su distribución en el caparazón de tortuga mora.
- Analizar la relación de estas anomalías con las diferentes características del individuo: madurez sexual, sexo, edad y año de nacimiento.
- Analizar la distribución geográfica de estas malformaciones en las diferentes sierras del área de estudio.
- Estudiar la relación de la aparición de las anomalías morfológicas con la variabilidad genética de las diferentes poblaciones.
- Considerar si las variables ambientales, en este caso la precipitación anual, constituyen un factor condicionante en la presencia de malformaciones.

3. Material y métodos

3.1. Sistema de estudio

La tortuga mora, *Testudo graeca graeca* (Linnaeus, 1758), pertenece al género *Testudo*, el cual se distribuye principalmente por la región norteafricana, el este del continente europeo llegando por el suroeste asiático hasta Irán y por el suroeste de Europa en las poblaciones ibéricas (Linnaeus, 1758). En la Figura 2, se puede observar cómo se distribuyen las subespecies de *T. graeca*. Las áreas destacadas en gris claro representan zonas de Asia en las cuales se desconoce que subespecies habitan.

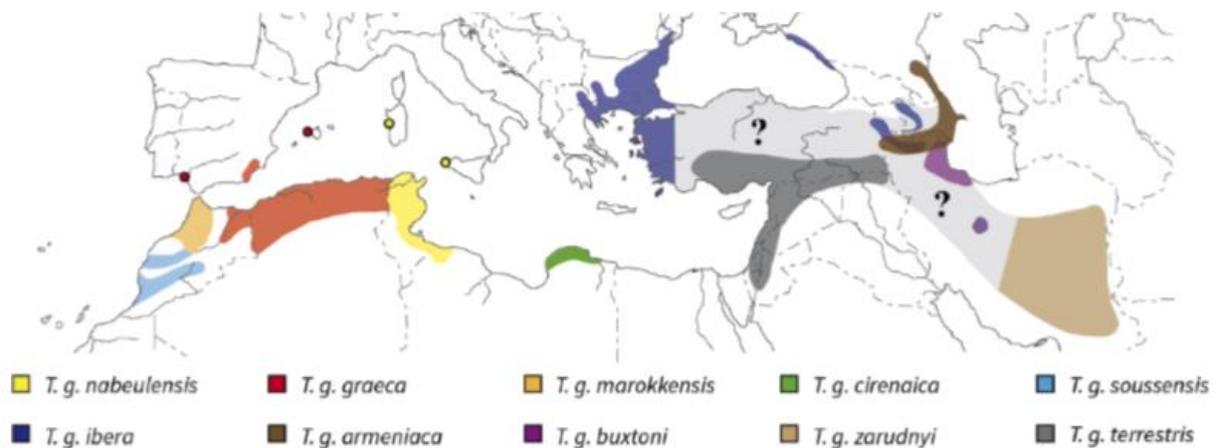


Figura 2: Distribución de las subespecies de *Testudo graeca*. Fuente: Graciá et al. (2017).

La subespecie, *T. g. graeca*, se distribuye por el norte de África y por el sur de Europa, encontrándose pequeñas poblaciones en las Islas Baleares, en el Parque Nacional de Doñana y en el sureste ibérico (sur de Murcia y Norte de Almería). Estas últimas poblaciones se encuentran en núcleos aislados. Vive en hábitats áridos o semiáridos, con pocas lluvias y predominio de matorrales y arbustos pequeños, en entornos típicamente mediterráneos (Anadón et al., 2006).

En relación con la morfología, su caparazón es abombado y de tonos amarillentos a verde oliva, aunque algunos ejemplares presentan un caparazón casi negro. Las placas que forman este caparazón suelen tener los bordes negros y una mancha negra en su interior. En el sureste ibérico, a partir de individuos capturados en dieciocho localidades del área de distribución, se obtuvo que el peso medio para las poblaciones estudiadas es de 340 g con una longitud espaldar que varía entre 34 y 170 mm con una longitud media de 110 mm aproximadamente (Ibáñez González et al., 1989).

La tortuga mora presenta un claro dimorfismo sexual, siendo los aspectos más evidentes que: las hembras son mayores que los machos, tardan más en alcanzar la madurez sexual (a los ocho o diez años; Rodríguez-Caro et al., 2013) y la placa supracaudal de las hembras es plana mientras que la de los machos es curva (Ibáñez González et al., 1989).

Algo característico de la tortuga mora y que la distingue de la tortuga mediterránea, es que la placa que está encima de la cola (placa supracaudal), no está dividida. Tienen cinco uñas en las patas delanteras y cuatro en las traseras, y en la parte posterior del muslo tienen un espolón, otra característica más que las distingue de las otras especies de *Testudo* (Giménez et al., 2004).

La tortuga mora es un animal ectotermo y por ello presenta unos marcados patrones de actividad, tanto estacionales como diarios, dependiendo de las condiciones ambientales (Pérez et al., 2002). En el sur peninsular, presenta dos periodos de inactividad, en verano y en invierno, alternados con periodos de actividad, en primavera y otoño. Por su actividad restringida y variable, la tortuga mora resulta una especie de muy baja detectabilidad, aún en poblaciones de altas densidades (Rodríguez-Caro et al., 2017). Esto hace que estimas sobre su abundancia o sobre el estado demográfico de sus poblaciones requieran de un gran esfuerzo de prospección (Ibáñez González et al., 1989).

Las tortugas son animales muy longevos, caracterizados por una alta supervivencia de adultos y baja de juveniles (Díaz-Paniagua et al., 2001). Por ello, la estabilidad demográfica de sus poblaciones es muy sensible a la mortalidad de adultos, mientras que variaciones en la fecundidad, éxito de las puestas o supervivencia juvenil tienen una menor influencia en la estabilidad de las poblaciones (Giménez et al., 2004).

Las cópulas de esta especie se inician entre Marzo y Abril. La actividad sexual va disminuyendo progresivamente durante el mes de Mayo, y cesando casi por completo a primeros de Junio (Ibáñez González, 1989). La hembra una vez fecundada prosigue su vida con normalidad hasta que busca un lugar llano, de tierra no muy blanda, y al abrigo de una planta. Allí excava un agujero colocando a continuación sus huevos. Por regla general cada hembra pone de 3 a 7 huevos que luego cubre con tierra (Rodríguez-Caro et al., 2014). Tras un periodo de incubación de unos tres meses, las tortugas nacen a finales de Agosto o principios de Septiembre, coincidiendo con las primeras lluvias y facilitando la humedad necesaria para la eclosión de los huevos.

El área en la que se ha realizado el estudio es el sureste ibérico, concretamente en las provincias de Murcia y Almería. El clima presente es el mediterráneo seco, clima que se da como transición entre el mediterráneo típico y el desértico, y se caracteriza por veranos secos y áridos y pocas lluvias e inviernos suaves. Se trata de una de las zonas más áridas de Europa donde las

precipitaciones tienen lugar sobre todo en primavera y otoño y al año se registran menos de 200 mm y las temperaturas son muy elevadas (Ibáñez et al., 1989).

La geología de la provincia murciano-almeriense es muy variada desde un punto de vista litológico, pero dominan las rocas carbonatadas. También encontramos afloramientos yesíferos y silíceos como pizarras. La diversidad litológica no siempre se corresponde con la edafológica dada la escasa precipitación que se registra en la provincia. Esto provoca una alta salinización por una alta evaporación de los suelos arrastrando a sus superficies las sales (Alcaraz et al., 1989). En la Figura 3 se muestra la distribución de la especie en el área de estudio.

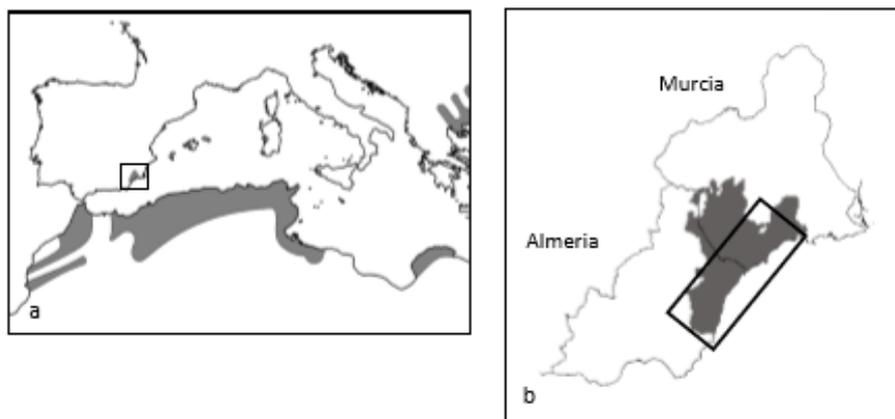


Figura 3: (a) Distribución de *Testudo graeca* en la Región Mediterránea (b) con detalle en las poblaciones del sureste ibérico. Fuente: Graciá (2013).

3.2. Descripción de anomalías

Una anomalía es una “deformidad o defecto congénito de alguna parte del organismo”. En las tortugas estas anomalías se pueden observar en el caparazón y se observa con frecuencia la presencia de placas adicionales o divididas en las tortugas (Loehr, 2016).

Una tortuga mora sin presencia de malformaciones tendría el caparazón con las características que podemos observar en la Figura 4:

- Cinco placas vertebrales
- Cuatro placas costales a la derecha y cuatro a la izquierda.
- Once placas marginales a la derecha y once a la izquierda.
- Una placa nual.
- Una placa caudal.

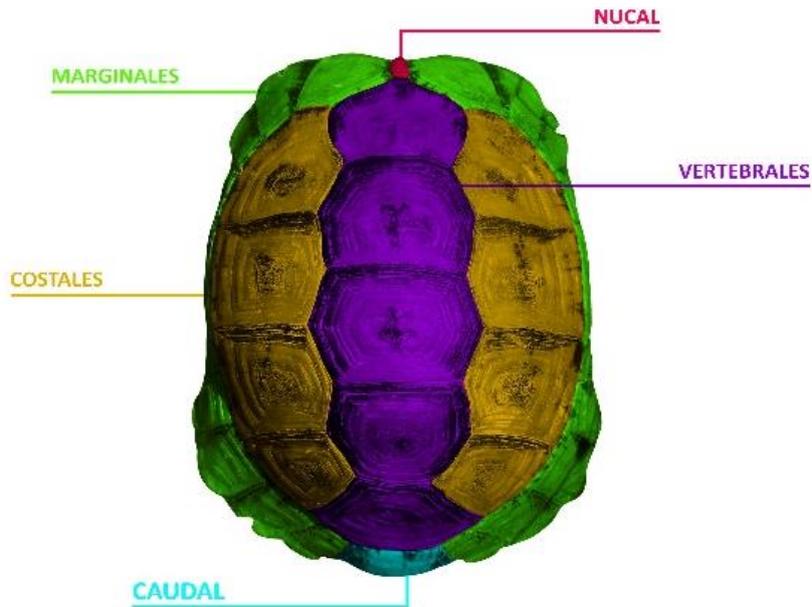


Figura 4: Caparazón de *Testudo graeca* sin anomalías. Fuente: Marina Moreno Fuentes.

Los casos más comunes de anomalías en la disposición y número de placas son:

1. Placas divididas: es el caso más frecuente y suele afectar a los escudos vertebrales. Se manifiesta con la presencia de un escudo partido en dos.
2. Placas adicionales: en este caso el número de placas es mayor que el que se corresponde normalmente y suele representarse en las costales y marginales.
3. Ausencia de placas: es poco frecuente y suele darse en las placas vertebrales.

Los casos que tendremos en cuenta para nuestro estudio serán los dos últimos: placas adicionales (Figura 5) o ausencia de éstas en las placas vertebrales, costales y marginales, teniendo en cuenta también si la malformación se da en la parte izquierda o derecha del caparazón.



Figura 5: La foto de la izquierda corresponde a una tortuga mora sin anomalías en el caparazón; a la derecha se pueden observar placas adicionales en vertebrales y costales derechas. Fuente: Marina Moreno Fuentes.

3.3. Obtención de datos de campo

El área de Ecología de la Universidad Miguel Hernández de Elche estudia las poblaciones naturales de tortuga mora en el sureste ibérico desde hace más de diez años (Rodríguez-Caro et al., 2016). Se ha realizado un monitoreo a largo plazo de la especie de estudio, pudiéndose usar para el presente trabajo datos de malformaciones desde el año 2005.

El muestreo se realiza durante el periodo reproductivo, en grupos de tres o cuatro personas, que realizan en las diferentes localidades numerosos itinerarios de censo, consistentes en transectos lineales de esfuerzo controlado independientes entre sí. Estos buscadores son los encargados de encontrar los individuos, marcarlos mediante muescas en las placas marginales del caparazón y tomarles los siguientes datos: población, coordenadas, sierra, fecha, sexo, edad, medidas biométricas y número de placas. También se han realizado estudios genéticos mediante la extracción de sangre a numerosos ejemplares, datos que nos serán de utilidad para nuestro estudio (Graciá, 2013).

3.4. Descripción de los factores ambientales y genéticos

Las variables utilizadas para relacionar las anomalías en el caparazón de *T. graeca* con características del individuo, geográficas, genéticas y ambientales son las siguientes:

- Madurez sexual y sexo: los individuos en los que se puede determinar el sexo (gracias a la forma del caparazón, del tamaño corporal y de la placa supracaudal) se clasificaron como adultos (mayores de ocho años de edad) y posteriormente como machos o hembras. Los que no pudieron ser sexados y con un caparazón rígido entre los cinco y ocho años se clasificaron como subadultos. Se clasificaron como inmaduros los individuos con un caparazón blando con un rango de edad de uno a cuatro años (Sanz-Aguilar et al., 2011).
- Edad: gracias a los anillos que poseen en las placas, podemos estimar la edad de cada individuo, ya que cada anillo representa un año de crecimiento (Rodríguez-Caro et al., 2015). Estos anillos se dividen en tres fases: la fase I correspondiente a los primeros años de crecimiento, donde los anillos están muy próximos entre sí; la fase II donde la distancia entre los anillos es mayor ya que son las edades de mayor crecimiento; y la fase III donde la distancia entre anillos es muy pequeña ya que el ritmo de crecimiento disminuye a cierta edad (Rodríguez-Caro et al., 2015).
- Año de nacimiento: pudimos estimar el año de nacimiento de cada individuo restándole al año de muestro la edad del ejemplar.
- Localización geográfica: población o sierra en la que habitan los individuos de *T. graeca*. Disponemos de datos de diferentes censos de las siguientes poblaciones, clasificadas a su vez en las diferentes sierras y ordenadas de Norte a Sur en el área de estudio (Tabla 1).

Tabla 1: Poblaciones de *Testudo graeca* en el sureste ibérico clasificadas por sierras y ordenadas de Norte a Sur utilizadas en el estudio.

Población	Sierra
Pisadas Virgen	Lorca Norte
Tova	Lorca Norte
Luchena	Lorca Norte
Tejera	Torreçilla
Xiquena	Torreçilla
Palo Seco	Jara
Albergue Jara	Jara
Culebras	Jara
Hinojares	Almenara
El Lentiscar	Almenara
Adanes	Almenara
Crisoleja	Almenara
Palomera	Almenara
Malcamino	Almenara
Madroñales	Almenara
Montería	Almenara
Ermita Villareal	Almenara
Casa Arcos	Almenara
Alto de las Quimeras	Almenara
Galera	Almenara
Alto de la Cuesta	Almenara
Cuesta del Grajo	Almenara
Chuecos Arriba	Almenara
Bas Norte	Almenara
Cortijo.P.O	Almenara
Collado del Alcaibar	Almenara
Chuecos Abajo	Almenara
Bas Sur	Almenara
Loma del Escribano	Almenara
Majada Moro	Almenara
Zerrichera	Almenara
Cuesta Bayona	Almenara
Las Palomas	Almenara
Quinoneros uno	Almenara
La Merced 2	Almenara
Cabo Cope	Almenara
Aguilon Sur	Pinos-Almagrera
Reinoso	Pinos-Almagrera
Aljife	Pinos-Almagrera
Pinos Sur	Pinos-Almagrera
Pane	Pinos-Almagrera
Marinica	Pinos-Almagrera
Mosca	Pinos-Almagrera
Canadas Sotomayor	Almagro
Sotomayor	Almagro
Ventorrillo	Almagro
Palas	Almagro
Sierrecica	Almagro
Villaltas	Bedar
Centinares Bajo	Bedar
Cunas	Vera
Pelaos	Vera
Salar de los Canos	Vera
Chinas	Vera
Alboluncas	Vera
Cueva Sucia	Cabrera
Aire	Cabrera
Judio	Cabrera
Margas Cabrera	Cabrera
Cintas	Cabrera

- Heterocigosidad esperada (H_e): medida de la variación genética de una población respecto a un gen particular. Se trata de uno de los índices de cuantificación más utilizados para revelar la diversidad genética de las poblaciones (González, 2008).

Los datos genéticos utilizados han sido obtenidos de estudios previos del área de Ecología de la Universidad Miguel Hernández (Graciá, 2013). En la Figura 6 podemos ver un mapa con las poblaciones que han sido utilizadas para los estudios genéticos, seleccionando aquellas que se encuentran en la zona de la costa y siguiendo la trayectoria del origen de expansión de tortuga desde la Cuenca de Vera.

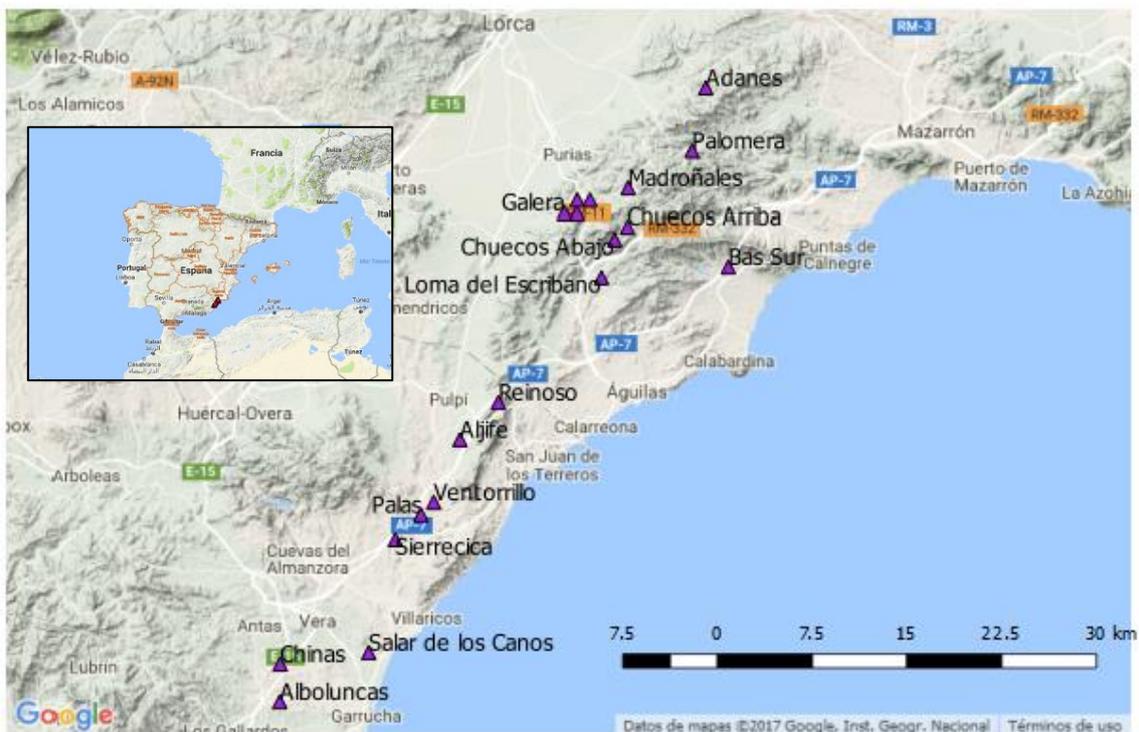


Figura 6: Poblaciones de *Testudo graeca* con datos genéticos utilizadas en relación a la presencia de anomalías en el caparazón. Fuente: Elaboración propia

- Precipitación: los datos utilizados en cuanto a la precipitación corresponden a información obtenida del IMIDA (www.imida.es) sobre la precipitación acumulada anualmente (mm) en su estación meteorológica de Lorca, estación situada en el centro del área de estudio de la especie en el sureste ibérico.

3.5. Análisis de datos

En primer lugar, se compilaron todos los datos en una única matriz, que fue revisada para evitar individuos repetidos debido a las recapturas realizadas durante todo el periodo de recopilación de datos de campo.

Una vez ordenados todos los datos, se evaluó la tasa de malformación, es decir, el número de individuos con presencia de una o más anomalías con respecto al total de tortugas muestreadas. Como podemos observar en la Figura 7, se han encontrado malformaciones en el caparazón de tortuga mora durante todos los años de muestreo.

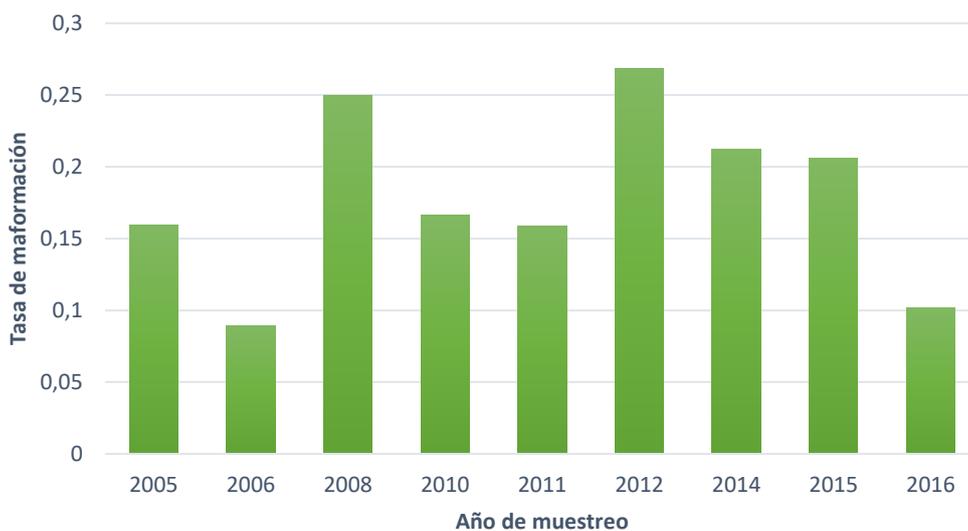


Figura 7: Tasa de malformación en el caparazón de *Testudo graeca* en cada año de muestreo.

Se realizaron diferentes gráficos con las tasas obtenidas para describir las malformaciones en relación al tipo, a las características del individuo, su localización geográfica, diversidad genética de las poblaciones y variable ambiental (ver apartado Resultados). Además, se han realizado tests de chi cuadrado y regresiones lineales con el programa estadístico R (www.R-project.org) para analizar la presencia de malformaciones en función del sexo de individuos, diversidad genética y precipitación.

4. Resultados

4.1. Características de las anomalías

Del total de individuos muestreados (2139), encontramos que 365 sufren alguna anomalía en su caparazón, ya sean placas adicionales o ausencia de ellas (tasa del 0,17 de individuos malformados). La mayoría de estos posee una única anomalía en su caparazón (185 individuos), disminuyendo este número a medida que aumenta el número de malformaciones, ya que sólo cuatro tortugas poseen cinco (Figura 8).

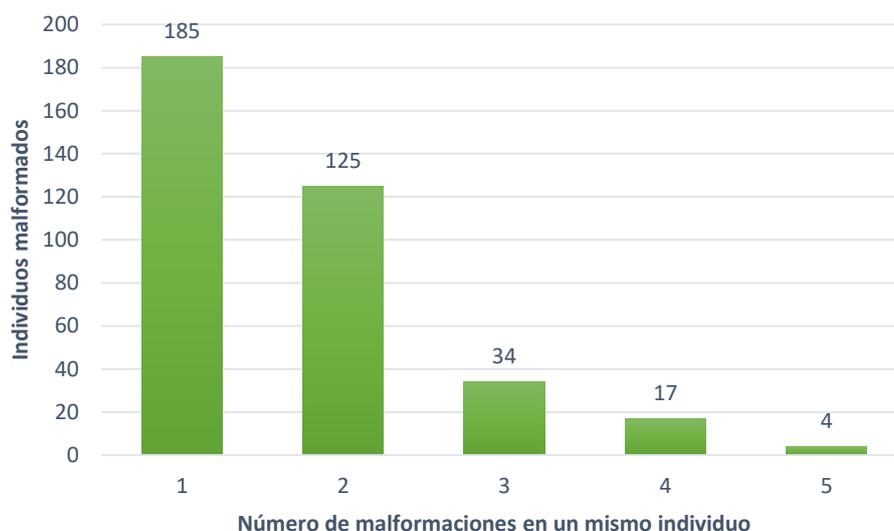


Figura 8: Total de los individuos de *Testudo graeca* malformados clasificados en función del número de anomalías sufridas por un mismo ejemplar en su caparazón.

El total de malformaciones encontradas es de 582 en los 365 individuos que presentan anomalías. Estas fueron clasificadas en función del lugar de aparición según los diferentes tipos de placas del caparazón de *T. graeca*, resultando que el mayor número de malformaciones se dan en las placas marginales, seguido de las costales, y por último encontraríamos las placas vertebrales (Figuras 9 y 10).

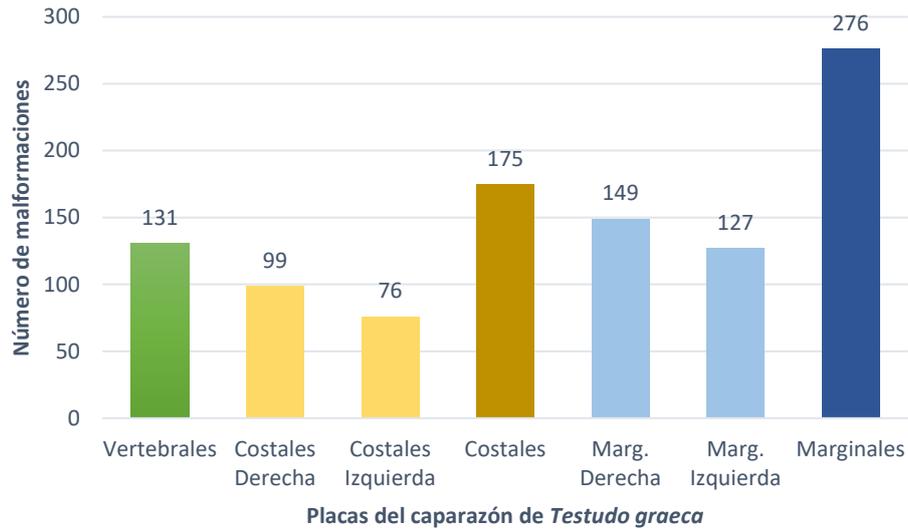


Figura 9: Número de malformaciones encontradas en función de dónde se encuentran dentro del caparazón de los ejemplares estudiados de *Testudo graeca*.

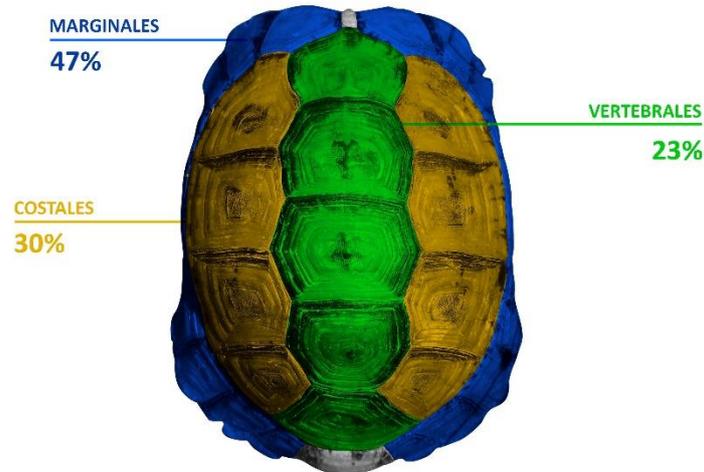


Figura 10: Reparto en porcentaje de la localización de las malformaciones en *Testudo graeca*.

4.2. Descripción de anomalías según las características del individuo

De los 365 individuos que poseen alguna malformación en el caparazón, las proporciones según su **madurez sexual** clasificándolos como adultos (tasa del 0,17), subadultos (tasa del 0,16), inmaduros (tasa del 0,13) y no identificados (tasa del 0,2) se muestran en la Figura 11.

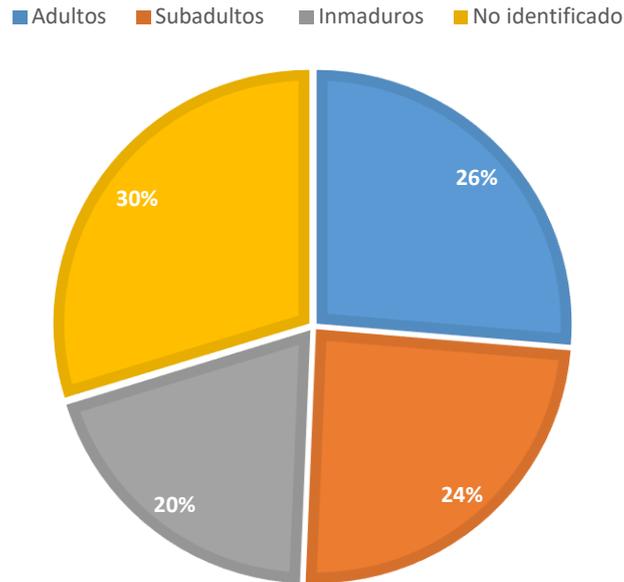


Figura 11: Reparto en porcentajes del total de individuos malformados de *Testudo graeca* en función de su madurez sexual.

De los 288 individuos adultos, podemos observar en la Figura 12 como el número de malformaciones es ligeramente mayor en machos (154 vs. 134).

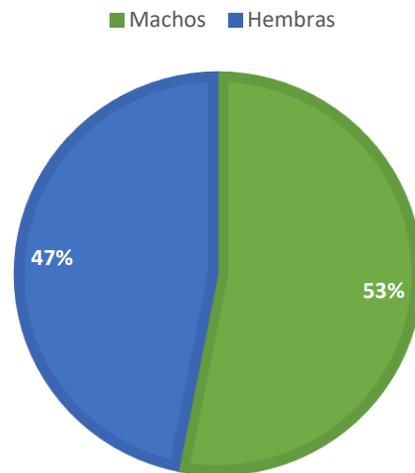


Figura 12: Porcentaje de aparición de anomalías en individuos adultos de *Testudo graeca* según su sexo.

Después de realizarse un test de chi cuadrado comprobamos que no existen diferencias significativas entre el número de individuos con anomalías y el sexo de los mismos ($\chi^2=1,348$; $p=0,273$).

En la Figura 13 se puede observar el resultado de relacionar la tasa de malformación con los diferentes rangos de **edad**, en la que podemos encontrar una tendencia positiva donde los individuos de mayor edad poseen una mayor tasa de malformación.

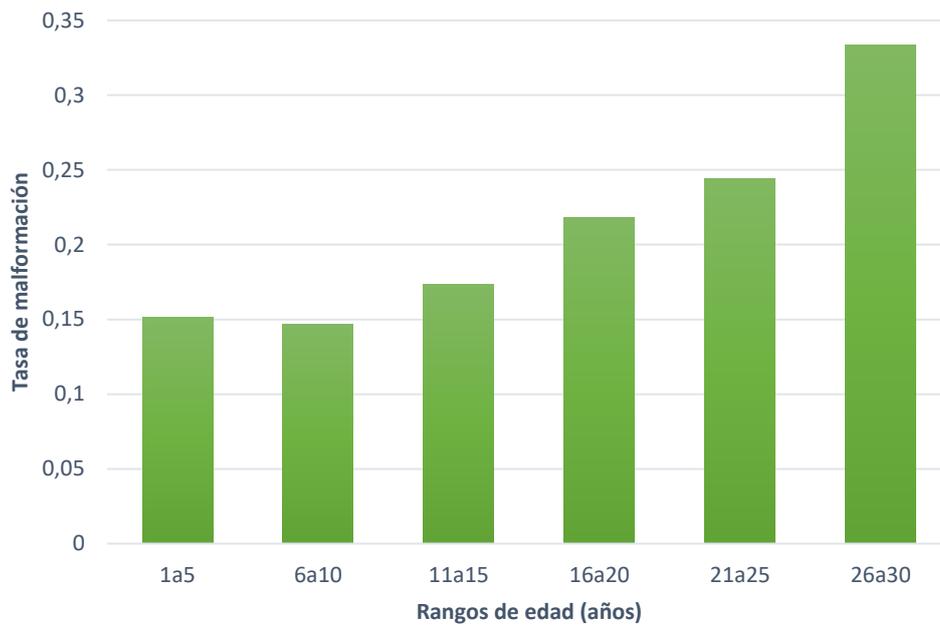


Figura 13: Tasa de malformación de *Testudo graeca* en cada rango de edad.

La tasa de malformación según el **año de nacimiento** de los individuos se muestra en la Figura 14, donde se observa una tendencia decreciente a lo largo de los años.

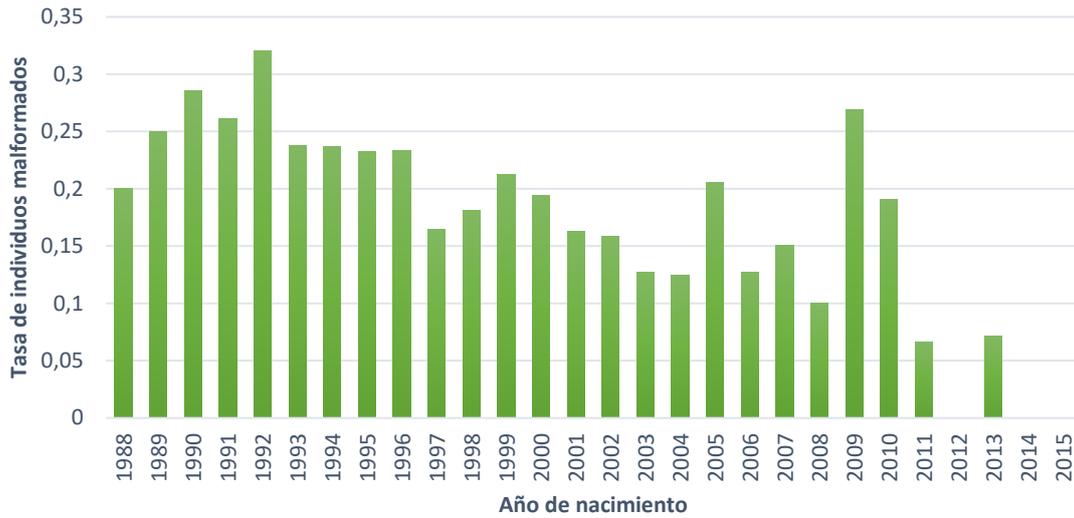


Figura 14: Tasa de malformación de *Testudo graeca* según su año de nacimiento.

4.3. Descripción de las anomalías por localización geográfica

En la Figura 15 está representada la tasa de malformación en función de las diferentes sierras ordenadas de Norte a Sur.

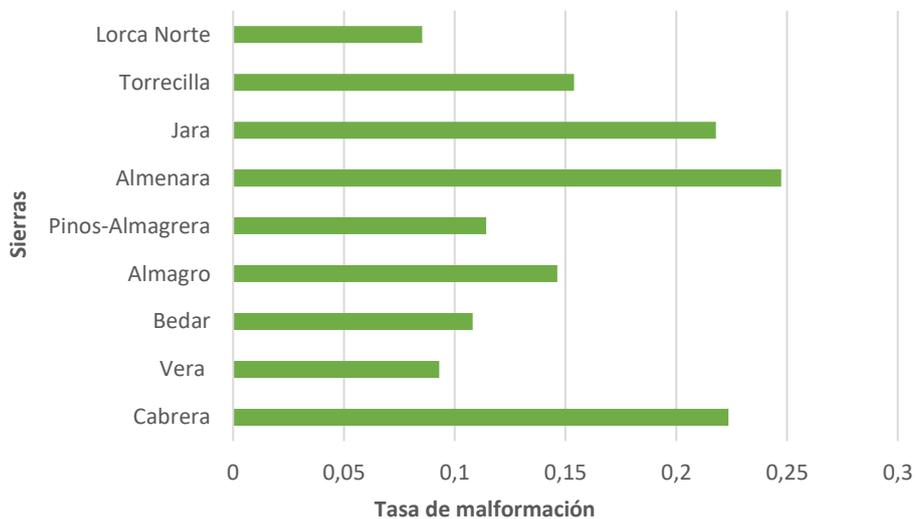


Figura 15: Tasa de malformación de *Testudo graeca* por sierras, ordenadas de Norte a Sur.

4.4. Análisis de las anomalías en relación a la variabilidad genética de las poblaciones

La regresión lineal entre la distancia al origen de las localidades de *T. graeca* y la heterocigosidad esperada de dichas localidades (Figura 16), muestra que existen diferencias significativas, con una tendencia negativa de la heterocigosidad ($\beta = -0,0012$; $p < 0,05$). Estos resultados justifican la evaluación de la distancia al origen en relación a la presencia de malformaciones.

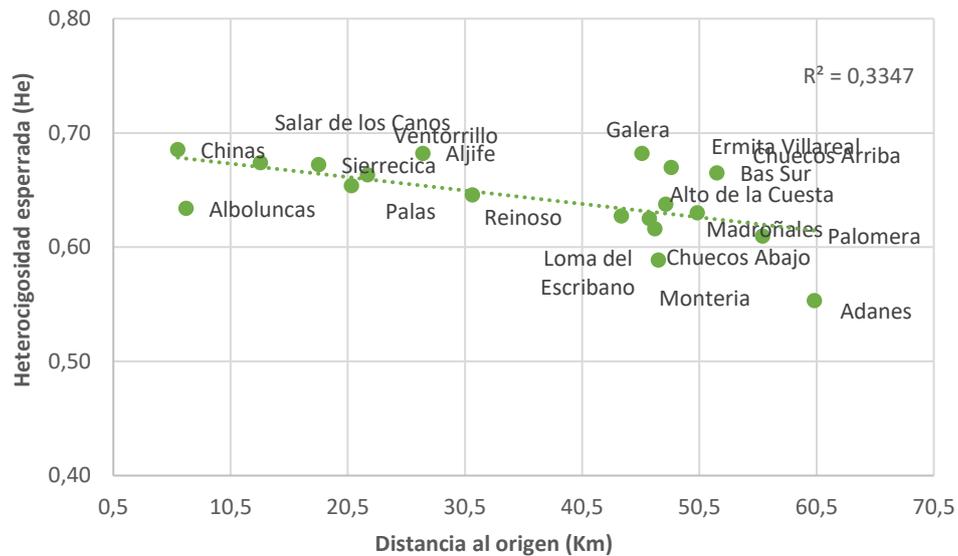


Figura 16: Datos de la heterocigosidad esperada de diferentes poblaciones de *Testudo graeca* en relación al origen de expansión de la especie. Fuente: Tomado con modificaciones de Graciá 2013.

Existe una relación significativa entre la distancia al origen de las localidades de *T. graeca* y la tasa de malformación ($\beta = 0,0049$; $p < 0,05$) (Figura 17).

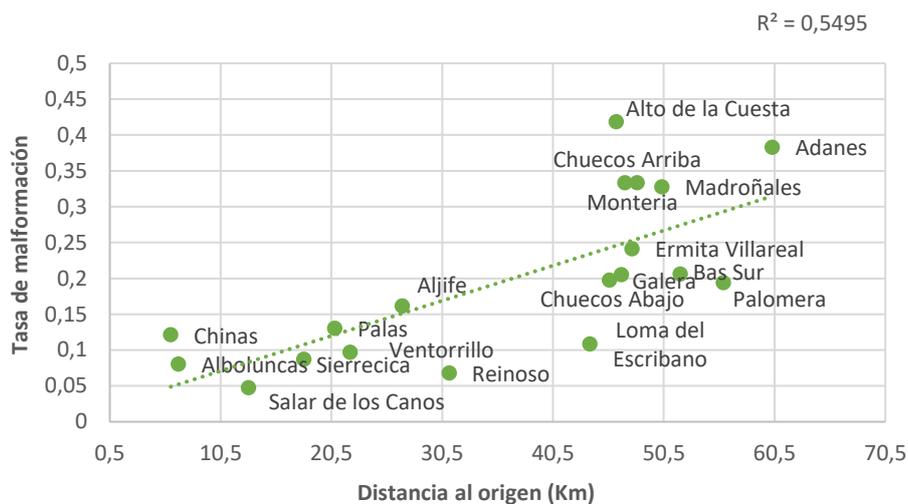


Figura 17: Representación de la tasa de malformación de *Testudo graeca* en función de la distancia al origen de expansión.

4.5. Relación entre las anomalías y las variables climáticas

Se muestra en la Figura 18 la precipitación anual acumulada relacionada con la tasa de malformación. El eje de los años corresponde con la tasa de malformación desde el año 1996 hasta el año 2011, mientras que los datos de precipitación corresponden con los tomados dos años antes, del año 1994 hasta el 2009.

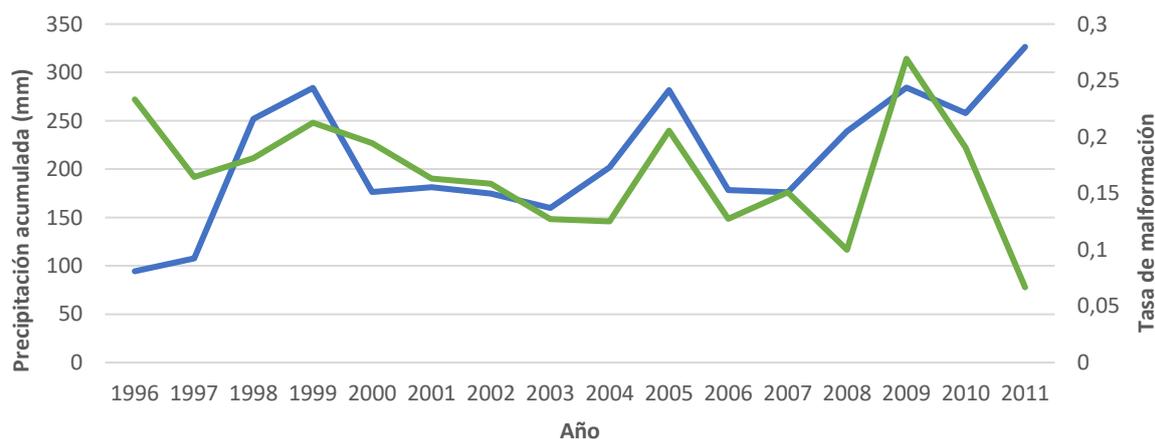


Figura 18: La línea azul corresponde a la precipitación acumulada en la Región de Murcia desde 1994. La línea verde corresponde a la tasa de malformación de *Testudo graeca* según el año de nacimiento de los individuos.

Se analizó también la relación entre la precipitación acumulada y la tasa de malformación sin tener en cuenta la tendencia a lo largo de los años, y aunque existe una tendencia ligeramente negativa entre la tasa de malformación conforme aumenta la precipitación acumulada anual, los análisis de regresión lineal indican que no existen diferencias significativas ($\beta = -0,0001148$; $p = 0,546873$).

5. Discusión

Este trabajo confirma que el patrón típico del caparazón de *T. graeca* es de cinco placas vertebrales, cuatro placas costales a izquierda y derecha y once marginales a cada lado del caparazón (Boycott et al., 2000). No obstante, la frecuencia de individuos con anomalías en ese patrón en las poblaciones estudiadas del sureste ibérico es relevante, puesto que un 17% de los ejemplares analizados las mostraron. A pesar de esto, este valor es inferior al de otras poblaciones de tortugas, con un 44% de anomalías encontradas por Loehr (2016) en *Homopus signatus*, el representante más pequeño entre los testudínidos. En el caso del galápagos europeo (*Emys orbicularis*) se han descrito poblaciones con un 75% de individuos malformados (Loehr, 2016).

El mayor número de malformaciones encontradas aparece en las placas marginales, seguido de las costales y las vertebrales. La presencia de anomalías en las placas vertebrales es posible que se relacione con mayores problemas en el desarrollo embrionario de la especie, pudiendo ser más difícil para las tortugas sobrevivir en esas situaciones y por tanto el porcentaje que encontramos es menor (Moustakas-Verho et al., 2014). Similares resultados obtuvo Loehr (2016) sobre las anomalías en el caparazón de la tortuga moteada del noreste de Sudáfrica (*Homopus signatus*). En el mismo trabajo, se observaba que el número más alto de anomalías se daba siempre en el lado derecho del caparazón, hecho que se repite en la población que hemos estudiado, pero hasta el momento no se ha proporcionado una explicación de este proceso.

Por otro lado, las anomalías se distribuyen homogéneamente entre sexos, coincidiendo nuestros resultados con trabajos anteriores donde las diferencias tampoco son significativas (Velo-Antón et al., 2011; Loehr, 2016). En principio, sería esperable encontrar mayor frecuencia de malformaciones en los estadios iniciales de desarrollo y que fueran disminuyendo en las clases de edad más altas como consecuencia de una menor eficacia biológica de los individuos. No obstante, no hemos encontrado diferencias significativas en la frecuencia de aparición de anomalías entre las diferentes etapas del desarrollo testadas. Puede deducirse, por tanto, que no parecen existir procesos de selección intensos contra las malformaciones, resultado similar a lo encontrado por Loehr (2016).

Nuestros resultados parecen indicar que la frecuencia de aparición de individuos con malformaciones tiende a disminuir en el caso de los individuos más jóvenes (con independencia de su población de procedencia). La tasa de malformación suele ser mayor en los individuos más viejos. Este resultado puede estar sesgado, ya que el total de tortugas en este rango de edad es bajo. Es necesario ampliar el tamaño de la muestra en esta clase de edad en trabajos posteriores para comprobar esta tendencia. Este dato junto al de la madurez sexual son especialmente interesantes, ya que ningún otro estudio ha abordado en profundidad estas variables en relación a la aparición de malformaciones.

Uno de los axiomas clásicos en genética de poblaciones y en ecología de la conservación es que la disminución de variabilidad genética está directamente relacionada con la disminución de la capacidad de respuesta de las poblaciones a los cambios ambientales. Además, en las situaciones de expansión del rango de distribución de una especie, en el frente de avance poblacional disminuye el flujo génico con el centro de origen y como consecuencia disminuye la variabilidad genética. En este trabajo hemos comprobado como el número de malformaciones aumenta conforme nos alejamos del origen de expansión (la sierra de Vera) y esto coincide con una disminución de la heterocigosidad (Graciá et al., 2013). Esto parece constituir una evidencia que apunta a una posible relación entre tasa de malformación y variabilidad genética. Esta relación ha sido puesta de manifiesto también en el galápagos europeo a escala peninsular (Velo-Antón et al., 2011). El valor bajo de R^2 obtenido en nuestros análisis es probablemente debido a que existe una gran variabilidad de las poblaciones que se encuentran más alejadas del origen y a que deben existir otros factores no estudiados.

Por último, las variables ambientales y en concreto la precipitación, no puede descartarse como un posible factor relacionado con la aparición de anomalías morfológicas en *T. graeca*. Aunque en los resultados de nuestro trabajo no hemos encontrado una relación significativa, sí que se aprecia un patrón temporal de variación similar entre la precipitación anual acumulada y la tasa de malformaciones. La precipitación, en el área de distribución de la especie (el sureste semiárido) es el principal factor limitante de la productividad primaria y por lo tanto determina de forma clara la dinámica demográfica de la especie (un herbívoro ectotermo).

6. Conclusiones y proyección futura

Tal y como se esperaba, *T. graeca* ha resultado ser un buen modelo de estudio de los factores ambientales y genéticos que intervienen en las dinámicas espaciales y temporales de las poblaciones, y que pueden influir en la aparición de anomalías morfológicas en el caparazón.

Aunque el porcentaje de individuos con presencia de malformaciones morfológicas no sea tan alto en *T. graeca* como en otras especies, puede ser un indicador de eficacia biológica ante los procesos de cambio de las poblaciones y su conservación.

No se ha encontrado una relación entre la aparición de anomalías y los factores climáticos. Sin embargo, se ha cumplido nuestra hipótesis inicial en cuanto a la relación entre presencia de malformaciones y la variabilidad genética de la especie (en este caso la heterocigosidad esperada en las poblaciones). Este resultado de aumento de malformaciones al alejarse del origen de la población está relacionado con el proceso de *surfing* genético.

Como conclusión final, es importante resaltar que relacionar los cambios que sufren los hábitats de las especies con el *fitness* de éstas es importante a la hora de desarrollar estrategias para la conservación y gestión de dichas poblaciones.

Como proyecciones futuras, de este trabajo fin de grado se propone:

1. Estudiar las causas de que exista una mayor frecuencia de aparición de malformaciones en las placas marginales, junto al mayor número de malformaciones en la parte derecha del caparazón y su relación con el proceso de desarrollo embrionario, ya que sería interesante como objeto de estudio en futuros trabajos con más poblaciones de tortugas.
2. Explorar la posible relación entre la disminución de la frecuencia de anomalías y los cambios en los usos en la agricultura intensiva (mayor regulación en el uso de plaguicidas) mediante evaluación toxicológica. Relacionar la intensidad de usos agrícolas intensivos y frecuencia de malformaciones.
3. Considerar este indicador de eficacia biológica para evaluar el estado de otras poblaciones de tortuga mora.
4. Por otro lado, también sería conveniente seguir explorando la posible influencia de la precipitación u otras variables meteorológicas en la aparición de anomalías de una forma más exhaustiva, es decir, considerando las condiciones meteorológicas a nivel local, para cada una de las poblaciones.

7. Agradecimientos

Después de tantos meses de trabajo (y aunque parecía que jamás iba a llegar este momento...), ¡se acabó! Pero nunca habría llegado hasta aquí sin las personas que han estado a mi lado ayudándome todo este tiempo...

Mi agradecimiento más especial es para Paco Botella; por haberse fijado en mí, por haberme despertado el interés por la ecología y por meterme el gusanillo de la investigación en el cuerpo. A Roberto por la paciencia con mis espléndidas dotes para la informática, y a Victoria por haberme acompañado durante todo el proceso esforzándose al máximo para que este trabajo saliese adelante.

A mi hermana, a Borja y a Román por ser mi desahogo siempre que lo he necesitado, por el apoyo y la paciencia, por haber estado conmigo desde el principio hasta el final, aguantando mi frustración y desesperación y compartiendo mis alegrías.

En general, a todos los que han estado conmigo durante todo el proceso, ¡gracias!

8. Bibliografía

- Alcaraz, F., Rios, S., Inocencio, C., Robledo, A. (1989). Variation in the riparian landscape of the Segura River Basin, SE Spain. *Journal of Vegetation Science* 8, 597-600.
- Alvarez, Y., Mateo, J. A., Andreu, A. C., Díaz-Paniagua, C. Díez, A., Bautista, J.M. (2000). Mitochondrial DNA Haplotyping of *Testudo graeca* on both continental sides of the Straits of Gibraltar. *Journal of Heredity*, 91: 39-41.
- Álvarez-Romero, J., Medellín, R. A., Oliveras de Ita, A., Gómez de Silva, H., Sánchez, O. (2008). Animales exóticos en México: una amenaza para la biodiversidad.
- Anadón, J. D., Giménez, A., Perez, I., Martinez, M., & Esteve, M. A. (2006). Habitat selection by the spur-thighed tortoise *Testudo graeca* in a multisuccessional landscape: implications for habitat management. *Biodiversity and Conservation*, 15(7), 2287-2299.
- Bárceñas-Ibarra, A., Maldonado, A. (2009). Malformaciones en embriones y neonatos de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) en Nuevo Vallarta, Nayarit, México. *Vet. Méx.* 40(4): 371-380.
- Blaustein, A. R., Johnson, P. T. J. (2003). The complexity of deformed amphibians. *Frontiers in Ecology and Environment*, 1: 87-94.
- Buica, G., Bancila, R. I., Tudor, M., Plăiașu, R., Cogălniceanu, D. (2014). The injuries on tortoise shells as a depository of past human impact, *Italian Journal of Zoology*, 81:2, 287-297.
- Boycott, R., Bourquin, O. (2000). *The Southern African Tortoise Book: A guide to southern African tortoises, terrapins and turtles*. Privately printed, Hilton, South Africa.
- Díaz-Paniagua, C., Keller, C., & Andreu, A. C. (2001). Long-term demographic fluctuations of the spur-thighed tortoise *Testudo graeca* in SW Spain. *Ecography*, 24(6), 707-721
- Excoffier, L., Foll, M., & Petit, R. J. (2009). Genetic consequences of range expansions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40, 481-501.
- Giménez, A., Esteve, M. A., Pérez, I., Anadón, J. D., Martínez, M., Martínez, J., Palazón, J. A. (2004). La tortuga mora en la Región de Murcia. Conservación de una especie amenazada. DM Ed. Murcia.
- González, E. A. (2008). Análisis de la Diversidad Genética en Poblaciones Naturales de Especies Vegetales Amenazadas: *Ilex perado* ssp. *lopezlilloi* (Aquifoliaceae), *Silene nocteolens* (Caryophyllaceae) y *Sorbus aria* (Rosaceae). Resultados Preliminares.

- Graciá, E. (2013). Patrones genéticos y cambios en la distribución de especies: filogeografía de la tortuga mora (*Testudo graeca* L.) en el Mediterráneo Occidental. Tesis doctoral inédita. Universidad Miguel Hernández.
- Graciá, E., Botella, F., Anadón, J. D., Edelaar, P., Harris, D. J., & Giménez, A. (2013). Surfing in tortoises? Empirical signs of genetic structuring owing to range expansion. *Biology letters*, *9*(3), 20121091.
- Graciá, E., Giménez, A., Anadón, J. D., Harris, D. J., Fritz, U., & Botella, F. (2013). The uncertainty of Late Pleistocene range expansions in the western Mediterranean: a case study of the colonization of south-eastern Spain by the spur-thighed tortoise, *Testudo graeca*. *Journal of Biogeography*, *40*(2), 323-334.
- Graciá, E., Botella, F., Rodríguez, R., Anadón, J. D., Fritz, U., Giménez, A. (2015). ¿Autóctona o introducida? Origen de la población de tortuga mora en el sureste ibérica. *Quercus* *347*, 33-40.
- Graciá, E., Vargas-Ramírez, M., Delfino, M., Anadón, J. D., Giménez, A., Fahd, S., Corti, C., Jbeidi, T. B., Fritz, U. (2017). Expansion after expansion: dissecting the phylogeography of the widely distributed spur-thighed tortoise, *Testudo graeca* (Testudines, testudinae). *Biological Journal of the Linnean Society*
- Hallatschek, O., Hersen, P., Ramanathan, S., & Nelson, D. R. (2007). Genetic drift at expanding frontiers promotes gene segregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(50), 19926-19930.
- Hunter Jr, M. L., Gibbs, J. P. (2006). *Fundamentals of conservation biology*. John Wiley & Sons.
- Ibañez, J. M., Lopez, L. F., Mc Ivor, J., Talavera, P. A. (1989). Las tortugas terrestres *Testudo graeca* y *Testudo hermanni* en España. *Revista científica de ANSE*.
- Klopfstein, S., Currat, M., & Excoffier, L. (2005). The fate of mutations surfing on the wave of a range expansion. *Molecular biology and evolution*, *23*(3), 482-490.
- Loehr, V. (2016). Wide variation in carapacial scute patterns in a natural population of speckled tortoises, *Homopus signatus*. *African Journal of Herpetology*, *65*:1, 47-54
- Marco, A. (2003). Impacto de radiación ultravioleta y contaminación en anfibios. *Munibe* *16*, 44-55.
- Martínez-Silvestre, A., Soler, J., Solé, R., Sampere, X. (1997). Polidactilia en *Testudo hermanni* y causas teratogénicas en reptiles. *Bol. Asoc. Herpetol. Esp* *8*, 35-38.

- Moustakas-Verho, J. E., Zimm, R., Cebra-Thomas, J., Lempiainen, N. K., Kallonen, A., Mitchell, K. L., Hamalainen, K., Salazar-Ciudad, I., Jernvall, J., Gilbert, S. (2014). The origin and loss of periodic patterning in the turtle shell. *The Company of Biologists, Development* 141, 3033-3039.
- Peñas de Giles, J., Benito de Pando, B., Martínez-Ortega, M. M. (2006). Efectos de la pérdida y la fragmentación de hábitat sobre la conservación del endemismo *Linaria nigricans* (SE España). *V Simposio Internacional sobre la Flora Silvestre en Zonas Áridas, Ecología y conservación* 889-910.
- Pérez, I., Giménez, A., Anadón, J. D., Martínez, M., & Selma, M. Á. E. (2002). Patrones de actividad estacional y diaria de la tortuga mora (*Testudo graeca* L. 1758 ssp. *graeca*) en el sureste de la Península Ibérica. In *Anales de Biología* (No. 24, pp. 65-75).
- R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rhodin, A., Walde, A., Horne B., Van Dijk, P., Blanck, T., Hudson, R. (2011). Turtles in trouble: the World's 25 most endangered tortoises and freshwater turtles.
- Rivera, A. C., Ayres, C., & Velo-Antón, G. (2008). High prevalence of accessory scutes and anomalies in Iberian populations of *Emys orbicularis*. *Rev. esp. herp*, 22, 5-14.
- Rodríguez-Caro, R. C., Graciá, E., Anadón, J. D., & Gimenez, A. (2013). Maintained effects of fire on individual growth and survival rates in a spur-thighed tortoise population. *European journal of wildlife research*, 59(6), 911-913.
- Rodríguez-Caro, R. C., Graciá, E., Anadón, J. D., Botella, P. & Giménez, A. (2014) A compensatory response in reproduction of the tortoise *Testudo graeca* against habitat disturbances?. XIII Congreso Luso-Español de Herpetología. Aveiro (Portugal).
- Rodríguez-Caro, R., Graciá, E., Dos Santos, R. M., Anadón, J. D., & Gimenez, A. (2015). One scute ring per year in *Testudo graeca*? A novel method to identify ring deposition patterns in tortoises. *Acta Herpetologica*, 10(2), 77-84.
- Rodríguez-Caro, R. C., Lima, M., Anadón, J. D., Graciá, E., & Giménez, A. (2016). Density dependence, climate and fires determine population fluctuations of the spur-thighed tortoise *Testudo graeca*. *Journal of Zoology*, 300(4), 265-273.
- Rodríguez-Caro, R. C., Oedekoven, C. S., Graciá, E., Anadón, J. D., Buckland, S. T., Esteve-Selma, M. A., ... & Giménez, A. (2017). Low tortoise abundances in pine forest plantations in forest-shrubland transition areas. *PloS one*, 12(3), e0173485.

- Sala, O., Stuart, F., Armesto, J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L., Jackson, R., Kinzig, A., Leemans, R., Lodge, D., Mooney, H., Oesterheld, M., Poff, N., Sykes, M., Walker, B., Walker, M., Wall, D. (2000). Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 287, 1770-1774.
- Santos T., Tellería J. L. (2006). Pérdida y fragmentación del hábitat: efecto sobre la conservación de las especies. *Ecosistemas* 2, 3-12
- Sanz-Aguilar, A., Anadón, J. D., Giménez, A., Ballestar, R., Graciá, E., Oro, D. (2011). Coexisting with fire: the case of the terrestrial tortoise *Testudo graeca* in mediterranean shrublands. *Biological Conservation* 144, 1040-1049.
- Velo-Antón, G., Becker, C. G., Cordero-Rivera, A. (2011). Turtle carapace anomalies: the roles of genetic diversity and environment. *Plos One* 6;4.