



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



**DIFERENCIACIÓN GONÁDICA EN CRÍAS DE**  
***Lepidochelys olivacea* (ESCHSCHOLTZ, 1829)**  
**(TESTUDINATA: CHELONIIDAE)**

**Tesis**

Que para obtener el grado de

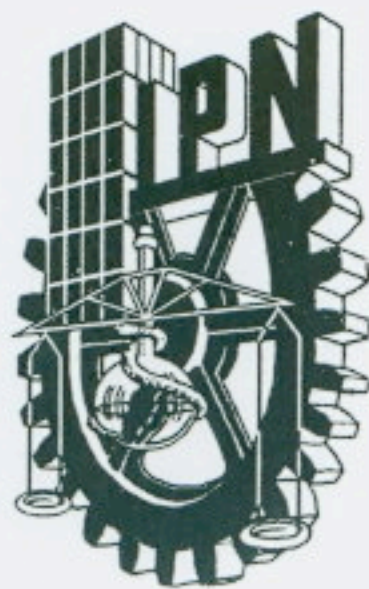
**Doctor en Ciencias Marinas**

Presenta:

**JESSICA YADIRA LÓPEZ CORREA**

**La Paz, B.C.S., Junio de 2010**





**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**  
**ACTA DE REVISIÓN DE TESIS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 14 horas del día 26 del mes de Mayo del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

**“DIFERENCIACIÓN GONÁDICA EN CRÍAS DE *Lepidochelys olivacea***  
**(ESCHSCHOLTZ, 1829) (TESTUDINATA: CHELONIIDAE)”**

Presentada por el alumno:

**LÓPEZ**

Apellido paterno

**CORREA**

materno

**JESSICA YADIRA**

nombre(s)

Con registro:

|   |   |   |   |   |   |   |
|---|---|---|---|---|---|---|
| B | 0 | 6 | 1 | 1 | 5 | 0 |
|---|---|---|---|---|---|---|

Aspirante de:

**DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

**LA COMISION REVISORA**

Directores de Tesis

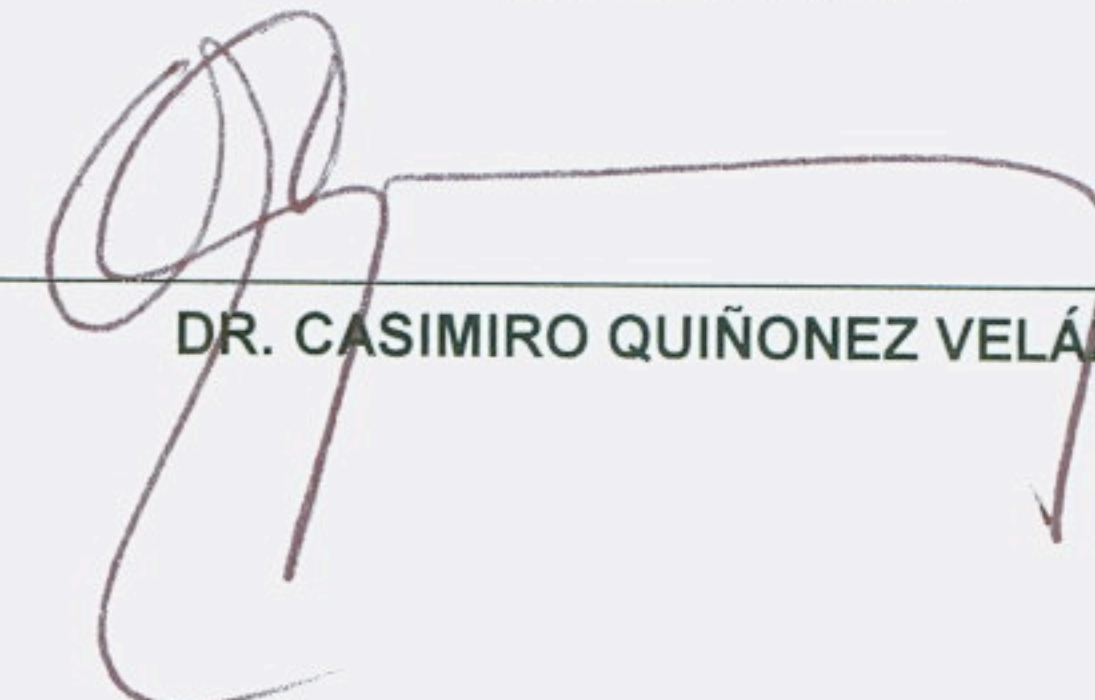
  
DR. VÍCTOR MANUEL GÓMEZ MUÑOZ

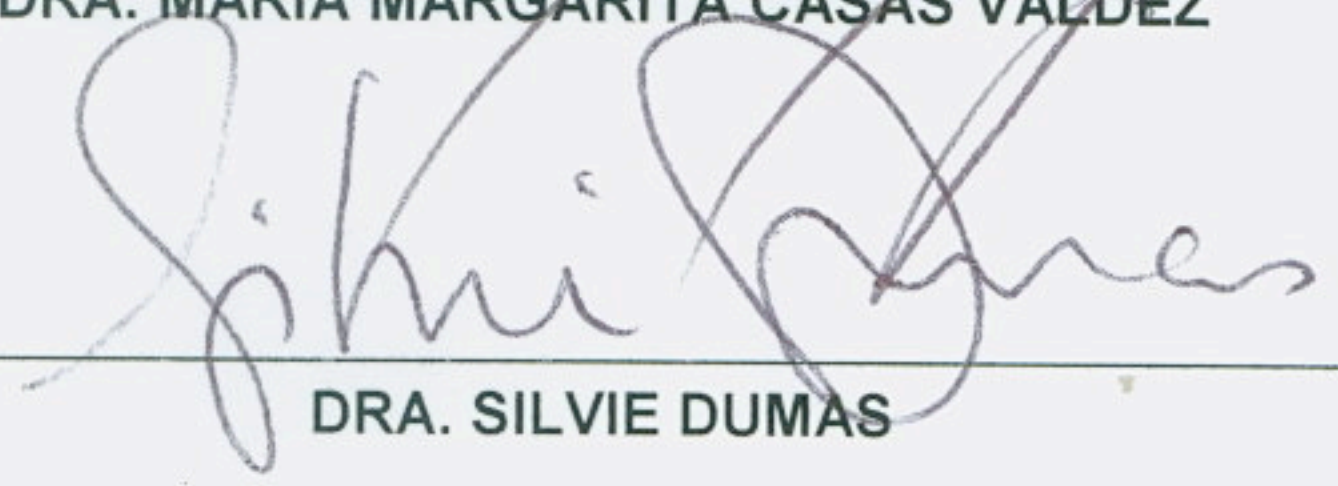
Director de Tesis

  
DR. FEDERICO ANDRÉS GARCÍA DOMÍNGUEZ

Director de Tesis

  
DRA. MARÍA MARGARITA CASAS VALDEZ

  
DR. CASIMIRO QUIÑONEZ VELÁZQUEZ

  
DRA. SILVIE DUMAS

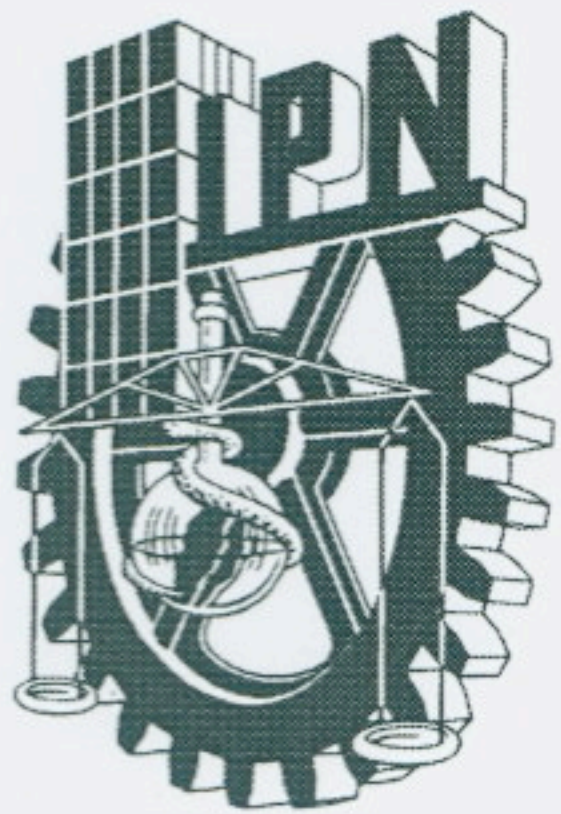
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

  
DR. RAFAEL CERVANTES DUARTE



IPN  
CICIMAR  
DIRECCION





# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 26 del mes Mayo del año 2010

el (la) que suscribe MC. JESSICA YADIRA LÓPEZ CORREA alumno(a) del

Programa de DOCTORADO EN CIENCIAS MARINAS

con número de registro B061150 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

DR. VÍCTOR MANUEL GÓMEZ MUÑOZ y DR. FEDERICO ANDRÉS GARCÍA DOMÍNGUEZ

y cede los derechos del trabajo titulado:

"DIFERENCIACIÓN GONÁDICA EN CRÍAS DE *Lepidochelys olivacea*

(ESCHSCHOLTZ, 1829) (TESTUDINATA: CHELONIIDAE)"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: jeka78@gmail.com - vgomez@ipn.mx - fdoming@ipn.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

MC. JESSICA YADIRA LÓPEZ CORREA

*nombre y firma*



---

## CONTENIDO

|                                                        | Página |
|--------------------------------------------------------|--------|
| RELACIÓN DE FIGURAS                                    | i      |
| RELACIÓN DE TABLAS                                     | iii    |
| GLOSARIO                                               | iv     |
| RESUMEN                                                | vi     |
| ABSTRACT                                               | vii    |
| 1. INTRODUCCIÓN                                        | 1      |
| 1.1 ANTECEDENTES                                       | 8      |
| 1.2. JUSTIFICACIÓN                                     | 14     |
| 1.3. OBJETIVOS                                         | 14     |
| 2. MATERIAL Y MÉTODOS                                  | 15     |
| 2.1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO                  | 15     |
| 2.2. INCUBACIÓN DE HUEVOS                              | 16     |
| 2.3. ECLOSIÓN                                          | 22     |
| 2.4. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA Y ANÁLISIS MORFOMÉTRICO   | 25     |
| 2.5. ANÁLISIS HISTOLÓGICO                              | 26     |
| 2.6. CULTIVO                                           | 27     |
| 2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO                              | 30     |
| 3. RESULTADOS                                          | 31     |
| 3.1. TEMPERATURA DE INCUBACIÓN                         | 31     |
| 3.2. ECLOSIÓN                                          | 40     |
| 3.2.1. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA Y ANÁLISIS MORFOMÉTRICO | 44     |
| 3.2.2. ANÁLISIS HISTOLÓGICO                            | 45     |
| 3.3. CULTIVO                                           | 48     |
| 3.3.1. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA Y ANÁLISIS MORFOMÉTRICO | 50     |
| 3.3.2. ANÁLISIS HISTOLÓGICO                            | 53     |
| 4. DISCUSIÓN                                           | 57     |
| 5. CONCLUSIONES                                        | 65     |

---



---

|                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| 6. LITERATURA CITADA                                                        | 66 |
| Anexo 1. ARTÍCULO PUBLICADO                                                 | 72 |
| Anexo 2. TÉCNICA HISTOLÓGICA                                                | 73 |
| Anexo 3. DISTRIBUCIÓN DEL PESO DE LAS CRÍAS POR GRUPO Y<br>POR MES          | 75 |
| Anexo 4. RELACIONES MORFOMÉTRICAS DE LA GÓNADA POR<br>MES                   | 83 |
| Anexo 5. RELACIONES MORFOMÉTRICAS DE LAS GÓNADAS POR<br>GRUPO DE INCUBACIÓN | 91 |

---



---

## RELACIÓN DE FIGURAS

|                                                                                                                                           | Página |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Figura 1. Características morfológicas que distinguen a la tortuga golfina (Pritchard, 2000)                                              | 4      |
| Figura 2. Ovario de <i>Lepidochelys olivacea</i> fijado dos días después de la eclosión                                                   | 6      |
| Figura 3. Testículo de <i>Lepidochelys olivacea</i> fijado tres días después de la eclosión                                               | 7      |
| Figura 4. Incubadora automática para huevos de <i>Lepidochelys olivacea</i> (López-Correa <i>et al.</i> , 2010)                           | 17     |
| Figura 5. Variaciones de temperatura en el grupo 3 durante la incubación de huevos de <i>Lepidochelys olivacea</i> en el experimento 2007 | 19     |
| Figura 6. Variaciones de temperatura en el grupo 4 durante la incubación de huevos de <i>Lepidochelys olivacea</i> en el experimento 2007 | 20     |
| Figura 7. Variación temporal de los pulsos masculinizantes en los ocho grupos de incubación del experimento 2008                          | 21     |
| Figura 8. Disección de gónadas de crías de <i>Lepidochelys olivacea</i>                                                                   | 25     |
| Figura 9. Gónada de cría de <i>Lepidochelys olivacea</i> donde se indican las variables morfométricas evaluadas                           | 26     |
| Figura 10. Fotografía de cría con marca donde se señala a que grupo pertenece y el número de cría                                         | 27     |
| Figura 11. Tanques de cultivo de crías de <i>Lepidochelys olivacea</i>                                                                    | 28     |
| Figura 12. Temperatura de incubación en el grupo 1 durante el experimento 2007                                                            | 32     |
| Figura 13. Temperatura de incubación en el grupo 2 durante el experimento 2007                                                            | 32     |
| Figura 14. Temperatura de incubación en el grupo 3 durante el experimento 2007                                                            | 33     |
| Figura 15. Temperatura de incubación en el grupo 4 durante el experimento 2007                                                            | 33     |
| Figura 16. Temperatura de incubación en el grupo 9 durante el experimento 2008                                                            | 34     |
| Figura 17. Temperatura de incubación en el grupo 10 durante el experimento 2008                                                           | 35     |
| Figura 18. Temperatura de incubación en el grupo 1 durante el experimento 2008                                                            | 36     |
| Figura 19. Temperatura de incubación en el grupo 2 durante el experimento 2008                                                            | 36     |



|                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 20. Temperatura de incubación en el grupo 3 durante el experimento 2008                                                 | 37 |
| Figura 21. Temperatura de incubación en el grupo 4 durante el experimento 2008                                                 | 37 |
| Figura 22. Temperatura de incubación en el grupo 5 durante el experimento 2008                                                 | 38 |
| Figura 23. Temperatura de incubación en el grupo 6 durante el experimento 2008                                                 | 38 |
| Figura 24. Temperatura de incubación en el grupo 7 durante el experimento 2008                                                 | 39 |
| Figura 25. Temperatura de incubación en el grupo 8 durante el experimento 2008                                                 | 39 |
| Figura 26. Porcentaje de eclosión, sobrevivencia, mortalidad y huevos sin desarrollo de los cuatro grupos del experimento 2007 | 40 |
| Figura 27. Embriones de <i>Lepidochelys olivacea</i> en la etapa 1 de desarrollo                                               | 42 |
| Figura 28. Embriones de <i>Lepidochelys olivacea</i> en la etapa 2 de desarrollo                                               | 42 |
| Figura 29. Embriones de <i>Lepidochelys olivacea</i> en la etapa 3 de desarrollo                                               | 42 |
| Figura 30. Porcentaje de eclosión, sobrevivencia, mortalidad y huevos sin desarrollo de los diez grupos del experimento 2008   | 43 |
| Figura 31. Gónadas de crías de <i>Lepidochelys olivacea</i> al momento de nacer                                                | 45 |
| Figura 32. Microfotografías de gónadas de <i>Lepidochelys olivacea</i>                                                         | 46 |
| Figura 33. Microfotografías de gónadas indiferenciadas de <i>Lepidochelys olivacea</i>                                         | 47 |
| Figura 34. Porcentaje de crías muertas en cada grupo durante seis meses de cultivo en el experimento 2008                      | 49 |
| Figura 35. Crías de <i>Lepidochelys olivacea</i> muertas por mordeduras durante el cultivo del experimento 2008                | 49 |
| Figura 36. Gónadas de crías de <i>Lepidochelys olivacea</i> durante los seis meses de cultivo                                  | 51 |
| Figura 37. Microfotografías de gónadas de <i>Lepidochelys olivacea</i> durante seis meses de cultivo en el experimento 2007    | 55 |



---

## RELACIÓN DE TABLAS

|                                                                                                                               | Página |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Tabla 1. Clasificación de la tortuga golfina, <i>Lepidochelys olivacea</i>                                                    | 3      |
| Tabla 2. Formación de grupos de los tres nidos recolectados en la temporada 2008                                              | 16     |
| Tabla 3. Grupos utilizados como testigos para inducir la formación de hembras y machos                                        | 18     |
| Tabla 4. Número de crías que se tomaron al momento de nacer en cada grupo y en cada experimento                               | 24     |
| Tabla 5. Número de crías de <i>Lepidochelys olivacea</i> sacrificadas durante el cultivo                                      | 29     |
| Tabla 6. Temperatura de incubación en cada grupo durante el experimento 2008                                                  | 35     |
| Tabla 7. Número de embriones encontrados en cada etapa de desarrollo en el experimento 2007                                   | 41     |
| Tabla 8. Número de embriones encontrados en cada etapa de desarrollo en el experimento 2008                                   | 44     |
| Tabla 9. Tamaño promedio de gónadas de <i>Lepidochelys olivacea</i> al momento de nacer                                       | 45     |
| Tabla 10. Sexo obtenido después del análisis histológico de las crías al momento de nacer en cada experimento y en cada grupo | 48     |
| Tabla 11. Medidas morfométricas de las gónadas en crías durante seis meses de cultivo en el experimento 2007                  | 52     |
| Tabla 12. Sexo obtenido después del análisis histológico para cada mes y cada grupo en el experimento 2007                    | 54     |
| Tabla 13. Sexo obtenido después del análisis histológico para cada mes y cada grupo en el experimento 2008                    | 54     |

---

## **GLOSARIO**

### **CAPARAZÓN O CAPARACHO**

PLACA ÚNICA QUE RECUBRE EL CUERPO DE LAS TORTUGAS. ESTÁ CONSTITUÍDO POR PLACAS DE HUESO DE ORIGEN DÉRMICO QUE LE DAN DUREZA Y RIGIDEZ, CUBIERTAS DE ESCAMAS DE ORIGEN EPIDÉRMICO. LA PARTE DORSAL SE DENOMINA CAPARACHO O CAPARAZÓN Y LA PARTE VENTRAL PLASTRON O PETO.

### **CARÚNCULA**

PEQUEÑA PUNTA Córnea DE ORIGEN EPIDÉRMICO QUE SIRVE PARA ROMPER LA CÁSCARA DEL HUEVO. ESTA PRESENTE EN TORTUGAS, COCODRILOS Y AVES.

### **RADIOINMUNOANÁLISIS**

TÉCNICA UTILIZADA PARA DETERMINAR LOS NIVELES ESPECÍFICOS DE CIERTAS HORMONAS EN LA CIRCULACIÓN Y PUEDE PROVEER DATOS PRECISOS DEL ESTADO REPRODUCTIVO O CONDUCTA DEL INDIVIDUO.

### **TEMPERATURA FEMINIZANTE**

TEMPERATURA DE INCUBACIÓN BAJO LA CUAL EN UNA ESPECIE EN PARTICULAR SE PRODUCE UN MAYOR PORCENTAJE DE CRÍAS HEMBRAS.

### **TEMPERATURA MASCULINIZANTE**

TEMPERATURA DE INCUBACIÓN BAJO LA CUAL EN UNA ESPECIE EN PARTICULAR SE PRODUCE UN MAYOR PORCENTAJE DE CRÍAS MACHOS.

### **TEMPERATURA UMBRAL O PIVOTE**

TEMPERATURA DE INCUBACIÓN BAJO LA CUAL SE PRODUCE EL 50% DE HEMBRAS Y EL 50% DE MACHOS.

### **PERIODO DE INCUBACIÓN**

PERIODO QUE COMPRENDE DESDE EL MOMENTO EN QUE SE COLOCAN LOS HUEVOS EN EL NIDO HASTA QUE ECLOSIONAN LAS CRÍAS.

### **ECLOSIÓN**

ACCIÓN DE UNA CRÍAS AL ROMPER EL CASCARÓN. EN LOS NIDOS NATURALES, SE DETERMINA POR EL NÚMERO DE CASCARONES VACÍOS DENTRO DEL NIDO.

### **SUPERVIVENCIA**

PARÁMETRO DEFINIDO COMO LA PROBABILIDAD DE VIVIR DESDE EL NACIMIENTO HASTA LA EDAD X.

### **MORTALIDAD**

MUERTE PRODUCIDA EN UNA POBLACIÓN DURANTE UN TIEMPO DADO.

### **ANTÍGENO**

SUBSTANCIA EXTRAÑA, GENERALMENTE PROTEÍNA O COMPLEJO POLISACÁRIDO PROTEÍNICO, QUE SUSCITA LA FORMACIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS EN UN ORGANISMO.



---

## **ANTICUERPO**

PROTEÍNA PRODUCIDA COMO RESPUESTA A LA PRESENCIA DE UNA SUSTANCIA EXTRAÑA EN LA SANGRE O EN LOS TEJIDOS

## **INTERSEXO**

ORGANISMO CUYAS GÓNADAS AL OBSERVARSE BAJO EL MICROSCOPIO DESPUES DE APLICAR LA TÉCNICA HISTOLÓGICA, SE PRESENTAN REGIONES ALTERNADAS CON LA CORTEZA BIEN DESARROLLADA Y CORDONES MEDULARES. LOS CORDONES MEDULARES SON CONSERVADOS EN ALGUNAS REGIONES, COMO EN LOS TESTÍCULOS, Y EL EPITELIO SUPERFICIAL APARECE EXTENDIDO, EN OTRAS REGIONES COMO EN LOS OVARIOS.

## **GÓNADA INDIFERENCIADA**

LA GÓNADA PERMANECE INDIFERENCIADA PORQUE NO EXISTE UN CLARO DESARROLLO HACIA CUALQUIERA DE LOS SEXOS. POR MEDIO DE LA HISTOLOGÍA SE OBSERVA QUE TANTO LOS CORDONES MEDULARES Y EL EPITELIO SUPERFICIAL PERMANECEN POBREMENTE DESARROLLADOS.

## **TEJIDO ESTROMÁTICO**

TEJIDO EN EL CUAL ESTÁN INCLUIDAS LAS UNIDADES SECRETORIAS Y LOS CONDUCTOS. ESTE TEJIDO BRINDA SOSTÉN MEDIANTE LAS SUSTANCIAS INTRACELULARES Y LLEVA VASOS SANGUÍNEOS Y FIBRAS NERVIOSAS A UNA GLÁNDULA U ÓRGANO.

## **CORPORA LUTEA O CORPORA ALBICANTIA**

CICATRIZ PEQUEÑA Y BLANCA FORMADA CUANDO NO HAY FECUNDACIÓN Y EL CUERPO LÚTEO COMIENZA A INCOLUCIONAR, LOS CAPILARES COLAPSAN Y LAS CÉLULAS LUTEÍNICAS SE DESINTEGRAN.

---

## RESUMEN

En las tortugas marinas la temperatura de incubación en etapas embrionarias determina el sexo. En la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*, temperaturas mayores de 32°C producen hembras, mientras que los machos se desarrollan a temperaturas menores de 28°C. En este trabajo se propuso delimitar el periodo sensible a la temperatura para la determinación del sexo y conocer el momento en que se observan características morfológicas que permitan distinguir una gónada femenina de una masculina durante los seis meses posteclosión. Para conocer el periodo sensible a la temperatura, se realizaron experimentos de doble cambio de temperatura durante el segundo tercio del periodo termosensitivo. Estos cambios fueron de temperatura feminizante-masculinizante-feminizante y viceversa. Se cultivaron durante seis meses las crías que se obtuvieron y se observaron los cambios morfológicos de las gónadas utilizando técnicas histológicas.

Se encontró que el periodo sensible a la temperatura de ambos sexos, se ubica entre los días de incubación 17-27. Durante un cultivo de seis meses se observó que hasta el quinto mes todavía se encuentran organismos indiferenciados por lo que la influencia que tiene la temperatura sobre la determinación del sexo no es definitiva. La morfometría de la gónada desde la posteclosión hasta los primeros seis meses de vida no permitió la separación de sexos.



---

## ABSTRACT

The temperature of the sand during incubation of sea turtles determines hatchling sex and influences embryonic survival and duration of incubation (temperature-dependent sex determination). For *Lepidochelys olivacea*, temperatures below 28 C result in males and above 32 C in females, while temperatures between 28 and 32°C result in hatchlings of both sexes. In order to know the thermal sensitive period, several experiments were done changing the female and male levels of temperature at different times within the second third of the incubation period. The hatchlings were cultivated during six months to observe monthly morphologic changes of the gonads. The sensitive period was located between to days 17 and 27. Gonads of males and females were differentiated after hatching until the fifth month of culture for what the influence that has the temperature on the determination of the sex is not definitive. The morfometría of the gonad hatching until the first six months of life did not separate sexes.

## 1. INTRODUCCIÓN

En los organismos que se reproducen sexualmente, la proporción sexual es un factor importante para la determinación del crecimiento poblacional. En la mayoría de las especies gonocóricas, machos y hembras son producidos en números aproximadamente iguales, independientemente del mecanismo de determinación sexual, para lograr proporciones sexuales balanceadas (Seger & Stubblefield, 2002). Se han observado proporciones sexuales notables en himenópteros (hormigas, abejas y avispas) (West *et al.*, 2002) y en especies sujetas a la determinación sexual por el ambiente (ESD), es decir determinación sexual dependiente de la temperatura (DST), entre ellas muchos reptiles, incluyendo las tortugas marinas (Delgado *et al.*, 2010). En tortugas marinas inmaduras, usando la morfología externa no es posible la identificación del sexo para conocer proporciones sexuales de una población debido a que el dimorfismo sexual se hace aparente sólo en la etapa adulta (Wibbels, 2003).

Aunque la etapa de vida pelágica de las tortugas marinas, implica la mayor parte de su ciclo de vida, poco es conocido acerca de esta fase. Este vacío de conocimiento es principalmente resultado de la dificultad logística de seguir la etapa pelágica juvenil de cualquier especie de tortuga marina, ya que los individuos abandonan las playas de anidamiento cuando son crías y se desarrollan en el mar abierto durante muchos años antes de trasladarse a las zonas de alimentación costeras como subadultos (Bolten, 2003). Por lo tanto, el papel y la importancia de las tortugas dentro del ambiente oceánico están lejos de ser comprendidos, y los números exactos, movimientos y comportamiento de los juveniles pelágicos están pobremente documentados (Delgado *et al.*, 2010).

Para propósitos de conservación y manejo, conocer parámetros demográficos tales como tasas de crecimiento, sobrevivencia, reclutamiento, edad de primera reproducción, porcentaje de animales reproductivamente activos cada año, edad y duración de la historia de vida reproductiva y la proporción sexual de cada población es esencial para el desarrollo de modelos de población (Owens, 1997) y es especialmente importante para las tortugas marinas dado que todas las especies están clasificadas como especies amenazadas (Casale *et al.*, 2006).



## Aspectos generales de la tortuga *Lepidochelys olivacea*

### Distribución

La tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) se distribuye en el Océano Pacífico Oriental desde el norte de California y el Golfo de California hasta Chile con áreas de concentración en México (Baja California, sur de Sinaloa, Michoacán, Guerrero y Oaxaca), Centroamérica, y más al Sur, hasta la zona entre Panamá y Colombia (Márquez-Millán, 1996). También se ha visto que en el oeste del Océano Índico anida a lo largo de la costa este de África, en Omán (Frazier, 1975), Pakistan (Asrar, 1999), Gujarat (India) así como en las costas este de la India, Sri Lanka, Bangladesh (Kar & Bhaskar, 1982) y otros países del sureste de Asia (Limpus, 1995). En India, unos pocos miles de ejemplares de *L. olivacea* anidan en Tamil Nadu, Islas Andaman y Nicobar (Andrews *et al.*, 2001).

### Alimentación

Se puede decir que esta especie es de alimentación omnívora con tendencia a carnívora ya que Montenegro *et al.* (1984) por medio del análisis de volumen y frecuencia, encontraron que *L. olivacea* en la playa “La Escobilla” en Oaxaca, tiene una dieta que incluye las salpas con un valor porcentual de 45.10 %, siguiendo los peces con valor de 41.68 %, a este grupo le proceden los moluscos (5.16%), crustáceos (3.53 %), algas (2.21 %), briozoarios (0.21 %), sipuncúlidos (0.04%), ascidias (0.037%) y huevos de peces (0.017%). El porcentaje volumétrico que presentó la materia vegetal, en este caso algas, fue del 2.21 %.

## Clasificación taxonómica

En la Tabla 1 se describe la clasificación taxonómica de la tortuga golfina (Bellairs & Attridge, 1975).

Tabla 1. Clasificación de la tortuga golfina.

|            |                     |
|------------|---------------------|
| Phylum     | Chordata            |
| Subphylum  | Vertebrata          |
| SuperClase | Tetrapoda           |
| Clase      | Reptilia            |
| SubClase   | Anaspide            |
| Orden      | Testudinata         |
| Suborden   | Cryptodira          |
| Familia    | Cheloniidae         |
| Género     | <i>Lepidochelys</i> |
| Especie    | <i>L. olivacea</i>  |

## Características morfológicas

Esta especie se caracteriza por tener una cabeza relativamente grande, ligeramente triangular; de 10 a 13 cm de ancho y con dos pares de escamas prefrontales y un pico córneo no aserrado con reborde alveolar (Pritchard, 2000). El caparazón es casi circular con una anchura cercana al 90% de su longitud. Generalmente el carapacho tiene más de 15 escudos mayores, cinco dorsales y frecuentemente más de cinco pares laterales, aunque también puede presentar desigualdad en el número de escudos de ambos lados; el par lateral anterior está en contacto con el escudo precentral. El plastrón tiene cuatro escudos inframarginales (Fig. 1) y cada uno presenta un poro. En el borde anterior de cada aleta hay una o dos uñas.

La longitud recta promedio del caparazón es de 67.6 cm, aunque algunos organismos pueden llegar a medir hasta 78 cm. El peso promedio es de 38 k. La coloración del carapacho de los adultos es gris oliváceo o amarillento, mientras que el vientre es de color crema a gris verdoso con manchas oscuras en los extremos de las aletas (Márquez-Millán, 1996).

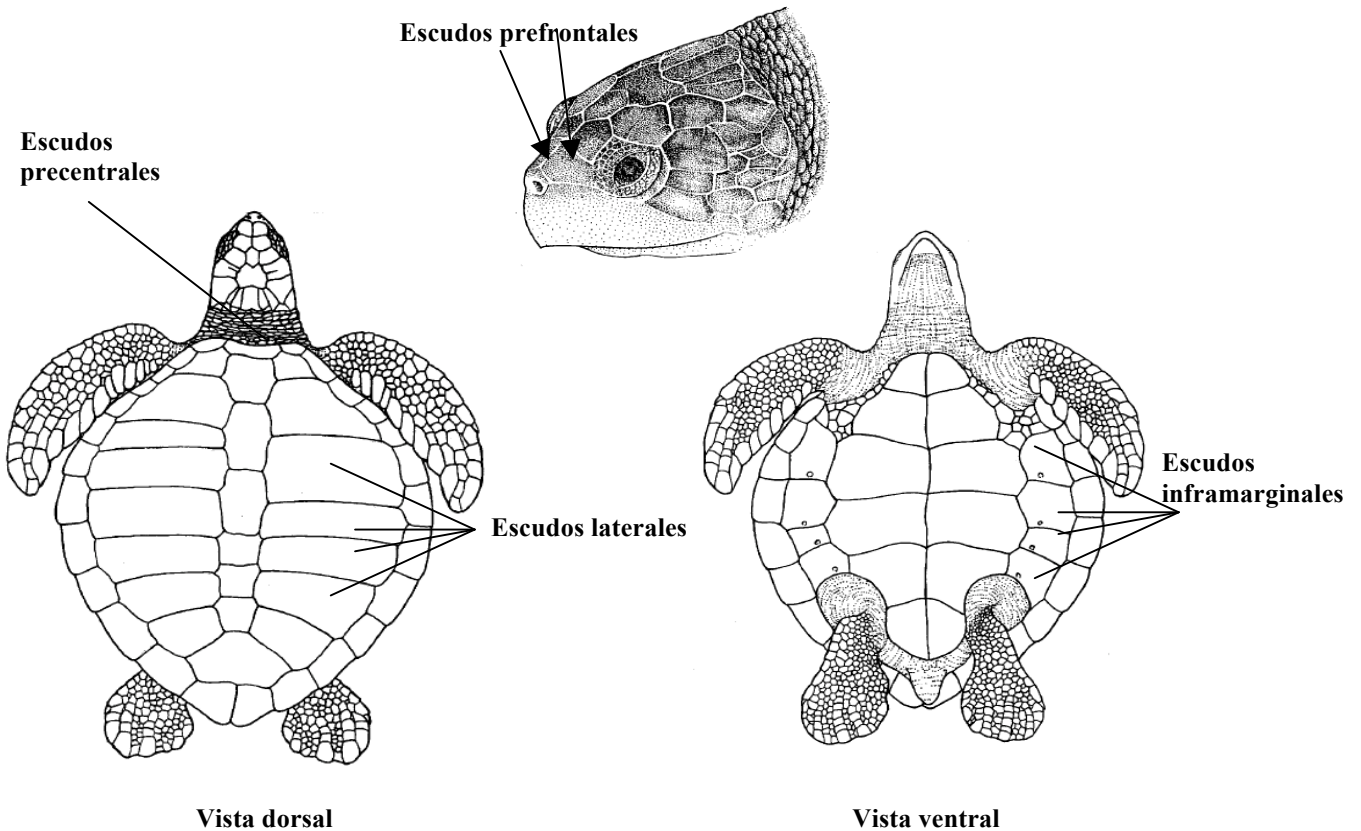


Figura 1. Características morfológicas que distinguen a la tortuga golfinia (Pritchard, 2000).

### Importancia

La tortuga golfinia *L. olivacea* es considerada la especie de tortuga marina más abundante del mundo. Pritchard (1997) atribuyó esto a la existencia de algunas playas donde tienen lugar numerosas anidaciones en grupo: dos en la costa del Pacífico de Costa Rica, una en el Pacífico mexicano y dos o tres en el noreste de la India, a las que se suman algunos sitios de importancia menor en Nicaragua y algunas otras costas continentales tropicales. En México, la tortuga golfinia se distribuye a lo largo de la costa del Pacífico (Márquez-Millán *et al.*, 1982), teniendo en la actualidad sus principales áreas de concentración de anidaciones en el estado de Oaxaca. Históricamente, en México existieron, además de las de este estado, numerosas playas donde ocurrían arribazones de importancia, principalmente en Jalisco, Colima, Michoacán y Guerrero. Sin embargo, por diversos motivos las poblaciones declinaron



severamente hasta imposibilitar la ocurrencia de arribazones en la mayoría de estas playas. La importancia económica de la tortuga golfina se atribuyó a la existencia de grandes concentraciones de individuos frente a las playas de anidación, lo que representaba mínimos esfuerzos de captura, y el valor comercial de su carne, huevos y piel, alcanzó niveles altos para dar soporte a un importante mercado (Anónimo, 2006).

### **Aspectos reproductivos**

La temporada de reproducción en la mayor parte del Pacífico mexicano se presenta de julio a enero. Sin embargo, en la playa “La Escobilla” en el estado de Oaxaca, las tortugas anidan durante todo el año, aunque las arribazones son frecuentes entre marzo y mayo y entre agosto y septiembre cuando son más abundantes (Peñaflares-Salazar *et al.*, 1998). Esta especie es de hábitos de desove nocturnos, pero en ocasiones también anida durante el día, principalmente durante los arribazones más grandes. El número de huevos por nidada varía de un par de docenas hasta más de 155, con una media alrededor de 109, aunque hay variación significativa entre localidades. Los huevos son de color blanco y de forma esférica con diámetro de 3.2 a 4.7 cm (Márquez-Millán, 1991). Los huevos se incuban en la arena por 45 días; cumplido este período, las crías emergen a la superficie, normalmente durante la noche y se dirigen al mar. Las crías son de color gris oscuro a negro y tienen una longitud promedio de 5 cm. Los hábitos de los neonatos y los juveniles son poco conocidos porque es difícil observarlos durante esas etapas, aunque en algunas ocasiones son detectados en las zonas de alimentación.

Esta especie alcanza la madurez a tallas pequeñas y exhibe tasas de maduración y crecimiento más rápidas que otras tortugas marinas. La reproducción ocurre comúnmente en ciclos anuales (Márquez-Millán, 1996).

### **Descripción del aparato reproductor**

El aparato reproductor masculino en las tortugas marinas está compuesto por un par de testículos que funcionan simultáneamente y ductos asociados (epidídimo y conductos deferentes). El tejido uretral es el sitio de acumulación y almacenamiento de espermatozoides antes de la eyaculación. El pene es un órgano intromitente y tiene un gancho en la punta, adyacente al conducto espermático, el cual presumiblemente ayuda en la intromisión y transferencia de esperma (Hamann *et al.*, 2003).

Las hembras de tortugas marinas tienen un par de órganos reproductivos localizados en el abdomen. Durante la pubertad hay cambios hormonales que incrementan el tamaño y estructura del ovario y oviducto. En comparación con hembras inmaduras, las hembras maduras tienen típicamente un ovario con un estroma expandido y un oviducto de al menos 1.5 cm de diámetro (adyacente al ovario) suspendido en la cavidad del cuerpo. Algunas características de una hembra adulta pueden incluir: 1) folículos vitelogénicos vascularizados de más de 0.3 cm de diámetro; 2) presencia de cicatrices ováricas (*corpora lutea* ó *corpora albicantia*); 3) presencia de folículos atrésicos; 4) presencia de huevos en el oviducto. Cada característica es indicadora de una etapa particular del ciclo reproductivo (Hamann *et al.*, 2003).

### Crías de tortugas marinas

Al emerger las crías, las gónadas aparecen como una estructura blanquecina alargada sobre la superficie ventral del riñón, la cual no puede ser distinguida a simple vista como un ovario o un testículo (Miller & Limpus, 2003). Histológicamente, los ovarios de crías de *L. olivacea* se distinguen por un engrosamiento conspicuo del epitelio superficial. Este aparece como un epitelio columnar, con una o más células de espesor. Contiene una membrana basal gruesa que separa el epitelio superficial de la región medular de la gónada. Los cordones medulares son vestigiales y aparecen como pequeños grupos de células epiteliales rodeadas de una membrana basal. El tejido estromático, es abundante en la región medular (Fig. 2) (Merchant-Larios, 2000).

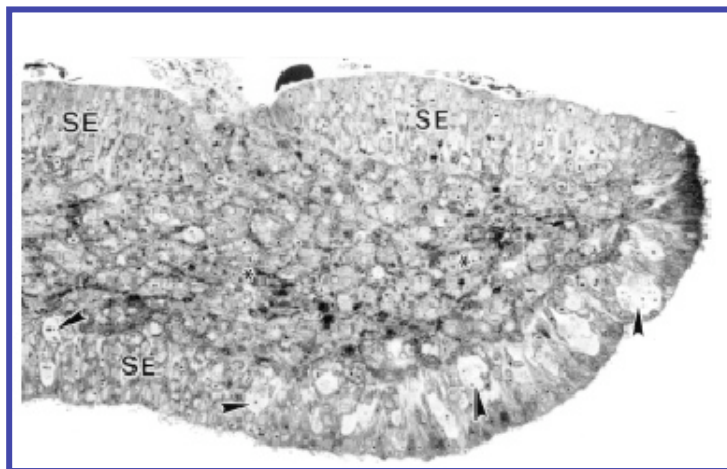


Figura 2. Ovario de *Lepidochelys olivacea* fijado dos días después de la eclosión. El epitelio superficial (SE), formado por un epitelio cilíndrico pseudoestratificado. Contiene numerosas células germinales (cabezas de flecha). 200X. (Tomado de Merchant-Larios, 2000).

Por otro lado, en los machos de crías de *L. olivacea*, el testículo presenta un epitelio superficial plano, monoestratificado que frecuentemente contiene varias células germinales. Los cordones medulares aparecen separados del epitelio superficial aunque algunos permanecen adjuntos a él. Los cordones medulares, rodeados por una membrana basal, se forman por un tipo de células epiteliales con abundantes gotas de lípidos. Las células germinales son escasas y no hay lumen en los cordones medulares que pueda justificar el nombre de túbulos seminíferos. Entre estas formaciones y bordeando el epitelio superficial está una membrana basal y abundante tejido estromático, formado en gran parte por matriz extracelular, células fibroblásticas y vasos sanguíneos (Fig. 3) (Merchant-Larios, 2000).

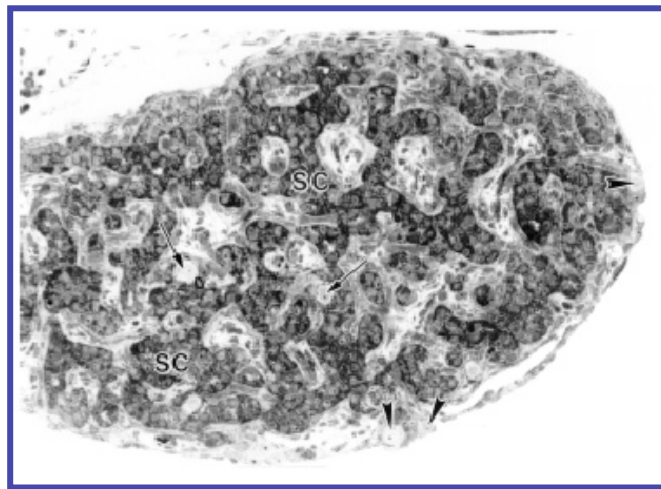


Figura 3. Testículo de *Lepidochelys olivacea* fijado tres días después de la eclosión. Se pueden apreciar claramente los cordones seminíferos (SC) formados por células epiteliales con citoplasma denso debido a numerosos gránulos de lípidos. Algunas células germinales están situadas en los cordones (flechas) y otras en el epitelio superficial (cabezas de flecha). 200X. (Tomado de Merchant-Larios, 2000).



## 1.1. ANTECEDENTES

En diversos estudios se han abordado niveles térmicos y periodos sensibles para la diferenciación sexual de reptiles, particularmente en tortugas dulceacuícolas y marinas. En este sentido, Standora & Spotila (1985) señalan que anteriormente se asumía que en todos los vertebrados la determinación del sexo era genética, y que en la mayoría de las especies el control genético del sexo era manifestado por la presencia de cromosomas sexuales morfológicamente diferentes, los que son característicos de mamíferos y aves, menos comunes en reptiles y poco comunes en anfibios y peces (Bull & Vogot, 1981). Sin embargo, el control genético al parecer puede presentarse en especies como la tortuga dulceacuícola de caparazón blando, *Trionix spiniferus* que carece de cromosomas sexuales evidentes (Bull & Vogot, 1981). En algunos reptiles en los que no se manifiesta heterogeneidad de cromosomas sexuales, se ha demostrado que la temperatura es un determinante ambiental de la determinación sexual (Bull & Vogot, 1981). Consecuentemente en los reptiles existen dos tipos de determinación sexual, la genotípica y la ambiental, esta última dependiente de la temperatura, aunque se sugiere también que la humedad influye en la determinación del sexo (Vogot & Flores, 1986), pero esto último no está esclarecido satisfactoriamente.

La historia evolutiva y las bases moleculares de los mecanismos responsables en los mencionados tipos de diferenciación sexual en reptiles son inciertas, pero se sugiere que tres procesos pueden estar involucrados (Standora & Spotila, 1985):

- 1) El antígeno HY puede ser el factor organizador de la gónada heterogamética.
- 2) La reversión sexual puede ocurrir en genotipos masculinos o femeninos.
- 3) La secuencia específica del DNA, tal como los componentes establecidos en las serpientes puede ser alterada en su expresión o comportamiento como un elemento controlado o móvil.

Tales autores mencionan también que el antígeno HY se ha conservado en la evolución de vertebrados y generalmente está confinado a los machos en especies con un mecanismo XX/XY de determinación sexual como en los mamíferos, algunos anfibios y varios peces; en especies con un mecanismo XX/XW las hembras son las heterogaméticas y el antígeno HY es confinado a las hembras de aves, reptiles y algunos anfibios.

Standora & Spotila (1985), han encontrado el HY positivo en las hembras en 13 de 14 especies de tortugas, por lo que concluyen que en la mayoría de las especies de tortugas un mecanismo ZZ/ZW de determinación sexual puede estar presente.

Por otro lado, debido a que en las crías de tortugas marinas no se presentan características sexuales secundarias, no es posible diferenciar visualmente cuales son hembras y cuales son machos (Miller & Limpus, 1981), por lo que se han desarrollado algunas técnicas de sexado que permiten evidenciar gónadas masculinas, femeninas y gónadas con características tanto de uno, como de otro sexo; sin embargo en tales técnicas es necesario el sacrificio de los organismos.

En las tortugas marinas la determinación del sexo por la temperatura ha sido encontrada en *Caretta caretta*, *Chelonia mydas*, *Dermochelys coriacea*, *Lepidochelys olivacea*, *L. kempii* y *Eretmochelys imbricata*; a temperaturas entre 22 y 27°C se producen machos y a temperaturas de 30°C o más se producen hembras. Cabe mencionar que existen temperaturas en las cuales no se ejerce ningún efecto sobre la proporción de sexos, conocidas como temperaturas umbrales (Mrosovsky & Pieau, 1991) o pivotes (Yntema & Mrosovsky, 1982). En *L. olivacea* McCoy *et al.* (1983) encontraron una proporción del 50% de hembras y 50% de machos a 30°C bajo condiciones de laboratorio.

Diferentes estudios indican que la temperatura de incubación afecta la determinación sexual solo durante una etapa crítica del desarrollo embrionario (Darlymple *et al.*, 1985; Bull, 1987), dicho periodo es conocido como periodo sensible o crítico para la determinación del sexo (Bull & Vogot, 1981; Yntema & Mrosovsky, 1982), sugiriéndose que este periodo se encuentra en el segundo tercio del desarrollo en tortugas marinas (Bull, 1987). En *C. caretta* se ha localizado con exactitud el periodo sensible a la temperatura para la determinación del sexo, el cual se encuentra entre los días 10 y 40 de incubación, correspondiendo a los estadios 12 y 22 del desarrollo según los estadios que Yntema (1968) establece para una tortuga dulceacuícola (Yntema & Mrosovsky, 1982). Para *L. olivacea*, Elizalde-Aguilar (1988) menciona que bajo condiciones de laboratorio, el periodo sensible a la temperatura para la determinación del sexo ocurre entre los días 18 y 25 de incubación.

Se ha afirmado que la determinación sexual por temperatura (DST) es un proceso de todo o nada y que los intersexos raramente se forman. Algunos casos de intersexualidad han sido reportados

en crías, juveniles y adultos de tortugas que presentan DST. En la tortuga de agua dulce, *Emys orbicularis* la intersexualidad gonadal ha sido observada en embriones de estadio tardíos y en crías, en condiciones naturales y artificiales de incubación para los huevos. La temperatura de incubación en nidos naturales no es constante sino que fluctúa durante el día y la noche y con los cambios climáticos. Cuando las fluctuaciones en la temperatura están por arriba y por debajo de la temperatura pivote, durante el periodo termosensitivo, a menudo se producen intersexos exactamente como en la incubación artificial (Girondot *et al.*, 1997).

Además de la temperatura se considera que algunos factores ambientales influyen en el desarrollo embrionario de los nidos por lo que al formar la cámara de incubación, ésta debe mantener condiciones adecuadas de humedad e intercambio de oxígeno entre el medio ambiente y los huevos, mismos que al mantenerse en valores óptimos favorecen este desarrollo (Márquez-Millán, 1994).

La temperatura y humedad de la arena son factores que influyen directamente en el número de crías que emergen de los nidos, por lo que es importante conocer cómo fluctúan estas variables físicas. Garduño & Cervantes (1996) evaluaron el efecto de la temperatura y humedad en el avivamiento de nidos de tortuga Carey (*Eretmochelys imbricata*) con dos técnicas de incubación: en corrales de incubación y en nidos *in situ*. Con estas dos formas de incubación encontraron que existía una diferencia evidente en el avivamiento, siendo del 84.1% para los nidos *in situ* y de 63.7% para los nidos en corral. Para la mayoría de los nidos las temperaturas oscilaron en promedio alrededor de 30.5°C, en los nidos del corral y de 30.4°C, en los nidos naturales, con máximas y mínimas de 33.8 a 26.7°C y 33.9 a 26.9°C, respectivamente. En relación a los porcentajes de humedad, determinaron un promedio del 7.49% para los nidos en corral y un 7.65% para los nidos naturales con valores máximos y mínimos del 18.36% a 0.29% para los nidos en corral y del 13.9% a 3.02% para los nidos *in situ*. El análisis realizado a ambos grupos no presentó diferencia significativa en la influencia de la temperatura y la humedad en el avivamiento de los nidos de corral y naturales, la diferencia en el porcentaje según los autores fue atribuible a la manipulación de los nidos.

La humedad de la arena ha sido identificada como un factor determinante para la anidación en las tortugas marinas. Márquez-Millán (1994) describe que al menos para el género *Lepidochelys* al emerger del mar las hembras encajan el pico y de una manera instintiva determinan cual es el “lugar

ideal” para la construcción del nido, en muchas ocasiones cuando la arena no contiene la humedad necesaria el nido se derrumba, fracasando el intento de anidación. La hembra reintenta buscando un nuevo sitio. McGehee (1979) realizó un estudio con nidos de tortuga caguama (*Caretta caretta*), determinó que de cinco diferentes condiciones de humedad, los nidos que mantuvieron los más altos porcentajes de avivamiento fueron los que se incubaron con un 25% de humedad, mientras que los nidos con porcentajes de 0, 50, 75 y 100% de humedad, mantuvieron avivamientos significativamente más bajos. Generalmente los huevos de las capas superiores de los nidos presentan una desecación por falta de humedad debido a que están más expuestas al medio ambiente de la atmósfera y pierden más humedad por la evaporación (McGehee, 1979).

Carrasco-Águila (2000) estudió el efecto de dos métodos de incubación de huevos en nidos en corral (con sombra y sin sombra) en *L. kempii*, y la proporción del sexo en las crías. Mediante técnicas histológicas encontró que en los nidos con sombra la proporción de machos fue del 50%, de hembras del 32.1%, de intersexos del 3.6% y de no determinados del 14.3% al momento de la eclosión; mientras que los nidos sin sombra presentaron un 93.4% de hembras y un 6.6% de no determinados. Con esto se observa que los huevos que se están incubando a más bajas temperaturas (con sombra), alrededor del 18% no se les puede tomar en cuenta para una proporción sexual, mientras el sexo no se identifique en su totalidad. Los individuos que se clasifican como “no determinados” son aquellos en los que las gónadas aún no se encontraban plenamente desarrolladas y era imposible reconocer estructuras que permitieran la separación del sexo.

### **Identificación del sexo**

Se presentan muchas dificultades asociadas a la estimación de la proporción de sexos en las poblaciones de tortugas. En contraste a los adultos, identificar el sexo en tortugas juveniles y crías representa un significativo obstáculo logístico. Se ha propuesto y desarrollado una variedad de métodos no letales para determinar el sexo en las tortugas juveniles. El método más definitivo es la observación directa de las gónadas por medio de un examen laparoscópico (Delgado *et al.*, 2010). Además varias técnicas han sido demostradas como aptas para una identificación fisiológica o molecular del sexo. Estas incluyen cariología, prueba de antígenos HY en las células sanguíneas, prueba de hibridación con ADN y análisis de los niveles de testosterona en sangre (Merchant-Larios, 2000).



Un problema mayor es identificar el sexo en crías de tortugas porque ellas no poseen, al igual que las juveniles, características externas que puedan ser usadas para distinguir el sexo y algunas técnicas utilizadas en las tortugas juveniles no han sido satisfactorias para sexar a las crías (Standora & Spotila, 1985). Se han probado solo algunos métodos para identificar el sexo en las crías:

**Métodos no invasivos:** se han examinado los niveles de estrógeno y testosterona en la sangre o el fluido corioalantónico y amniótico por medio de radioinmunoanálisis. Gross *et al.* (1995) encontraron en *Caretta caretta* que la proporción de concentraciones de estradiol respecto a testosterona es significativamente menor en los machos que en hembras, lo que permite predecir el sexo con precisión aceptable. Sin embargo, Merchant-Larios (2000) en *L. olivacea*, no encontró diferencias en los niveles de estas hormonas entre los sexos, por lo que esta técnica requiere de mayor validación.

**Métodos invasivos:** están disponibles tres procedimientos basados en observaciones morfológicas (Wibbels, 2003):

Observación directa de las gónadas *in situ*. Los criterios que se utilizan para este método se basan en los detalles morfológicos gonadales observados inmediatamente después de remover algunos órganos que las cubren como intestinos, hígado y estómago (Merchant-Larios, 2000). Las gónadas aparecen como dos bandas claras que se extienden a lo largo de la longitud de los riñones (mesonefros). Se han intentado sexar las gónadas de *L. olivacea* a partir de que los ovarios tienen su superficie arrugada y son más grandes que los testículos. Como este criterio es cuestionable, se propuso el método de observación de gónadas *in toto* el cual requiere de la disección del complejo urogenital (gónada y riñones) y su fijación en formol al 10%. Posteriormente la gónada se separa del riñón y se sumerge una solución de formol y glicerol. Con este procedimiento los sexos pueden ser claramente distinguibles, ya que los ovarios tienen una superficie rugosa, y los testículos en su interior se distinguen por una apariencia granular que posiblemente corresponde con la presencia de túbulos seminíferos. Debido a la aparente facilidad con la cual este procedimiento puede realizarse para determinar el sexo en crías, muchos investigadores han indicado que la morfología de las gónadas puede ser usada para determinar el sexo de las crías (McCoy *et al.*, 1983), mientras que otros han sugerido que la histología es mejor que la morfología macroscópica, puesto que muestran características sexo-específicas y no se está

expuesto al criterio arbitrario del investigador (Mrosovsky & Benabib, 1990; Mrosovsky & Godfrey, 1995).

Un nuevo método histológico fue desarrollado para distinguir las características sexuales en crías de *Chelonia mydas*, utilizando el diámetro de los conductos paramesonéfricos, la altura del epitelio y el grosor de la corteza, se encontró que a través de datos morfométricos es posible distinguir el sexo con exactitud, mientras que los métodos de observación de gónadas siempre estarán sujetos a sesgo. Otra de las ventajas de este método fue la utilización de un menor número de crías para el estudio (46 de un total de 1000), con lo cual se reduce el tamaño de muestra necesaria. Con estos datos Ikonopoulou *et al.* (2006) reportaron por primera vez en tortugas marinas, datos morfométricos de las gónadas de *C. mydas*, encontrando diferencias que permiten distinguir hembras, machos e intersexos. Estas diferencias se lograron observar en conductos paramesonéfricos, epitelio y corteza de las gónadas. Además, con los datos morfométricos que obtuvieron, lograron separar dos grupos dentro de los intersexos, llamados interhembras e intermachos, los cuales presentan características más parecidas a hembras o machos, respectivamente, pero que aún no pueden catalogarse completamente como tales.

Al inicio de esta investigación se planteó como hipótesis, que en *L. olivacea* se podía inducir la formación de intersexos mediante variaciones de temperatura. Una vez que se formaran los intersexos, utilizar la morfometría de la gónada para separarlos en machos y hembras como fue reportado por Ikonopoulou *et al.* (2006) para *C. mydas*. Además de cultivar las crías durante seis meses para observar si los intersexos obtenidos se diferenciaban en hembras o machos a lo largo del tiempo. Este experimento se realizó en las instalaciones del CIBNOR, en un área exclusiva para la incubación de los huevos donde se mantenía aire acondicionado las 24 h, lo cual era necesario para el enfriamiento de las cajas de incubación. Sin embargo al tratar de repetir dicho experimento, en la temporada 2008, estas facilidades no se obtuvieron y la incubación de los huevos se realizó solo para delimitar el momento en que ocurre la determinación del sexo y observar los cambios en las gónadas durante seis meses de cultivo.

## 1.2. JUSTIFICACIÓN

La información obtenida hasta el momento sobre la determinación sexual en reptiles es abundante. Sin embargo, los estudios en donde se analice el momento en que ocurre la determinación sexual no han resultado concluyentes para delimitar este periodo. Además son pocos los trabajos en donde se estudie el desarrollo de las gónadas de las crías posteclosión, siendo este conocimiento fundamental para realizar investigaciones fisiológicas sobre la diferenciación sexual en especies con determinación sexual dependiente de la temperatura de incubación. Esta información es esencial para aplicarse en estudios ecológicos de conservación y manejo de reptiles amenazados o en peligro de extinción. Por lo anterior, se considera importante delimitar el periodo sensible a la temperatura para la determinación del sexo en la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*.

## 1.3. OBJETIVOS

### General

Conocer el momento en que ocurre la determinación sexual y observar las características del desarrollo gonádico durante los primeros seis meses de vida en crías de *L. olivacea*.

### Particulares

1. Inducir la formación de hembras y machos mediante variaciones de la temperatura de incubación y encontrar el momento en que se determina el sexo.
2. Analizar las diferencias morfológicas entre las gónadas de ambos sexos en las crías posteclosión.
3. Observar los cambios morfológicos de las gónadas de las crías durante los primeros seis meses de vida.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### INDUCIR LA FORMACIÓN DE HEMBRAS Y MACHOS MEDIANTE VARIACIONES DE TEMPERATURA.

Con el objetivo de inducir la formación de hembras y machos de *L. olivacea* mediante variaciones de la temperatura de incubación, fue necesario diseñar una incubadora para poder controlar la temperatura de incubación a 28, 30 y 32°C.

Se realizaron tres experimentos a diferentes temperaturas (28, 30 y 32°C) en los cuales, dentro de una caja de unicel de 26x 20x 29 cm con orificios en toda su superficie a una separación de 10 cm entre ellos, se colocó una capa de arena de 15 cm de espesor con una humedad del 7% (dato que se obtuvo de muestras que se tomaron *in situ* en nidos de *L. olivacea*), para el control de la temperatura se introdujo en la arena una placa de tipo Heat Pad® que puede lograr temperaturas de 50-60°C. El encendido y apagado de la placa fue de forma manual para alcanzar y mantener la temperatura deseada. El registro continuo de la temperatura se hizo mediante un escaner programado para tomar lecturas cada minuto.

Una vez que se controló la temperatura de la arena de forma manual, se diseñó un termostato electrónico programable con un sensor de una precisión de 0.06°C, construido para controlar la temperatura de la placa; además se elaboró un programa en Pbasic de Parallax para poder hacer las modificaciones necesarias a la temperatura de la placa durante la incubación (Anexo 1). Antes de trasladar los huevos al laboratorio para su incubación, se realizaron algunas pruebas con el termostato electrónico para garantizar que la temperatura de incubación se mantuviera a 28, 30 y 32°C. Estas pruebas consistieron en acondicionar un área dispuesta especialmente para mantener las cajas de incubación con arena al 7% de humedad y programar el termostato a 28, 30 y 32°C durante varios días continuos para confirmar el control de la temperatura. Una vez que se logró controlar la temperatura de la arena con el termostato electrónico, se realizó la recolecta de los huevos para su incubación.

### 2.1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Durante el período de reproducción de la tortuga golfina, en el Pacífico entre julio y enero, se realizó la recolecta de los nidos. Para lo cual, se llevaron a cabo recorridos nocturnos (entre las 11:00 PM y las 6:00 AM del día siguiente) en una playa de anidación que consistieron en revisar e identificar nidos de *L. olivacea*, a todo lo largo de la playa abarcando aproximadamente 35 km desde la zona



hotelera de San José del Cabo (23° 01'32.2"N, 109° 42'55.45"W) hasta la playa Las Destiladeras (23°09' N, 109°30' W).

Una vez que se localizó el nido por medio del rastro que deja la hembra, se hizo una excavación hasta el lugar en donde se encuentran los huevos (aproximadamente 45 cm de profundidad). Posteriormente se contaron y se colocaron los huevos en una bolsa de plástico para su transporte al campamento. En dicho lugar, se prepararon cajas de unicel con orificios en toda la superficie para favorecer el intercambio de oxígeno y se les colocó arena obtenida de los mismos nidos. Cada nido se colocó en una caja de unicel y así fueron transportados al laboratorio.

## 2.2. INCUBACIÓN DE HUEVOS

### Formación de grupos de incubación

En este trabajo se realizaron dos experimentos, el primero comenzó en agosto de 2007 donde se recolectó un nido que contenía 93 huevos y al ser trasladado al laboratorio fue dividido en cuatro grupos, cuyo número de huevos en cada uno fue de: Grupo1=25; Grupo 2=25; Grupo 3=25; Grupo 4=18. El segundo experimento comenzó en septiembre de 2008 y consistió en recolectar 3 nidos que contenían 100, 96 y 130 huevos, respectivamente. En este caso el Nido 1 y el Nido 2 fueron divididos en 8 grupos, mientras que el Nido 3 solo en dos grupos ya que de los 130 huevos que tenía al ser recolectado, solo 66 fueron viables, por lo que el resto no se incubó (Tabla 2).

Tabla 2. Formación de grupos de los tres nidos recolectados en la temporada 2008.

| Nido           | Grupo | Número de huevos |
|----------------|-------|------------------|
| 1 (100 huevos) | 1     | 25               |
|                | 2     | 25               |
|                | 3     | 25               |
|                | 9     | 25               |
|                | 4     | 24               |
| 2 (96 huevos)  | 5     | 24               |
|                | 6     | 24               |
|                | 10    | 24               |
|                | 7     | 33               |
| 3 (66 huevos)  | 8     | 33               |

En los dos experimentos el arreglo de los huevos dentro de las cajas de unicel fue el mismo: en cada caja se colocó una primera capa de arena de 15 cm; enseguida se colocaron los huevos y entre ellos se puso un sensor de temperatura (Fig. 4). Después se cubrieron con arena y para incrementar la temperatura de la arena se colocó una placa de tipo Heat Pad. El encendido y apagado de la placa fue de forma automática controlado por el termostato electrónico. Para tener el registro continuo de la temperatura, se programó el escaner para tomar lecturas cada 10 minutos y el registro de los datos se realizó durante todo el periodo de incubación.

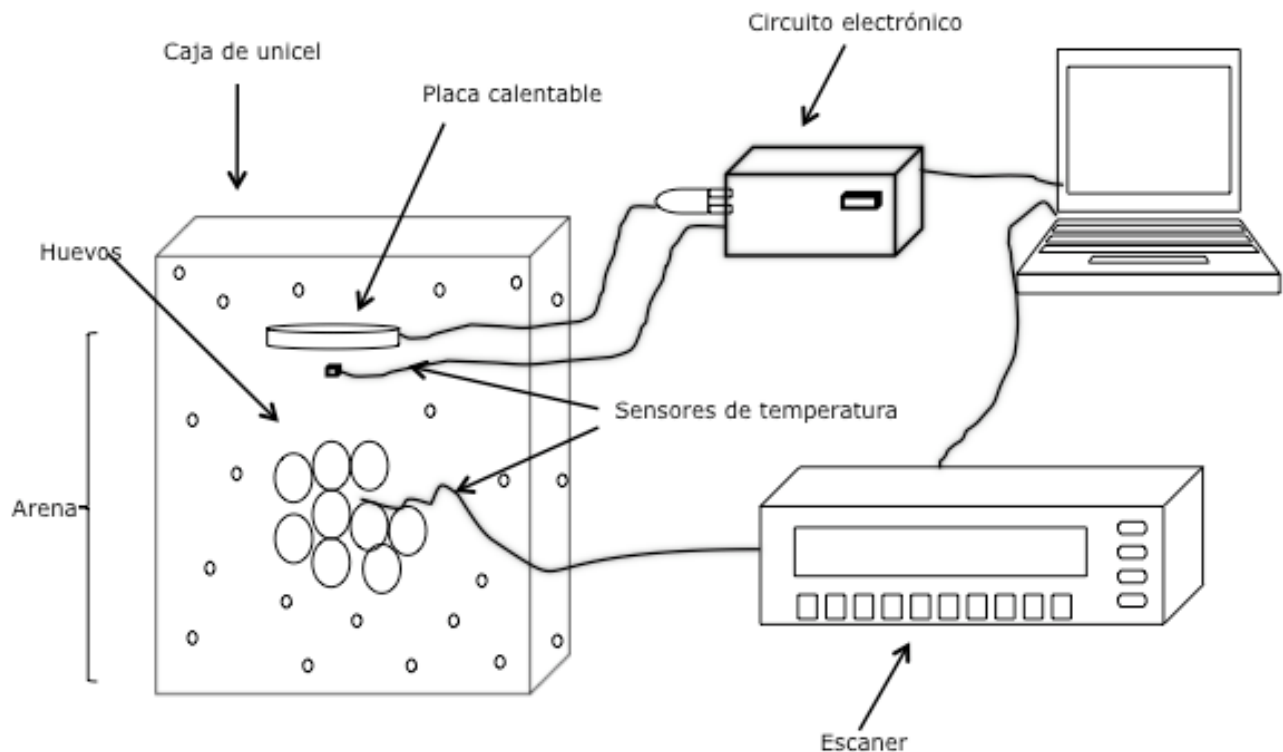


Figura 4. Incubadora automática para huevos de *Lepidochelys olivacea* (López-Correa *et al.*, 2010).

Se tomaron lecturas continuas con un sensor de humedad Decagon Devices® en porcentaje volumétrico (VWC, *volumen water content*) con una resolución de 0.1%. La humedad de la arena se mantuvo al 7% VWC.

Para inducir la formación de machos y hembras mediante las variaciones de la temperatura, en los dos experimentos realizados se usaron dos grupos como testigos, es decir un grupo sometido a

temperatura feminizante (32°C) y el otro grupo testigo a temperatura masculinizante (28°C), esperando así obtener el 100% de hembras y el 100% de machos, respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3. Grupos utilizados como testigos para inducir la formación de hembras y machos.

| Experimento | Grupo | Temperatura de incubación |
|-------------|-------|---------------------------|
| 2007        | 1     | 28°C                      |
|             | 2     | 32°C                      |
| 2008        | 9     | 28°C                      |
|             | 10    | 32°C                      |

### Temperatura de incubación

Para identificar con precisión el periodo sensible a la temperatura a la que se determina el sexo, se realizaron dos tipos de ensayos que consistieron en incubar los huevos inicialmente a una temperatura (masculinizante o feminizante) y después de algunos días se cambiaron a la temperatura opuesta, permaneciendo en ésta diferentes días y finalmente se regresaron a la temperatura de incubación inicial. Estos ensayos fueron:

#### Experimento 2007

- 1) Grupo 3. Temperatura masculinizante-feminizante-masculinizante
- 2) Grupo 4. Temperatura feminizante-masculinizante-feminizante

#### Experimento 2008

- 2) Grupos 1 a 8. Temperatura feminizante-masculinizante-feminizante

Debido a que en este experimento no se contó con la infraestructura adecuada para realizar el ensayo 1), solo se realizó el ensayo 2).

Se ha reportado que la duración del periodo de incubación está relacionada con la temperatura, por lo que a mayor temperatura, menos días de incubación y viceversa; además la determinación del sexo tiene lugar durante el segundo tercio del periodo de incubación ((Merchant-Larios *et al*, 1997).

En este estudio se esperaba que a temperatura masculinizante (28°C) la incubación duraría 60 días y a temperatura feminizante (32°C) la incubación sería de 45 días, por lo que el segundo tercio del periodo de incubación sería entre los días 20 a 40 y 15 a 30, respectivamente.

En el experimento 2007 las variaciones de temperatura que se realizaron dentro del periodo termosensitivo fueron:

1) Grupo 3. Durante los primeros 26 días de incubación se mantuvieron los huevos a temperatura masculinizante (28°C). Después se dio un pulso de temperatura feminizante (32°C) durante siete días, siendo en el día 33 cuando se regresó a la temperatura de inicio (28°C) (Fig. 5).

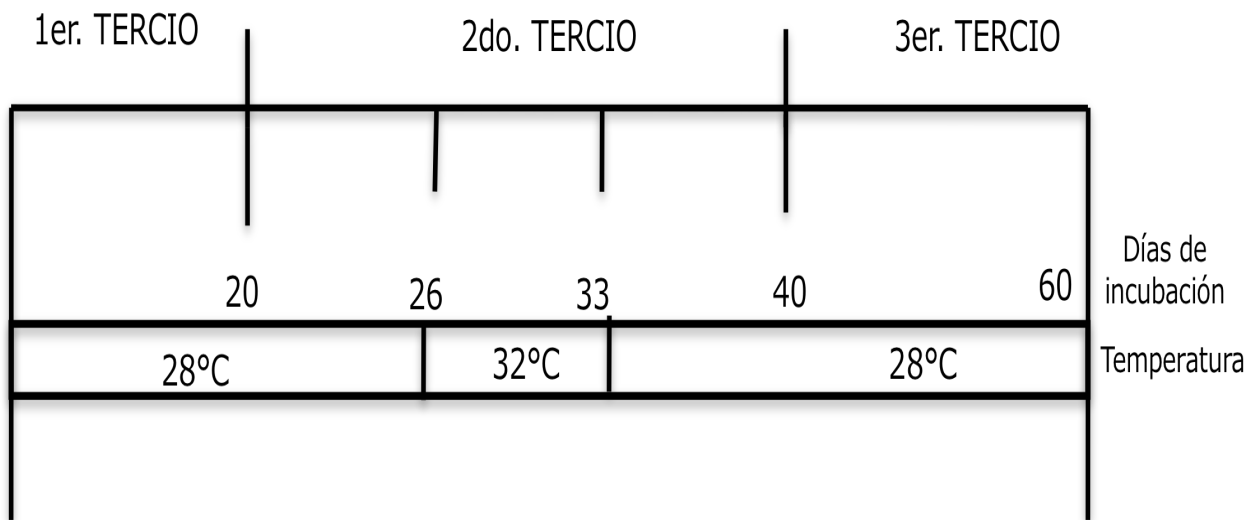


Figura 5. Variaciones de temperatura en el grupo 3 durante la incubación de huevos de *Lepidochelys olivacea* en el experimento 2007.

2) Grupo 4. Los embriones iniciaron el desarrollo a temperatura feminizante (32°C) durante los primeros 20 días de incubación, y posteriormente se trasladaron a la temperatura masculinizante (28°C), permaneciendo en esta cinco días y finalmente se regresaron a la temperatura feminizante, quedándose en esta última hasta la eclosión (Fig. 6).



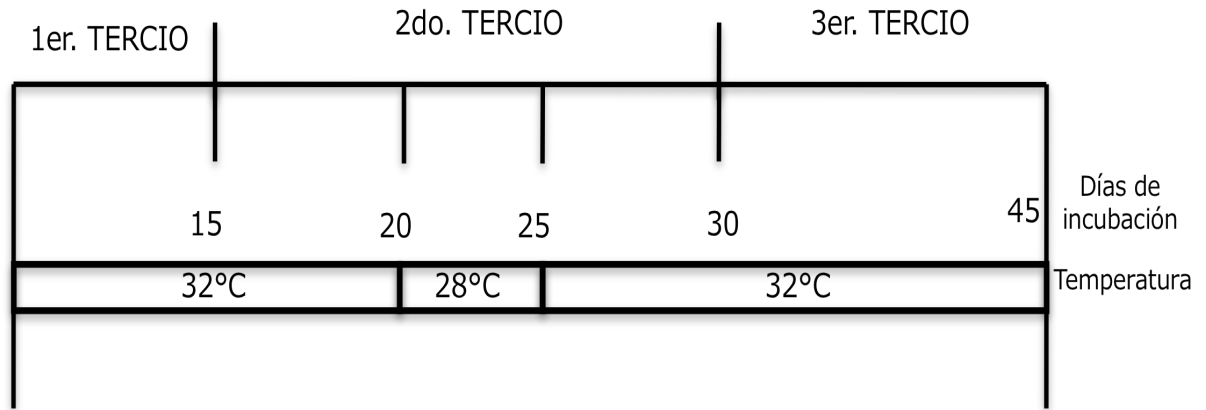


Figura 6. Variaciones de temperatura en el grupo 4 durante la incubación de huevos de *Lepidochelys olivacea* durante el experimento 2007.

En los grupos del experimento 2008, la incubación se inició a temperatura feminizante, sin embargo difieren en el día en que se inició el pulso de temperatura masculinizante (15, 17, 19, 21, 23, 25, 27 y 29), en este caso la duración del pulso fue de tres días para todos los grupos (Fig. 7). Al transcurrir 45 días se revisaron las cajas de incubación y se observó que las crías comenzaron a salir del cascarón por lo cual se detuvo la incubación y se retiraron las placas de calentamiento y los sensores de humedad y temperatura, para permitir que las tortugas subieran libremente a la superficie de la caja de incubación. Solo los grupos incubados a temperatura masculinizante (grupo 1 para el experimento 2007 y grupo 9 para el experimento 2008) siguieron con la incubación y se revisaron periódicamente hasta la eclosión de las crías.

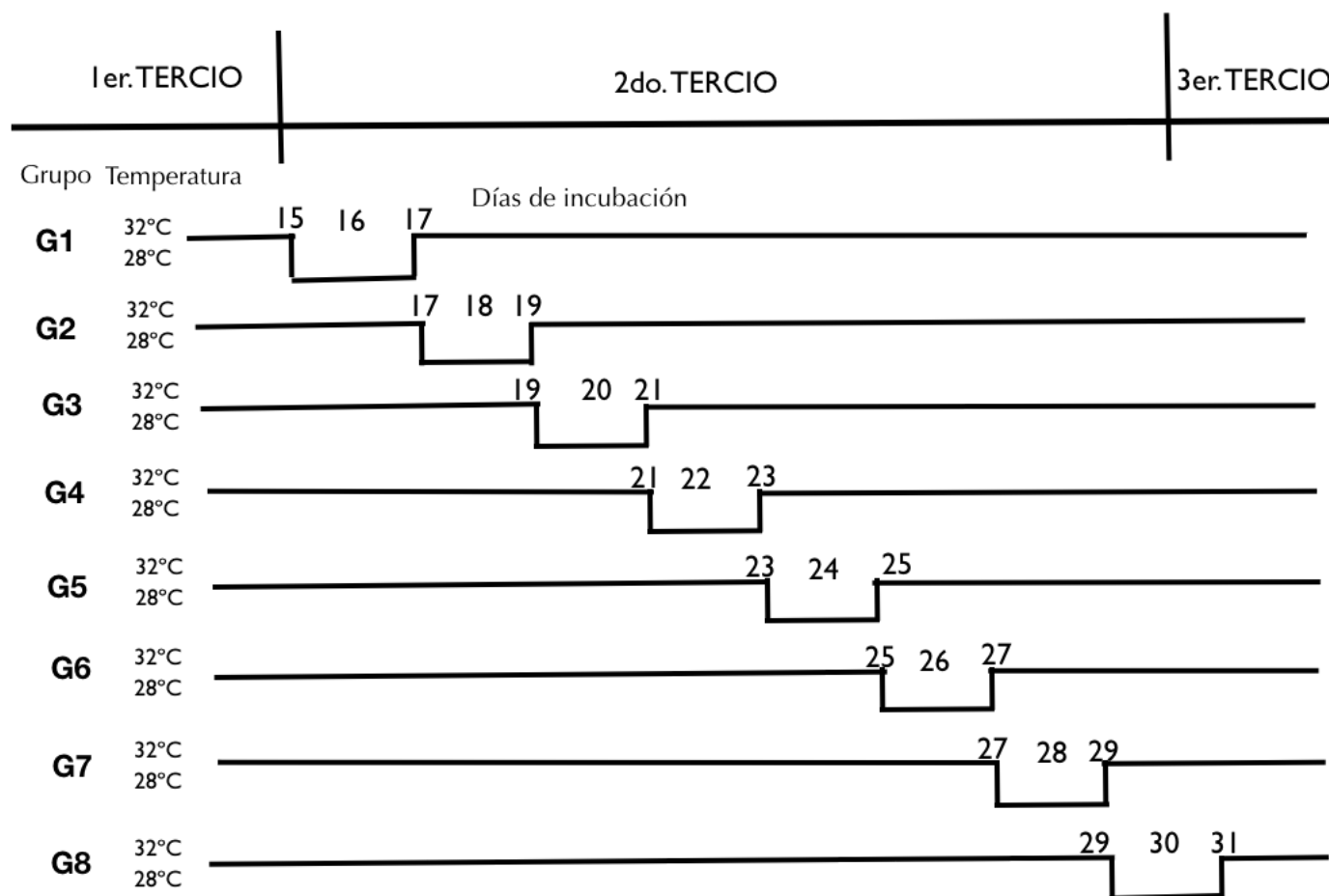


Figura 7. Variación temporal de los pulsos masculinizantes en los ocho grupos de incubación del experimento 2008.

### 2.3. ECLOSIÓN

Una vez finalizada la incubación, se revisaron las cajas para contar y separar huevos, crías vivas y muertas en cuatro categorías:

- 1) Huevos sin desarrollo. Son aquellos que redujeron su tamaño (usualmente menores a la mitad del diámetro de los huevos normales) que contienen principalmente albúmina y algunos gránulos de vitelo. La yema no está encerrada por una membrana vitelina y carece de disco embrionario.
- 2) Huevos no eclosionados. Son huevos con un embrión evidente sin importar la etapa de desarrollo en la que se encontraban.
- 3) Crías vivas. Crías que salieron del cascaron.
- 4) Crías muertas. Crías que salieron del cascaron pero que no sobrevivieron.

Para cada grupo se calcularon los porcentajes de eclosión, supervivencia y mortalidad de la siguiente manera:

$$E = C_v H * 100$$

$$S = C_v + e_v H * 100$$

$$M = C_m + e_m H * 100$$

Donde:

E= Eclosión (%)

S= Supervivencia (%)

M= Mortalidad (%)

C<sub>v</sub>= Crías vivas (número)

C<sub>m</sub>= Crías muertas (número)

e<sub>v</sub>= Embriones vivos (número)

e<sub>m</sub>= Embriones muertos (número)

H= Total de huevos (número)

### **Análisis de los huevos no eclosionados**

Para cada grupo los huevos no eclosionados que contenían embriones que no habían culminado su desarrollo se fijaron en formol al 10% y posteriormente fueron separados en tres grupos de acuerdo a las etapas de desarrollo morfológico propuestas por Miller (1985):

Etapa 1: coloración de la retina, forma de las extremidades anteriores, formación del caparazón y del plastrón, aparece el pico, el cual sirve únicamente para romper el cascarón y después degenera.

Etapa 2: formación de los primeros dígitos, el borde del plastrón esta completo, la carúncula aparece como un lunar blanco, iris completamente pigmentado. La cabeza no tiene escamas, existen uñas en el 1er dígito, la periferia del caparazón está completa. En los embriones más desarrollados, todas las escamas están presentes en las aletas y pueden exhibir alguna pigmentación superficial. El plastrón comienza a tener una coloración definida.

Etapa 3: en esta etapa se incluyen las crías y las precrías, estas últimas se caracterizan porque el volumen del vitelo se va haciendo más pequeño que el volumen del embrión, la pigmentación de los escudos del caparazón, plastrón y puente continúa obscureciéndose. Las escamas de la cabeza están pigmentadas y las perioculares son evidentes, la cabeza está pigmentada completamente en la etapa de precría. En la etapa de cría el vitelo está casi completamente dentro del abdomen y está cubierto por el tejido pigmentado. La proporción del volumen de cría a volumen de vitelo es de 11:1. Las membranas extraembrionarias están ausentes y presentan una cicatriz umbilical.

### **DIFERENCIAS MORFOLÓGICAS ENTRE LAS GÓNADAS DE AMBOS SEXOS EN LAS CRÍAS POSTECLOSIÓN.**

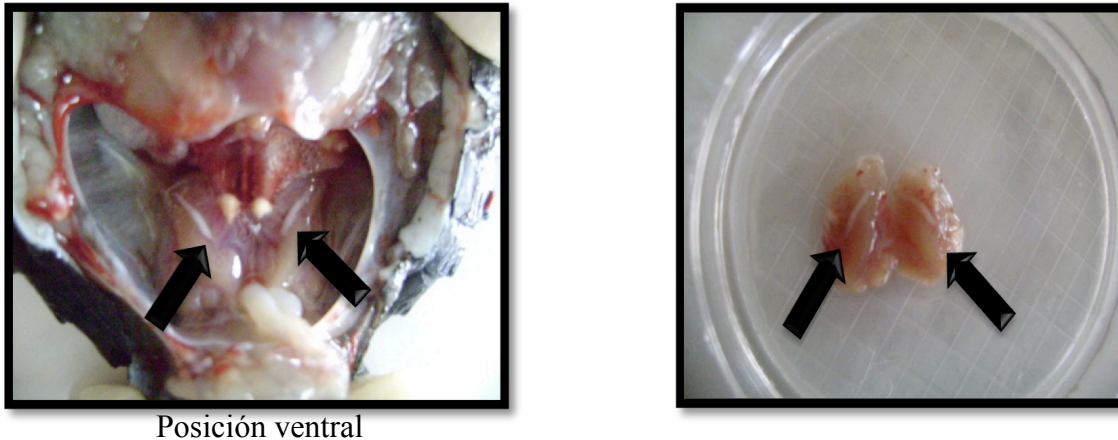
Para encontrar las posibles diferencias morfológicas entre las gónadas masculinas y femeninas de crías al momento de nacer, se tomó una muestra al azar en cada uno de los grupos durante los dos experimentos (Tabla 4).

Tabla 4. Número de crías que se tomaron al momento de nacer en cada grupo y en cada experimento.

| Experimento | Grupo | Número de crías |
|-------------|-------|-----------------|
| 2007        | 1     | 1               |
|             | 2     | 2               |
|             | 3     | 0               |
|             | 4     | 1               |
| 2008        | 1     | 2               |
|             | 2     | 2               |
|             | 3     | 2               |
|             | 4     | 2               |
|             | 5     | 2               |
|             | 6     | 2               |
|             | 7     | 3               |
|             | 8     | 4               |
|             | 9     | 2               |
|             | 10    | 2               |

**Obtención de gónadas.** Las crías que se seleccionaron fueron sacrificadas con cloroformo y posteriormente se realizó la dirección de las gónadas siguiendo la técnica de Elizalde-Aguilar (1988), las cuales se encuentran sobre los riñones y se distinguen por ser estructuras alargadas de color blanco (Fig. 8). Una vez disectadas, el par de gónadas de cada cría fueron fijadas con formol al 10%.





Posición ventral

Figura 8. Disección de gónadas de crías de *Lepidochelys olivacea*. Flechas: gónadas.

#### 2.4. DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA Y ANÁLISIS MORFOMÉTRICO.

Las gónadas se colocaron bajo la lupa estereoscópica para tomar imágenes y realizar observaciones macroscópicas y mediciones morfológicas utilizando el software Image Pro-Plus V4. Las medidas determinadas fueron: Longitud total (LT) y Anchura máxima (AM). Debido a que el ancho de la gónada varía a lo largo de la misma, se tomó la medida más grande (Fig. 9).

Las características específicas que se emplearon para sexar las gónadas de las crías fueron las siguientes (Ordoñez, 1998):

- 1) Se consideró macho si presentó estructuras tubulares en su interior y hembra si la gónada era transparente, sin importar los bordes de la gónada.
- 2) Si la gónada presentaba los bordes con numerosos pliegues y el área central menos opaca que los bordes se identificó como hembra y si el contorno era liso se identificó como macho.

En ambos casos se identificó una gónada como indiferenciada cuando ninguna de estas características se observaba claramente.

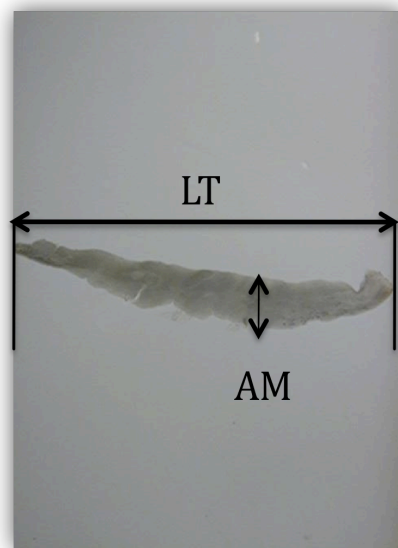


Figura 9. Gónada de cría de *Lepidochelys olivacea* donde se indican las variables morfométricas evaluadas. LT: longitud total, AM: anchura máxima.

## 2.5. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Después que se midieron las gónadas se realizó la técnica histológica (Humason, 1979). Las gónadas se lavaron con agua corriente durante 24 horas para eliminar el fijador. Posteriormente se deshidrataron en alcohol etílico en concentraciones crecientes (de alcohol de 70° a alcohol absoluto) y se transparentaron con tolueno. Posteriormente se incluyeron en parafina y se obtuvieron cortes de 7  $\mu\text{m}$  de espesor por medio de un microtomo de rotación (Anexo 2). Finalmente los cortes fueron teñidos con Hematoxilina de Harris y eosina acuosa al 1% y se montaron en resina sintética para su observación al microscopio. Se revisaron en el microscopio óptico las laminillas obtenidas y se tomaron microfotografías de epitelio, médula y corteza para distinguir las características de hembras y machos de acuerdo al criterio de Merchant-Larios (2000).

## OBSERVACIÓN DE LOS CAMBIOS EN LAS GÓNADAS DE LAS CRÍAS DURANTE LOS PRIMEROS SEIS MESES DE VIDA.

El resto de las crías que eclosionaron se colocaron por grupo en cajas de unicel con una capa de arena de 20 cm. Se dejaron ahí dos días mientras terminaban de reabsorber el vitelo, de acuerdo al criterio de Márquez-Millán (1991). Mientras tanto se pesaron con una balanza digital y se marcaron en el caparazón con esmalte acrílico como se muestra en la figura 10. En el lado izquierdo del caparazón

se colocó el número del grupo en la cual fue incubada la tortuga, y en el derecho la marca correspondiente al número de la tortuga dentro de ese mismo grupo.

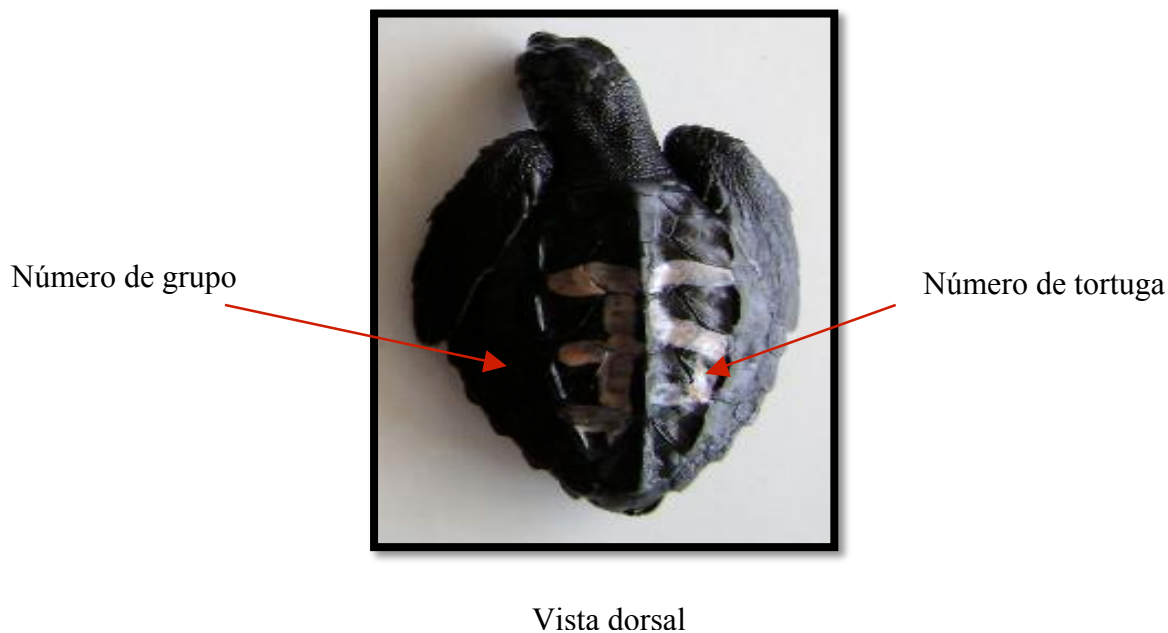


Figura 10. Fotografía de cría con marca donde se señala a qué grupo pertenece y el número de la cría.

## 2.6. CULTIVO

Al tener todas las crías pesadas y marcadas se trasladaron a la Unidad Piloto de Maricultivos del CICIMAR para su cultivo. Las crías se mantuvieron en un sistema de cultivo de circulación cerrada compuesto por cuatro tanques de fibra de vidrio de 600 L de capacidad conectados a un filtro de arena, un filtro biológico de lodo activado y lámparas UV (Fig. 11). El agua de mar se mantuvo a una salinidad constante de 36 ups y se proporcionó aireación constante. La temperatura del agua se registró con un termómetro de mercurio (al momento de llenar los estanques fue de 26°C). En los meses de diciembre a febrero se colocaron dos calentadores de acuario de 300 Watts por estanque para mantener una temperatura entre 25-26°C (Aguilar, 1986).

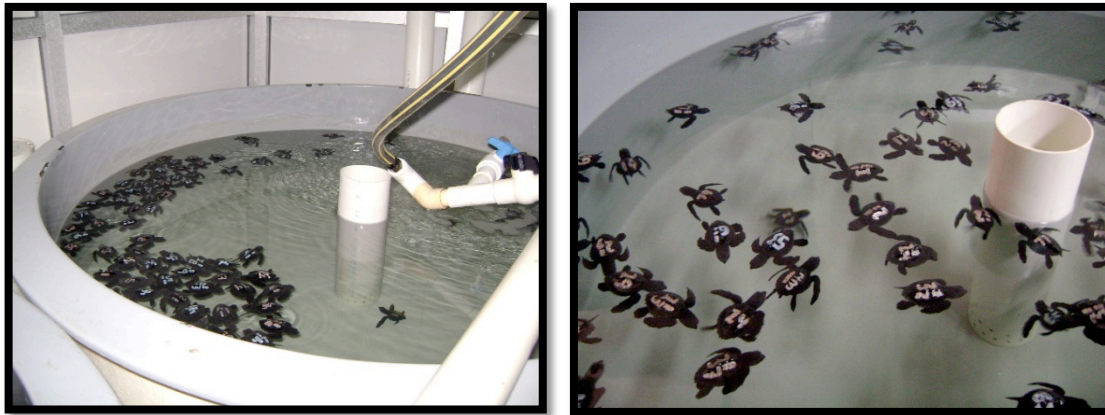


Figura 11. Tanques de cultivo de crías de *Lepidochelys olivacea*.

Cada grupo fue colocado en los cuatro tanques de la siguiente manera:

Experimento 2007

Tanque 1: Grupo 1

Tanque 2: Grupos 2 y 4

Experimento 2008

Tanque 1: Grupos 1 y 2

Tanque 2: Grupos 3 y 4

Tanque 3: Grupos 5, 6 y 7

Tanque 4: Grupos 8, 9 y 10

Las crías fueron alimentadas diariamente con alimento peletizado de la marca Tortuguetas minibits®, que contiene un 35% de proteína, un 5% de grasa y un 2% de fibra cruda, y que se recomienda por el fabricante para tortugas recién eclosionadas. Una peculiaridad que debe tener el alimento es que debe flotar en el agua durante varias horas para facilitar el que las tortugas lo tomen (Márquez-Millán, 1991). A las crías se les proporcionó diariamente todo el alimento que pudieron consumir. Cuando las tortugas tenían tres meses en cultivo, el alimento se cambió por Tortuguetas junior® que además de ser hojuelas más grandes, contiene un 41.7% de proteína, un 6.3% de grasa y un 2.2% de fibra. Este cambio de alimento fue recomendado por el fabricante ya que en la dieta de una tortuga joven, se requiere un aporte energético más elevado que le permita un crecimiento dinámico y constante. Los residuos de alimento y sus excretas fueron eliminados diariamente con un sifón de 3 cm de luz. Cada mes se lavaron los tanques con una esponja y agua dulce.

Las crías fueron sometidas cada semana a un baño de agua dulce y se cepilló el caparazón y plastron para eliminar restos de alimento y evitar el crecimiento de hongos y bacterias. Se observó el

estado físico de cada tortuga y cuando se detectó que tuvieran heridas ocasionadas por mordeduras, se les separó del grupo para ser tratadas con el antibiótico Tanox® ó con azul de metileno.

Mensualmente se tomó una muestra al azar de cada grupo para los dos experimentos (Tabla 5) y se les dio el mismo tratamiento que las crías al momento de nacer, desde la disección de las gónadas hasta obtener las laminillas.

Tabla 5. Número de crías de *Lepidochelys olivacea* sacrificadas durante el cultivo.

| Experimento | Grupo | Mes 1 | Mes 2 | Mes 3 | Mes 4 | Mes 5 | Mes 6 |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 2007        | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     | 2     |
|             | 2     | 3     | 2     | 1     | 0     | 0     | 1     |
|             | 3     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
|             | 4     | 1     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     |
| 2008        | 1     | 3     | 2     | 3     | 3     | 3     | 5     |
|             | 2     | 3     | 3     | 3     | 3     | 3     | 4     |
|             | 3     | 3     | 3     | 3     | 3     | 3     | 4     |
|             | 4     | 3     | 3     | 3     | 3     | 3     | 3     |
|             | 5     | 3     | 3     | 3     | 3     | 3     | 4     |
|             | 6     | 3     | 3     | 3     | 3     | 3     | 4     |
|             | 7     | 4     | 3     | 4     | 3     | 3     | 3     |
|             | 8     | 3     | 2     | 2     | 3     | 4     | 3     |
|             | 9     | 2     | 3     | 3     | 4     | 3     | 3     |
|             | 10    | 2     | 2     | 2     | 3     | 4     | 5     |

## 2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las distribuciones estadísticas de los pesos de los diferentes grupos de incubación se compararon de dos en dos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnosv (K-S) de dos muestras (Steel & Torrie, 1980). Los cálculos se realizaron con el programa kstest2.m del módulo de estadística del paquete Matlab versión 7.5.



Se encontraron las relaciones morfométricas entre el largo total y la anchura máxima de la gónada, mediante regresiones lineales simples de los datos que correspondieron al mismo sexo, incluyendo el caso de los indiferenciados. Los cálculos y las gráficas se realizaron mediante la opción de línea de tendencia que ofrece el programa Matlab versión 7.5, al mostrar el diagrama de dispersión. La prueba de significación del coeficiente de correlación se hizo mediante la prueba t-student del mismo programa (Steel & Torrie, 1980).

Cuando los ajustes para machos y hembras fueron significativos, las pendientes obtenidas se compararon mediante la prueba t-student (Zar, 1996), realizada también con el programa Matlab versión 7.5.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. TEMPERATURA DE INCUBACIÓN**

##### **EXPERIMENTO 2007**

El periodo de incubación para el grupo incubado a temperatura masculinizante (grupo 1) duró 60 días, mientras que para el grupo incubado a temperatura feminizante (grupo 2) fue de 45 días. Ambos grupos fueron considerados como testigos en este experimento. En el grupo 1 la temperatura se mantuvo alrededor de los 27-28°C teniendo como promedio 27.61°C (Fig. 12). En el caso del grupo 2 se mantuvo una temperatura promedio de 32.24°C (Fig. 13).

En el grupo 3 (Fig. 14), durante el primer tercio del periodo de incubación, la temperatura promedio fue de 27.38°C, al comenzar el segundo tercio (día 20) la temperatura promedio de los siguientes seis días fue de 27.45°C (días 20 a 26), después se incrementó hasta obtener en promedio 31.94°C (días 26 a 33) y nuevamente disminuyó la temperatura a 28.35°C en promedio hasta concluir la incubación.

En el grupo 4 (Fig. 15) durante el primer tercio la temperatura se mantuvo en 31.79°C en promedio, al comenzar el segundo tercio (día 15) fue de 32.84°C en promedio hasta el día 20 de incubación, a partir del día 20 y hasta el día 25 se mantuvo en promedio a 27.72°C y se volvió a incrementar a partir del día 25 hasta el final de la incubación manteniendo a 32.27°C en promedio.

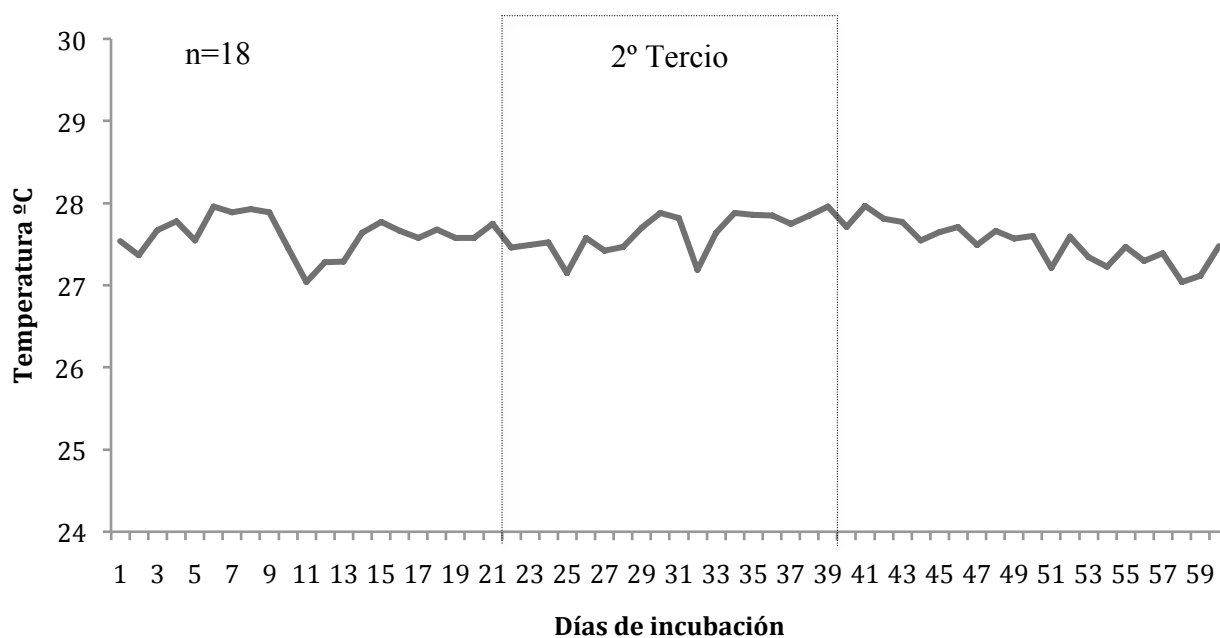


Figura 12. Temperatura de incubación en el grupo 1 durante el experimento 2007.

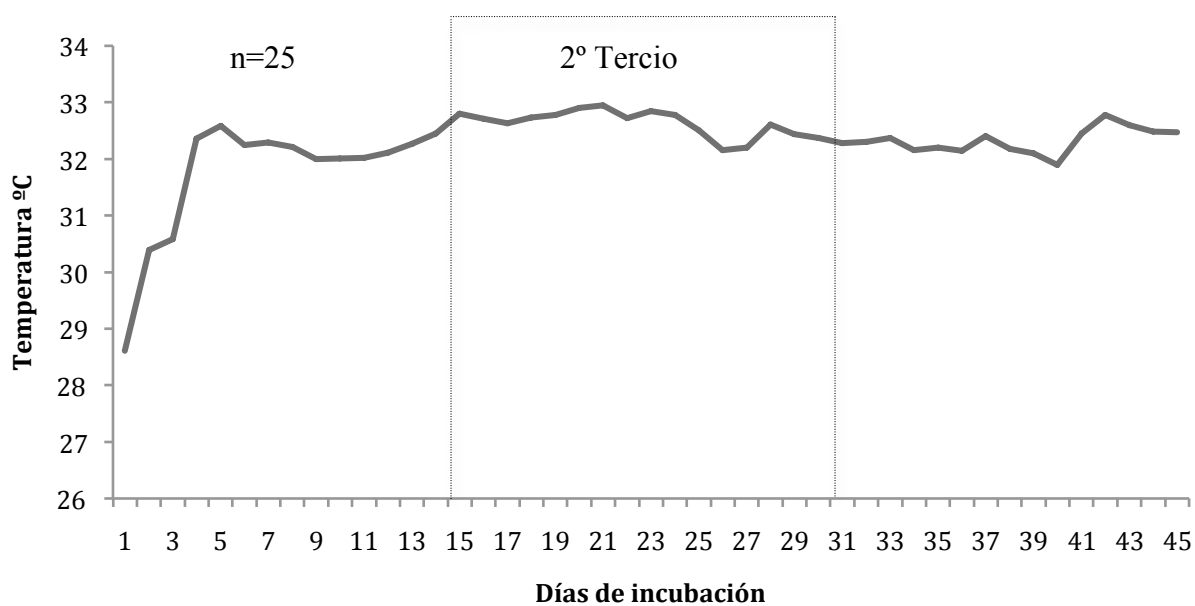


Figura 13. Temperatura de incubación en el grupo 2 durante el experimento 2007.

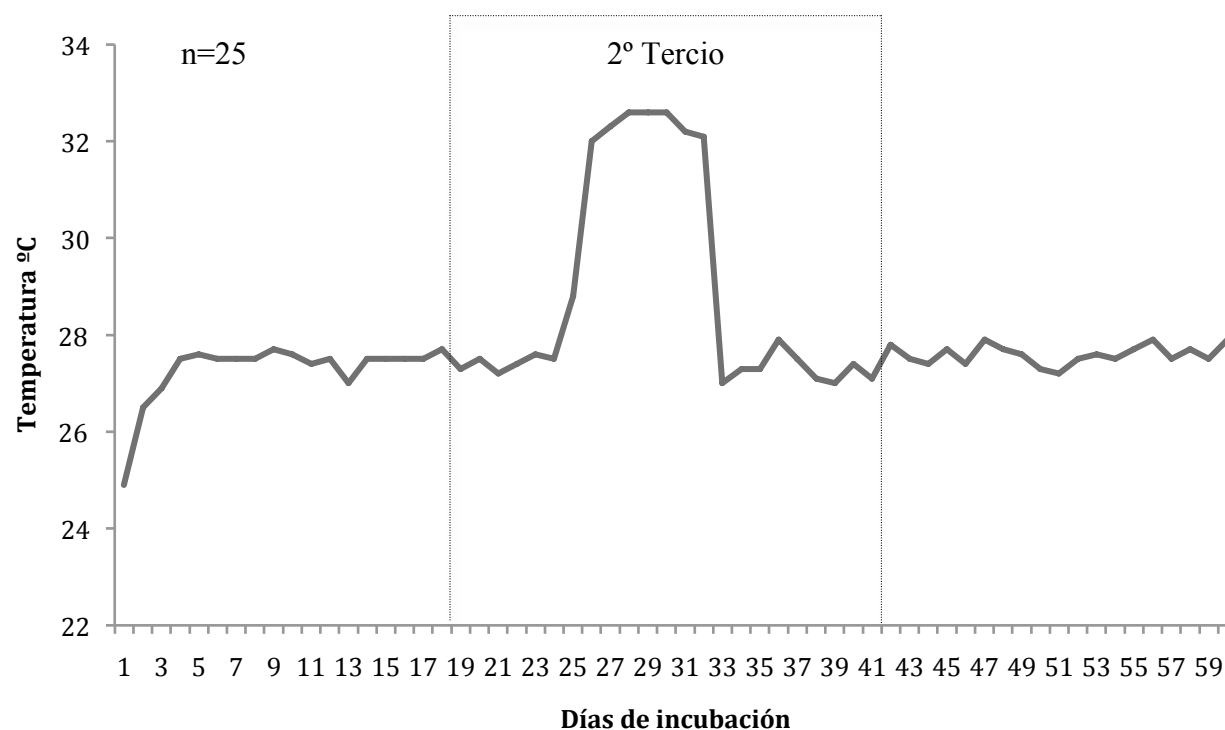


Figura 14. Temperatura de incubación en el grupo 3 durante el experimento 2007.

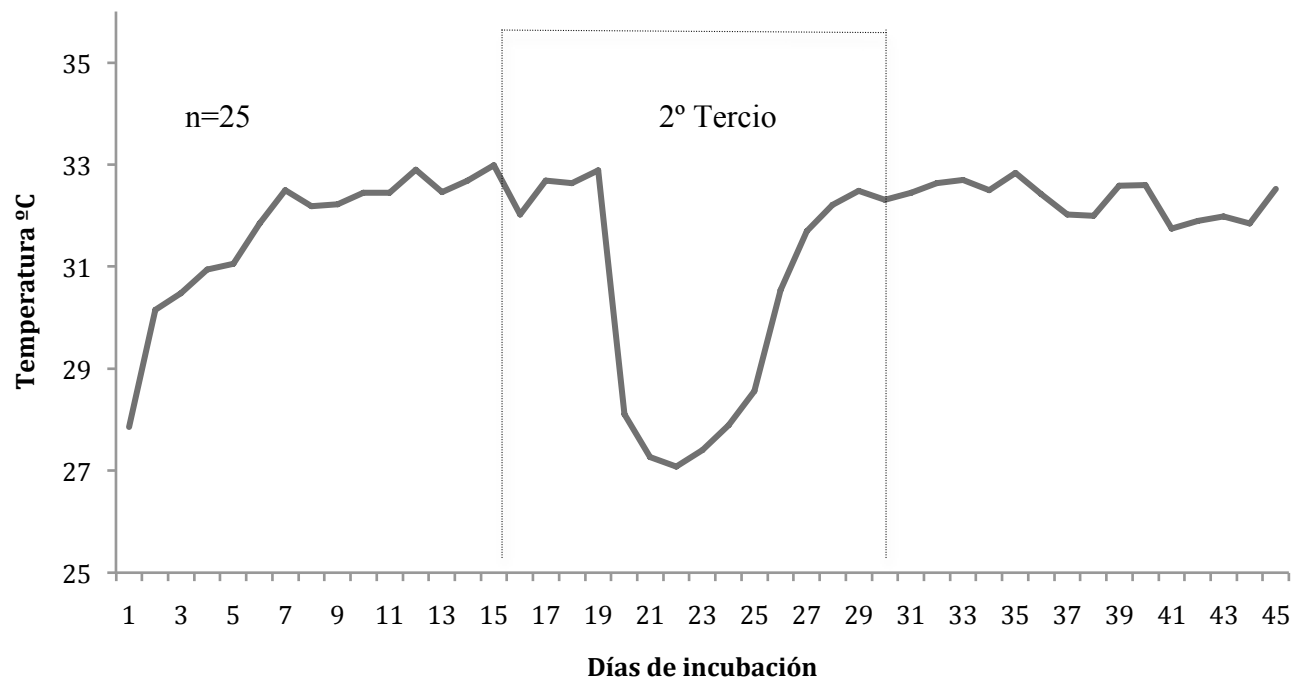


Figura 15. Temperatura de incubación en el grupo 4 durante el experimento 2007.

## EXPERIMENTO 2008

En los grupos testigo, el grupo 9 se mantuvo a temperatura masculinizante cuyo promedio fue de 28.62°C con un máximo de 29.5°C y un mínimo de 27.16°C (Fig. 16). El periodo de incubación duró 54 días por lo que el segundo tercio comenzó en el día 18 y culminó el 36.

En el grupo 10 la incubación fue de 45 días y el segundo tercio fue entre los días 15 a 30. En este último grupo se mantuvo a temperatura feminizante a un promedio de 32.29°C, con un mínimo de 29.9°C y un máximo de 33.06°C (Fig. 17).

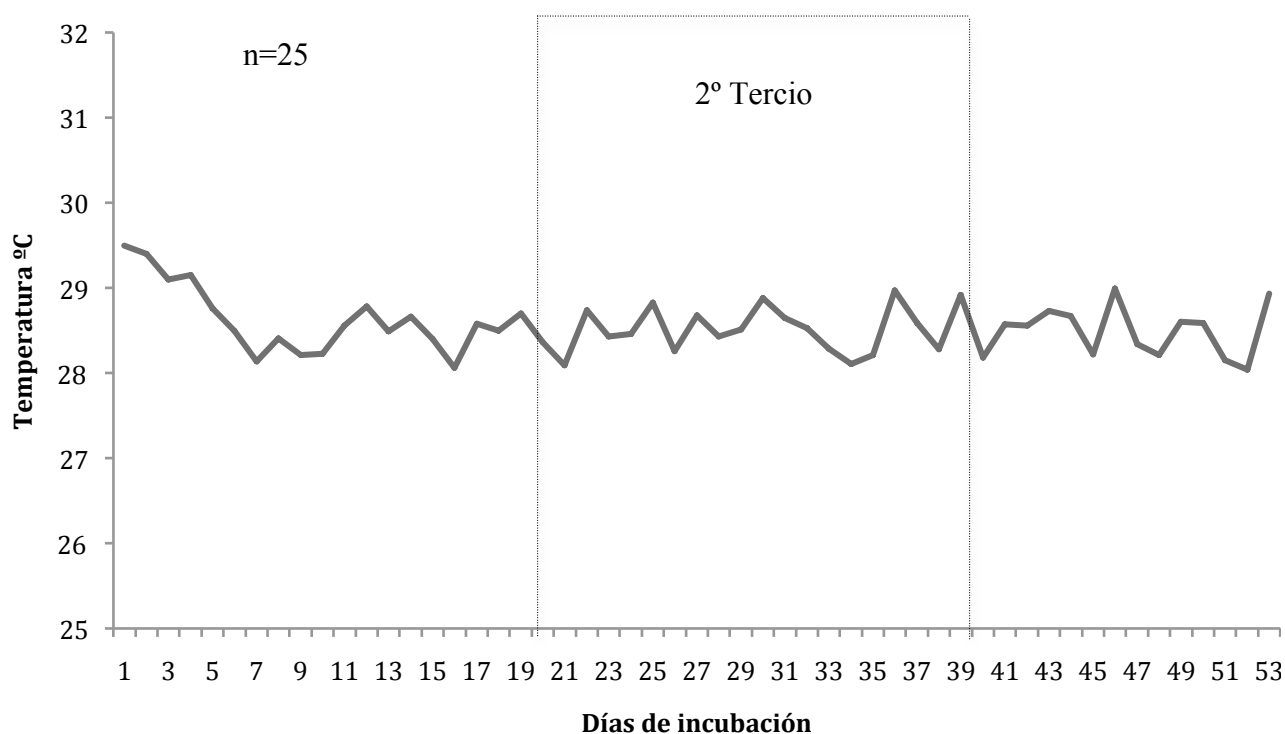


Figura 16. Temperatura de incubación en el grupo 9 durante el experimento 2008.



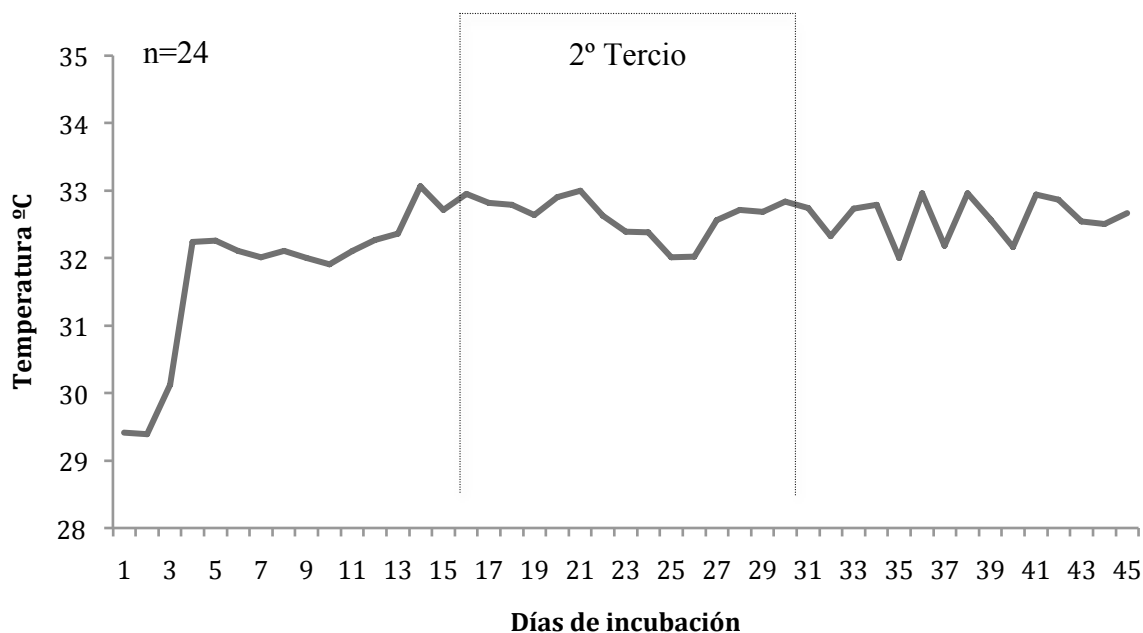


Figura 17. Temperatura de incubación en el grupo 10 durante el experimento 2008.

El periodo de incubación duró 45 días en los primeros ocho grupos. La temperatura promedio que se mantuvo en cada grupo y durante los días en que se cambió de feminizante-masculinizante-feminizante se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Temperatura de incubación en cada grupo durante el experimento 2008.

| Grupo | Día de incubación | Temperatura promedio (°C) | Grupo | Día de incubación | Temperatura promedio (°C) |
|-------|-------------------|---------------------------|-------|-------------------|---------------------------|
| 1     | 1-15              | 32                        | 5     | 1-23              | 31.68                     |
|       | 15-17             | 28.11                     |       | 23-25             | 28.53                     |
|       | 17-45             | 32.19                     |       | 25-45             | 32.40                     |
| 2     | 1-17              | 31.63                     | 6     | 1-25              | 31.88                     |
|       | 17-19             | 27.92                     |       | 25-27             | 28.20                     |
|       | 19-45             | 32.12                     |       | 27-45             | 32.29                     |
| 3     | 1-19              | 31.5                      | 7     | 1-27              | 32.06                     |
|       | 19-21             | 28.36                     |       | 27-29             | 28.31                     |
|       | 21-45             | 32.36                     |       | 29-45             | 32.45                     |
| 4     | 1-21              | 31.77                     | 8     | 1-29              | 32.23                     |
|       | 21-23             | 28.37                     |       | 29-31             | 28.94                     |
|       | 23-45             | 32.34                     |       | 31-45             | 32.21                     |

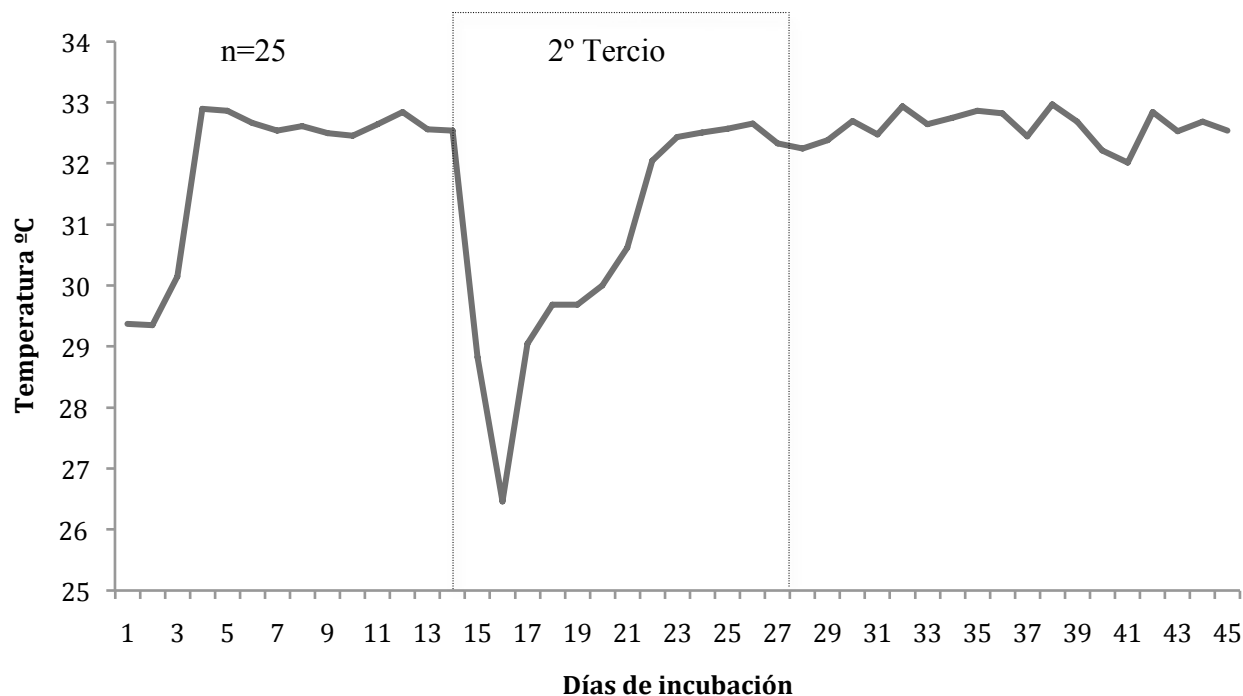


Figura 18. Temperatura de incubación del grupo 1 en el experimento 2008 donde se realizó el cambio de temperatura a partir del día 15 de incubación.

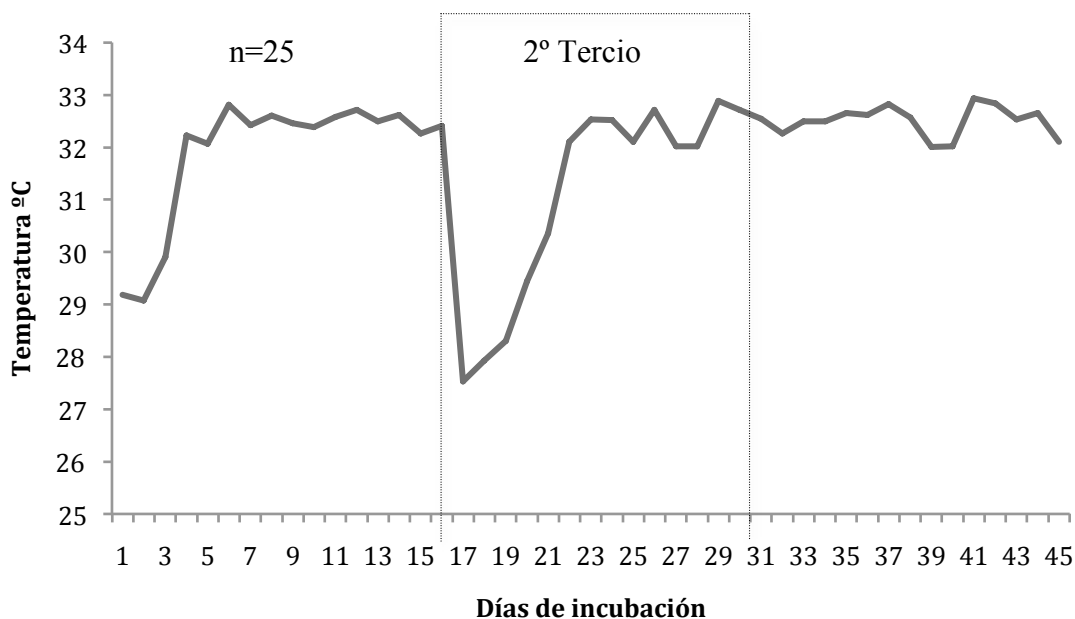


Figura 19. Temperatura de incubación del grupo 2 en el experimento 2008 donde se realizó el cambio de temperatura a partir del día 17 de incubación.

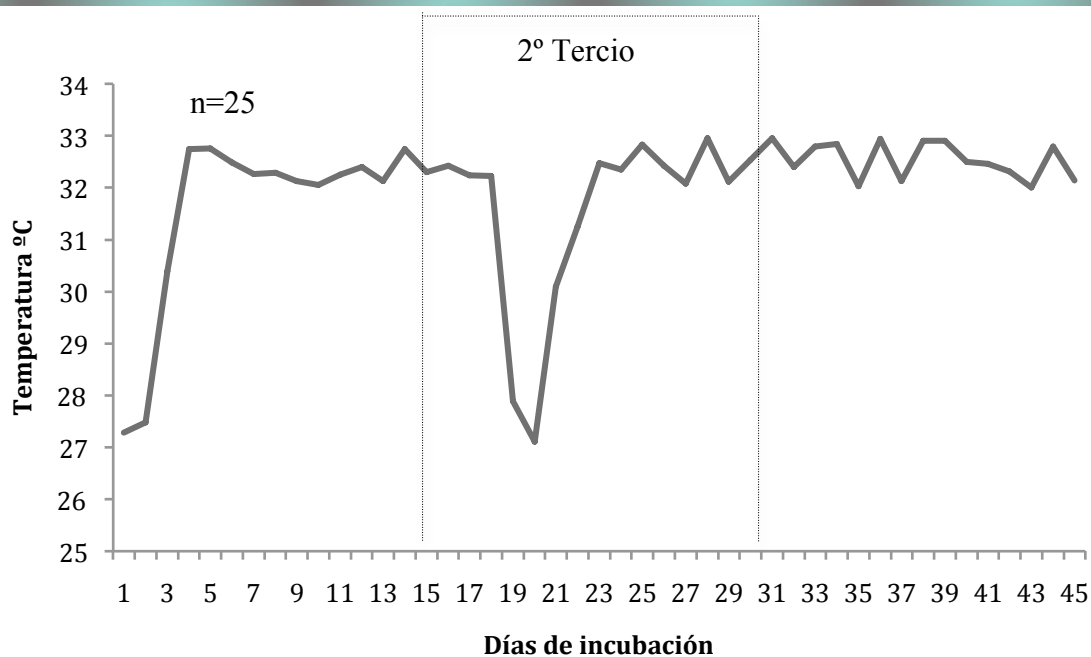


Figura 20. Temperatura de incubación del grupo 3 en el experimento 2008 donde se realizó el cambio de temperatura a partir del día 19 de incubación.

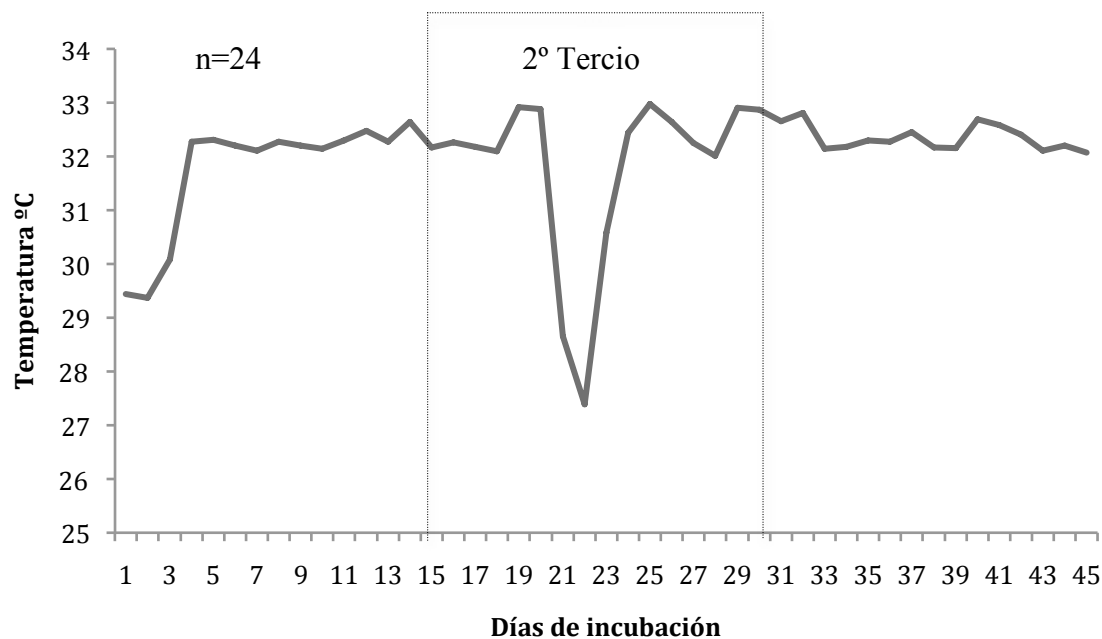


Figura 21. Temperatura de incubación del grupo 4 en el experimento 2008 donde se realizó el cambio de temperatura a partir del día 21 de incubación.

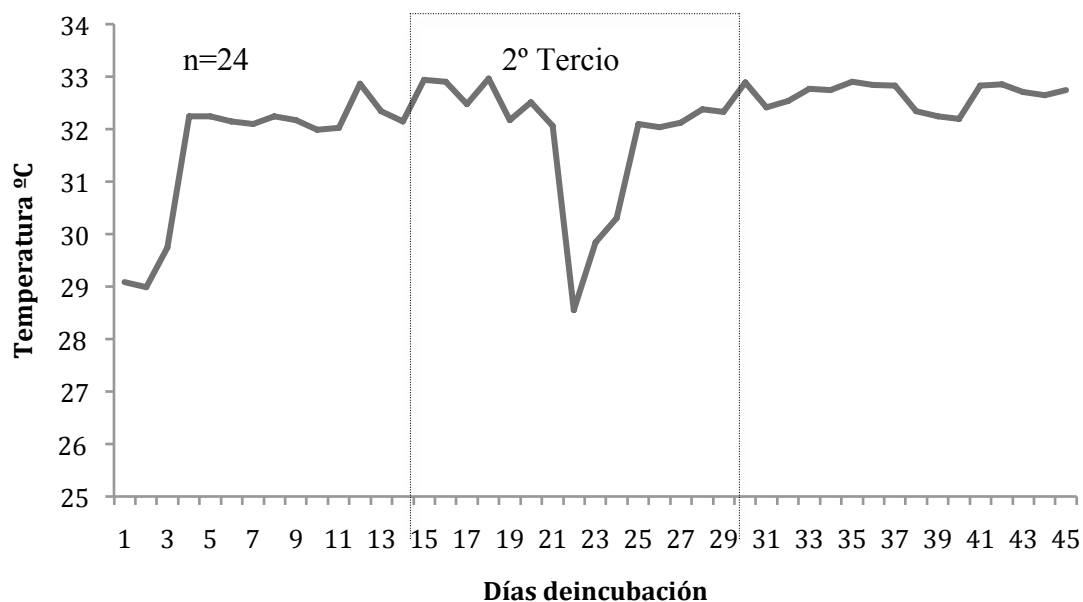


Figura 22. Temperatura de incubación del grupo 5 en el experimento 2008 donde se realizó el cambio de temperatura a partir del día 23 de incubación.

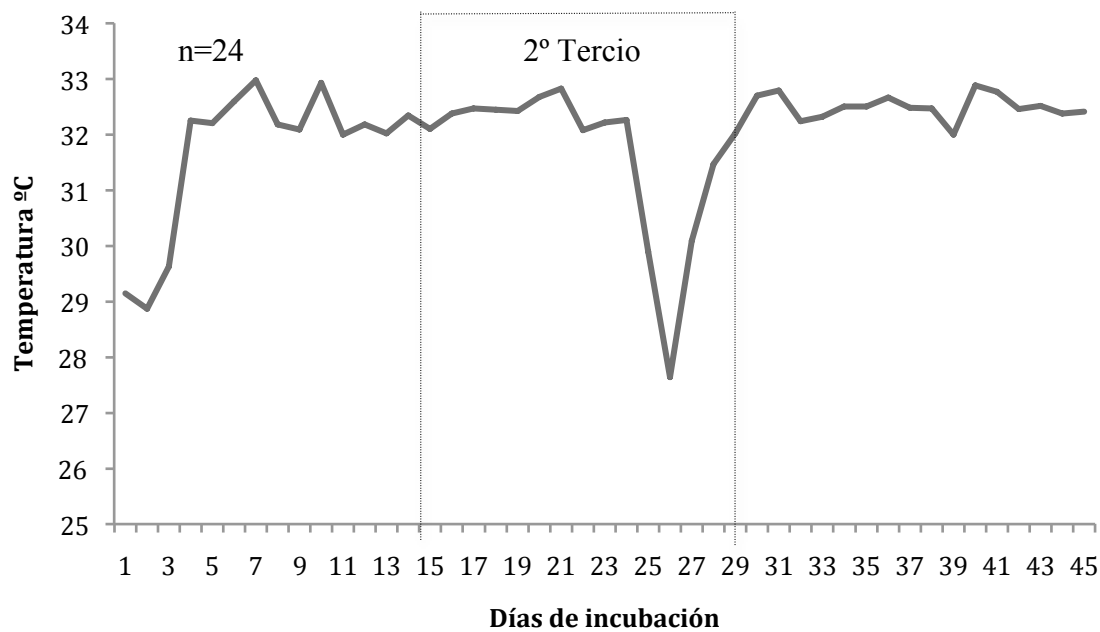


Figura 23. Temperatura de incubación del grupo 6 en el experimento 2008 donde se realizó el cambio de temperatura a partir del día 25 de incubación.

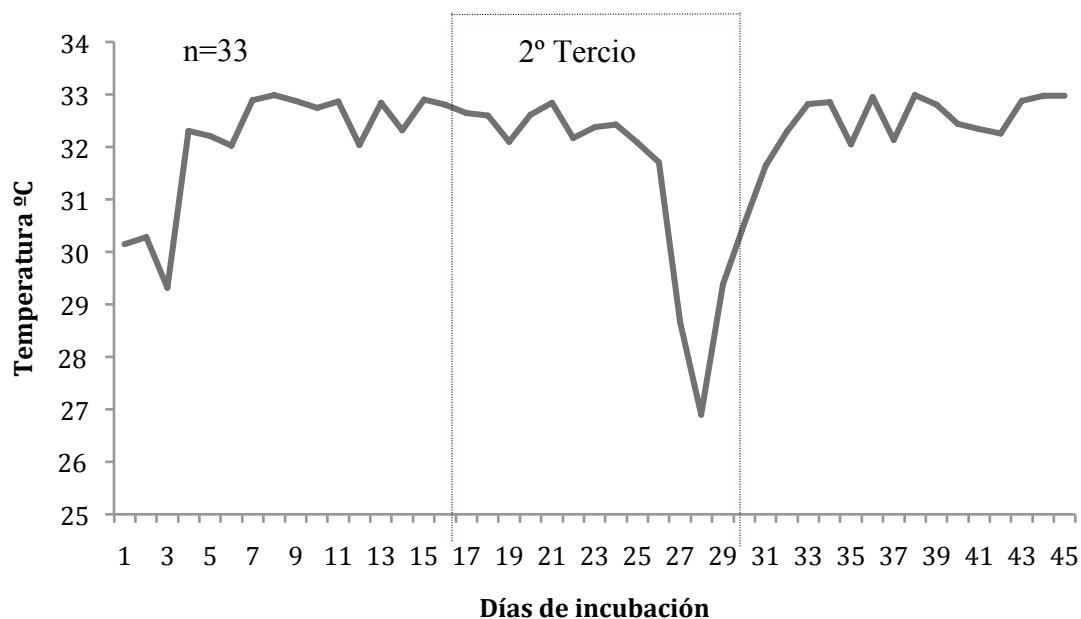


Figura 24. Temperatura de incubación del grupo 7 en el experimento 2008 donde se realizó el cambio de temperatura a partir del día 27 de incubación.

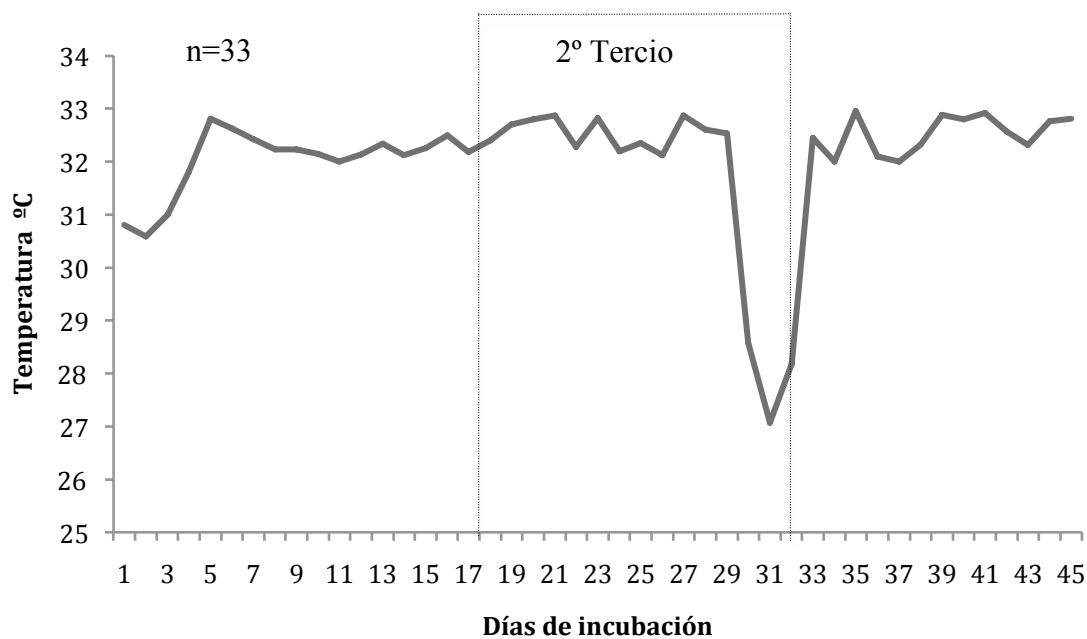


Figura 25. Temperatura de incubación del grupo 8 en el experimento 2008 donde se realizó el cambio de temperatura a partir del día 29 de incubación.

### 3.2. ECLOSIÓN

#### EXPERIMENTO 2007

En los cuatro grupos se calculó el porcentaje de eclosión, sobrevivencia, mortalidad y de huevos sin desarrollo (Fig. 26). En el grupo 2 se encontró el más alto porcentaje de eclosión, esto probablemente se debió a que no se realizaron cambios de temperatura durante el periodo de incubación ya que fue uno de los grupos testigo (incubado a temperatura feminizante). En contraste con el porcentaje de eclosión, el de mortalidad fue mayor en el grupo 2 que en el grupo 1 (grupo testigo incubado a temperatura masculinizante). Algunas de las crías que eclosionaron del grupo 2 se encontraban débiles, les faltaba reabsorber vitelo y no lograron sobrevivir, razón por la que la mortalidad es mayor que en el grupo 1. En el grupo 3 se encontró el más alto porcentaje de mortalidad aunque no haya eclosión ni sobrevivencia, ya que para la mortalidad se consideran las crías y los embriones muertos. En el grupo 4 se observó un 11% de eclosión, sin embargo la mortalidad fue muy alta. En el caso del porcentaje de eclosión se consideró a aquellas crías que salen del huevo por sus propios medios, aunque posteriormente murieron.

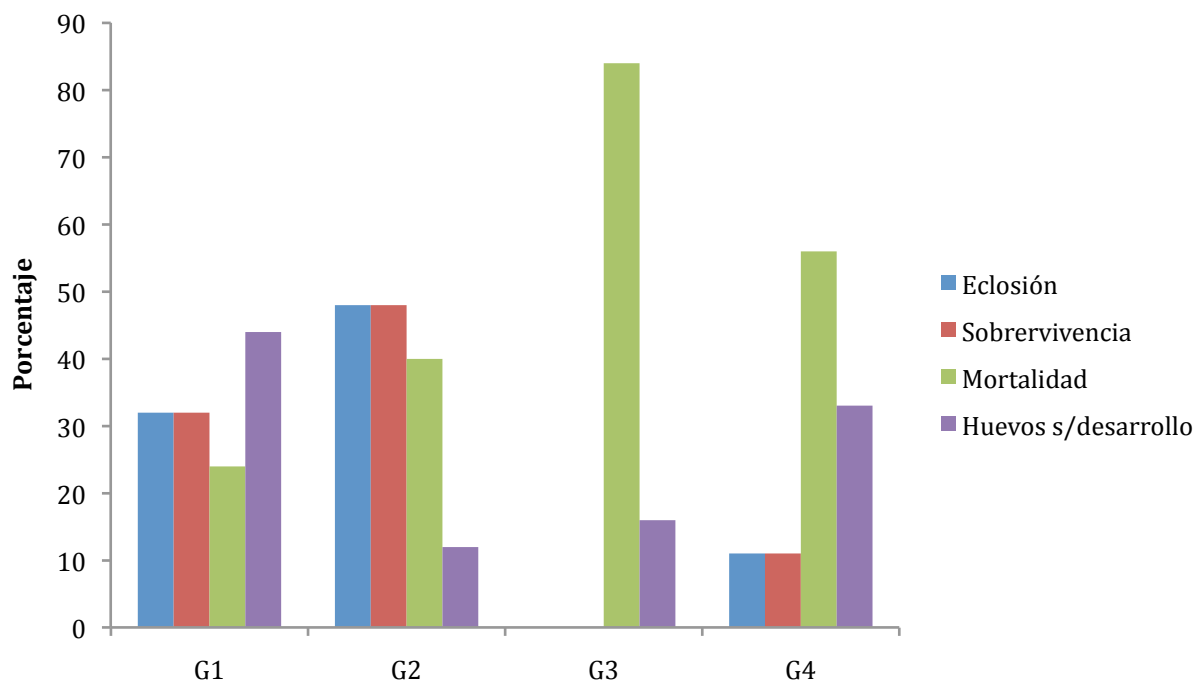


Figura 26. Porcentaje de eclosión, supervivencia, mortalidad y huevos sin desarrollo de los cuatro grupos del experimento 2007.



### **Análisis de los huevos no eclosionados**

Los embriones muertos que se obtuvieron al terminar la incubación, fueron separados en tres etapas de desarrollo morfológico (Tabla 7). En los cuatro grupos el mayor número de embriones que se observaron se encontraban en la etapa 1 (Fig. 27), siendo el grupo 3 el que presentó el mayor número de embriones en esta etapa. Expresado en días, estos embriones murieron antes de llegar al día 15 de incubación. Además, este grupo es el que presentó el mayor número de embriones en la etapa 3 (Fig. 29) por lo que solo les restaba reabsorber vitelo. En los grupos testigo (grupo 1 y grupo 2) predominaron los embriones en la etapa 1 y etapa 2 (Fig. 28).

Tabla 7. Número de embriones encontrados en cada etapa de desarrollo en el experimento 2007.

| Etapa | Grupo 1 | Grupo 2 | Grupo 3 | Grupo 4 |
|-------|---------|---------|---------|---------|
| 1     | 4       | 5       | 13      | 5       |
| 2     | 1       | 2       | 4       | 4       |
| 3     | 1       | 3       | 4       | 1       |

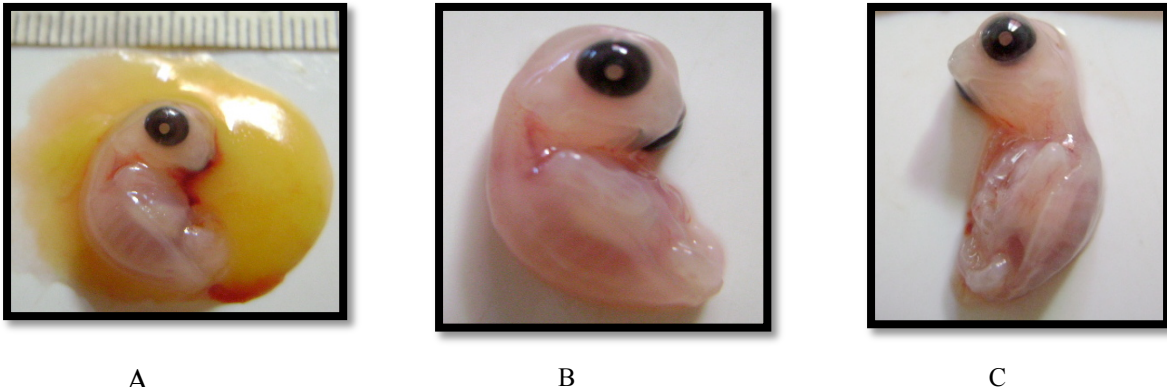


Figura 27. Embriones de *Lepidochelys olivacea* en la etapa 1 de desarrollo. A) Comienza la coloración de la retina. B) Se forma el caparazón y plastron. C) Aparecen las extremidades anteriores.

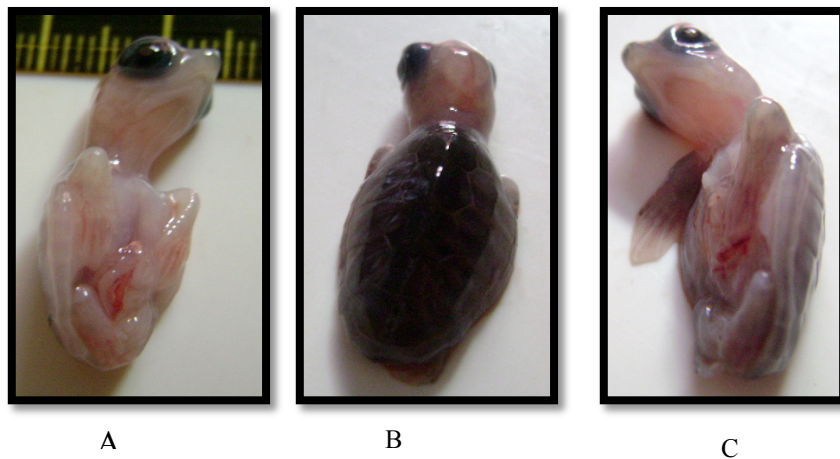


Figura 28. Embriones de *Lepidochelys olivacea* en la etapa 2 de desarrollo. A) El iris está pigmentado. B) El caparazón ya tiene una coloración definida. C) La periferia del caparazón está completa.

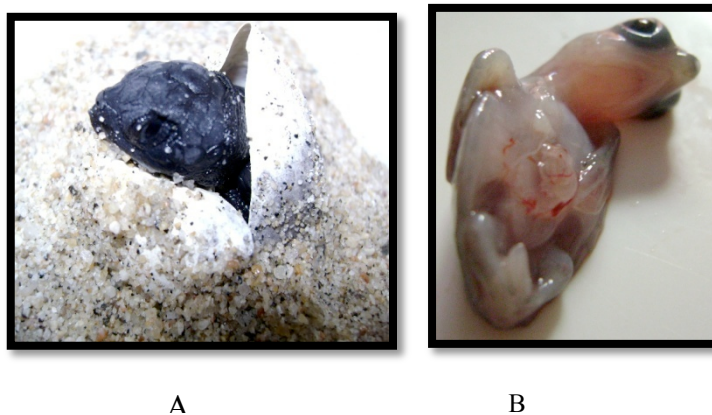


Figura 29. Embriones de *Lepidochelys olivacea* en la etapa 3 de desarrollo. A) La cabeza está totalmente pigmentada. B) El vitelo está casi completamente dentro del abdomen.

## EXPERIMENTO 2008

En este experimento los porcentajes de eclosión y supervivencia fueron mayores al 80% en todos los grupos. El primer grupo testigo (grupo 9, incubado 54 días a temperatura masculinizante) presentó un 84% de eclosión mientras que en el segundo grupo testigo (grupo 10, incubado los 45 días a temperatura feminizante) todas las crías eclosionaron y sobrevivieron (Fig. 30). En los grupos 3, 5 y 6 se obtuvo un 96% de eclosión y solo un huevo en cada grupo no se desarrolló. Los grupos 7 y 8 son los que presentaron el menor porcentaje de eclosión y supervivencia y el mayor porcentaje de mortalidad y de huevos sin desarrollo. Estos dos grupos pertenecieron al mismo nido (Nido 3) el que contenía el menor número de huevos. En el grupo 8 se obtuvo el 71% de eclosión, sin embargo una cría murió en la arena antes de salir a la superficie de la caja de incubación por lo que el porcentaje de supervivencia fue menor (68%) (Fig. 30).

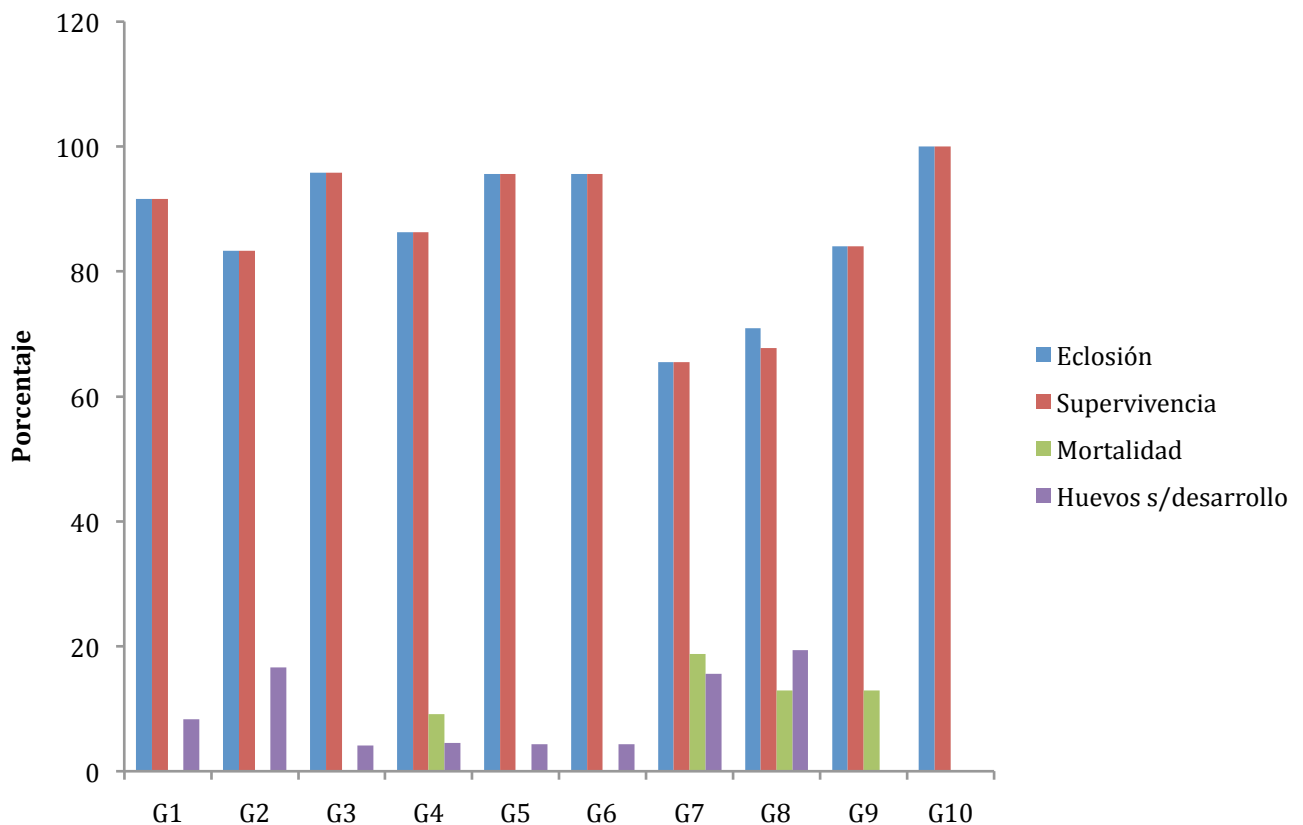


Figura 30. Porcentaje de eclosión, supervivencia, mortalidad y huevos sin desarrollo de los diez grupos del experimento 2008.

### **Análisis de los huevos no eclosionados**

Se encontraron en los grupos 4, grupo 7, grupo 8 y grupo 9 huevos no eclosionados que contenían embriones en diferentes etapas de desarrollo. En el grupo 4 se encontraron dos embriones muertos, uno se desarrolló hasta la etapa 2, que expresado en días de incubación, fue entre el día 29 y 30. Mientras que el segundo embrión se encontraba en la etapa 3, que en días de incubación corresponde del día 31 al 45. Dentro del grupo 7, dos embriones murieron entre el día 25 y 31, por lo que se encontraban en la etapa 2 y 4 embriones se encontraban en la última etapa del desarrollo embrionario ya que solo le restaba reabsorber vitelo. De igual manera, en los grupos 8 y grupo 9 los embriones que murieron se encontraban en la última etapa, ya que habían completado su desarrollo y solo les restaba reabsorber vitelo (Tabla 8).

Tabla 8. Número de embriones encontrados en cada etapa de desarrollo en el experimento 2008.

| Etapa | Grupo 4 | Grupo 7 | Grupo 8 | Grupo 9 |
|-------|---------|---------|---------|---------|
| 1     | 0       | 0       | 0       | 1       |
| 2     | 1       | 2       | 0       | 0       |
| 3     | 1       | 4       | 3       | 3       |

### **3.2.1. DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA Y ANÁLISIS MORFOMÉTRICO**

Las gónadas se localizaron en la parte ventral de los riñones y se distinguieron claramente por ser estructuras alargadas de color blanco a amarillo tenue. Al realizar las observaciones macroscópicas en ambos experimentos, se clasificaron las gónadas en hembras, machos e indiferenciados (Fig. 31). Posteriormente se tomaron las medidas de las gónadas disectadas de las crías posteclosión, en cada experimento No se aplicó una prueba estadística ya que son muy pocas muestras las que se obtuvieron. Sin embargo, en la Tabla 8 se observa que no existe diferencias entre el tamaño de la gónada entre los cuatro grupos del experimento 2007. Sin embargo el grupo 2 es el que presenta los valores más altos.

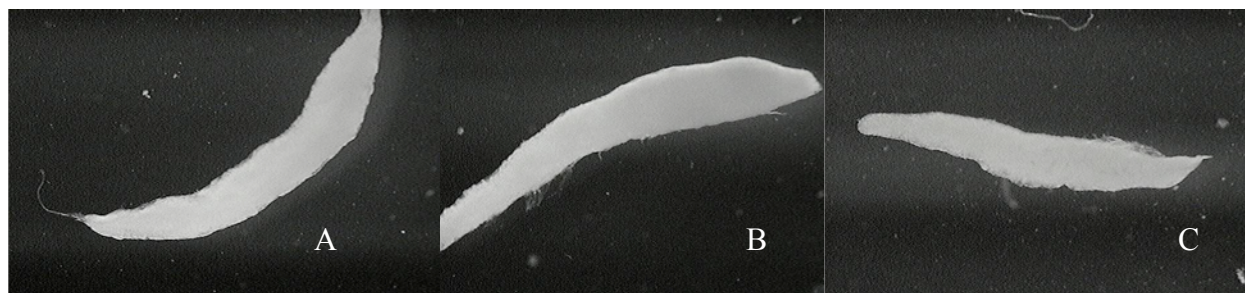


Figura 31. Gónadas de crías de *Lepidochelys olivacea* al momento de nacer. A) Hembra; B) Macho; C) Indiferenciado.

Tabla 9. Tamaño promedio de gónadas de *Lepidochelys olivacea* al momento de nacer.

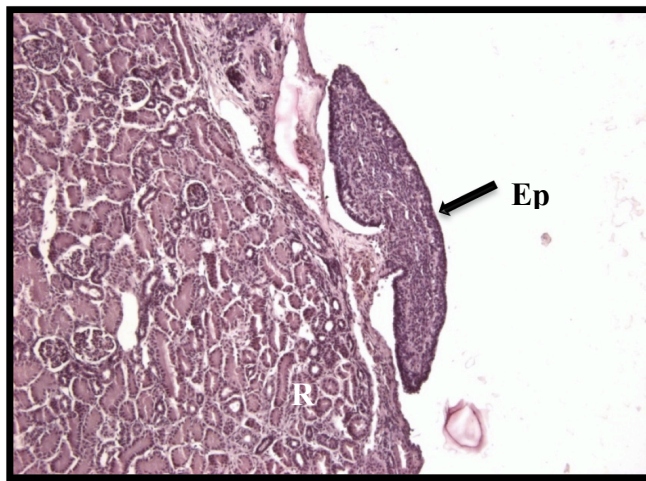
|                     | Grupo | Longitud total | Anchura máxima |
|---------------------|-------|----------------|----------------|
| Experimento<br>2007 | 1     | 5.39           | 0.56           |
|                     | 2     | 5.81           | 0.83           |
|                     | 3     | 3.82           | 0.57           |
|                     | 4     | 4.8            | 0.78           |
| Experimento<br>2008 | 1     | 4.67           | 0.75           |
|                     | 2     | 5.04           | 0.80           |
|                     | 3     | 5.97           | 0.69           |
|                     | 4     | 4              | 0.55           |
|                     | 5     | 3.73           | 0.54           |
|                     | 6     | 4.76           | 0.53           |
|                     | 7     | 4.47           | 0.65           |
|                     | 8     | 4.6            | 0.64           |
|                     | 9     | 5.15           | 0.69           |
|                     | 10    | 4.86           | 0.58           |

### 3.2.1. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

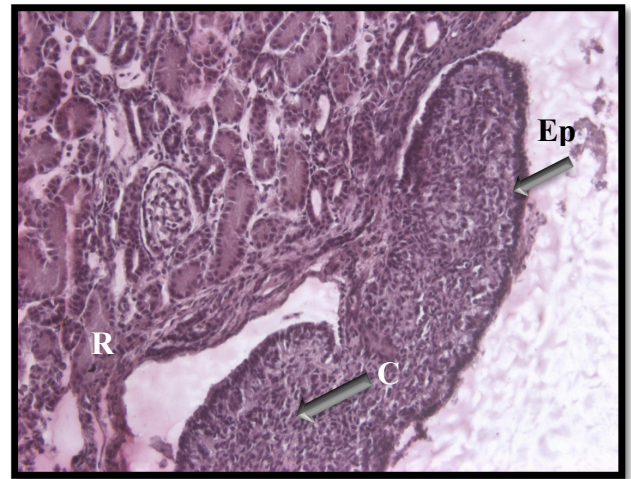
En las crías que se analizaron con la técnica histológica se distinguió un ovario de un testículo porque en el ovario se encuentra un epitelio germinal conspicuo en la superficie exterior del mismo (Fig. 32a) que forma extensiones dentro de la médula, lo cual se asocia con los canales superficiales



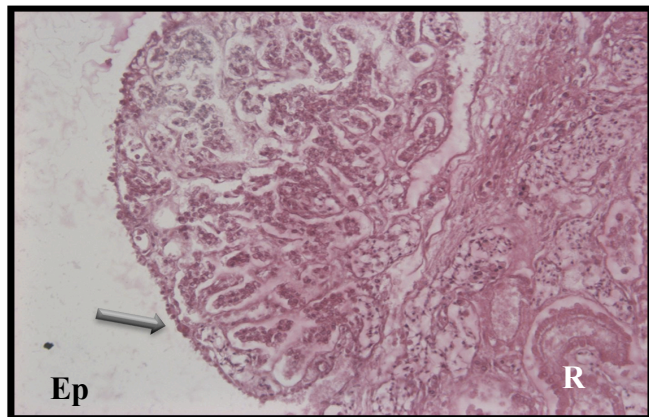
que se presentan (Fig. 32b). En los testículos el epitelio germinal es más delgado y los cordones primarios forman túbulos seminíferos con diámetros que son de dos a cuatro veces más grandes que los cordones primarios de las hembras (Fig. 32c). Las gónadas que presentaban características poco evidentes de ovario o testículo por lo general se observaban con un epitelio germinal engrosado y una gran cantidad de cordones medulares con algunas células germinales se clasificaron como indiferenciados (Fig. 33).



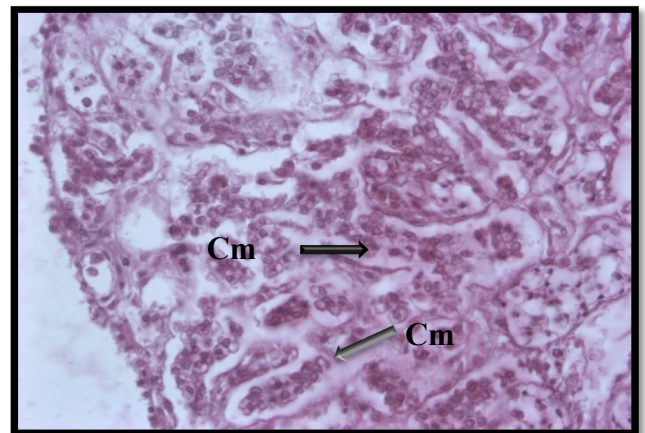
**a** (10X)



**b** (20X)



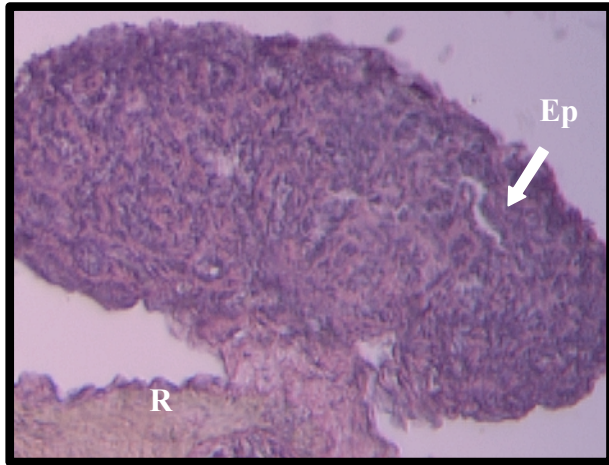
**c** (10X)



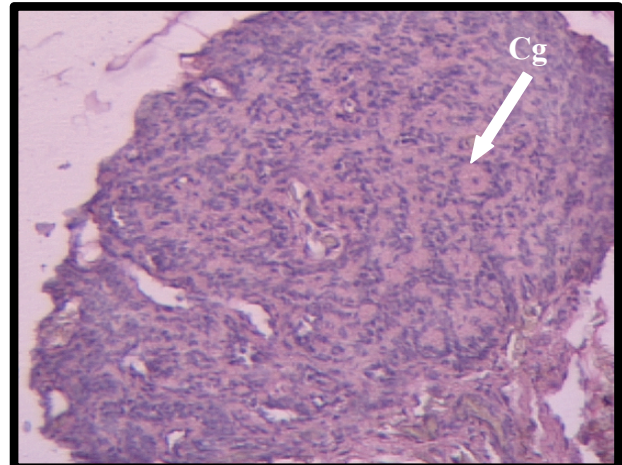
**d** (40X)

Figura 32. Microfotografías de gónadas de *Lepidochelys olivacea*. a) y b) ovario, c) y d) testículo. R= riñón; Ep= epitelio; C= corteza; Cm= cordones medulares.

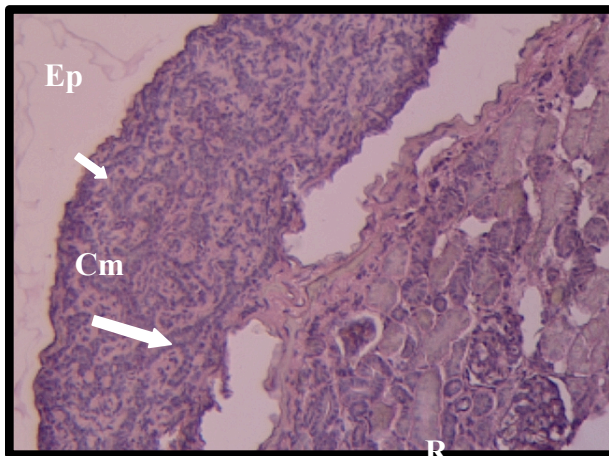




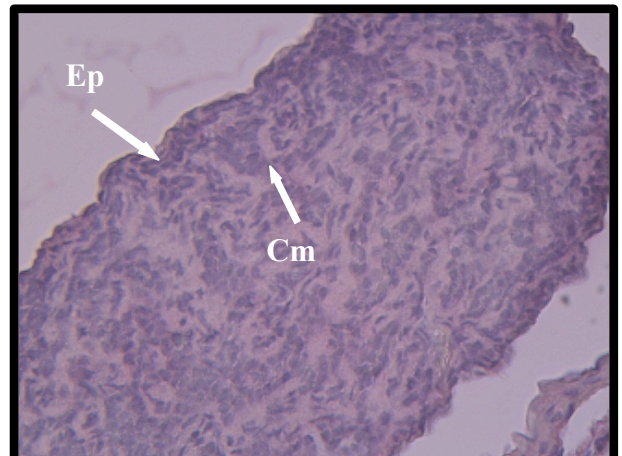
**a** (10X)



**b** (10X)



**c** (10X)



**d** (20X)

Figura 33. Microfotografías de gónadas indiferenciadas de *Lepidochelys olivacea*. EP= epitelio; R= riñón; Cg= células germinales; Cm= cordones medulares.

En algunas crías se puede distinguir un testículo de un ovario desde el momento de la eclosión. Sin embargo esto no se observó en todos los grupos de ambos experimentos, pues también se encontraron gónadas indiferenciadas (Tabla 10).

Tabla 10. Sexo obtenido después del análisis histológico de las crías al momento de nacer en cada experimento y cada grupo.

|                  | Grupo | Machos | Hembras | Indiferenciados |
|------------------|-------|--------|---------|-----------------|
| Experimento 2007 | 1     | 3      | 0       | 4               |
|                  | 2     | 0      | 5       | 6               |
|                  | 3     | 5      | 0       | 2               |
|                  | 4     | 2      | 1       | 3               |
| Experimento 2008 | 1     | 1      | 0       | 1               |
|                  | 2     | 1      | 0       | 1               |
|                  | 3     | 0      | 2       | 0               |
|                  | 4     | 2      | 0       | 0               |
|                  | 5     | 2      | 0       | 0               |
|                  | 6     | 1      | 1       | 0               |
|                  | 7     | 0      | 3       | 0               |
|                  | 8     | 0      | 4       | 0               |
|                  | 9     | 2      | 0       | 0               |
|                  | 10    | 0      | 1       | 1               |

### 3.3. CULTIVO

Para observar los cambios en las gónadas de las crías se cultivaron durante seis meses 19 crías en el experimento 2007 y 188 crías en el experimento 2008. Durante el cultivo, solo en el experimento 2008 se murieron 17 crías sin que fueran parte de la muestra mensual (Fig. 34). Los grupos 7 y grupo 8 presentaron el más alto porcentaje de crías muertas, seguidos por los grupos testigo (grupo 9 y grupo 10). La muerte de estas crías fue provocada por las mordeduras que se observaron principalmente en las aletas y en la cabeza (Fig. 35).

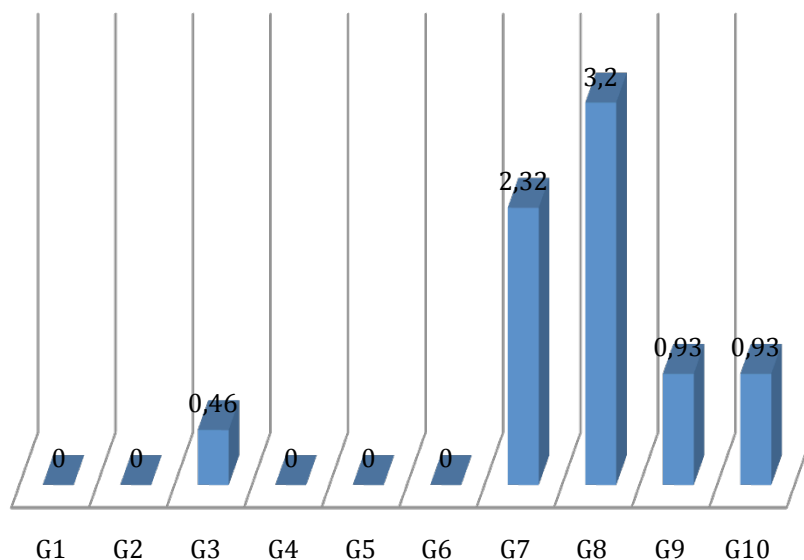


Figura 34. Porcentaje de crías muertas en cada grupo durante seis meses de cultivo en el experimento 2008.



Figura 35. Crías de *Lepidochelys olivacea* muertas por mordeduras durante el cultivo del experimento 2008. A) Heridas en la cabeza con pérdida del ojo izquierdo; B) y C) Mordeduras en las extremidades con amputación de las mismas.

Durante el cultivo se registró el peso de cada organismo y los resultados se presentan en el Anexo 3. Es de destacar que en el momento de la eclosión, la distribución del grupo 7 no difiere significativamente con las de los grupo grupo 5 y grupo 6, a pesar de que en la gráfica se muestra un traslape mínimo, debido a que las distribuciones se complementan y según la prueba no se puede rechazar que provengan de una distribución común. Por el contrario, los grupos grupo 6 y el grupo 10 presentan diferencias significativas a pesar del traslape tan grande que tuvieron, posiblemente debido a la diferente agudeza de las distribuciones, pues en el caso de la del grupo 10, los datos están más concentrados en la moda.

Desde el momento de la eclosión se logra observar en el diagrama de frecuencias, que el grupo 7 y 8 son los que presentan los valores más bajos en peso (Anexo 3). Este comportamiento se repite a lo largo de los seis meses de cultivo. Seguido de estos dos grupos, en el grupo 9 los organismos presentaron un bajo peso. El grupo 9 fue incubado a temperatura masculinizante por lo que se esperaría que todos fueran machos. Durante el mes 4 en los grupos 3 y 5, los organismos presentaron pesos muy variados, desde menos de 30 hasta más de 50 g, sin embargo, al siguiente mes esta variación desaparece, siendo de nuevo los grupos 7 y 8 los que presentan los valores más bajos.

### **3.3.1. DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA Y ANÁLISIS MORFOMÉTRICO**

En los experimentos 2007 y 2008, durante el cultivo se observaron cambios morfológicos en las gónadas de las crías. Al momento de nacer y en el primer mes la gónada se observa casi transparente y con bordes poco evidentes, conforme pasan los meses la gónada se va engrosando y dejó de verse translúcida, esto se puede observar en los meses 5 y 6 (Fig. 36). Estos cambios en las gónadas durante el cultivo no fueron suficientes para diferenciar hembras y machos mediante observación macroscópica, por lo que para separar los sexos se recurrió al análisis morfométrico e histológico.



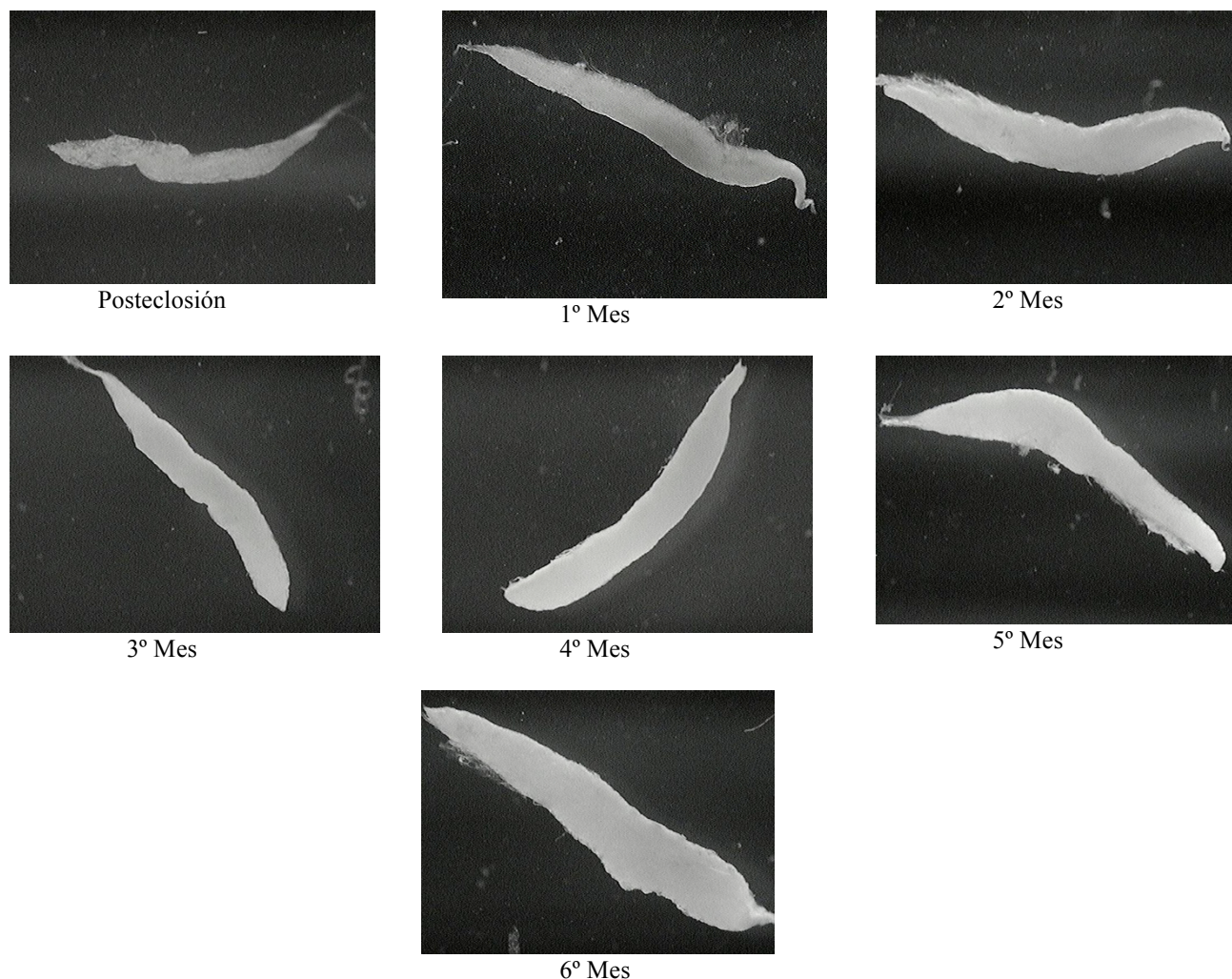


Figura 36. Gónadas de crías de *Lepidochelys olivacea* durante los seis meses de cultivo. Posteclosión (hembras); del mes 1 al 6 no se distinguen claramente los sexos.

## EXPERIMENTO 2007

Se tomaron las medidas de longitud total y anchura máxima de las gónadas en las crías cultivadas de los grupos 1 y grupo 2. El grupo 1 (incubado a temperatura masculinizante) no presentó diferencias en la anchura máxima de la gónada con respecto al tiempo, ya que el primer mes es el que tiene el valor más alto (Tabla 11). De la misma manera la longitud total de la gónada tampoco está relacionada con la edad, puesto que el organismo sacrificado al cuarto mes es el que tiene el valor más alto. En el grupo 2 (incubado a temperatura feminizante) se presentó un comportamiento similar que en el grupo 1, ya que

no existe una relación entre la longitud total y anchura máxima de la gónada con respecto al tiempo. Debido a que en el grupo 2 se tenían pocos organismos, se dejó una cría hasta los seis meses para poder cubrir, este periodo al igual que el grupo 1.

Tabla 11. Medidas morfométricas de las gónadas en crías durante seis meses de cultivo en el experimento 2007.

| Mes | Grupo 1             |                     | Grupo 2             |                     |
|-----|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|     | Longitud total (mm) | Anchura máxima (mm) | Longitud total (mm) | Anchura máxima (mm) |
| 0   | 5.39                | 0.56                | 5.81                | 0.34                |
| 1   | 5.39                | 1.3                 | 5.39                | 1.3                 |
| 2   | 8.42                | 0.86                | 7.92                | 0.87                |
| 3   | 10.15               | 0.93                | 11.03               | 1.12                |
| 4   | 11.06               | 0.75                | -                   | -                   |
| 5   | 7.5                 | 1.16                | -                   | -                   |
| 6   | 9.17                | 0.63                | 11.66               | 2.09                |

Debido a que el número de organismos que se tomaron cada mes fue muy bajo, no fue posible aplicar alguna prueba estadística para saber si existe alguna relación entre las medidas seleccionadas.

## EXPERIMENTO 2008

Las medidas morfométricas que se tomaron de las gónadas de las crías desde la eclosión hasta los primeros seis meses de vida se muestran en el Anexo 4. La mayoría de las regresiones no fueron significativas. Éstas se presentaron principalmente en los datos combinados para hembras, machos e indiferenciados (global). Para hembras sólo hubo dos regresiones significativas, una para indiferenciados y otra para los machos. En las relaciones del global, las pendientes indican que la anchura está entre el 6 y el 12% del largo y no se muestra una tendencia clara de este parámetro ocasionada por el crecimiento de los organismos.

Aunque el valor de la ordenada al origen es menor de 1 mm en todos los casos, la corrección que hace este parámetro a la proporcionalidad entre ambas variables es considerable, sobre todo en los organismos pequeños (Anexo 4).



Posterior a este análisis se obtuvieron las correlaciones en cada grupo durante los seis meses de cultivo (Anexo 5). Se encontró que sólo en los grupos 5 y 7 existe una relación lineal entre las medidas de la gónada para cada sexo. En ambos casos las pendientes correspondientes a machos y a hembras fueron significativamente diferentes (G5:  $t=2.65$ ,  $p=0.0086$ ; G7:  $t=17.29$ ,  $p=1.28e-11$ ), es decir, estos modelos permiten separar la anchura de las gónadas de hembras y machos en términos de la longitud total. En ambos grupos, las gónadas de las hembras son más anchas que las de los machos a la misma longitud total (gráficas G5 y G7 del Anexo 5). Sin embargo, este resultado no es generalizable ni tampoco atribuible a las condiciones de la incubación, ya que en los demás grupos no fue observado.

### 3.3.2. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Después del análisis morfométrico se procesaron las gónadas con la técnica histológica y se observaron el número de hembras, machos e indiferenciados en cada grupo para el Experimento 2007 y 2008. En el Experimento 2007 se observó que en el grupo 1 desde mes 1 hasta el mes 6 las gónadas presentaban características de testículo (Fig. 37). Lo cual se esperaba al ser el grupo testigo incubado a temperatura masculinizante. En el grupo 2 a los dos meses de cultivo la gónada se observó en estado indiferenciado y es hasta el mes 3 donde comienzan a observarse algunos cambios en el epitelio y la médula de la gónada. Al pasar del mes 3 al mes 6, se observa un ovario con todas las características que se utilizan para la separación de los sexos en las gónadas de tortugas marinas, es decir, el grosor del epitelio y la presencia de una médula y corteza bien distinguibles. El grupo 2 fue el grupo testigo incubado a temperatura feminizante, por lo que se esperaba que todas las gónadas se diferenciaron en ovarios. Con estos resultados se puede suponer que en algunas crías, la temperatura de incubación no tuvo el efecto esperado en la determinación del sexo, ya que no todas crías nacen con la gónada diferenciada (Tabla 12).

Tabla 12. Sexo obtenido después del análisis histológico para cada mes y cada grupo en el experimento 2007.

| mes | Grupo 1 |   |   | Grupo 2 |   |   |
|-----|---------|---|---|---------|---|---|
|     | H       | M | I | H       | M | I |
| 1   | -       | 1 | - | -       | - | 3 |
| 2   | -       | 1 | - | -       | - | 2 |
| 3   | -       | 1 | - | -       | 1 | - |
| 4   | -       | 1 | - | -       | - | - |
| 5   | -       | 1 | - | -       | - | - |
| 6   | -       | 2 | - | -       | 1 | - |

H= hembra; M= macho; I= indiferenciado

En el experimento 2008, las crías que se analizaron por cortes histológicos se logró distinguir entre un ovario y un testículo desde el primer mes en todos los grupos, excepto en los grupos 1 y grupo 3. En estos dos grupos solo se encontraron gónadas indiferenciadas en el mes 1 (Tabla 13). Desde el mes 1 hasta el mes 5 se observaron gónadas indiferenciadas en la mayoría de los grupos, y fue el grupo 1 el que presentó el mayor número de gónadas de este tipo.

Tabla 13. Sexo obtenido después del análisis histológico para cada mes (m) y cada grupo en el experimento 2008.

| GRUPO                                                                                                                |            |   |   |            |   |   |            |   |   |            |   |   |            |   |   |            |   |   |            |   |   |            |   |   |    |   |   |     |  |  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|---|---|------------|---|---|------------|---|---|------------|---|---|------------|---|---|------------|---|---|------------|---|---|------------|---|---|----|---|---|-----|--|--|
| m                                                                                                                    | G1 (15-17) |   |   | G2 (17-19) |   |   | G3 (19-21) |   |   | G4 (21-23) |   |   | G5 (23-25) |   |   | G6 (25-27) |   |   | G7 (27-29) |   |   | G8 (29-31) |   |   | G9 |   |   | G10 |  |  |
|                                                                                                                      | H          | M | I | H          | M | I | H          | M | I | H          | M | I | H          | M | I | H          | M | I | H          | M | I | H          | M | I | H  | M | I |     |  |  |
| 1                                                                                                                    |            |   | 1 |            | 1 |   |            |   | 1 | 1          |   |   |            | 1 |   | 1          |   |   | 4          |   | 3 |            |   |   | 2  |   | 2 |     |  |  |
| 2                                                                                                                    | 1          | 1 |   | 2          | 1 |   | 3          |   |   | 3          |   |   |            | 3 |   |            | 3 |   | 3          |   |   | 2          |   |   | 3  |   | 3 |     |  |  |
| 3                                                                                                                    |            | 1 | 2 |            | 2 | 1 |            | 2 | 1 | 3          |   |   | 2          |   | 1 | 3          |   |   | 1          |   | 3 | 1          |   | 1 | 1  | 2 | 3 |     |  |  |
| 4                                                                                                                    |            | 3 | 1 | 2          | 1 |   |            | 3 | 1 | 3          |   | 1 | 2          | 1 | 1 | 4          |   |   | 2          | 1 |   |            | 1 | 2 | 4  | 1 | 4 |     |  |  |
| 5                                                                                                                    | 4          |   |   | 4          |   |   | 3          | 1 |   | 1          | 1 | 1 | 4          |   |   | 4          |   | 1 | 2          |   |   | 3          | 1 |   | 3  |   | 4 |     |  |  |
| 6                                                                                                                    |            | 5 |   |            | 4 |   |            | 4 |   | 3          |   |   | 4          |   |   | 4          |   | 3 |            |   | 3 |            |   |   | 3  |   | 5 |     |  |  |
| H= hembra; M= macho; I= indiferenciado; T= total; G=grupo (día en que se dio el pulso de temperatura masculinizante) |            |   |   |            |   |   |            |   |   |            |   |   |            |   |   |            |   |   |            |   |   |            |   |   |    |   |   |     |  |  |

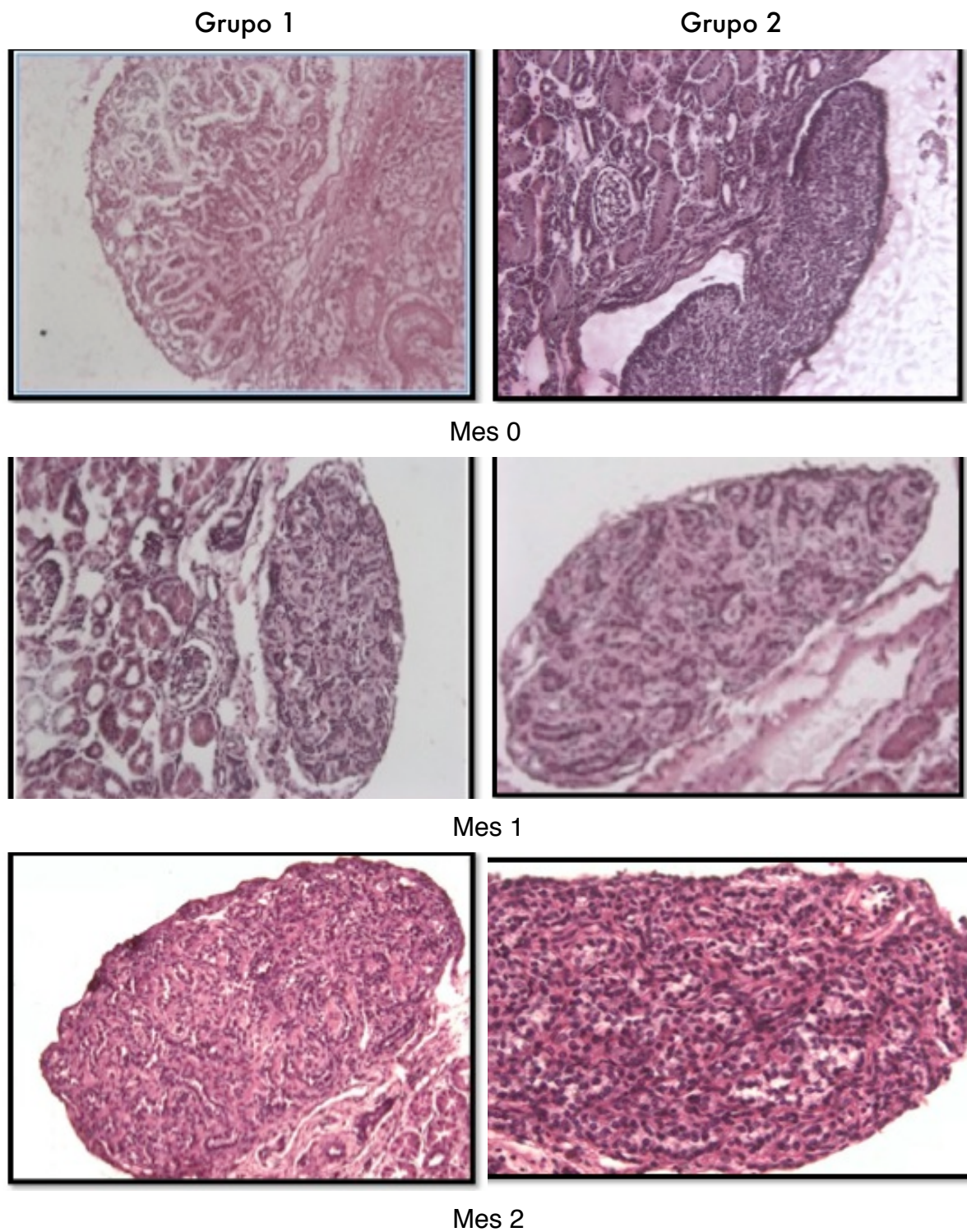
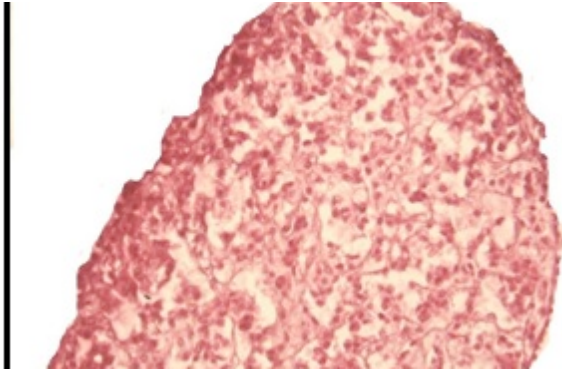


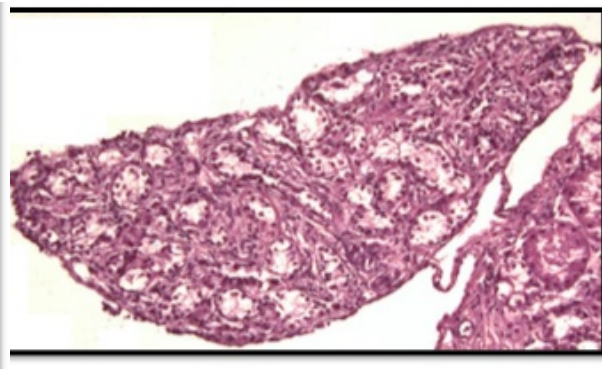
Figura 37. Microfotografías de gónadas de *Lepidochelys olivacea* durante 6 meses de cultivo en el experimento 2007.



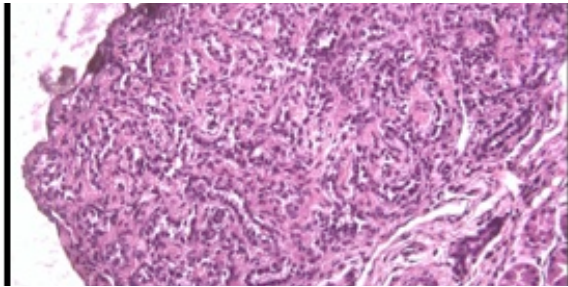
Grupo 1



Grupo 2

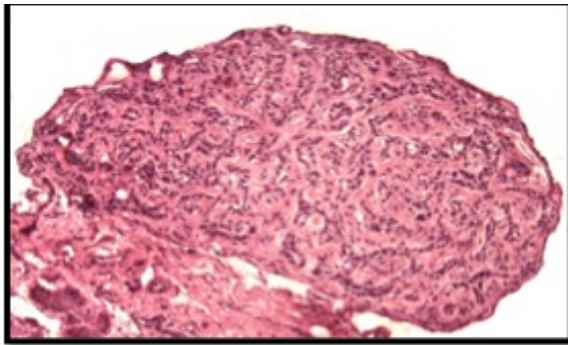


Mes 3



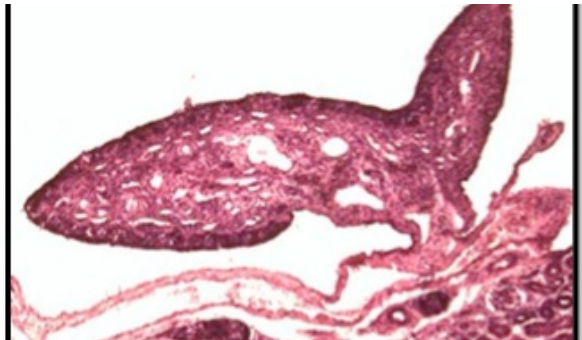
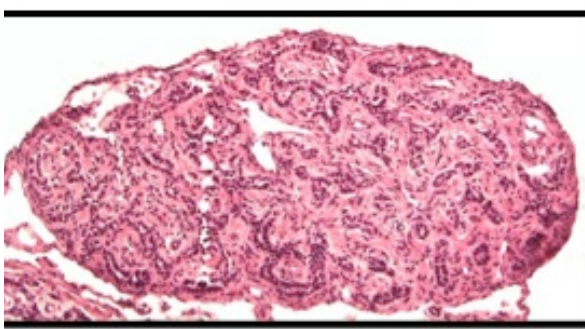
No se tomó muestra

Mes 4



No se tomó muestra

Mes 5



Mes 6

Figura 37. Microfotografías de gónadas de *Lepidochelys olivacea* durante 6 meses de cultivo en el experimento 2007.

## 4. DISCUSIÓN

### Temperatura de incubación

Durante los experimentos de 2007 y 2008 se observó que el periodo de incubación duró 45 días en los grupos que se incubaron a temperatura feminizante, como se ha reportado por varios autores para *L. olivacea*. Las variaciones que se han encontrado en algunos experimentos en cuanto a los días en que tardan en eclosionar los huevos, corresponden a las variaciones que se realizan durante el segundo tercio del periodo de incubación. Aunque el grupo 4 del experimento 2007 y en los ocho primeros grupos del experimento 2008 estuvieron sujetos a cambios durante el periodo termosensitivo, no se observó un cambio en la duración del periodo total de incubación. El grupo incubado a temperatura masculinizante (28°C) en el experimento 2008, el periodo de incubación duró 54 días, siendo que Peñaflores-Salazar *et al.* (1998) encontraron que los huevos de *L. olivacea* incubados a 28°C eclosionaban a los 60 días. Sin embargo, estos autores mencionan que el traslado de los huevos recolectados en Oaxaca, fue de más de 24 horas, mientras que en los experimentos realizados en este trabajo, el tiempo transcurrido desde la puesta de los huevos, hasta su colocación en las cajas para su incubación, no fue de más de 7 horas, lo cual pudiera haber afectado de alguna manera la duración del periodo total de incubación.

### Eclosión

El porcentaje de eclosión encontrado en el experimento 2007 fue muy bajo en los cuatro grupos. Esto pudo deberse principalmente a la falta de humedad en la arena, ya que en este experimento no se contó con un sensor de humedad que ayudara a monitorear este factor. Al finalizar la incubación y observar los huevos que no eclosionaron en los cuatro grupos, mostraban signos de desecación. Al mismo tiempo, las crías que eclosionaron se observaron débiles y tardaron en ser activas. Otro de los factores que pudieron haber afectado la eclosión fue la falta de oxigenación de la arena dentro de las cajas de incubación, lo cual pudo haberse evitado al remover la arena constantemente hasta donde se encontraban los sensores de temperatura. Estas particularidades solo se pueden deducir con la experiencia en la incubación de huevos ya que en la literatura no se reportan este tipo de actividades. Al observar las etapas en las que se encontraban los embriones que murieron de los cuatro grupos, se puede decir que el desarrollo de los embriones se vio interrumpido desde los primeros quince días de

incubación por lo que los cambios de temperatura que se realizaron no tuvieron algún efecto en la muerte de los mismos.

En el experimento 2008, los porcentajes de eclosión que se obtuvieron en de cada uno de los grupos, fue mayor que en el experimento 2007, debido a que el manejo de los huevos desde la recolecta, el traslado y el tratamiento que se les dio durante la incubación se realizó con mayor cautela. Esto provocó que solo en tres grupos (grupo 2, grupo 7 y grupo 8) se encontró un porcentaje mayor del 15% de huevos sin desarrollo. Este porcentaje es mayor a lo reportado por Merchant *et al.* (1997) para la incubación en laboratorio de *L. olivacea*, sin embargo los grupos 7 y 8 provenían de un nido que desde la playa ya se encontraba deteriorado debido a que al hacer la recolecta de este nido, el total de huevos era de 130, sin embargo solo 66 se encontraban en buen estado, el resto se desechó pues como lo han reportado Bellairs y Attridge (1975), la calidad de los huevos depende de una textura, espesor y turgencia características para considerarlos viables. Los huevos que se desecharon presentaban un color amarillento, poco turgentes y el olor que despedían era a descomposición. Estos factores fueron suficientes para descartarlos como huevos viables. El resto de la nidada presentaba características típicas de huevos sanos como son color blanco, turgentes, firmes y sin expedir olor (Carrasco-Águila, 2000). Es probable que los huevos de los grupos 7 y 8 hayan sido los que presentaron el menor número de embriones implantados y que a su vez los embriones que se desarrollaron se encontraban más susceptibles a los cambios de temperatura durante la incubación.

De los dos embriones muertos encontrados en el grupo 4, uno se encontraba en la etapa 2 de la clasificación propuesta por Miller (1985), que expresado en días es entre el 29 y 30. Mientras que el segundo embrión se encontraba en la etapa 3 que en días corresponde del 31 al 45. En este grupo, el cambio de temperatura se inició en el día 21 y finalizó el 23, por lo que la muerte de ambos embriones fue después de estos días y no se debió al cambio de temperatura. En el grupo 7, el pulso de temperatura masculinizante se inició en el día 27 y terminó el día 29 por lo que los dos embriones que se encontraban en la etapa 2 fueron afectados por la variación de la temperatura. En el grupo 8 los tres embriones que murieron ya habían completado su desarrollo y solo les restaba reabsorber vitelo por lo que su muerte no fue influenciada por el cambio de temperatura.



### **Análisis macroscópico y análisis morfométrico**

Con los resultados obtenidos en ambos experimentos, se observa que con la morfología de las gónadas se identificaron hembras, machos e indiferenciados, utilizando el criterio de Ordoñez (1998).

Con las medidas morfométricas de las gónadas de las crías al nacer, se observa que no existen diferencias entre los grupos.

### **Análisis histológico**

Al identificar el sexo en ambos experimentos mediante la técnica histológica se encontró que al nacer algunas de las crías aún no se diferenciaba el sexo. Esto difiere de muchos trabajos en los cuales se afirma que la determinación sexual ocurre dentro del periodo de incubación y que al nacer las crías ya se pueden separar en machos o hembras.

### **Cultivo**

Durante el cultivo, 17 crías murieron sin ser parte de la muestra mensual. Esto se pudo deber a que la densidad en los estanques era muy alta. Márquez-Millán (1991), recomienda que para un buen crecimiento se deba tener 10 crías por cada metro cuadrado, sin embargo se contó solo con cuatro estanques para 188 crías.

Aunque el alimento fue suministrado diariamente y de manera abundante, la agresividad de las crías fue evidente. Esto ha sido reportada por varios autores (Aguilar, 1986; Márquez-Millán, 1991; Márquez-Millán, 1994) lo cual se pudo comprobar al tener varias muertes debidas a heridas causadas por mordeduras, las cuales se presentaron en un 70% en las aletas y en un 30% en la cabeza. Al parecer, cuando una tortuga muerde a otra, la agresión provoca una pequeña herida, la cual es del mismo color que su alimento lo que genera que se continúe con el ataque. A pesar de que las crías que mostraban heridas se separaban del grupo y se trataban con azul de metileno, en algunas ocasiones las heridas eran muy graves y causaban la muerte de las crías.

Se ha estudiado que en los organismos que se encuentran en cultivo, pueden generar altos niveles de estrés lo cual pudiera afectar su alimentación y por consecuencia llevar a la muerte. No se ha encontrado hasta el momento un estudio específico sobre el estrés que pudieran presentar las crías de tortugas que se encuentran en cautiverio, pues los programas de conservación se centran en la liberación de las crías y no en el cultivo. Sin embargo Márquez-Millán (1991), menciona que en los

adultos una alta densidad, ocasiona una disminución en la talla y aparición de enfermedades probablemente ocasionadas por el estrés.

Al tomar una muestra mensual se registró el peso de todos los organismos, así se observó que durante los seis meses de cultivo los grupos 7 y 8 son los que mostraron el menor peso. Esto corresponde a lo que se ha discutido anteriormente sobre la condición de la nidada. Al parecer este factor ha influido en la incubación y el cultivo de estos organismos, pues son los que presentaron el mayor número de huevos sin desarrollo y son las crías con la menor talla. Estos resultados se pueden deber por otro lado, a las diferencias individuales, ya que algunos organismos comían más que otros, o también se deba a que una hembra puede ser inseminada en la temporada reproductiva hasta por cuatro machos, teniendo así una paternidad múltiple, lo cual estaría reflejado en las variaciones de tamaño de los organismos así como de algunos órganos internos, como en este caso, las gónadas. Al observar macroscópicamente las gónadas se observa un cambio tanto en grosor, como en los bordes hasta el 5° y 6° mes.

### **Análisis macroscópico y análisis morfométrico**

Se ha reportado que existen diferencias entre las gónadas de hembras y machos en las crías de las tortugas marinas, y que dichas diferencias se logran observar al aplicar una técnica de aclaramiento (Mrosovsky y Benabib, 1990). Aunque en este estudio no se realizó ninguna técnica para la separación de sexos de manera macroscópica, no se logró observar una diferencia entre hembras y machos durante los seis meses de cultivo. Esto se debió a que conforme las crías fueron creciendo, las gónadas se observaban más gruesas y no era posible distinguir algunas estructuras internas (necesarias para la identificación de testículos).

El análisis morfométrico nos indica que no existe una relación entre la longitud de la gónada con respecto al sexo, es decir, la morfometría de la gónada no ayuda a separar hembras de machos. Al analizar los datos morfométricos por grupo, se comportan de una manera similar, pues únicamente en el grupo 7 es donde se observó una relación entre las hembras, los machos e indiferenciados con la longitud de la gónada.

## **Análisis histológico**

Al observar la identificación del sexo por histología en el experimento 2008, se encontró que el Grupo 1 fue el que presenta el mayor número de organismos indiferenciados. Esto pudiera deberse a que al momento en que se realizó el cambio de temperatura, las gónadas aún se encontraban diferenciadas. Cabe destacar que el grupo 4 es el que presenta la mayor diferencia entre hembras y machos, lo cual puede deberse a que en el momento en que se realizó el cambio de temperatura de feminizante a masculinizante se diferenciaron la mayoría de los huevos en hembras; esto ocurrió en el día 21-23. Esta marcada diferencia entre los sexos se continúa observando en los grupos 5 y 6 abarcando hasta el día 27 de incubación. Por lo anterior se puede inferir que la temperatura feminizante influye más durante los días 21-27 ya que fue cuando se encontró el mayor número de hembras. Mientras que en los grupos 2 y 3 la temperatura masculinizante tuvo un mayor efecto en los huevos al encontrar un mayor número de machos. La influencia que tiene la temperatura masculinizante sobre los huevos es a partir del día 17-21.

La temperatura feminizante comenzó a influir en la determinación sexual de la gónada en los embriones desde el momento que comienza el periodo termosensitivo ya que en el grupo 1 se encontraron embriones que eclosionaron como hembras, indicando que no respondieron el cambio a la temperatura masculinizante, mientras que otros embriones si fueron sensibles a este cambio de temperatura (los que eclosionaron como machos). Entre más tiempo permanezcan en la temperatura feminizante (antes del cambio de temperatura) mayor será el número de embriones que se determinen como hembras (grupo 4 a grupo 6). Merchant-Larios *et al.* (1997) denominaron a este periodo como de predeterminación sexual de la gónada e incluye a embriones de las etapas 24 a 26 (Miller, 1985), en donde la incubación a temperatura feminizante hasta estas etapas determina el sexo de algunos embriones (no de todos).

Al observar los resultados de los sexos que se obtuvieron en los grupos 4 a 8 del experimento 2008, se puede decir que muestran de manera general tres tipos de respuesta de los embriones a la temperatura de incubación en la determinación sexual de la gónada. En la primera, la temperatura de incubación inicial no influye en la determinación del sexo de los embriones, de tal forma que la mayoría de éstos adquirieron el sexo según la temperatura de cambio. Este periodo de indeterminación sexual de la gónada, incluye embriones de etapas tempranas de desarrollo. Este periodo puede explicarse porque, a) el embrión y la gónada presentan poco desarrollo para que se desencadenen los mecanismos de

determinación sexual, b) los eventos de determinación sexual, se pudieron haber disparado en las etapas iniciales pero fueron revertidos por el cambio de temperatura, c) los embriones y la gónada no han acumulado el tiempo suficiente en la temperatura de incubación para que se activen los procesos de determinación sexual.

La segunda respuesta se observa cuando se obtienen crías de los dos sexos por el cambio de temperatura (grupo 7). Algunos embriones adquirieron el sexo de la primera temperatura de incubación (antes del cambio de temperatura los embriones ya habían determinado el sexo), mientras que otros embriones desarrollaron el sexo acorde a la segunda temperatura de incubación. Este periodo de predeterminación sexual de la gónada, incluye a embriones de etapas de desarrollo intermedias. Se le denomina periodo de determinación parcial sexual, porque solo una parte de los embriones establece el sexo de la primera temperatura de incubación (Merchant-Larios *et al.*, 1997). Este periodo puede explicarse porque los embriones que desarrollaron el sexo acorde a la primera temperatura de incubación, estuvieron el tiempo suficiente en la primera temperatura para activar los procesos de determinación sexual y porque los embriones que presentaron el sexo acorde a la segunda temperatura, puede suponerse que no se activaron los procesos de determinación sexual porque no estuvieron el tiempo suficiente en la primera temperatura, o tal vez si se activaron inicialmente, pero los procesos fueron revertidos por la segunda temperatura.

La tercera respuesta se caracteriza porque la mayoría de los embriones adquieren el sexo acorde a la primera temperatura de incubación, de tal forma que pocos embriones son sensibles a la temperatura de cambio. Este periodo de determinación total, incluye a embriones de etapas intermedias y avanzadas. Este periodo puede explicarse porque los embriones estuvieron el tiempo suficiente en la primera temperatura de incubación para determinar el sexo de la gónada.

El efecto que tenga un pulso de temperatura (masculinizante o feminizante) en la determinación sexual va a depender de la duración del pulso de temperatura, el día en que inicia (día de incubación) y la etapa de desarrollo de los embriones cuando se aplica el pulso de temperatura. Cuando un pulso de temperatura se aplica a embriones de etapas (o edades) tempranas de desarrollo, estos pulsos no influyen en la determinación sexual, porque los mismo se aplicaron en etapas tempranas del desarrollo para poder producir algún efecto en la determinación sexual.

Cualquier periodo sensible a la temperatura puede ser medido con base en una escala de desarrollo morfológico o a través de una escala cronológica. En este estudio, se encontró con base en una escala de desarrollo morfológico, que el periodo sensible a la temperatura para la determinación sexual de machos ocurre antes que la determinación de las hembras. Similares resultados han sido reportados para las tortugas *Emys orbicularis* y *Graptemys ouchatensis* (Bull y Vogot, 1979). Sin embargo en otras especies de reptiles esta situación se presenta a la inversa, es decir, la determinación sexual en las hembras es anterior a la de los machos, por ejemplo en la tortuga marina *Caretta caretta* (Yntema y Mrosovsky, 1982), el lagarto *Alligator mississippiensis* y la tortuga *Trachemys scripta* (Wibbels *et al.*, 1991).

La mayoría de los experimentos de temperatura en *L. olivacea*, sugieren que durante el periodo sensible a la temperatura los embriones deben permanecer en una temperatura por varias etapas de desarrollo para que la determinación sexual se alcance. Similares descubrimientos han sido reportados para las tortugas *Chelydra serpentina*, *Caretta caretta*, *Emys orbicularis* y *Graptemys ouachitensis* (Bull y Vogot, 1981). Lo anterior parece indicar que la temperatura de incubación ejerce su efecto en la determinación sexual mediante un efecto acumulativo. Sin embargo en este estudio los resultados de la mayoría de los grupos indican que no es necesario permanecer demasiado tiempo en una temperatura para adquirir el sexo específico, por ejemplo solo tres días fueron suficientes para tener un alto porcentaje de hembras (grupo 4).

Cabe destacar que en tortugas marinas solo se han reportado datos histológicos posteclosión, y en este trabajo se llevó a cabo un cultivo por seis meses, en donde se logró observar que algunos organismos, aún después de cinco meses de posteclosión, no se diferenciaron en hembras o machos. Estos datos demuestran que la determinación sexual no siempre se da desde el momento del nacimiento, como se reporta en la literatura. Este resultado no ha sido previamente reportado para ninguna de las especies de tortugas marinas y complementa los resultados de varios autores que afirman que la determinación sexual siempre se da en el segundo tercio del periodo de incubación (Bull & Vogot, 1981; Elizalde Aguilar, 1988; Merchant-Larios *et al.*, 1997; Miller & Limpus, 1981). La dificultad que representa el mantener en cautiverio especies amenazadas parecería ser una de las razones por las que está restringido este tipo de estudio.

En *Chelydra serpentina* ocurre algo similar, ya que pulsos feminizantes de 3 y 6 días provocan el desarrollo de algunas hembras y del 100% de hembras, respectivamente (Yntema y Mrosovsky, 1979). Estos hallazgos pueden indicar que la determinación sexual no siempre se debe a un efecto acumulativo de la temperatura de incubación, o que tal vez este efecto acumulativo es relativo, o probablemente exista una gran variabilidad para que ocurra la determinación sexual, es decir, para inducir un sexo en algunos embriones se necesita poco tiempo de incubación, mientras que para otros embriones se requiera mayor tiempo de incubación. Sin embargo, lo que sí parece cierto, es que entre más tiempo se experimente una temperatura se tiene mayor certeza de inducir el sexo en algún o algunos embriones, pero no necesariamente en todos.



## 5. CONCLUSIONES

La influencia que tiene la temperatura de incubación sobre la determinación del sexo no es definitiva ya que en los grupos donde se esperaba el 100% de hembras y el 100% de machos hubo gónadas indiferenciadas.

No en todos los organismos se determina el sexo dentro del segundo tercio del periodo de incubación, ni al nacer, ni al transcurrir algunos meses posteclosión, ya que hasta el quinto mes todavía se encontraron ejemplares con gónadas indiferenciadas.

En los embriones de la tortuga marina *L. olivacea*, el periodo sensible a la temperatura para la determinación sexual de la gónada se ubica entre los días 17-27. Esto delimita aún más el periodo termosensitivo reportado anteriormente.

La morfología y la morfometría de la gónada en crías de *L. olivacea* no son adecuadas para distinguir entre hembras y machos, mientras que la técnica histológica permitió la separación de sexos.

## 6. LITERATURA CITADA

- Aguilar, R. H. 1986. Optimización del semicultivo de Tortugas marinas y alternativas de manejo del recurso en el estado de Oaxaca. Protocolo de investigación. *CIIDIR-IPN*. Unidad Oaxaca. 19 p.
- Andrews, H. V., S. Krishnan & P. Biswas. 2001. *The status and distribution of marine turtles around the Andaman and Nicobar Archipelago*. National Sea turtle Project. India. 29 p.
- Anónimo. 2006. La protección de la tortuga golfina. *Instituto Nacional de la Pesca*. México. 23 p.
- Asrar, F. F. 1999. Decline of marine turtle nesting populations in Pakistan. *Marine Turtle Newsletter*, 83:13–14.
- Bellairs, A. & J. Attridge. 1975. *Los Reptiles*. H. Blume Ediciones, Madrid. 261 p.
- Bolten, A. B. 2003. Variation in sea turtle life history patterns: neritic vs oceanic developmental stages, 243-257. En: Lutz, P. L. & J. A. Musick. (Eds.) *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 432 p.
- Bull, J. J. 1987. Temperature-sensitive periods of determination in a Lizard: similarities with turtles and crocodilians. *J. Exp. Zool.*, 241:143-148.
- Bull, J. J. & R. C. Vogot. 1979. Temperature-dependent sex determination in turtles. *Science*, 206:1186-1188.
- Bull, J. J. & R. C. Vogot. 1981. Temperature-sensitive periods of sex determination in emydis turtles. *J. Exp. Zool.*, 218:434-440.
- Carrasco-Águila, M. A. 2000. *Estudio de los parámetros físicos que afectan el avivamiento en nidos de tortuga lora (Lepidochelys kempii, Garman, 1880)*. Tesis de Maestría. FMVZ Universidad de Colima, México. 91 p.

- Casale, P., B. Lazar, S. Pont, J. Tomás, N. Zizzo, F. Alegre, J. Badillo, A. Summa, D. Freggi. G. Lackovi, J.A. Raga, L. Rositani & N. Tvrtkovi. 2006. Sex ratios of juvenile loggerhead sea turtles *Caretta caretta* in the Mediterranean. *Sea. Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 324:281-285.
- Darlrymple, G. H., J. C. Hampp & D. J. Wellins. 1985. Male-biased sex ratio in a cold nest of a hawksbill sea turtle (*Eretmochelys imbricata*). *J. Herp.*, 19 (1):180-183.
- Delgado, C., A. V. Canário & T. Dellinger. 2010. Sex ratios of loggerhead sea turtles *Caretta caretta* during the juvenile pelagic stage. *Mar. Biol.*, 157:979-990.
- Elizalde Aguilar, M. C. 1988. *Periodo sensible a la temperatura para la determinación del sexo en la tortuga marina Lepidochelys olivacea*. Tesis de Licenciatura. ENEP-Iztacala UNAM. México. 50 p.
- Frazier, J. G. 1975. Marine turtles of the Western Indian Ocean. *Oryx.*, 13(2):164–175.
- Kar, C. S. & S. Bhaskar. 1982. The status of sea turtles in the Eastern Indian Ocean 365–372. En: Bjorndal, K. A. (Ed.) *Biology and Conservation of Sea Turtles*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
- Garduño, A. & E. Cervantes. 1996. Influencia de la temperatura y humedad en la sobrevivencia en nidos *in situ* y en corral de tortuga carey (*Eretmochelys imbricata*) en las Coloradas, Yuc., Mex. INP. SEMARNAP. *Ciencia Pesquera*, 12:90-97.
- Girondot, M., H. Fouillet & C. Pieau. 1997. Feminizing turtle embryos as a conservation tool. *Con. Biol.*, 12(2):353-362.
- Gross, T. S., D. A Crain, K. A. Bjorndal, A. B. Bolten & R. R. Carthy. 1995. Identification of sex in hatchling loggerhead turtles (*Caretta caretta*) by analysis of steroid concentration in chorioallantoic/amniotic fluid. *Gen. Com. Endo.*, 99:104-210.

- Hamann, M., C. J. Limpus, & D. W. Owens. 2003. Reproductive cycles of males and females, 135-161. En: Lutz, P. L. & J. A. Musick. (Eds.) *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 432 p.
- Humason, G. L. 1979. *Animal tissue techniques*. 4a ed.: W. H. Freeman and Company. San Francisco 661 p.
- Ikonomopoulou, M. P., J. M. Whittier, R. C. Aland & K. Ibrahim. 2006. Identification of sex in hatchling green turtles (*Chelonia mydas*) by morphometric histological measurements. En: *26th Annual Sea Turtle Symposium*. Creta, Grecia.
- Limpus, C. J. 1995. Global overview of the status of marine turtles: a 1995 viewpoint, 605-609. En: Bjorndal, K.A. (Ed.) *Biology and Conservation of Sea Turtles*: Revised Edition. Smithsonian Institution Press, Washington DC.
- López-Correa, J., M. A. Porta-Gándara, J. Gutierrez & V. M. Gómez-Muñoz. 2010. A novel incubator to simulate the natural thermal environment of sea turtle eggs. *J. Thermal Biol.*, 35:138–142.
- Márquez-Millán, R. 1991. Informe de viaje a la isla Gran Caimán, Antillas Occidentales. *Proj. Reps.*, 24 p.
- Márquez-Millán, R. 1994. Sinopsis de datos biológicos sobre la tortuga lora, *Lepidochelys kempi* (Garman, 1880). *FAO Sinopsis sobre la Pesca*, 152. Instituto Nacional de Pesca/FAO, México, D. F. 141 p.
- Márquez-Millán, R. 1996. *Las tortugas marinas y nuestro tiempo*. Fondo de Cultura Económica. México. 200 p.
- Márquez-Millán R., A. Villanueva, C. Peña Flores & D. Ríos. 1982. Situación actual y recomendaciones para el manejo de las tortugas marinas de la costa occidental mexicana, en

- especial la tortuga golfina, *Lepidochelys olivacea*. *Ciencia Pesquera. Inst. Nal. Pesca*, 91(3):83-91.
- McCoy, C. J., R. C. Vogt & E. J. Censky. 1983. Temperature-controlled sex determination in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *J. Herp.*, (17):404-406.
- McGehee, M. A. 1979. *Factors affecting the hatching success of loggerhead sea turtles egg (Caretta caretta caretta)*. Tesis. B. S. Presbyterian College, U.S.A. 252 p.
- Merchant-Larios, H. 2000. Determinación del sexo en crías, 150-155. En: Eckert, K. L., K. A. Bjorndal, F. A. Abreu-Grobois & M. Donnelly (Eds.) *Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas*. Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE, Pensilvania. 270 p.
- Merchant-Larios, H., S. Ruiz-Ramírez, N. Moreno-Mendoza & A. Marmolejo-Valencia. 1997. Correlation among thermosensitive period, estradiol response, and gonad differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Gen. Com. Endo.*, 107: 373-385.
- Miller, J. D. 1985. Embryology of marine turtles, 270-328. En: E. Gans, F. Billet & F. A. Maderson (Eds.). *Biology of the Reptilia*. John Wiley and Sons, New York.
- Miller, J. D. & C. J. Limpus. 1981. Incubation period and sexual differentiation in the turtles, *Chelonia mydas*. 66-73. En: C. Banks & A. Martin (Eds.) *Proceedings of Melbourne Herpetological Symposium*. Zoological Board of Victoria Australia.
- Miller, J. D. & C. J. Limpus. 2003. Ontogeny of marine turtle gonads, 199-224. En: Lutz, P. L. & J. A. Musicks (Eds.) *The biology of the sea turtles*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 432 p.
- Montenegro, S. B., N. Bernal & A. Martínez. 1984. Estudio del contenido estomacal de la tortuga marina *Lepidochelys olivacea*, en la costa de Oaxaca, México. *An. Inst. Cienc. Mar. Limnol.* Universidad Nacional Autónoma de México. Formato Digital.

- Mrosovsky, N. & M. Benabib. 1990. An assessment of two methods of sexing hatchling sea turtles. *Copeia*, (2):589-591.
- Mrosovsky, N. & C. Pieau. 1991. Transitional range of temperature, pivotal temperatures and thermosensitive stages for sex determination in reptiles. *Am.Rep.*, 12:169-179.
- Mrosovsky, N. & M. H. Godfrey. 1995. Manipulating sex ratios: Turtle speed ahead!. *Chel. Con. Biol.*, 1:238-240.
- Ordoñez, E. M. 1998. *Análisis histológico para la identificación del sexo de las gónadas de crías de las tortugas marinas Dermochelys coriacea y Lepidochelys olivacea*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 50 p.
- Owens, D. W. 1997. Hormones in the life history of sea turtles, 315-341. En: Lutz, P. L. & J. A. Musick. (Ed.) *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 432 p.
- Peñaflores-Salazar, C., J. Vasconcelos-Pérez, E. Albavera-Padilla & R. Márquez-Millán. 1998. Twenty five years nesting of olive ridley sea turtle *Lepidochelys olivacea* in Escobilla Beach, Oaxaca, México. 27-29. En: Abreu-Grobois, F. A., R. Briseño-Dueñas, R. Márquez & L. Sarti (Eds.). *Memorias del Eighteenth International Sea Turtle Symposium*. Mazatlán, México.
- Pritchard, P. C. 1997. Evolution, philogeny and current status of sea turtles, 1-28. En: Lutz, P. L. y J. A. Musick. (Eds.) *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 432 p.
- Pritchard, P. C. 2000. Taxonomía, Morfología Externa e Identificación de las Especies, 23-42. En: Eckert, K.L., K.A. Bjorndal, F. A. Abreu-Grobois & M. Donnelly (Eds.) *Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas*. Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE, Pensilvania. 270 p.



- Seger, J. & J. W. Stubblefield. 2002. Models of sex ratio evolution, 2-25. En: Hardy I. C. (Ed.) *Sex ratios: concepts and research methods*. Cambridge University Press. Cambridge. 325 p.
- Standora, E. A. & J. R. Spotila. 1985. Temperature dependent sex determination in sea turtles. *Copeia*, 3:711-722.
- Steel, R. G., J. H. Torrie. 1980. Principles and procedures of statistics. A biometrical approach. McGraw-Hill Book Company, USA. 633p
- Vogot, R. C. & O. A. Flores. 1986. Determinación del sexo en Tortugas por la temperatura de incubación de los huevos. *Ciencia*, 37:21-32.
- West, S. A., S. E. Reece & B. C. Sheldon. 2002. Sex ratios. *Heredity*, 88:117-124.
- Wibbels, T. 2003. Critical approaches to sex determination in sea turtles, 103-134. En: Lutz, P. L. & J. A. Musick. (Eds.) *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 432 p.
- Yntema, C. L. 1968. A series of stages in the embryonic development of *Chelydra serpentina*. *J. Morphol.*, 125:219-251.
- Yntema, C. L. & N. Mrosovsky. 1979. Incubation temperature and sex ratio in hatchling loggerhead turtles: A preliminary report. *Marine Turtle News letter*, 11:9-10.
- Yntema, C. L. & N. Mrosovsky. 1982. Critical periods and pivotal temperatures for sexual differentiation in loggerhead sea turtles. *Can. J. Zool.*, 60:1012-1016.
- Zar, J. H. 1996. Biostatistical Analysis, 3th Edition. Prentice Hall, Englewood. 960 p.

## **ANEXO 1**

### **ARTÍCULO PUBLICADO**

**López-Correa, J., M. A. Porta-Gándara, J. Gutierrez & V. M. Gómez-Muñoz. 2010. A novel incubator to simulate the natural thermal environment of sea turtle eggs. *J. Thermal Biol.*, 35:138–142.**

**ANEXO 2****TÉCNICA HISTOLÓGICA**

|                        |        |
|------------------------|--------|
|                        |        |
| <b>DESHIDRATACIÓN</b>  |        |
| ALCOHOL 70% I          | 1 h    |
| ALCOHOL 70% II         | 1 h    |
| ALCOHOL 70% III        | 1 h    |
| ALCOHOL 85% I          | 1 h    |
| ALCOHOL 85% II         | 1 h    |
| ALCOHOL 85% III        | 1 h    |
| ALCOHOL 96% I          | 1 h    |
| ALCOHOL 96% II         | 1 h    |
| ALCOHOL 96% III        | 1 h    |
| ALCOHOL-TOLUENO 1:1    | 30 min |
| TOLUENO                | 30 min |
| PARAFINA TOLUENO       | 30 min |
| PARAFINA I (54-56°C)   | 45 min |
| PARAFINA II (56-58°C)  | 45 min |
| PARAFINA III(58-60°C)  | 45 min |
|                        |        |
| <b>DESPARAFINACIÓN</b> |        |
| XIOL I                 | 5 min  |
| XIOL II                | 5 min  |
| XIOL III               | 5 min  |
| ALCOHOL 96% I          | 5 min  |
| ALCOHOL 96% II         | 5 min  |
| ALCOHOL 96% III        | 5 min  |

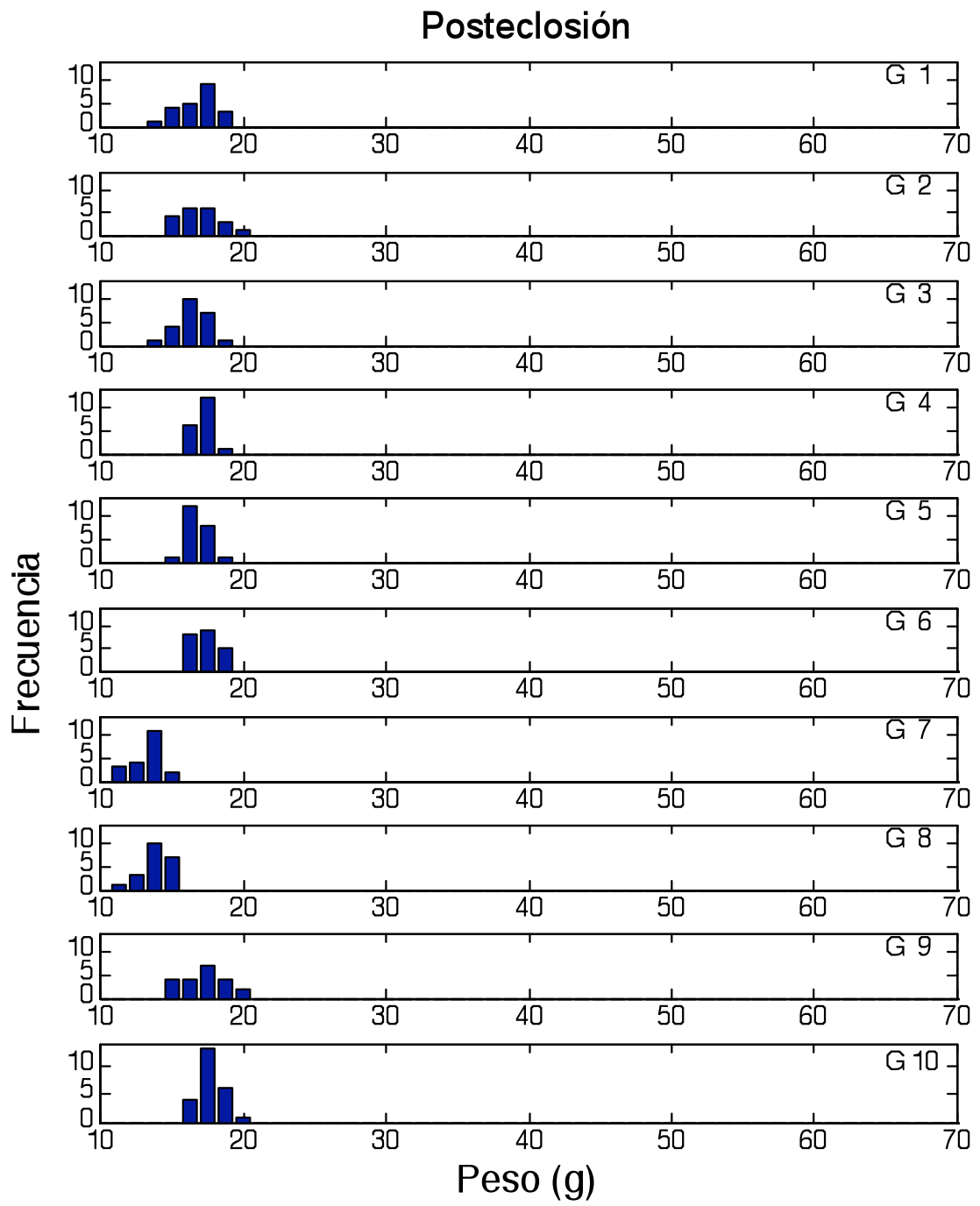
|                                  |               |
|----------------------------------|---------------|
| ALCOHOL 80%                      | 5 min         |
| ALCOHOL 70%                      | 5 min         |
| ALCOHOL 60%                      | 5 min         |
| AGUA DESTILADA I                 | 5 min         |
| AGUA DESTILADA II                | 5 min         |
| COLORACIÓN                       |               |
| HEMATOXILINA                     | 1 min         |
| LAVAR EN AGUA CORRIENTE          | Cambio rápido |
| ALCOHOL ÁCIDO                    | 1min          |
| LAVAR CON AGUA CORRIENTE         | Cambio rápido |
| LAVAR CON AGUA CORRIENTE         | Cambio rápido |
| DIRERENCIACIÓN EN AGUA AMONIACAL | 1 min         |
| LAVAR EN AGUA CORRIENTE          | 1 min         |
| LAVAR EN AGUA DESTILADA          | 2 min         |
| EOSINA ACUOSA AL 1%              | 1 min         |
| LAVAR CON ALCOHOL 96%            | Cambio rápido |
| LAVAR CON ALCOHOL 96%            | Cambio rápido |
| ALCOHOL ABSOLUTO                 | 1 min         |
| ALCOHOL ABSOLUTO                 | 1 min         |
| ACETONA-CITRISOL V               | 2 min         |
| CITRISOL V                       | 5 min         |
| CITRISOL V                       | 5 min         |
| CITRISOL V                       | 5 min         |

## ANEXO 3

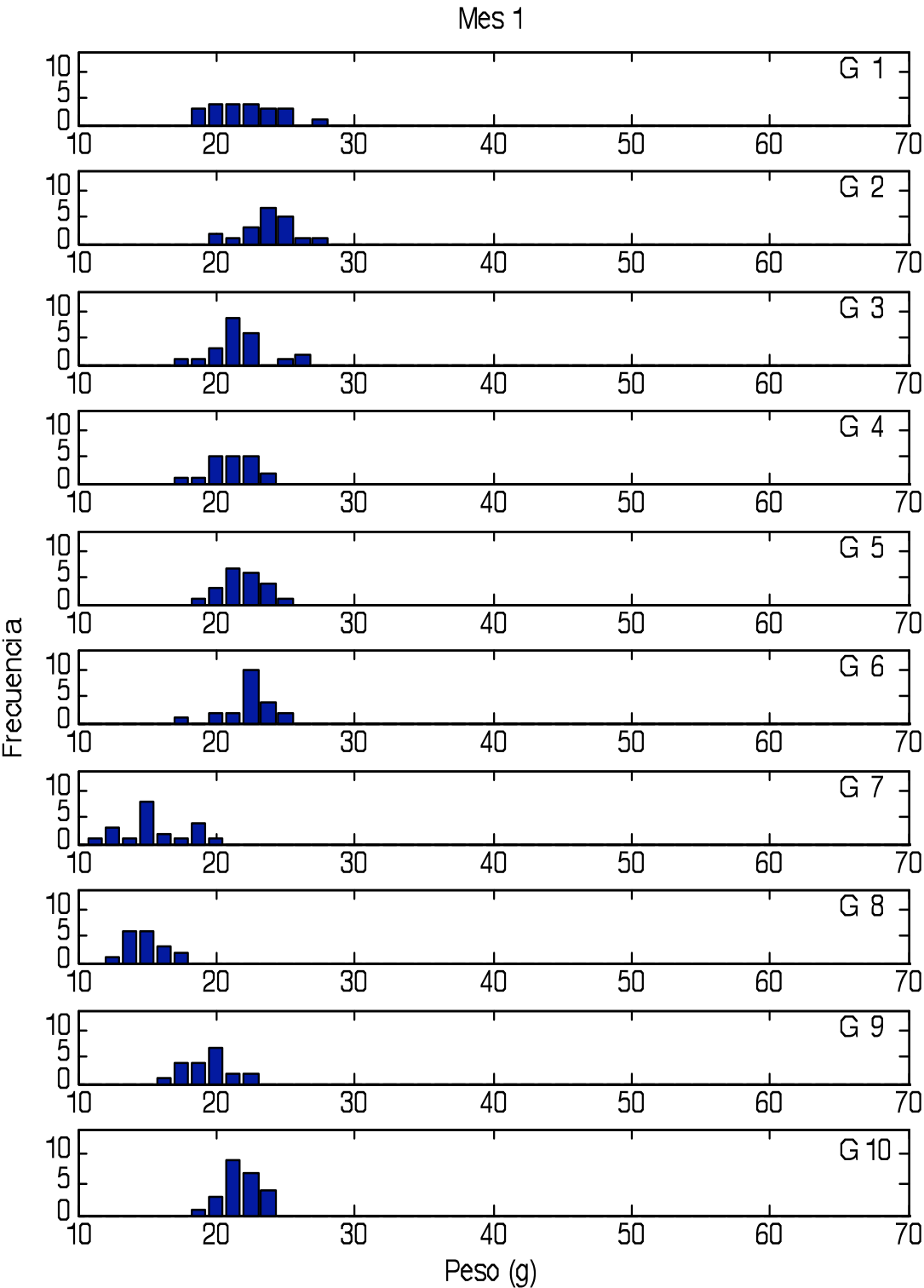
### DISTRIBUCIÓN DEL PESO DE LAS CRÍAS POR GRUPO Y POR MES.

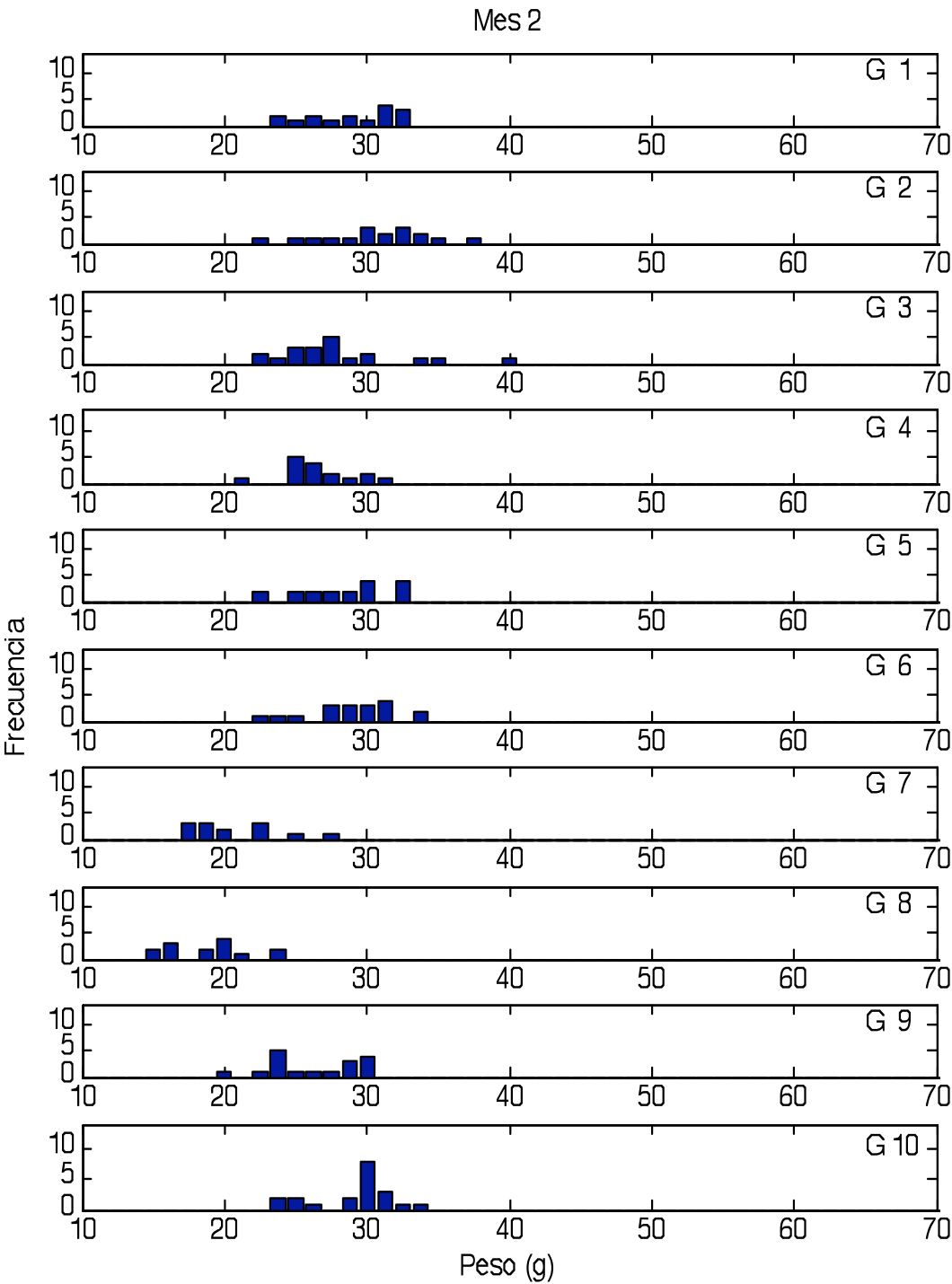
Se muestran las distribuciones del peso de las crías conservando la escala del peso y de las frecuencias para fines comparativos. En la tabla se muestran las distribuciones significativamente diferentes según la prueba Kolmogorov-Smirnov (K-S), solamente para la posteclosión.

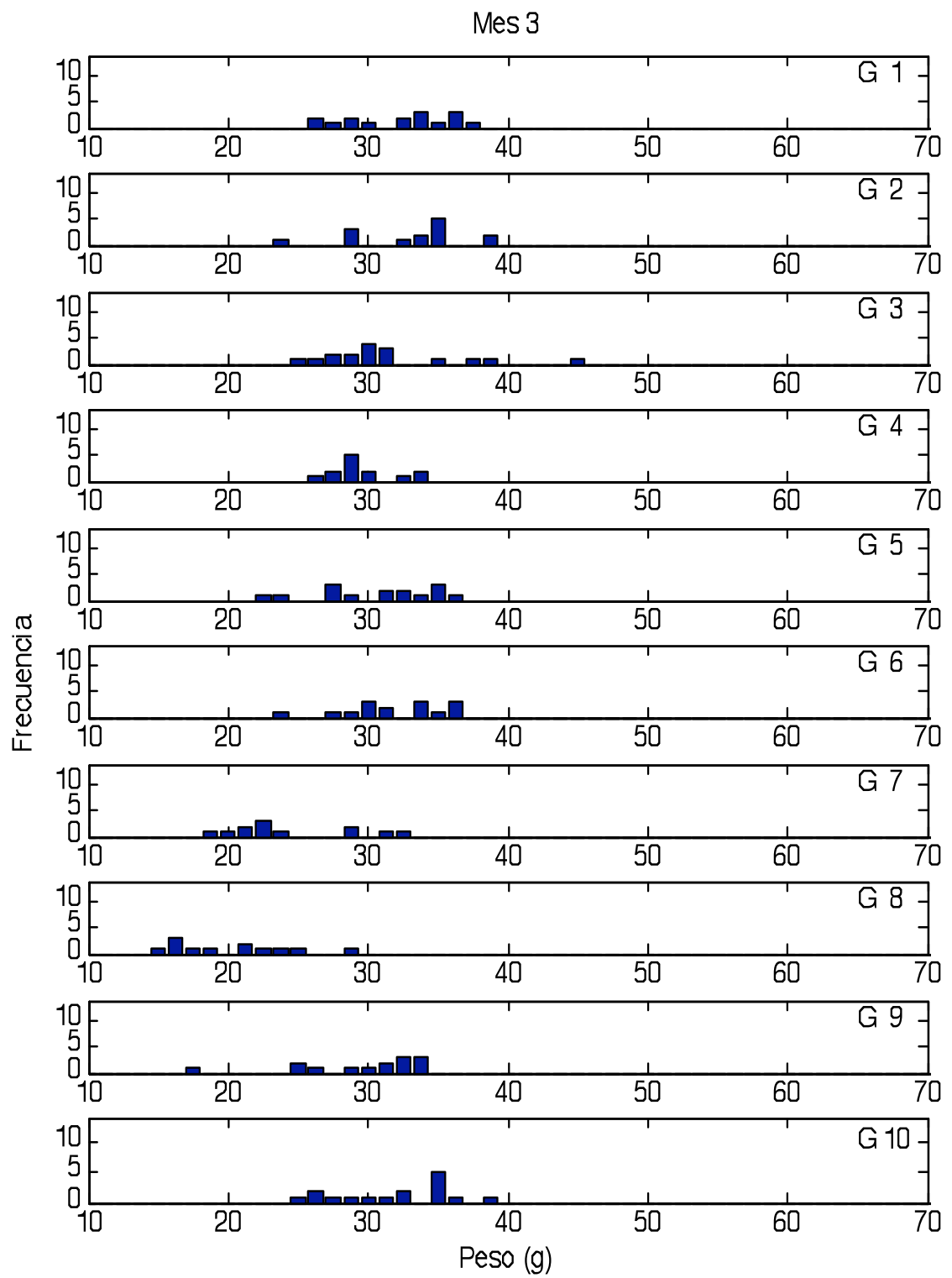
| Comparación de las distribuciones de peso de la posteclosión mediante la prueba de K-S. |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|
|                                                                                         | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 | G7 | G8 | G9 | G10 |
| G1                                                                                      |    | -  | -  | -  | -  | -  | *  | -  | -  | -   |
| G2                                                                                      |    |    | -  | -  | -  | -  | *  | -  | -  | -   |
| G3                                                                                      |    |    |    | -  | -  | -  | *  | -  | -  | -   |
| G4                                                                                      |    |    |    |    | -  | -  | *  | -  | -  | -   |
| G5                                                                                      |    |    |    |    |    | -  | -  | -  | -  | -   |
| G6                                                                                      |    |    |    |    |    |    | -  | -  | -  | *   |
| G7                                                                                      |    |    |    |    |    |    |    | -  | *  | *   |
| G8                                                                                      |    |    |    |    |    |    |    |    | -  | -   |
| G9                                                                                      |    |    |    |    |    |    |    |    |    | -   |

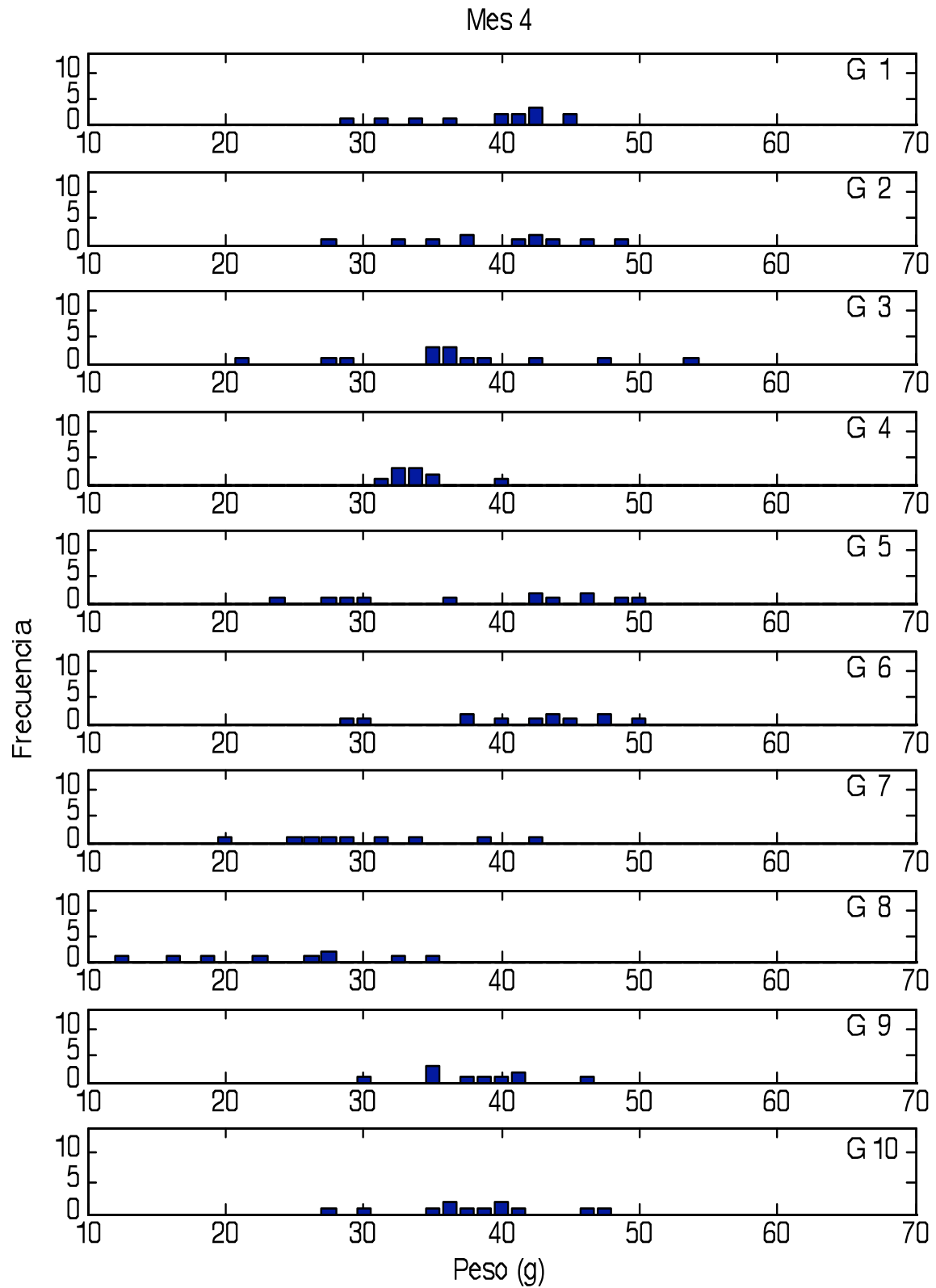


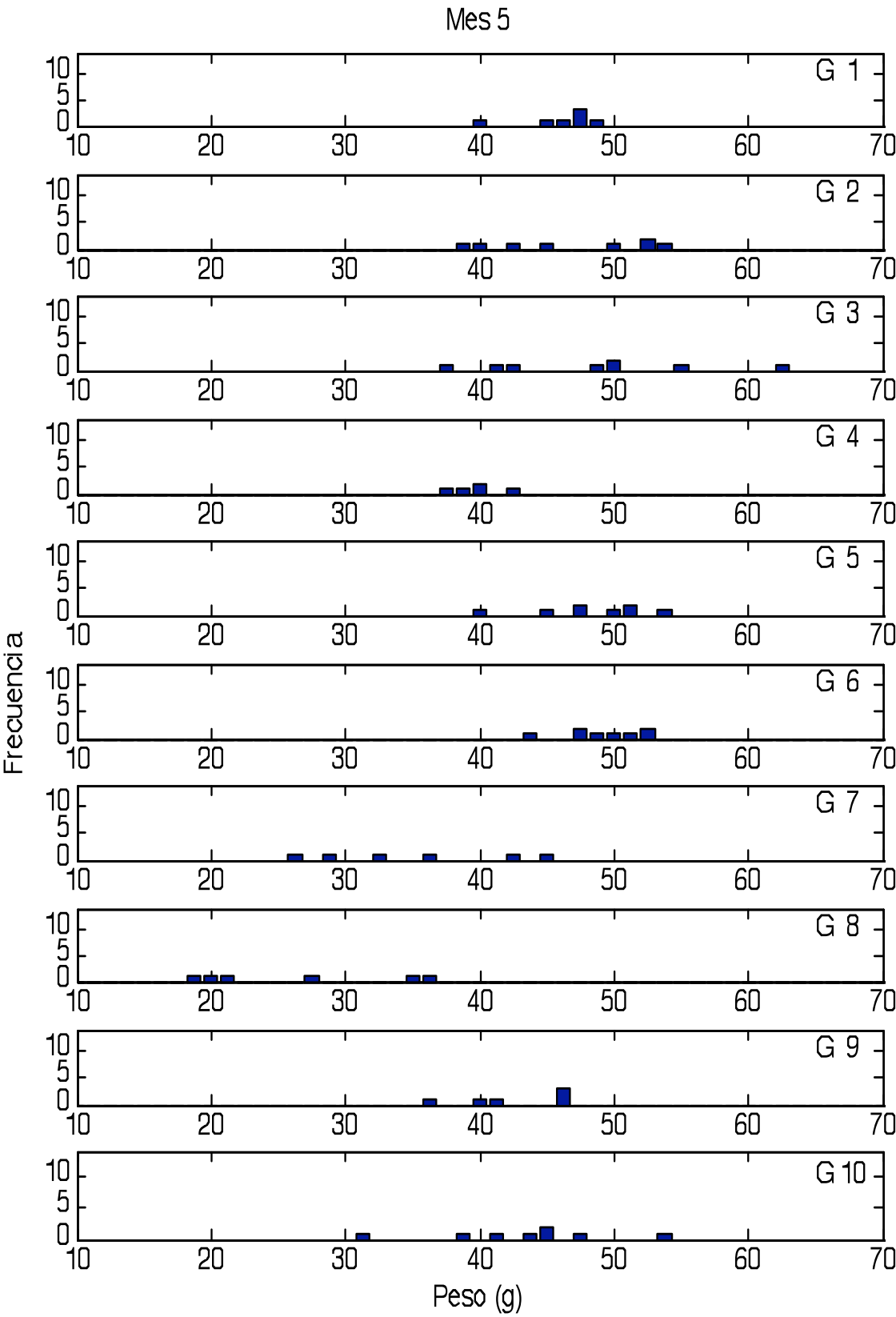


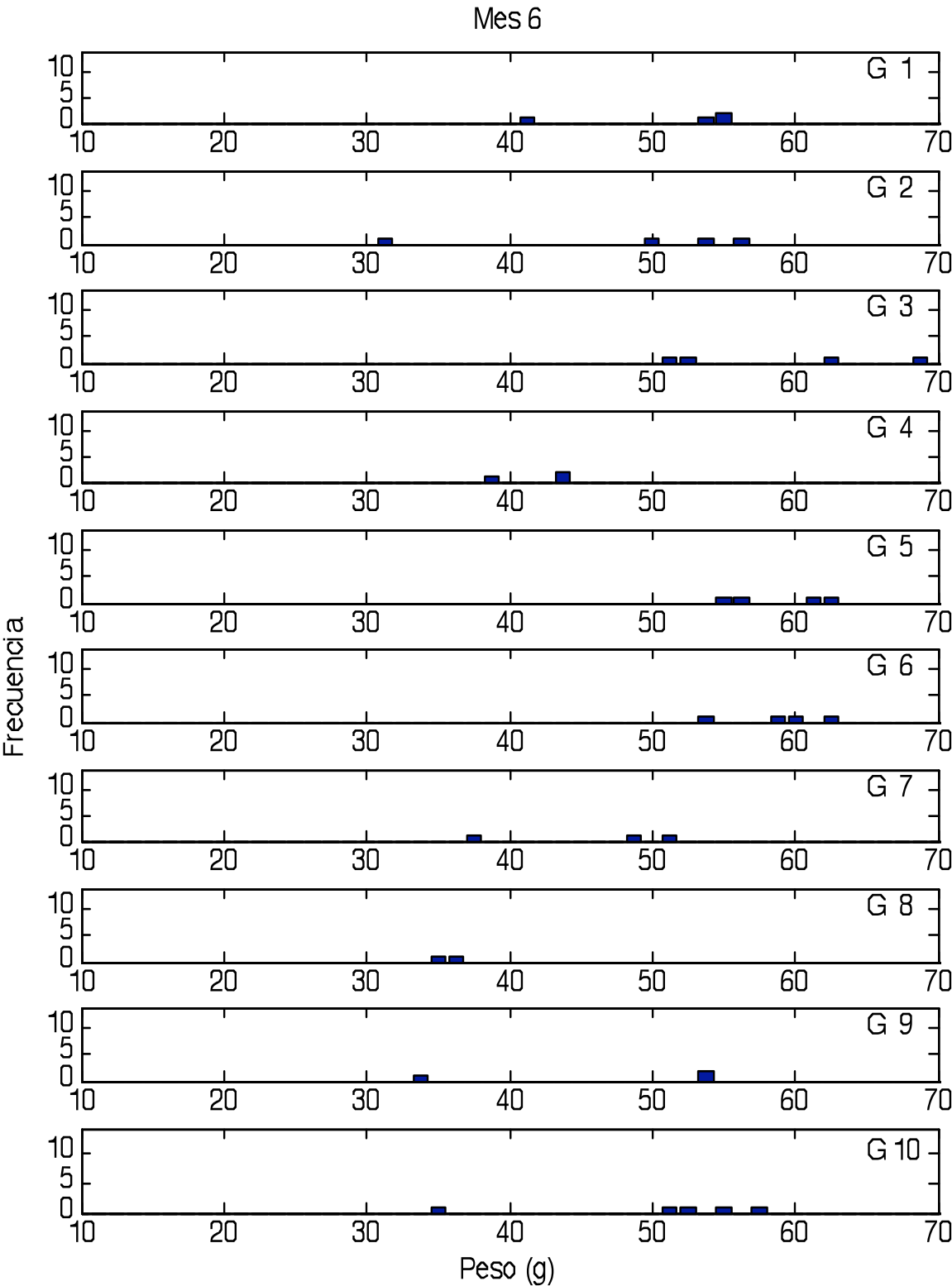














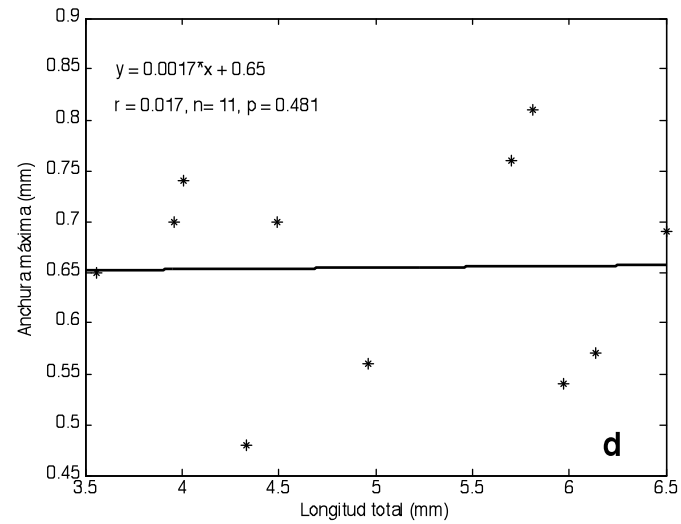
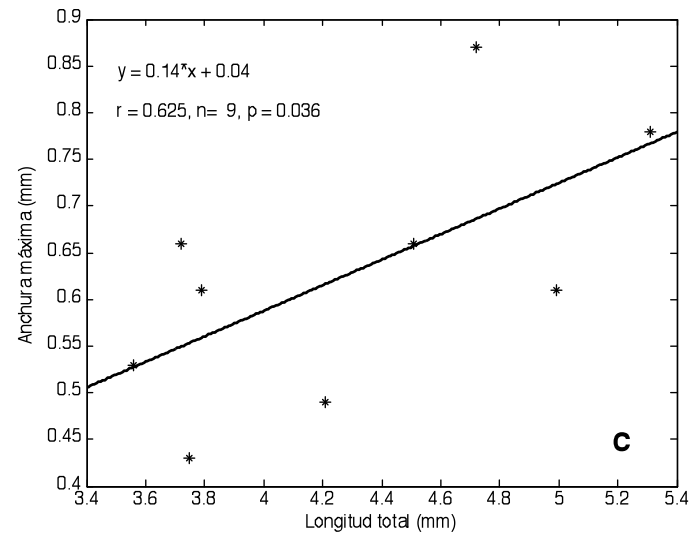
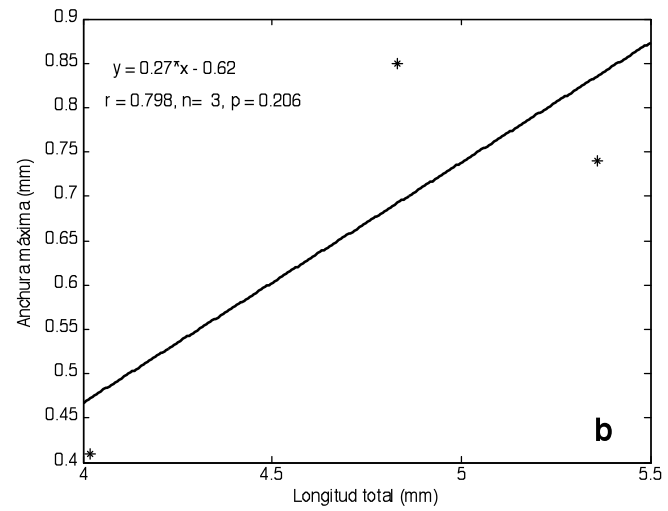
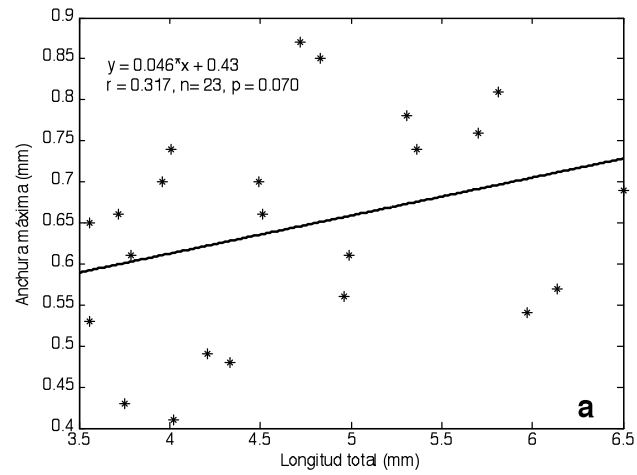
## ANEXO 4

### RELACIONES MORFOMÉTRICAS DE LA GÓNADA POR MES

Seguimiento mensual de la relación morfométrica lineal  $A=aL+b$  entre la anchura máxima  $A$  de la gónada y su longitud total  $L$ . En la tabla se muestran solamente las ecuaciones que tuvieron correlación significativa. En las gráficas siguientes aparece el diagrama de dispersión, las rectas de regresión y los estadísticos del ajuste para la posteclosión y cada mes de cultivo.

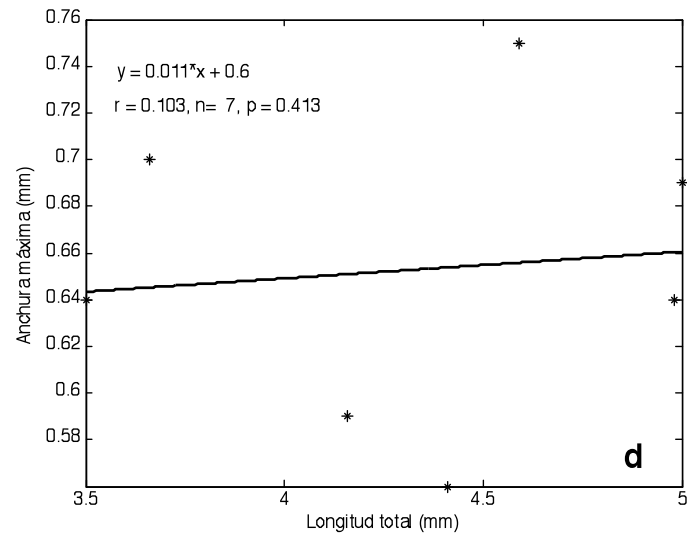
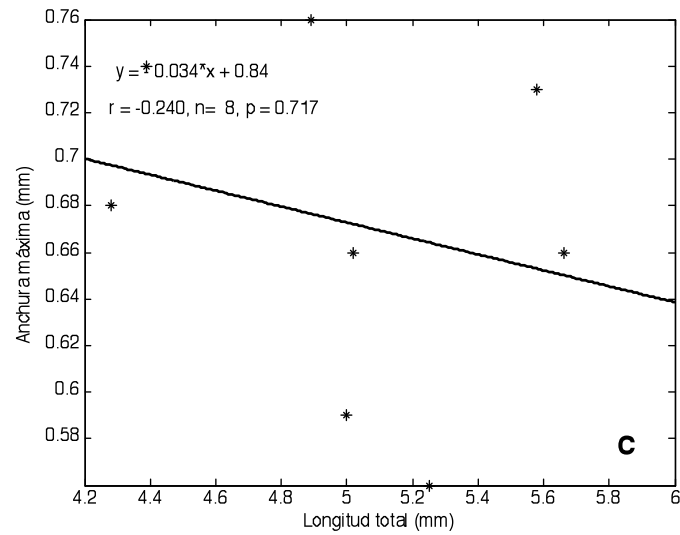
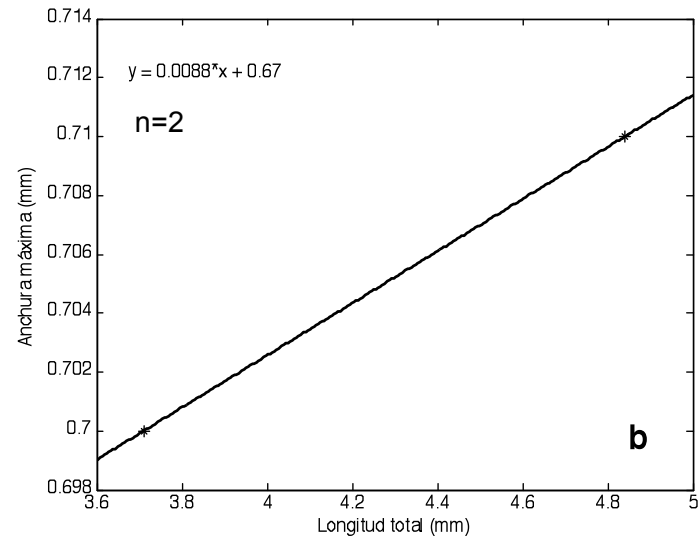
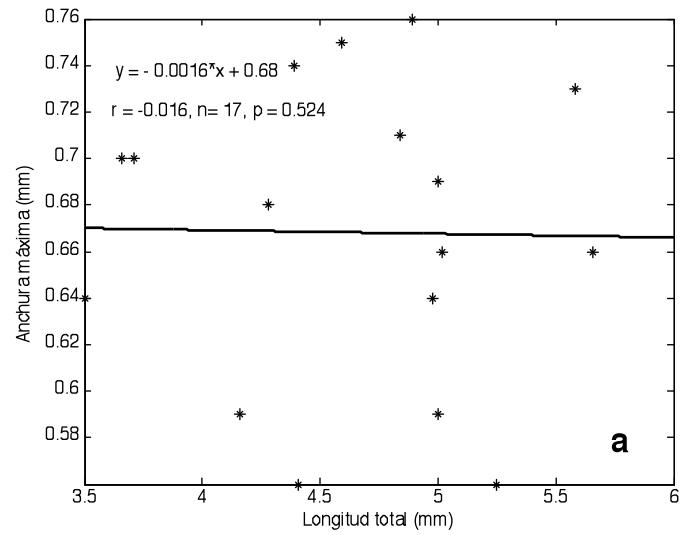
| Rectas de regresión entre la longitud total y la anchura máxima de la gónada |                  |                     |                 |                  |
|------------------------------------------------------------------------------|------------------|---------------------|-----------------|------------------|
| Mes                                                                          | Global (a)       | Indiferenciados (b) | Machos (c)      | Hembras (d)      |
| 0                                                                            | -                | -                   | $A=0.14*L+0.04$ | -                |
| 1                                                                            | -                | -                   | -               | -                |
| 2                                                                            | $A=0.061*L+0.43$ | -                   | -               | -                |
| 3                                                                            | $A=0.07*L+0.36$  | $A=0.11*L+0.18$     | -               | -                |
| 4                                                                            | $A=0.067*L+0.46$ | -                   | -               | $A=0.098*L+0.27$ |
| 5                                                                            | $A=0.12*L+0.29$  | -                   | -               | $A=0.13*L+0.22$  |
| 6                                                                            | $A=0.066*L+0.78$ | -                   | -               | -                |
| A= anchura máxima; L= longitud total                                         |                  |                     |                 |                  |

## ANEXO 4



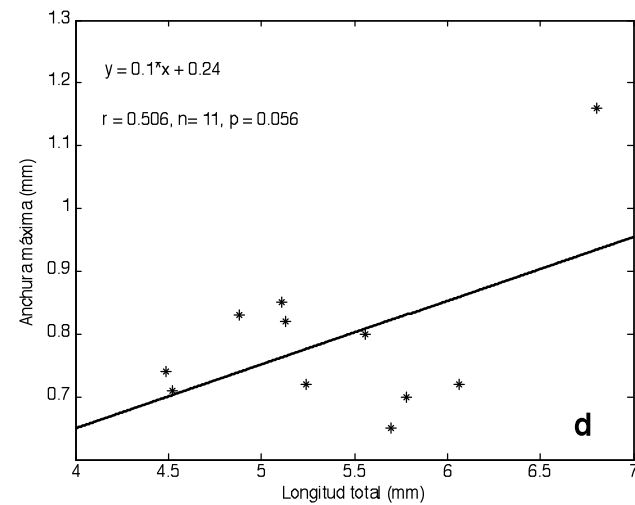
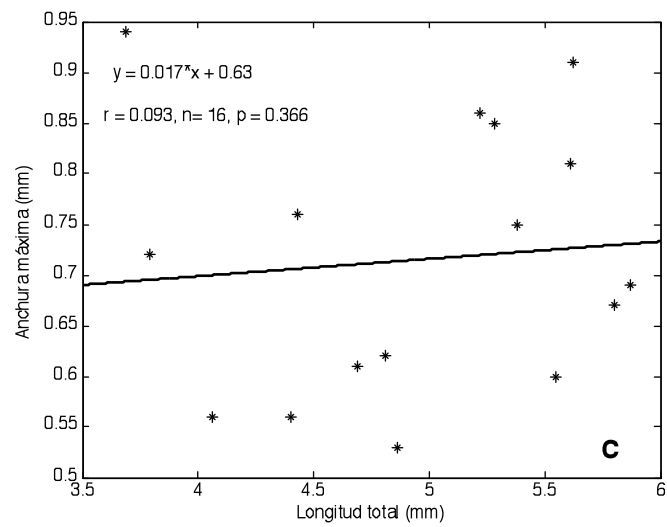
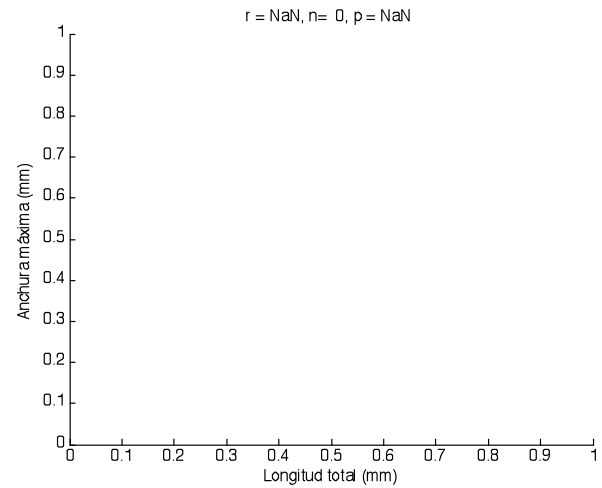
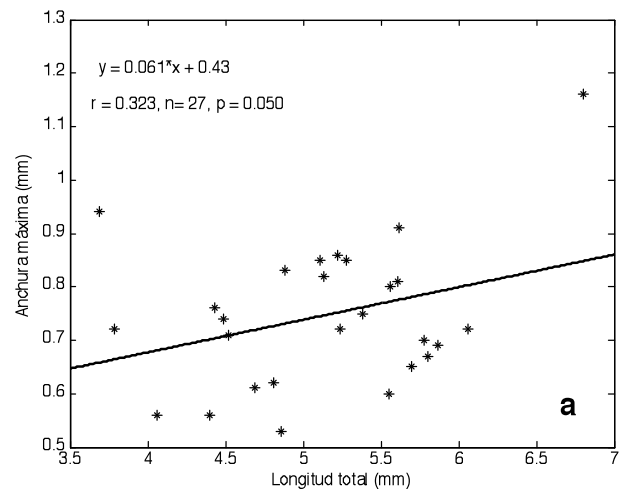
**Posteclosión. (a) Global; (b) Indiferenciados; (c) Machos; (d) Hembras**

## ANEXO 4



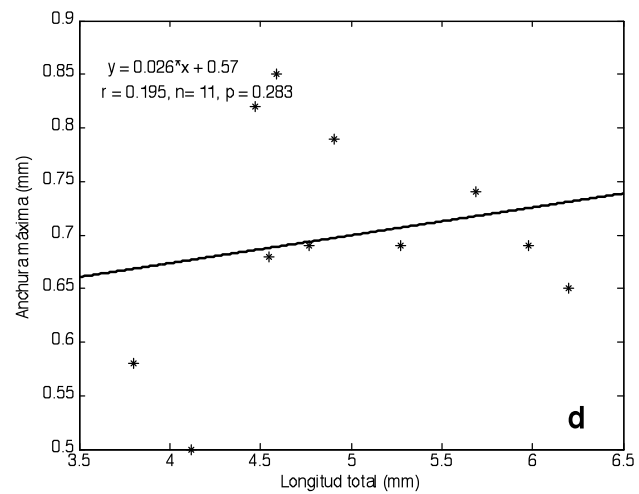
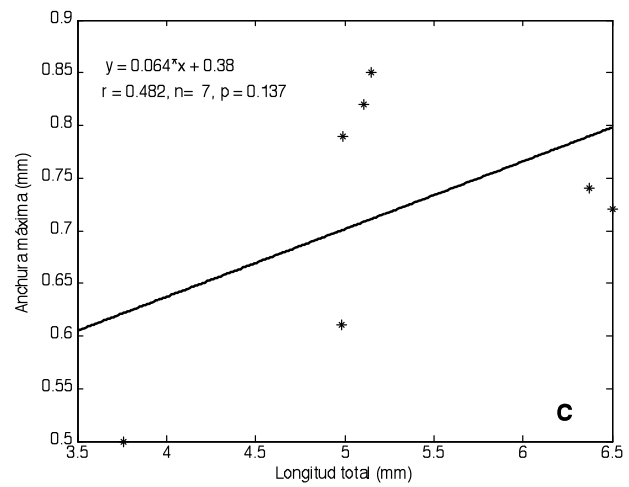
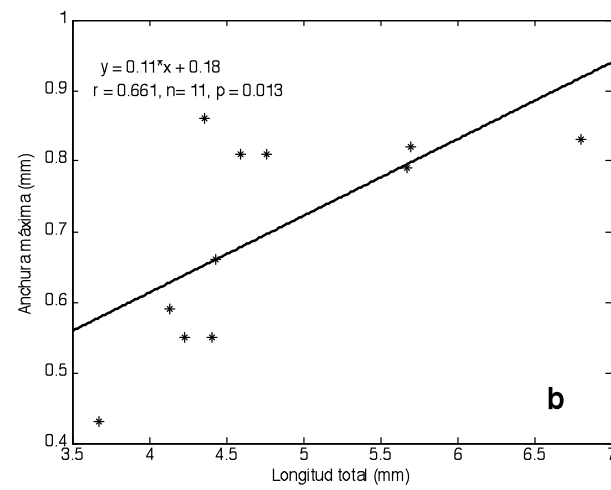
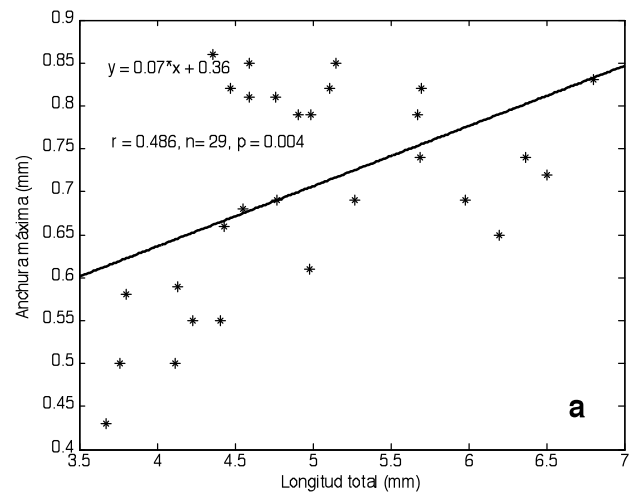
Mes 1. (a) Global; (b) Indiferenciados; (c) Machos; (d) Hembras

## ANEXO 4



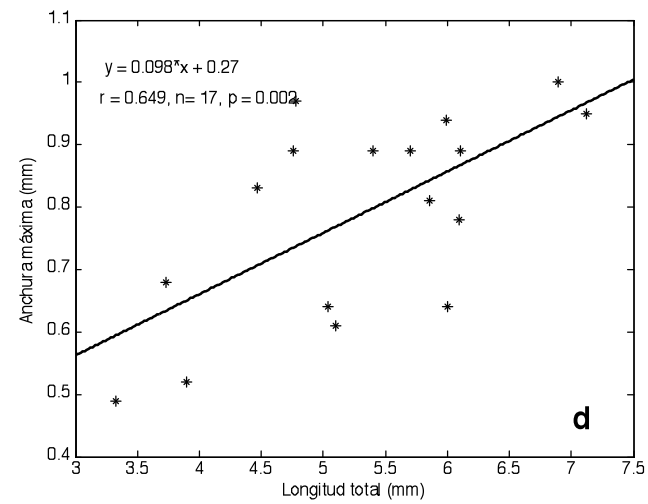
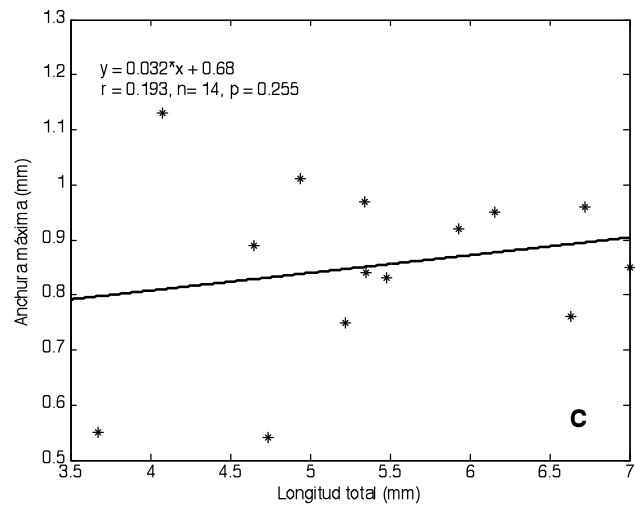
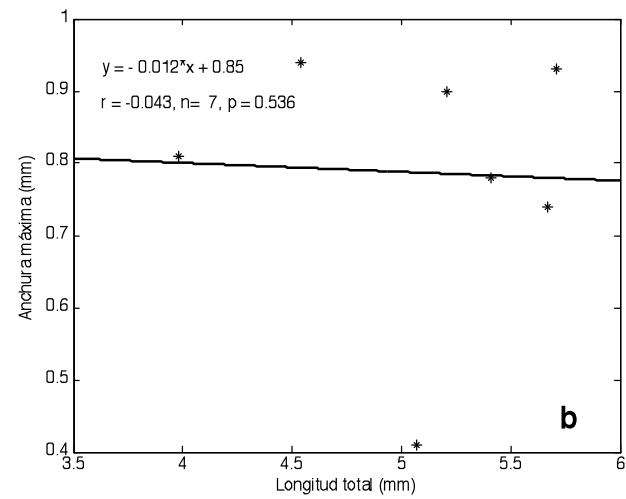
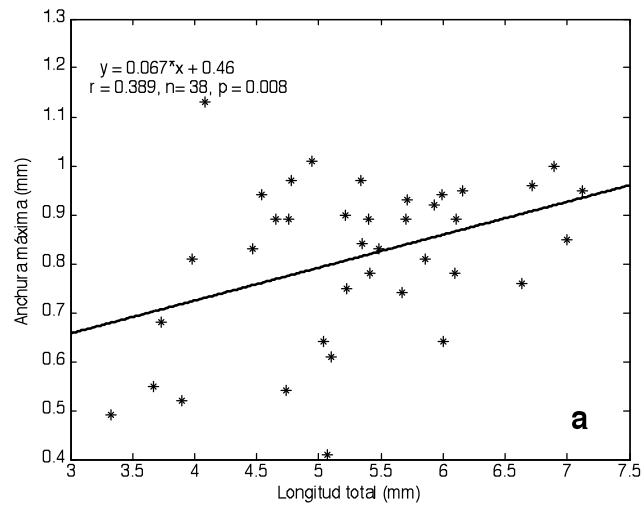
**Mes 2. (a) Global; (b) Indiferenciados; (c) Machos; (d) Hembras**

## ANEXO 4



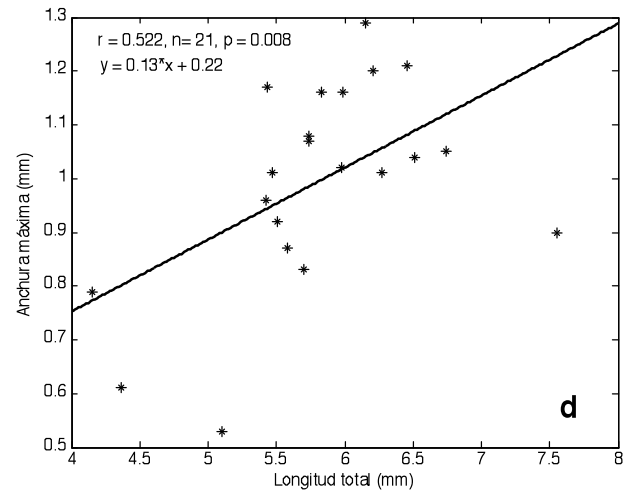
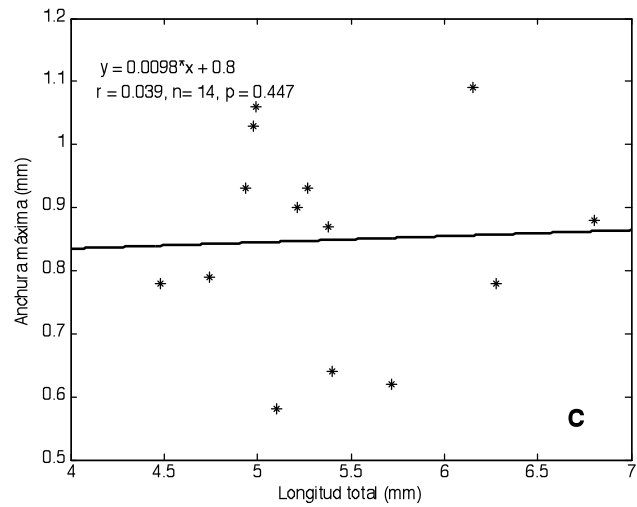
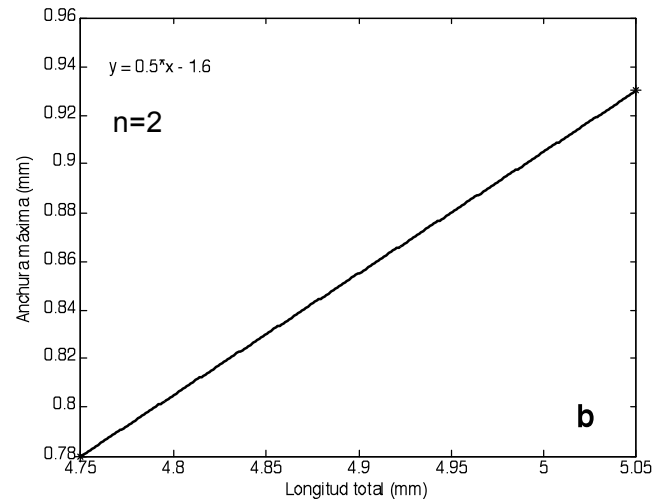
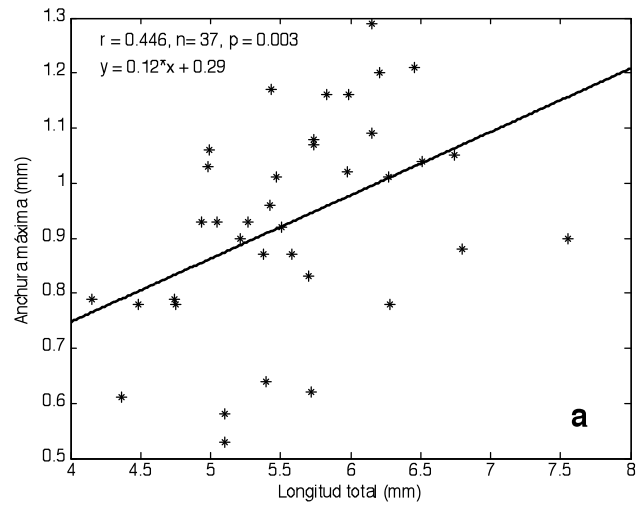
**Mes 3. (a) Global; (b) Indiferenciados; (c) Machos; (d) Hembras**

## ANEXO 4



**Mes 4. (a) Global; (b) Indiferenciados; (c) Machos; (d) Hembras**

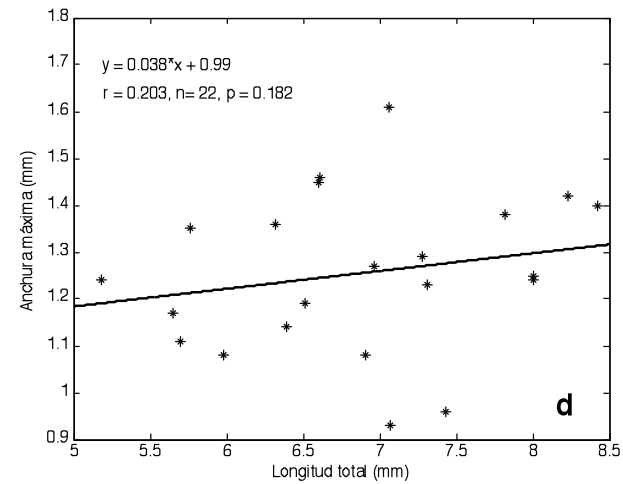
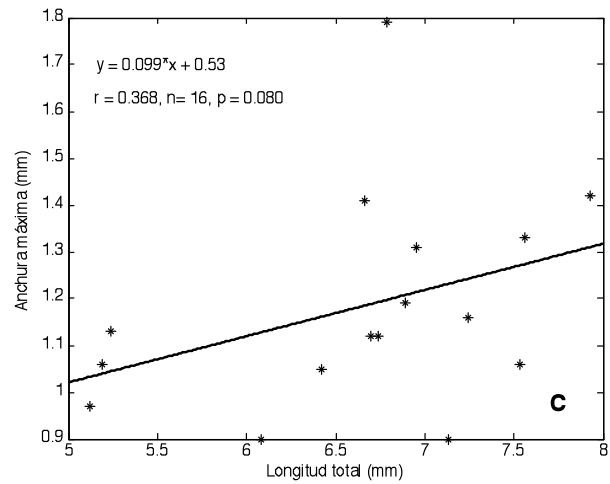
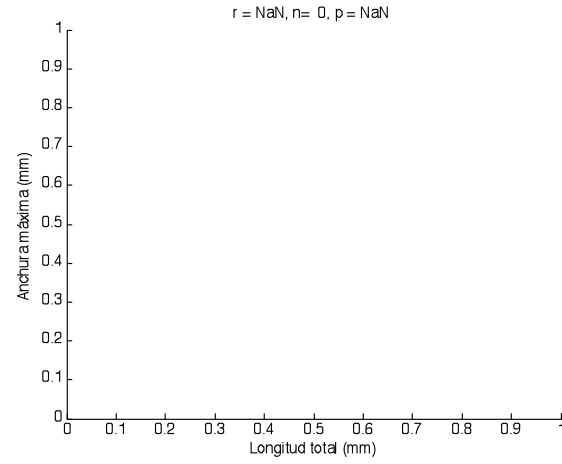
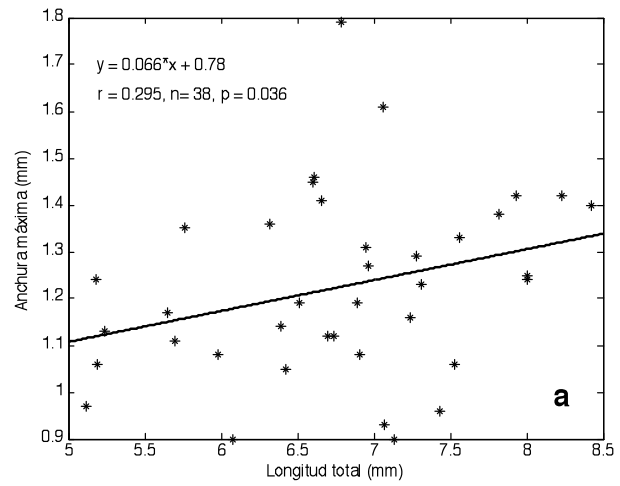
## ANEXO 4



**Mes 5. (a) Global; b) Indiferenciados; c) Machos; d) Hembras**



## ANEXO 4



Mes 6. (a) Global; (b) Indiferenciados; (c) Machos; (d) Hembras

## **ANEXO 5**

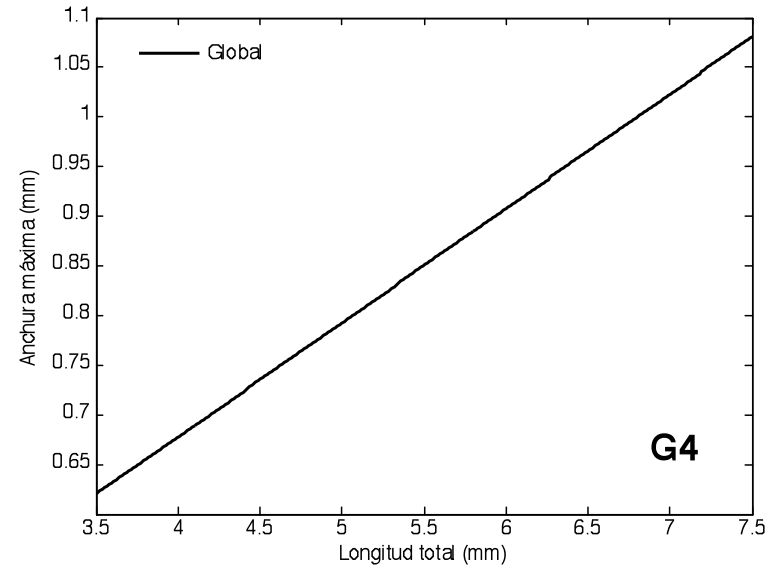
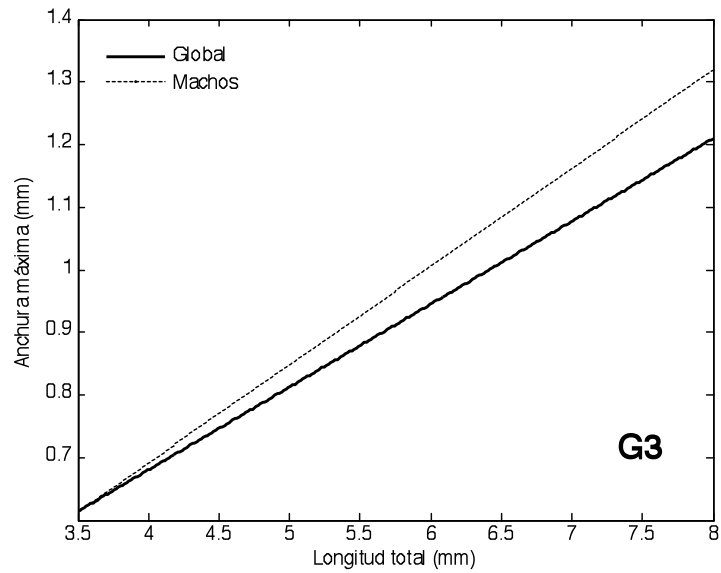
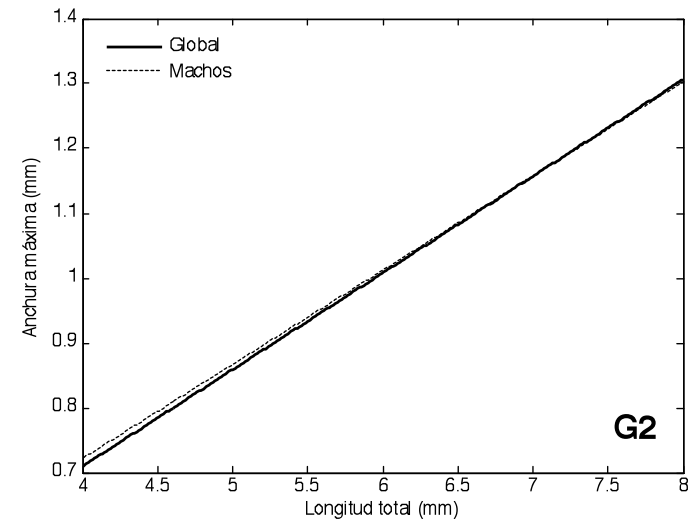
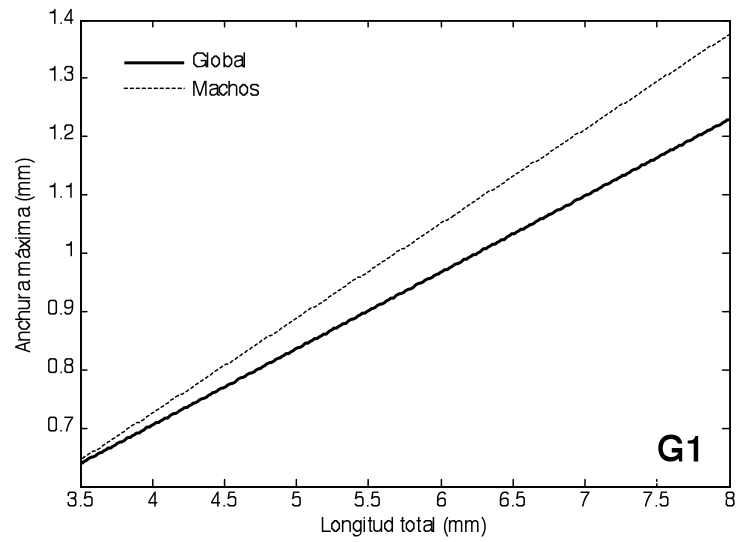
### **RELACIONES MORFOMÉTRICAS DE LAS GÓNADAS POR GRUPO DE INCUBACIÓN**

Para cada grupo sólo se muestran las rectas cuyos ajustes fueron significativos, sin incluir el diagrama de dispersión de los datos, a fin de facilitar la comparación gráfica. Para cada grupo de incubación, en la tabla aparecen las ecuaciones correspondientes a cada sexo, indiferenciados y al global, con sus respectivos estadísticos.

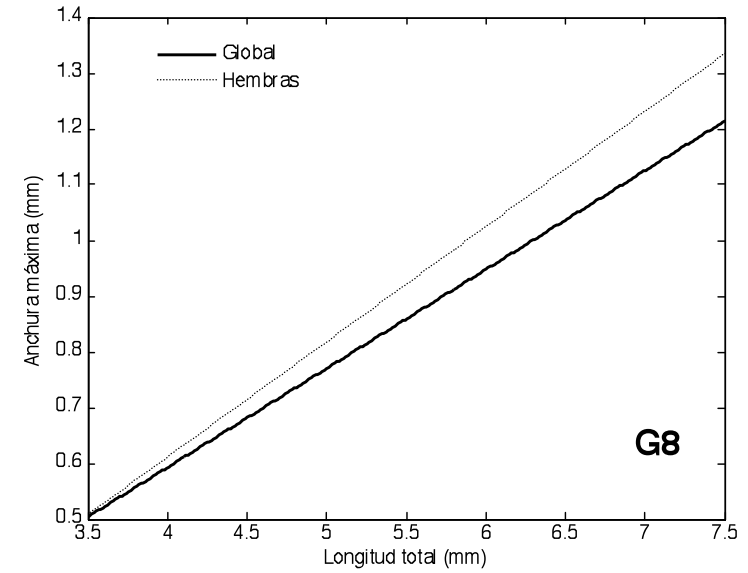
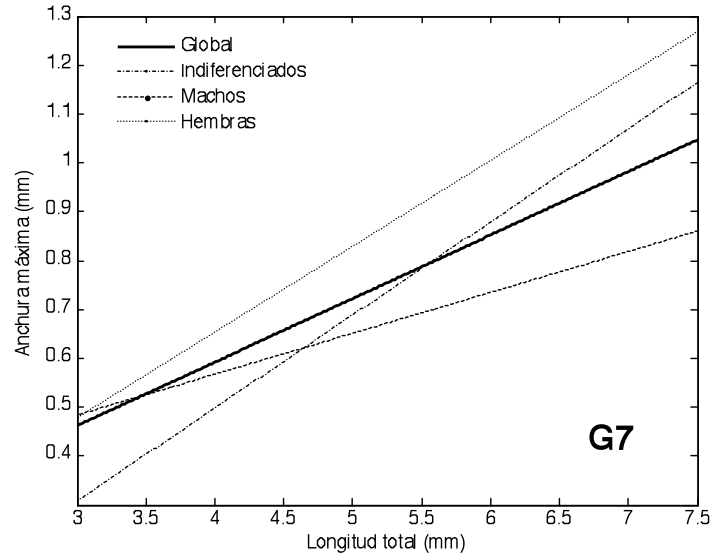
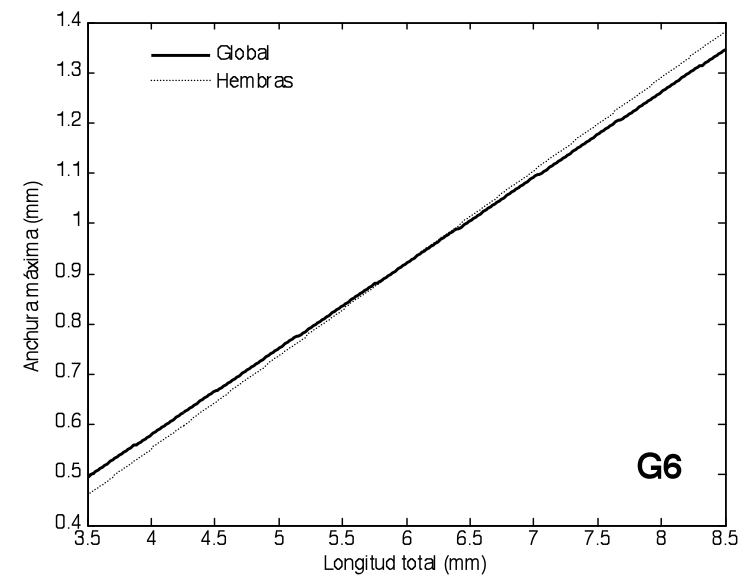
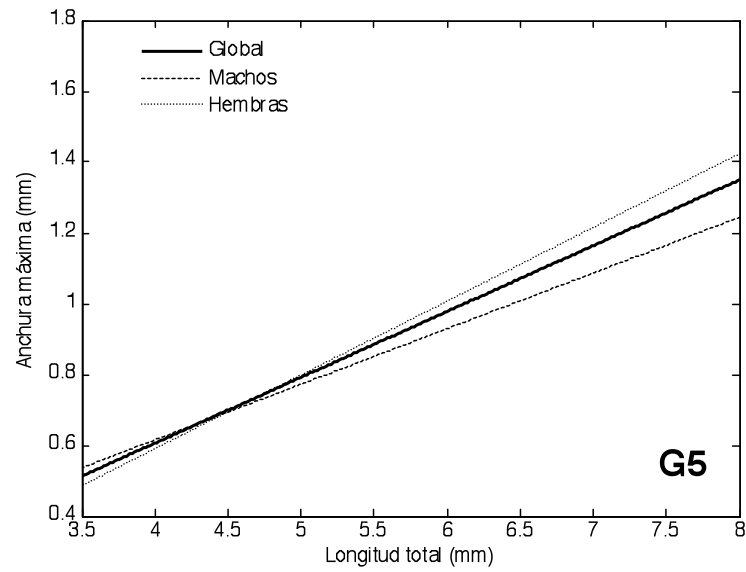
|                 | Ecuación           | r     | n  | p     |
|-----------------|--------------------|-------|----|-------|
| G1              |                    |       |    |       |
| Global          | $A=0.13*L + 0.18$  | 0.525 | 21 | 0.007 |
| Indiferenciados | -                  | -     | -  | -     |
| Machos          | $A=0.16*L + 0.076$ | 0.593 | 11 | 0.027 |
| Hembras         | -                  | -     | -  | -     |
| G2              |                    |       |    |       |
| Global          | $A=0.15*L + 0.11$  | 0.663 | 20 | 0.001 |
| Indiferenciados | -                  | -     | -  | -     |
| Machos          | $A=0.15*L + 0.14$  | 0.670 | 10 | 0.017 |
| Hembras         | -                  | -     | -  | -     |
| G3              |                    |       |    |       |
| Global          | $A=0.13*L + 0.15$  | 0.589 | 21 | 0.002 |
| Indiferenciados | -                  | -     | -  | -     |
| Machos          | $A=0.16*L + 0.064$ | 0.658 | 10 | 0.019 |
| Hembras         | -                  | -     | -  | -     |
| G4              |                    |       |    |       |
| Global          | $A=0.12*L + 0.22$  | 0.568 | 19 | 0.006 |
| Indiferenciados | -                  | -     | -  | -     |
| Machos          | -                  | -     | -  | -     |
| Hembras         | -                  | -     | -  | -     |
| G5              |                    |       |    |       |
| Global          | $A=0.19*L - 0.14$  | 0.764 | 21 | 0.000 |
| Indiferenciados | -                  | -     | -  | -     |
| Machos          | $A=0.16*L - 0.013$ | 0.860 | 7  | 0.006 |
| Hembras         | $A=0.21*L - 0.24$  | 0.696 | 12 | 0.006 |
| G6              |                    |       |    |       |
| Global          | $A=0.17*L - 0.1$   | 0.788 | 21 | 0.000 |
| Indiferenciados | -                  | -     | -  | -     |
| Machos          | -                  | -     | -  | -     |
| Hembras         | $A=0.18*L - 0.19$  | 0.844 | 23 | 0.000 |
| G7              |                    |       |    |       |
| Global          | $A=0.13*L + 0.072$ | 0.586 | 23 | 0.002 |
| Indiferenciados | $A=0.19*L - 0.26$  | 0.999 | 3  | 0.011 |
| Machos          | $A=0.084*L + 0.23$ | 0.813 | 10 | 0.002 |
| Hembras         | $A=0.18*L - 0.048$ | 0.640 | 10 | 0.023 |
| G8              |                    |       |    |       |
| Global          | $A=0.18*L - 0.12$  | 0.623 | 21 | 0.001 |

|                 |                    |       |    |       |
|-----------------|--------------------|-------|----|-------|
| Indiferenciados | -                  | -     | -  | -     |
| Machos          | -                  | -     | -  | -     |
| Hembras         | $A=0.21*L - 0.22$  | 0.771 | 10 | 0.004 |
| G9              |                    |       |    |       |
| Global          | $A=0.081*L + 0.38$ | 0.466 | 21 | 0.017 |
| Indiferenciados | $A=0.093*L + 0.3$  | 0.504 | 18 | 0.016 |
| Machos          | -                  | -     | -  | -     |
| Hembras         | -                  | -     | -  | -     |
| G10             |                    |       |    |       |
| Global          | $A=0.19*L - 0.2$   | 0.806 | 21 | 0.000 |
| Indiferenciados |                    |       |    |       |
| Machos          |                    |       |    |       |
| Hembras         | $A=0.18*L - 0.11$  | 0.777 | 20 | 0.000 |

## ANEXO 5



## ANEXO 5



## ANEXO 5

