



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**  
**UNIDAD ACADÉMICA MAZATLÁN**  
**(BIOLOGÍA MARINA)**

**EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE INCUBACIÓN Y LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL  
SOBRE LA MORFOLOGÍA DE CRÍAS DE TORTUGA GOLFINA *Lepidochelys olivacea***

**TESIS**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**  
**ERIK JONATHAN NAVARRO SÁNCHEZ**

**TUTOR:**  
**DR. FEDERICO ALBERTO ABREU GROBOIS**  
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA,  
UNIDAD ACADÉMICA MAZATLÁN, UNAM

**COMITÉ TUTOR:**  
**DRA. ALEJANDRA GARCÍA GASCA**  
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA  
**DR. FAUSTO MÉNDEZ DE LA CRUZ**  
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA  
**DR. VÍCTOR MANUEL GÓMEZ MUÑOZ**  
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA  
**DR. HORACIO MERCHANT LARIOS**  
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

MÉXICO, D. F. ENERO 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al laboratorio de Genética del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (Unidad Académica Mazatlán) donde he aprendido sobre una gran variedad de temas relacionados a la línea de investigación que pretendo desarrollar. Al Dr. F. Alberto Abreu Grobois por dirigir esta tesis y recibirme de manera cordial y profesional en este laboratorio, así como las pláticas y enseñanzas compartidas. A Norma Adanary Ruiz García por los gratos momentos compartidos y con quien juntos aprendimos en los muestreos y trabajos de laboratorio. A la M. en C. Raquel Briseño Dueñas por su opinión y aporte al desarrollo de la tesis, los momentos de reflexión y desahogo que compartimos. A la M. en C. María de los Ángeles Herrera por su tiempo y disposición durante el trabajo en el laboratorio.

Al santuario de anidación de tortugas marinas playa el Verde Camacho por facilitar sus instalaciones y permitirnos realizar la colecta de las muestras. Al Biol. Daniel Ríos Olmeda por la atención y retroalimentación brindada durante el desarrollo de nuestro experimento. A Efraín y todo el personal que labora en el campamento y que ayudo durante nuestras prácticas de colecta.

Al laboratorio de Histopatología del Centro de Investigación en alimentación y Desarrollo A. C. Unidad Mazatlán donde me brindaron las facilidades para el procesamiento de las muestras. A la M. en C. Selene María Abad Rosales por el tiempo de colaboración.

Al Dr. Víctor Hugo Cruz Escalona y a la M. en C. Andrea Franco Moreno, del Laboratorio de Ecología de Pinnípedos "Burney J. LeBoeuf" en el departamento de Pesquerías y Biología Marina del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional, por su tiempo, hospitalidad y atenciones brindadas durante mi estancia en La Paz B. C.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme cursar este posgrado, y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante el periodo de mis estudios. A la Unidad Académica Mazatlán y al personal que labora en ella por su accesibilidad y disposición para el uso de sus instalaciones.

A los miembros del comité: a la Dra. Alejandra García Gasca, al Dr. Fausto Méndez de la Cruz, al Dr. Víctor Manuel Gómez Muñoz y al Dr. Horacio Merchant Larios por sus recomendaciones y comentarios que mejoraron el trabajo.

A toda mi familia y a las personas queridas y cercanas, que son parte de mi segunda familia, ya que todos fungieron un papel importante y determinante para la realización de esta tesis. A mi madre, mi abue y mis tías, que son las personas importantes en mi vida y, que siempre me hicieron sentir su incondicional apoyo en los momentos en los que lo necesite, y que gracias a ellas pude continuar hasta el momento de concluir esta tesis.

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>I</b>
<b>ÍNDICE</b> .....	<b>III</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>V</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>X</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XII</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2 ANTECEDENTES</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1 Especie de estudio</b> .....	<b>5</b>
<b>2.2 Morfometría geométrica</b> .....	<b>6</b>
<b>3 JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>9</b>
<b>4 HIPÓTESIS</b> .....	<b>12</b>
<b>5 OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
<b>5.1 General</b> .....	<b>13</b>
<b>5.2 Específicos</b> .....	<b>13</b>
<b>6 PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>14</b>
<b>7 SITIO DE COLECTA</b> .....	<b>15</b>
<b>8 MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
<b>8.1 Trabajo de campo</b> .....	<b>16</b>
<b>8.2 Incubación</b> .....	<b>17</b>
<b>8.2.1 Sistema de incubación</b> .....	<b>17</b>
<b>8.2.2 Calibración de sensores de temperatura</b> .....	<b>23</b>
<b>8.2.3 Funcionamiento del código</b> .....	<b>25</b>
<b>8.2.4 Incubación y monitoreo</b> .....	<b>26</b>
<b>8.3 Registro fotográfico</b> .....	<b>27</b>
<b>8.4 Determinación de sexo</b> .....	<b>27</b>

8.4.1	Obtención de gónadas.....	27
8.4.2	Histología .....	28
8.4.3	Aclaración de gónadas.....	29
<b>8.5</b>	<b>Número de escudos.....</b>	<b>29</b>
<b>8.6</b>	<b>Morfometría lineal.....</b>	<b>31</b>
<b>8.7</b>	<b>Morfometría geométrica.....</b>	<b>33</b>
<b>8.8</b>	<b>Análisis estadísticos .....</b>	<b>36</b>
<b>9</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
<b>9.1</b>	<b>Eclosión.....</b>	<b>38</b>
<b>9.2</b>	<b>Determinación de sexo por métodos invasivos .....</b>	<b>39</b>
9.2.1	Histología .....	39
9.2.2	Aclaración de gónadas.....	41
9.2.3	Comparación histología vs aclaración .....	42
<b>9.3</b>	<b>Número de escudos.....</b>	<b>44</b>
9.3.1	Variaciones en número de escudos.....	46
<b>9.4</b>	<b>Determinación de sexo por morfometría.....</b>	<b>50</b>
9.4.1	Morfometría lineal.....	50
9.4.2	Morfometría geométrica.....	57
<b>10</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>66</b>
<b>10.1</b>	<b>Sistema de incubación .....</b>	<b>66</b>
<b>10.2</b>	<b>Determinación de sexo por métodos invasivos .....</b>	<b>67</b>
<b>10.3</b>	<b>Número de escudos.....</b>	<b>69</b>
<b>10.4</b>	<b>Determinación de sexo por morfometría lineal .....</b>	<b>71</b>
<b>10.5</b>	<b>Determinación de sexo por morfometría geométrica .....</b>	<b>73</b>
<b>10.6</b>	<b>Trabajo a futuro.....</b>	<b>76</b>
<b>11</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>78</b>
<b>12</b>	<b>LITERATURA CITADA .....</b>	<b>81</b>
<b>13</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>91</b>
13.1	ANEXO I.....	91
13.2	ANEXO II.....	95

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Variación observada de: a) el promedio mundial de las temperaturas en superficie; b) el promedio mundial del nivel del mar a partir de datos mareométricos (azul) y satelitales (rojo); y c) la cubierta de nieve del Hemisferio Norte durante marzo-abril (fuente: IPCC, 2007).....	2
<b>Figura 2.</b> Localización geográfica del santuario “Campamento Tortuguero el Verde Camacho”, Mazatlán Sinaloa.....	15
<b>Figura 3.</b> Diagrama general del sistema de incubación.....	18
<b>Figura 4.</b> Diagrama de circuito electrónico del controlador de potencia (voltaje) de corriente alterna utilizado para el control de la temperatura en las incubadoras desarrolladas. ....	19
<b>Figura 5.</b> Distribución espacial dentro del cuarto de incubación.....	20
<b>Figura 6.</b> Fotografías de la distribución y configuración de las incubadoras dentro del cuarto de incubación.....	21
<b>Figura 7.</b> Diagrama de incubadora y posición de la charola.....	21
<b>Figura 8.</b> a) Sensor sumergible de temperatura DS18B20 con recubrimiento de acero inoxidable. b) Sensor de temperatura DS18B20. c) Sensor de humedad relativa DHT22. ....	23
<b>Figura 9.</b> Comparación de la dispersión de las variaciones de lectura antes y después de la calibración.....	24
<b>Figura 10.</b> Sistema de toma de fotografías.....	27
<b>Figura 11.</b> Carapacho de cría de <i>Lepidochelys olivacea</i> . Identificación de escudos: (N) nucal, (V) vertebrales, (C) costales, (M) marginales y (SC) Supracaudales.....	30
<b>Figura 12.</b> Clasificación de escudos según sus características geométricas .....	31
<b>Figura 13.</b> a) Medidas lineales del carapacho obtenidas mediante vernier. b) Medidas lineales digitales obtenidas de fotografías digitales mediante el software ImageJ 1.46r. ....	32
<b>Figura 14.</b> Ilustración de cría de tortuga golfina ( <i>Lepidochelys olivacea</i> ) de las 69 landmarks utilizadas en el estudio.....	34

<b>Figura 15.</b> a) Superposición generalizada Procrustes de todas las crías de tortuga en la que se aprecia la variación total en cada landmark. b) Promedio de forma presentado como rejilla fina de deformación.....	34
<b>Figura 16.</b> Módulos de conjuntos de escudos seleccionados a partir de las landmarks ajustadas por el GPA que presentaron las mayores diferencias. La descripción de escudos incluidos en cada módulo se detalla en la Tabla III. ....	35
<b>Figura 17.</b> Cortes transversales de gónadas de crías de tortugas marinas <i>Lepidochelys olivacea</i> . A. Gónada masculina que se observa la presencia de túbulos seminíferos. B. Gónada femenina en la que se aprecia la ausencia de cuerdas medulares y el engrosamiento de de la superficie epitelial formando la corteza ovárica. ....	40
<b>Figura 18.</b> Proporción sexual, de los nidos combinados, para los tratamientos de 24°C a 34°C representado por la proporción de hembras.....	41
<b>Figura 19.</b> Gónadas de <i>L. olivacea</i> procesadas por aclaración con glicerol en las cuales se puede apreciar la diferenciación sexual. <b>A</b> Acercamiento de una gónada femenina en la cual se observan estrías en el borde, con una tonalidad más opaca en la parte medial de la gónada que en el borde. <b>B</b> Gónada femenina completa. <b>C</b> Gónada masculina completa. <b>D</b> Gónada masculina en la cual se observa una patrón granular, debido a la presencia de túbulos seminíferos, sin estrías en su superficie. ....	42
<b>Figura 20.</b> Efecto de la temperatura de incubación sobre el número de escudos para cada conjunto de escudos. ....	46
<b>Figura 21.</b> Gráfica de los promedios y desviación estándar de las diez mediciones morfométricas realizadas sobre fotografías digitales (longitud en mm) de las crías eclosionadas en cada tratamiento (Tabla XI). ....	51
<b>Figura 22.</b> Análisis de componentes principales de las mediciones morfométricas. El Componente Principal 1 explica el 52.3% de la varianza total y el Componente Principal 2 explica el 17.0%. ....	54
<b>Figura 23.</b> Gráfico de la función discriminante por sexos usando las siete medidas morfométricas lineales estandarizadas no correlacionadas.....	55

**Figura 24.** Gráficas de los componentes principales 1 y 2 de todos los módulos con las muestras identificadas según su temperatura de incubación por distintos colores (verde = 26, amarillo = 28, violeta = 30, rojo = 32)..... 59

**Figura 25.** Valores de la función discriminante por sexos para el ModuloAnterior para todos los tratamientos. En el eje de las abscisas, los valores a la derecha del cero identifican a la clase “Hembra”, a la izquierda la clase “Macho”..... 61

**Figura 26.** Función discriminante del ModuloAnterior construida a partir de los coeficientes para cada coordenada Procrustes X, Y derivados del Análisis de Función Discriminante (DFA) para la clasificación por sexos..... 62

**Figura 27.** Rejilla de deformación representando la forma promedio del ModuloAnterior de las crías de *Lepidochelys olivacea* para ambos sexos (M=macho H=hembra). 63

**Figura 28.** Gráfica de distribución de los valores calculados de FD para los conjuntos de landmarks del ModuloAnterior de las crías provenientes de las cuatro temperaturas de incubación. Valores de  $FD < 0$  identifican a la clase macho,  $FD > 0$  a hembras. Para cada tratamiento (temperatura) se graficó la distribución de los valores de FD y se designó el sexo deducido por histología de cada cría por color (rojo=hembras; azul=machos). El error estándar para cada temperatura = barras de error; promedio =círculo vacío negro..... 65

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Distribución de los sensores de temperatura y humedad dentro y fuera de las incubadoras.....	22
<b>Tabla II.</b> Número de muestras tomadas para cada nido y cada tratamiento.....	28
<b>Tabla III.</b> Nombre de escudos involucrados y número de landmarks en cada módulo. .....	35
<b>Tabla IV.</b> Eclosiones y porcentajes de eclosión por nido en cada tratamiento descartando los HSDA.....	39
<b>Tabla V.</b> Clasificación de sexos a partir de histología y transparentación.....	43
<b>Tabla VI.</b> Identificación de sexos en mismas muestras, comparando los resultados de histología y transparentación.....	44
<b>Tabla VII.</b> Estadística descriptiva de los escudos del carapacho de las crías de tortuga <i>Lepidochelys olivacea</i> . Con asterisco los conjuntos de escudos cuya abundancia fue afectada significativamente ( $P < 0.05$ ) por el tratamiento (temperatura de incubación).....	45
<b>Tabla VIII.</b> Variación en la abundancia y frecuencia de los escudos del carapacho de crías de <i>Lepidochelys olivacea</i> y sus frecuencias (%). Izq-Der = distribución Izquierda – Derecha.....	47
<b>Tabla IX.</b> Ocurrencia de diferentes niveles de variación en la abundancia de escudos del carapacho de crías de tortuga golfina para los tratamientos de temperatura de incubación.....	48
<b>Tabla X.</b> Número de variaciones de escudos del carapacho de crías de tortuga golfina comparado con el patrón normal y su relación con los tratamientos.....	49
<b>Tabla XI.</b> Estadística descriptiva de las medidas lineales con vernier y digitales de las crías de tortuga <i>Lepidochelys olivacea</i> . Las ubicaciones de los rasgos morfométricos analizados están descritas en la Figura 11.....	50
<b>Tabla XII.</b> Matriz de correlaciones y significancia de las mediciones morfométricas. Las mediciones altamente correlacionadas se indican con letras en negritas itálicas.	53

<b>Tabla XIII.</b> Porcentaje de correcta clasificación de crías en las categorías de cada tratamiento (temperatura, nido de procedencia, sexo) con estandarización y sin estandarización de datos; con y sin variables correlacionadas.....	56
<b>Tabla XIV.</b> Porcentaje de correcta asignación del sexo para crías de los tratamientos en los que se obtiene un solo sexo.....	56
<b>Tabla XV.</b> Número de componentes principales y porcentaje de varianza explicada para los primeros dos componentes principales.....	58
<b>Tabla XVI.</b> Tabla de resumen de resultados de la clasificación de sexos utilizando el DFA y significancia de los grupos (sexo) por módulos. En rojo se indican los valores significativos ( $P < 0.05$ ).....	60
<b>Tabla XVII.</b> Clasificación de crías de los tratamientos en los que por la temperatura de incubación hay certeza que hubo proporciones sexuales del 100% para un solo sexo usando la función discriminante derivada de la clasificación por sexos ( <i>FD</i> ) del ModuloAnterior.....	64
<b>Tabla XVIII.</b> Comparación de los costos y efectividad de las diferentes técnicas utilizadas para la evaluación del sexo.....	69

## RESUMEN

Las tortugas marinas dependen de condiciones específicas que garanticen una incubación exitosa de sus huevos, por lo que son extremadamente vulnerables a las transformaciones ambientales previstas bajo escenarios del cambio climático global. En este trabajo se logró desarrollar un sistema modular de seis incubadoras independientes capaces de controlar la temperatura constante de incubación. Se realizaron incubaciones de huevos de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) de tres nidos (N=90 c/u), distribuidos (N=15) en seis tratamientos a temperaturas constantes (24-34°C), contando con la licencia de muestreo científico “SGPA/DGVS/05780/12” de la Dirección General de Vida Silvestre y la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Se obtuvo desarrollo embrionario en todos los nidos y en todas las temperaturas de incubación (24-34°C), logrando eclosión en cuatro de los seis tratamientos (26-32°C), con periodos de incubación de 42 a los 97 días y porcentajes de eclosión superiores al 85%.

Un seguimiento sencillo y confiable de la proporción sexual en nidos es necesario para monitorear cambios en el tiempo y su relación con las temperaturas ambientales. Mediante técnicas histológicas se obtuvieron las proporciones sexuales para cada tratamiento teniendo 100% de machos en las temperaturas de 24-28°C, 100% de hembras en los tratamientos de 32-34°C y una proporción de ambos sexos (70% machos y 30% hembras) en el tratamiento de 30°C. En ningún tratamiento se encontraron diferencias en las proporciones sexuales asociadas al nido de procedencia. Se realizó la comparación de la efectividad de sexado de las técnicas de transparentación de gónadas (88.6%), morfometría lineal (75.3%) y morfometría geométrica (100%) respecto a la histología considerada como la técnica por excelencia o “Gold Standard”.

Dado el probable efecto que la temperatura ejerce sobre las características merísticas y morfológicas de las crías, además del sexo, es necesario evaluar estas relaciones de

una manera más robusta. Se encontró que el efecto de la temperatura de incubación es significativo sobre el número de escudos costales izquierdos ( $X^2_{[3]} = 25.811$ ,  $p < 0.05$ ), vertebrales ( $X^2_{[3]} = 56.610$ ,  $p < 0.05$ ), costales derechos ( $X^2_{[3]} = 9.856$ ,  $p < 0.05$ ) y nucales ( $X^2_{[3]} = 13.010$ ,  $p < 0.05$ ). Se encontró variación en el patrón de escudos del carapacho respecto al patrón “normal” (1 escudo nual, 5 escudos vertebrales, 1 par de escudos supracaudales, 6 pares de escudos costales y 12 pares de escudos marginales) del 76.5% de las crías obtenidas en las incubaciones en todos los tratamientos, encontrando diferencias significativas en la incidencia en las variaciones debido a la temperatura de incubación ( $X^2_{[3]} = 7.875$ ,  $p < 0.05$ ).

## ABSTRACT

Sea turtles depend on specific conditions that guarantee successful egg incubation, so they are extremely vulnerable to environmental transformations envisaged under global climate change scenarios. A modular system was developed with six independent incubators controlling constant incubation temperatures. Olive ridley eggs from three nests (N = 90 each) were incubated and distributed (N = 15) in six treatments at constant temperatures (24-34° C), with the permit of scientific sampling "SGPA/DGVS/05780/12" of the Dirección General de Vida Silvestre y la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Embryonic development of all nests and at all incubation temperatures (24-34° C) was observed. Hatching occurred in four of six treatments (26-32° C), with incubation periods of 42 to 97 days, and hatching percentages higher than 85%.

A simple and reliable method to monitor sex ratios in nests is required to follow changes in time and the relationship with environmental temperatures. Using histological techniques, sex ratios for each treatment were obtained with 100% males at 24-28°C, 100% females at 32-34°C, and both sexes (70% males and 30% females) at 30°C. Since differences in sex ratios associated with the nest of origin were found in every treatment, the effectiveness of sexing techniques was compared, gonadal transparenation (88.6%), linear morphometrics (75.3%) and geometric morphometrics (100%), with respect to histology considered the Gold Standard technique.

Given the potential effect that temperature has on the meristic and morphological characteristics of hatchlings, besides sex, it is necessary to evaluate these relationships in a more robust manner. A significant effect of incubation temperature on the number of left rib shields ( $X^2_{[3]} = 25,811$ ,  $p < 0.05$ ), spine ( $X^2_{[3]} = 56,610$ ,  $p < 0.05$ ), rights rib shields ( $X^2_{[3]} = 9,856$ ,  $p < 0.05$ ) and nuchal ( $X^2_{[3]} = 13.010$ ,  $p < 0.05$ ) was observed. Variation was found in the pattern of carapace scutes from the normal pattern obtained in 76.5% of hatchlings from all treatments (1 nuchal shield, 5 vertebral

scutes, 1 pair of supracaudals shields, 6 pairs of costal scutes, and 12 pairs of marginal scutes); significant differences in the incidence of these variations due to incubation temperatures were found ( $X^2_{[3]} = 7.875, p < 0.05$ ).

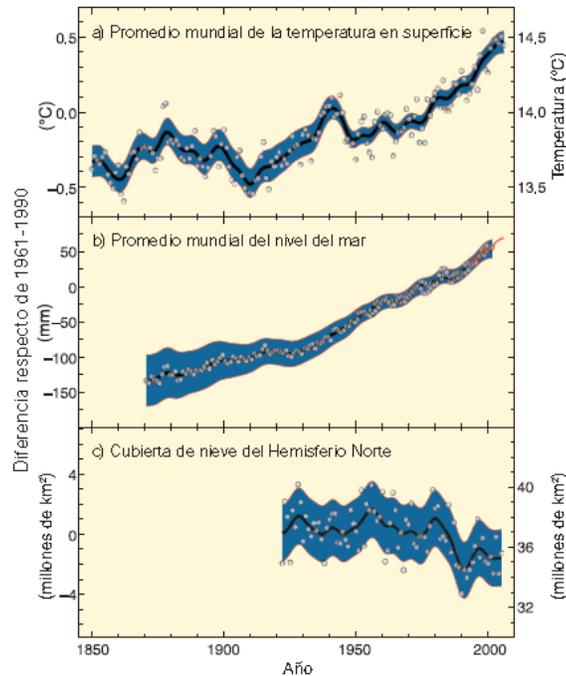
# 1 INTRODUCCIÓN

Se define al cambio climático como “...todo cambio que ocurre en el clima a través del tiempo, resultado de la variabilidad natural o de las actividades humanas”. El calentamiento de la Tierra o “calentamiento global”, por su parte, es la manifestación más evidente del cambio climático y se refiere al incremento promedio de las temperaturas terrestres y marinas globales. A pesar de que el clima cambia de manera natural, los expertos señalan que existen claras evidencias de que el calentamiento del planeta registrado en los últimos 50 años puede ser atribuido a los efectos de las actividades humanas (Cambio Climático 2010).

El calentamiento del sistema climático es inequívoco, como evidencian ya los aumentos observados del promedio mundial de la temperatura del aire y del océano, el deshielo generalizado de nieves y hielos, y el aumento del promedio mundial del nivel del mar (Figura 1). De los doce últimos años (1995-2006), once figuran entre los doce más cálidos en los registros instrumentales de la temperatura de la superficie mundial (desde 1850). El aumento de nivel del mar concuerda con este calentamiento (Figura 1). En promedio, el nivel de los océanos mundiales ha aumentado desde 1961 a 1.8 [entre 1.3 y 2.3] mm/año, y desde 1993 a 3.1 [entre 2.4 y 3.8] mm/año, en parte por efecto de la dilatación térmica y del deshielo de los glaciares, de los casquetes de hielo y de los mantos de hielo polares (IPCC 2007).

En 1992, México firmó la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CMNUCC), misma que fue ratificada en 1993. En 1997 se firmó el Protocolo de Kyoto y quedó ratificado en el año 2000. En 2005, fue creada la Comisión Intersecretarial de Cambio Climático (CICC) como el órgano federal responsable de formular las políticas públicas y las estrategias transversales de mitigación y adaptación al cambio climático. Sin embargo, fue hasta 2009, cuando se publicó el Programa Especial de Cambio Climático (PECC). En este contexto, y de acuerdo con los objetivos estratégicos del Programa Nacional de Áreas Naturales Protegidas 2007-2012, la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP) presenta la

Estrategia de Cambio Climático para Áreas Protegidas (ECCAP) con el fin de conservar el patrimonio natural de México para hacer frente los efectos del cambio climático al convertir a las áreas protegidas en un instrumento efectivo para la adaptación y mitigación del país, con la participación de diversos actores de la sociedad (CONANP 2010).



**Figura 1.** Variación observada de: a) el promedio mundial de las temperaturas en superficie; b) el promedio mundial del nivel del mar a partir de datos mareométricos (azul) y satelitales (rojo); y c) la cubierta de nieve del Hemisferio Norte durante marzo-abril (fuente: IPCC, 2007)..

Las tortugas marinas ocupan una amplia gama de hábitats costeros y marinos, y muchos aspectos de su historia de vida han demostrado estar estrechamente ligados a las variables climáticas, como la temperatura del ambiente y las tormentas. Como grupo, por lo tanto, las tortugas marinas pueden ser buenos indicadores de los efectos del cambio climático sobre su entorno (Hawkes *et al.* 2009). Las especies que tienen determinación de sexo dependiente de la temperatura (TDS, por sus siglas en inglés) producen uno de los sexos arriba de una temperatura umbral (llamada “pivote”) y el otro por debajo de este valor. En el caso de las tortugas marinas arriba de la

temperatura pivote se producen hembras. Curiosamente, en condiciones naturales las playas de anidación de tortugas marinas tienden a producir proporciones de sexos en su descendencia sesgadas, favoreciendo la proporción de hembras (Hays *et al.* 2010).

Además del sexo de los neonatos la temperatura de incubación influye sobre variables fisiológicas durante la incubación de huevos de tortugas marinas como la mortalidad, malformaciones, el tiempo de desarrollo, la duración de la incubación, tamaño, masa, y la cantidad de vitelo (Foley 1998, Reece *et al.* 2002, Booth *et al.* 2004). El desarrollo embrionario es más rápido a temperaturas más altas, lo que resulta en períodos más cortos de incubación (Davenport 1997).

El enigma ecológico de la TDS ha motivado preocupación de que temperaturas extremas ocasionadas por el cambio climático pueden inducir la producción de generaciones de un solo sexo y por lo tanto conducir a la extinción de la población. Todas las especies de tortugas marinas presentan TDS. El aumento de temperatura de la arena causado por el cambio climático podría poner en peligro la estabilidad de las poblaciones de tortugas marinas en el futuro (IUCN 2009).

Por lo anterior, los potenciales impactos nocivos por incrementos en las temperaturas ambientales proyectados para el cambio climático sobre las tortugas marinas son de gran preocupación. Más aun, debido a que las tortugas marinas son recursos naturales de gran importancia cultural, ecológica y socioeconómica pero que en la actualidad están catalogadas como especies en peligro de extinción en la normatividad nacional e internacional el agregar nuevos factores de presión podría anular los avances de los programas de protección a los que han estado sujetas.

Los retos a futuro ocasionados por incrementos a las temperaturas se agregarán a una tarea de por sí complicada de protección de las tortugas marinas debido a la complejidad de su historia de vida. Por un lado, será necesario un monitoreo de largo plazo sobre las temperaturas ambientales en sitios de anidación para verificar los cambios en el tiempo y comprobar sus relaciones con el fenómeno de cambio

climático. Por otro, será también indispensable dar seguimiento de manera expedita y práctica a la proporción de sexos entre los neonatos en playas de anidación de tortugas marinas para delimitar y predecir los impactos a futuro en función de los modelos sobre el calentamiento global. Esta necesidad es la que se aborda en este proyecto de investigación.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Especie de estudio

La tortuga golfina, la más pequeña de la familia Cheloniidae, es la especie de tortuga marina más abundante en el mundo. Se caracteriza por tener un caparazón casi circular, este tiene más de 15 escudos mayores, cinco dorsales y frecuentemente más de cinco pares laterales y puede presentar desigualdad en el número de escudos en ambos lados. El plastrón tiene cuatro escudos inframarginales (Frazier 1983).

La cabeza es triangular, presenta dos pares de escamas prefrontales, pico córneo con un reborde alveolar interno (Márquez 1990). En los adultos la cola del macho se asoma por debajo del caparazón y posee dos garras en cada una de sus cuatro extremidades, presentan una coloración del caparazón gris oliváceo o amarillento, el plastrón va de crema a gris verdoso con manchas oscuras en los extremos de las aletas. Las crías son dorsal y ventralmente de color gris oscuro a negro.

En adultos la longitud curva del caparazón (LCC) va de los 67.6 hasta los 78 cm con un ancho de este cercano al 90 % de su longitud recta (Márquez *et al.* 1976).

Tras varias décadas de desarrollo las hembras se reproducen hasta alcanzar una talla promedio de 60 cm. El cortejo y la copula se dan en el mar, la hembra puede almacenar el esperma del macho y usarlo a lo largo de la época de apareamiento. Generalmente una hembra anida de dos a seis veces durante una temporada (Parque Nacional Lagunas de Chacahua. 2008).

El número de huevos depositados por nidada puede ser de hasta 160, con una media alrededor de 105, la cual varía entre localidades. Los huevos son de color blanco y de forma esférica con diámetro de 3.2 a 4.7 cm (Márquez 1990). Las crías concluyen su desarrollo embrionario y eclosionan dentro de los 45-51 días siguientes a la puesta,

dependiendo de la temperatura, misma que también determinará el sexo de las tortugas (Parque Nacional Lagunas de Chacahua 2008).

Su alimentación es diurna, su dieta en la fase juvenil cambia drásticamente según su localización, en aguas oceánicas se alimenta de organismos pelágicos como langostillas y huevos de peces, mientras que en aguas costeras se alimentan de crustáceos, moluscos, peces y salpas (Montenegro *et al.* 1982).

## **2.2 Morfometría geométrica**

La morfometría geométrica surge a finales de los años 80 como un nuevo modo de estudiar las diferencias morfológicas, teniendo en cuenta la globalidad de la forma. Se diferencia de la morfometría tradicional en que el estudio de la forma se realiza mediante coordenadas de puntos, o landmarks, representadas en un plano o en un espacio cartesiano. La morfometría geométrica deriva de la síntesis de dos escuelas que se desarrollaron independientemente durante el siglo pasado. Por una parte la aproximación que se origina directamente de la biometría de Karl Pearson (1857-1936), Francis Galton (1822-1911), W. F. R. Weldon (1860-1906) y Ronald Aylmer Fisher (1890-1962), quienes aplicaron el álgebra de la estadística multivariante (especialmente matrices de covarianza) a conjuntos de distancias, tomadas a partir de una muestra de individuos; y por otra parte la aproximación geométrica asociada al nombre de D'Arcy Wentworth Thompson (1860-1948) con el uso de la representación directa de la diferencia de forma mediante rejillas de deformación.

Los trabajos que establecieron la base teórica de la morfometría geométrica aparecieron en los años ochenta: Bookstein (1982) propuso la descripción de la forma mediante coordenadas cartesianas que permitían visualizar las diferencias entre individuos y la posibilidad de aplicar pruebas t de Student para valorar la significación estadística; Goodall (1983) describió cómo utilizar los valores de las F en coordenadas no estandarizadas para la dimensión; y finalmente Kendall (1984) teorizó la

existencia de un espacio de la forma (o espacio de Kendall) demostrando cómo los trabajos de Bookstein y Goodall se interpretaban en este espacio. A finales de los años 80, la estadística multivariante y la posibilidad de representar visualmente las diferencias morfológicas encontradas entre organismos hallaron su síntesis en la morfometría geométrica, que ha tomado contribución de las matemáticas, de la estadística, de la geometría no euclídea y del desarrollo de los ordenadores cada vez más potentes con la finalidad de realizar las operaciones complicadas de los cálculos necesarios. La morfometría geométrica estudia la forma de los organismos, entendiéndose como forma (form) el conjunto de dos componentes: dimensión (size) y conformación (shape). La dimensión viene definida por el tamaño del centroide (centroid size), que constituye una estimación geométrica de la dimensión de un objeto en todas las direcciones respecto a su centroide, a diferencia de las medidas lineares entre dos puntos, y se define como la raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de las distancias entre el centroide del objeto y cada punto homólogo (Bookstein 1991). La conformación se caracteriza únicamente por su propiedad geométrica (la posición relativa de las coordenadas en el espacio), y a su vez está formada por una componente uniforme y otra no uniforme. La primera representa toda la diferencia de forma asociada a una escala infinita, es decir no localizada en ningún punto del objeto que se está estudiando. Forman parte de esta transformación el alargamiento (dilatación) o la compresión o bien el deslizamiento de una parte sobre la otra. Las diferencias no uniformes son aquéllas localizadas en determinadas áreas de la configuración (Bookstein 1996).

Los métodos geométricos, los cuales se aplican a datos obtenidos en forma de coordenadas de landmarks en dos o tres dimensiones, han engendrado un especial entusiasmo porque permiten recuperar y visualizar la información espacial que no es capturada por el conjunto de medidas de distancias. En estudios de sistemática, la morfometría geométrica es una herramienta muy potente. El análisis de grupos muy próximos, como es el caso de poblaciones, demos y subespecies, siempre implica la comparación de formas muy similares, que difieren sobre todo en pequeños desplazamientos relativos de landmarks. Esto significa que es más probable que los

landmarks sean homólogos cuando se comparan diferentes formas de grupos próximos que cuando los taxones no están tan relacionados (Loy 1996).

### 3 JUSTIFICACIÓN

El incremento de la temperatura ambiental bajo el escenario de cambio climático global trae consigo consecuencias potencialmente graves para las especies de tortugas marinas, particularmente en la fase embrionaria que se lleva a cabo en playas de anidación. Para ser exitosa, la incubación requiere condiciones térmicas que garanticen: (1) intervalos adecuados de temperatura para un desarrollo saludable de los embriones y (2) la producción balanceada de ambos sexos. El último factor es relevante en escenarios con variaciones en las temperaturas debido a que, como muchos otros reptiles, las crías de tortugas marinas son hembras si la temperatura de incubación rebasa un umbral (“temperatura pivote”), machos si está por debajo, y una proporción igual si permanece cercano a ese valor. Un incremento de temperatura significativo en las incubaciones provocaría la combinación de altas mortalidades de embriones y un sesgo hacia hembras en crías sobrevivientes, ambas consecuencias drásticas que pondrían en riesgo la persistencia de las especies de tortugas marinas.

Ante la posibilidad de que el cambio climático afecte la proporción de sexos en tortugas marinas surgen preocupaciones sobre el seguimiento práctico de este parámetro en las playas de anidación. Por ejemplo, ¿cuál sería la metodología menos invasiva pero a su vez precisa y accesible, para dar seguimiento a la proporción de sexos generada en playas en las que el régimen térmico cambia bajo los efectos del cambio climático?

Para dar respuesta a estas preocupaciones, el presente proyecto evaluará el uso de métodos de morfometría geométrica sobre neonatos para estudiar su eficiencia, factibilidad y exactitud en la determinación del sexo en comparación con métodos estándar usando histología. Adicionalmente, reconociendo que los estudios anteriores generalmente han limitado las temperaturas experimentales a solo dos (feminizante y masculinizante) (por ejemplo Michel-Morfin *et al.* 2001) o una sola a la temperatura pivote (Valenzuela *et al.* 2004) se implementará un sistema de incubadoras económicas controladas por microprocesadores Arduino de arquitectura abierta para

comparar la morfología y el sexo resultantes de incubaciones a varias temperaturas abarcando el intervalo completo del rango térmico para la especie. Esto permitirá por primera vez deslindar con mayor exactitud y complejidad los efectos de la temperatura sobre la morfología y sobre el desarrollo del sexo.

La problemática prevista por los incrementos en las temperaturas ambientales estará afectando cada una de las especies de tortugas marinas, todas consideradas como especies en peligro de extinción. Sin embargo, entre éstas especies la de mayor abundancia y la que ha demostrado los mejores índices de recuperación en las últimas décadas es la tortuga golfina, *Lepidochelys olivacea*. Esta situación relativamente favorable, se refleja en el hecho que de todos los quelonios, es la única que ha sido posible cambiar su estado de conservación de condición “en peligro” a “vulnerable” (Abreu-Grobois y Plotkin 2008). Esta situación favorece y justifica su uso para experimentos como los planteados y que involucra el sacrificio de decenas de organismos. Estos niveles de mortalidad no pueden considerarse significativos para la población fuente dado que llegan a ocurrir típicamente más de 1000 anidaciones por año en estas playas, con entre 90 y 120 huevos por nido. Es decir un sacrificio de alrededor de 300 huevos representa menos del 0.3% del esfuerzo reproductivo. Además, a diferencia de otras especies de tortugas marinas, la golfina presenta arribadas, no en el Verde pero sí en otras playas del Pacífico, en cuyos casos se estiman 200,000 nidos por año y millones de crías de esta especie. Bajo esta óptica, la relativa abundancia de la especie y su extensión de anidaciones en playas del Pacífico mexicano constituye una valiosa fuente justificada de especímenes modelo para estudios de fisiología y desarrollo ante el cambio climático.

Por las delicadas repercusiones posibles a causa de incrementos en las temperaturas en los hábitats de incubación los programas de manejo requieren de información confiable y sobre la especie bajo consideración no solo sobre los límites letales de temperatura sino también sobre las consecuencias de sobrevivir bajo regímenes sub-letales mismos que pueden impactar el desempeño de crías en sus primeros días críticos que son cuando primero ingresan al mar. Para lograr este propósito

abordando las interrogantes anteriormente mencionadas, el presente proyecto representa una primera fase de un estudio de mayor alcance. En esta primera etapa se desarrollará un sistema de incubadoras con temperatura y humedad controladas por microprocesadores de arquitectura abierta que además de servir como la plataforma experimental para regímenes térmicos de incubación para el resto del proyecto, se aprovecharán componentes electrónicos económicos pero de alta precisión, conducentes a manejos flexibles de las condiciones experimentales y de fácil replicación. Esto último permitirá reproducir el estudio sobre temperaturas a diferentes colonias de la misma especie de tortuga marina dentro de su ámbito de distribución y de esta manera ampliar la línea base de datos sobre sensibilidad y variación intrapoblacional de la respuesta a altas temperaturas. Esta plataforma de trabajo permitirá la incubación en un gradiente de temperaturas abarcando la producción de ambos sexos, temperaturas sub-letales, y letales para estudiar y analizar de manera simultánea la relación entre temperatura, morfometría, sexo y características de desempeño en crías. Los resultados serán de utilidad para mejorar predicciones sobre impactos por el cambio climático en función del grado de plasticidad y la variación de la respuesta a temperaturas altas que, a su vez, permitirán adecuar las prácticas de protección de la especie ante escenarios del cambio climático en el futuro.

## **4 HIPÓTESIS**

La temperatura de incubación influye sobre la variación en el número de escudos de las crías producidas

Existe una relación directa entre la morfología geométrica de crías de tortuga marina y los regímenes térmicos de su incubación pero dentro de cada temperatura es posible distinguir entre machos y hembras por diferencias morfológicas.

La probabilidad de estimación del sexo de crías de tortuga golfina usando morfología geométrica es alta comparando con los resultados derivados de resultados histológicos o de transparentación de gónadas.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 General

Analizar los efectos de una gama de regímenes térmicos constantes de incubación de huevos de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) sobre la morfología y sexo de las crías producidas.

### 5.2 Específicos

- Desarrollar un sistema de incubación para huevos de tortuga marina con temperaturas constantes controladas por microprocesador Arduino abarcando el rango completo de tolerancia para la especie (24, 26, 28, 30, 32, 34°C).
- Determinar el sexo de las crías producidas en los distintos regímenes térmicos por medio de dos métodos invasivos: (a) histología, (b) transparentación de gónadas.
- Caracterizar los patrones y variaciones en el número de escudos de las crías y determinar su relación con la temperatura y humedad de incubación y el sexo.
- Caracterizar la morfología geométrica de carapachos y aletas de las crías eclosionadas y su relación con (a) la temperatura de incubación y (b) el sexo.
- Derivar modelos matemáticos para relacionar la morfología geométrica de las crías producidas con (a) la temperatura de incubación y (b) su sexo.
- Comparando con los resultados de sexado por histología, evaluar la capacidad y confiabilidad de los modelos de morfología geométrica para predecir el sexo de crías.
- Evaluar las ventajas y desventajas del uso de morfología geométrica para identificar el sexo de neonatos en la tortuga golfina.

## **6 PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuál es la relación entre la temperatura de incubación y las principales dimensiones morfológicas (largo y ancho de carapacho, largo aletas, ancho de cabeza) de crías de la tortuga golfina?

¿Cómo se relaciona la temperatura de incubación con la distribución espacial de puntos de referencia (morfometría geométrica) en el carapacho y aletas de crías de tortuga golfina?

¿Cuál es la relación entre el sexo de crías incubadas a distintas temperaturas (determinado por histología) y la morfometría geométrica?

¿Tomando en cuenta la variación morfométrica asociada con la temperatura de incubación, qué tanta confiabilidad en la determinación del sexo de crías de tortuga golfina se puede lograr usando la morfometría geométrica?

## 7 SITIO DE COLECTA

El santuario de anidación de tortugas marinas “Campamento Tortuguero el Verde Camacho” ubicado entre los paralelos 23° 28’ 34” y 23° 18’ 30”N y los meridianos 106° 34’ 20.60” y 106° 29’ 04.00”O (Figura 2). El polígono del santuario se localiza al norte del municipio de Mazatlán y corre desde “Punta Cerritos”, al sur, hasta “Punta Gruesa (Mármol)”, al norte, y de Oeste a Este abarca desde la isolínea batimétrica de las 5 brazas al contorno de la “Maxipista Mazatlán-Culiacán”. Tiene una superficie aproximada de 6,450.26 ha, y 25 km en el perímetro costero, correspondientes al 31% de la extensión litoral del municipio de Mazatlán, Sinaloa en el Noroeste de México.

El santuario “Campamento Tortuguero el Verde Camacho” es una playa índice para áreas de no arribada de la tortuga golfina, *Lepidochelys olivacea* (Briseño-Dueñas, 1980) catalogado como Santuario de Tortugas Marinas por la CONANP en 2001. El verde representa la playa de anidación más importante para la reproducción de la tortuga golfina en el estado de Sinaloa. Por esta razón, desde 1975, se estableció un programa de protección por el “Departamento Pesquero de México” en Mazatlán con la colaboración del “Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Estación Académica Mazatlán, UNAM” (Hendrickx *et al.* 1983).



**Figura 2.** Localización geográfica del santuario “Campamento Tortuguero el Verde Camacho”, Mazatlán Sinaloa.

## 8 MÉTODOS

### 8.1 Trabajo de campo

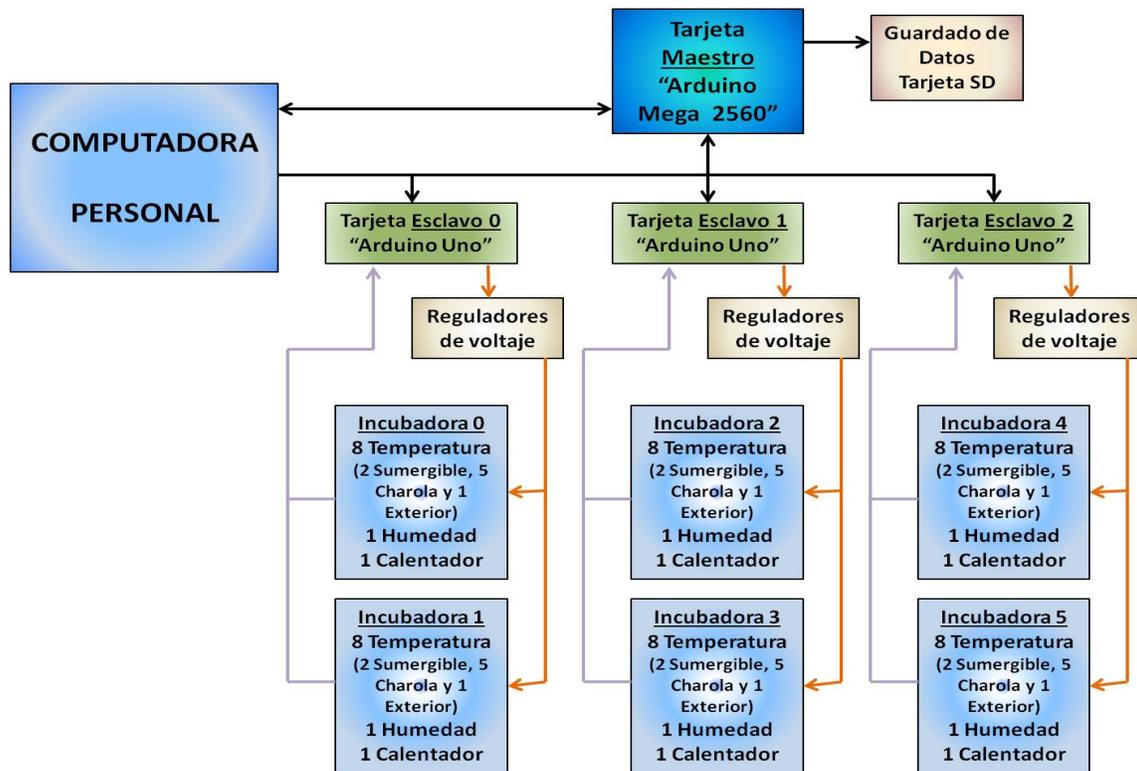
Para la extracción de muestras necesarias para este trabajo se contó con un permiso de la Dirección General de Vida Silvestre y la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. La licencia de muestreo científico por proyecto sobre especies o poblaciones en riesgo o sobre hábitat crítico es la que se identifica con el número de oficio "SGPA/DGVS/05780/12". Este permiso es requerido debido a que las tortugas marinas se encuentran dentro de la categoría de especie en peligro de extinción de acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT-2010.

El área natural protegida del santuario de tortugas marinas el Verde Camacho se visitó durante el final de la temporada de anidación 2012-2013. La colecta de tres nidadas de diferentes hembras se realizó el 03 de enero del 2013 durante el patrullaje nocturno a lo largo de la playa tomando medidas del largo curvo del caparazón (LCC) y del ancho curvo del caparazón (ACC) (Eckert *et al.* 2000) de dos de las tres hembras anidadoras. Los huevos se extrajeron de la arena y fueron colocados en bolsas de plástico recabando los datos especificados en la ficha de campo, justo como se realiza habitualmente en el campamento. En las instalaciones del campamento se tomaron 90 huevos de cada nidada los cuales fueron aleatoriamente pesados, medidos en su diámetro máximo y marcados para su futura identificación, con un lápiz de dibujo suave "2B", con un código alfanumérico comprendido de una letra (A, B ó C) que indica el nido de procedencia y un número (1, 2, 3,...,90) que indica el número individuo. Los huevos fueron colocados de manera ordenada con la marca de identificación hacia arriba, evitando movimientos bruscos, en cajas de poliestireno expandido relleno con vermiculita (vermiculita media nacional, ICAPSA, Culiacán). La mañana del 04 de enero del 2013 las nidadas fueron trasladadas por automóvil al cuarto de incubación, ubicado en las instalaciones del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica Mazatlán.

## **8.2 Incubación**

### **8.2.1 Sistema de incubación**

Se instrumentaron seis incubadoras basadas en hieleras comerciales Coleman® de 51 litros de capacidad. En el fondo de cada una se mantuvo un depósito de 8 litros de agua purificada en el que se colocó un calentador de acuario de 200W controlado por una combinación de microprocesadores, de plataforma Arduino®. Con esta configuración de calentador sumergido, además de generar el calor necesario, proporcionaban los niveles de humedad en el sistema, los cuales se mantuvieron homogéneos dentro de la incubadora con un arreglo de ventiladores en cada una de ellas. Las incubadoras permanecieron dentro de un cuarto de temperatura controlada con temperatura ambiental ajustado a 22°C, en la salas de acuarios del “ICMyL Unidad Académica Mazatlán” (Figura 5 y Figura 6). El sistema de incubación completo consta de la serie de seis incubadoras controladas, por pares, a través de microprocesadores Arduino UNO® “esclavos” los cuales, a su vez, estuvieron manejados por un microprocesador Arduino MEGA® que fungió como “maestro” (Figura 3).



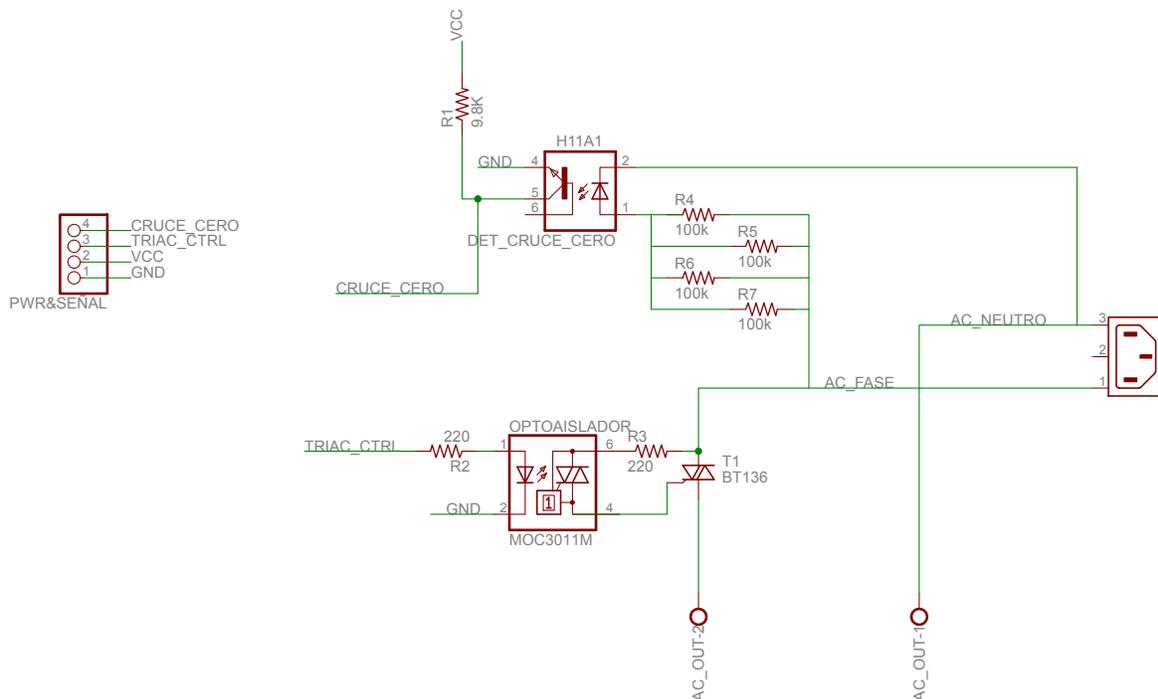
**Figura 3.** Diagrama general del sistema de incubación.

Todos los sensores de cada par de incubadoras estuvieron conectados a un microprocesador esclavo que enviaba la información al microprocesador central, programado para coordinar las diferentes incubadoras por medio de (1) solicitar periódicamente datos, (2) registrarlos en memoria SD, (3) calcular ecuaciones que derivan los ajustes del calentador necesario para mantener la temperatura deseada en cada incubadora y (4) enviar el dato de la potencia requerida a cada esclavo. Los niveles de humedad relativa también fueron registrados, a través de sensores digitales de humedad relativa “DHT22” (Figura 8c) con la misma frecuencia que los sensores de temperatura “DS18B20” (Figura 8 a y b).

Los niveles de temperatura fueron ajustados modulando el voltaje enviado al calentador, a través de un sistema de control de fase (potencia) el cual denominamos control TRIAC el cual se describe más adelante, de acuerdo a las lecturas evaluadas por el microprocesador para que la temperatura sobre la superficie de los huevos se mantenga en el valor experimental deseado en cada incubadora. Se mantuvo una

circulación del aire dentro de cada incubadora con ventiladores de computadora modificados para garantizar un régimen térmico homogéneo. Las seis temperaturas que se usaron para los experimentos fueron: 24, 26, 28, 30, 32, 34°C.

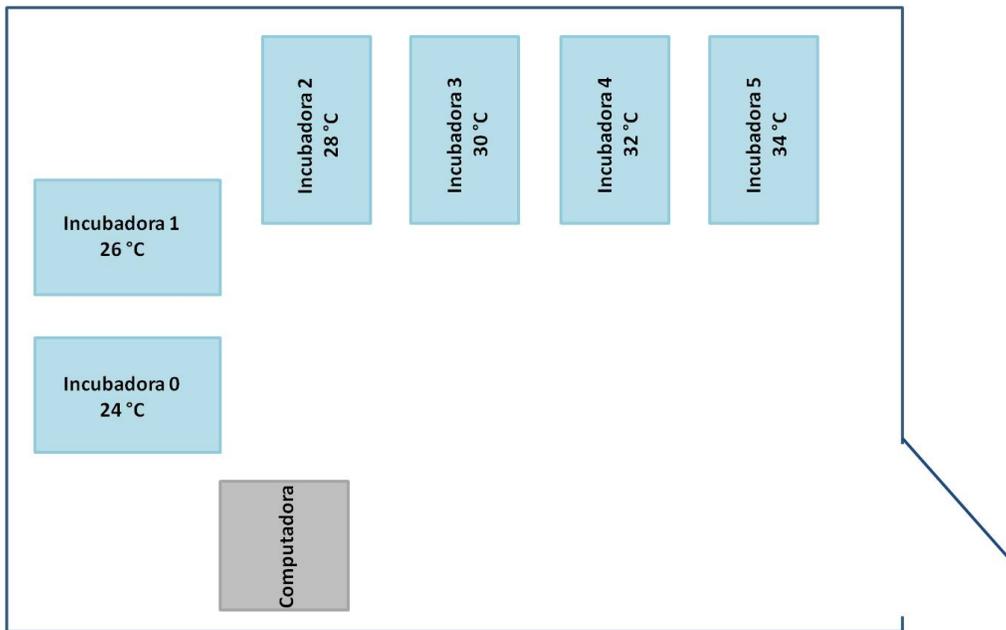
El sistema de control TRIAC que desarrollamos se diseñó con la intención de funcionar como un interruptor bidireccional de corriente alterna capaz de regular la potencia de salida en función de la señal proveniente del microprocesador Arduino. En la figura se observa el esquemático del circuito electrónico utilizado en este proyecto para que pueda ser interpretado y replicado en el diseño de sistemas que requieran una regulación similar.



**Figura 4.** Diagrama de circuito electrónico del controlador de potencia (voltaje) de corriente alterna utilizado para el control de la temperatura en las incubadoras desarrolladas.

El código Arduino utilizado (ver ANEXO I y ANEXO II) para el sistema ha sido desarrollado en colaboración con el M.C. Carlos Montoya de la Universidad Politécnica

de Sinaloa. Tiene básicamente dos componentes, las instrucciones para el funcionamiento de los Arduino esclavos y el maestro (Ver descripción de Funcionamiento del código). El código del maestro permitió establecer una comunicación con los esclavos para recibir los datos de temperatura en tiempo real, comparar la temperatura promedio y evaluar por medio de ecuaciones de control por PID (Proporcional, Integral, Diferencial) la potencia necesaria para mantener o acercarse a la temperatura deseada ("setpoint").



**Figura 5.** Distribución espacial dentro del cuarto de incubación.





**Figura 6.** Fotografías de la distribución y configuración de las incubadoras dentro del cuarto de incubación.

Los huevos en la incubadora se mantuvieron dentro de una charola de armazón de PVC y malla de mosquitero ubicada a 20 cm del espejo de agua (Figura 7), sobre la cual se colocaron en una cama de vermiculita (vermiculita media nacional, ICAPSA, Culiacán) que los cubrió en un 90% aproximadamente.



**Figura 7.** Diagrama de incubadora y posición de la charola.

La temperatura se midió por sensores digitales DS18B20 los cuales se encontraban distribuidos como se especifica en la Tabla I.

**Tabla I.** Distribución de los sensores de temperatura y humedad dentro y fuera de las incubadoras.

<b>Ubicación</b>	<b>Tipo de Sensor</b>
En el depósito de agua	2 Sensores digitales de temperatura sumergibles.
Sobre la superficie de huevos en el centro y las cuatro esquinas de la charola	5 Sensores digitales de temperatura.
En el aire fuera de la incubadora	1 Sensor digital de temperatura.
En el aire dentro de la incubadora	1 Sensor de humedad relativa

Las características de los sensores utilizados para la medición de los parámetros de temperatura y humedad (Figura 8) tienen las siguientes características:

#### Sensores de temperatura DS18B20

- Termómetro digital con resolución seleccionable de 9-bit a 12-bit.
- Rango de medición de temperatura de -55 °C a 125 °C.
- Interface de comunicación 1-Wire. Solo requiere un pin digital de comunicación.
- Código serial de identificación único de 64-bit.
- Precisión de  $\pm 0.5$  °C de -10 °C a 85 °C.
- Alimentación de 3.0V a 5.5V.

#### Sensores de humedad DHT22

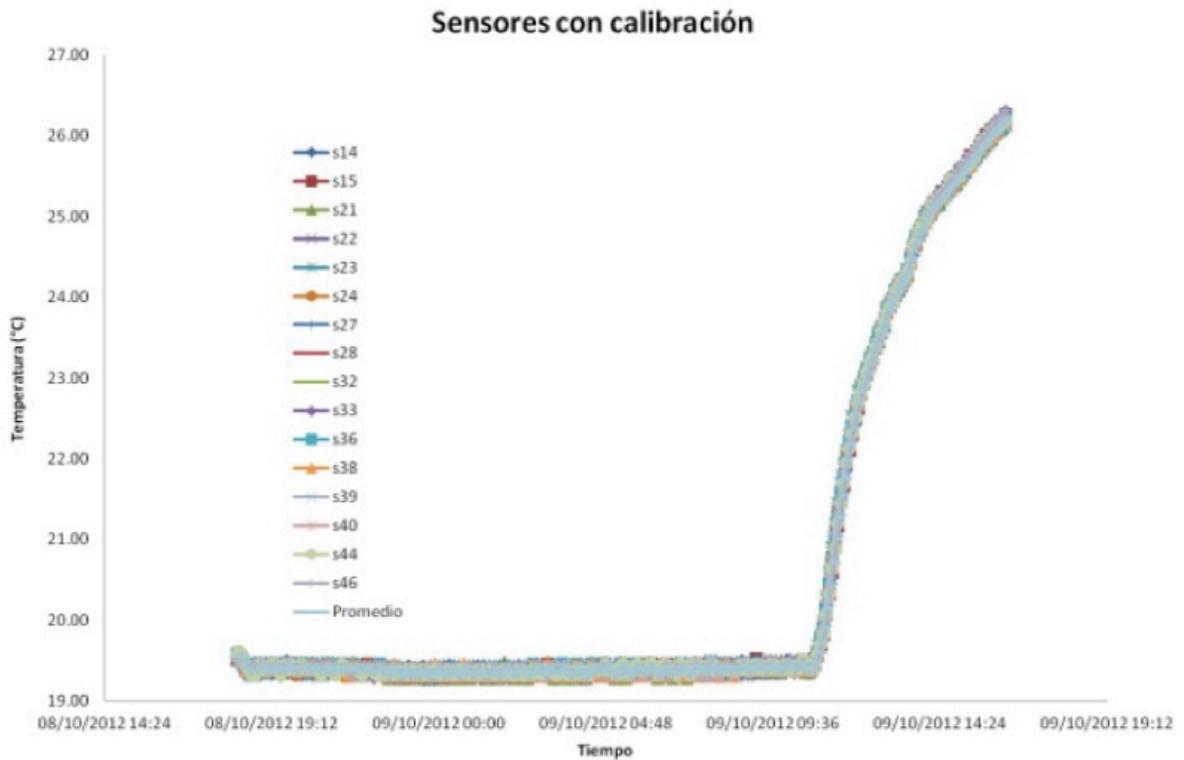
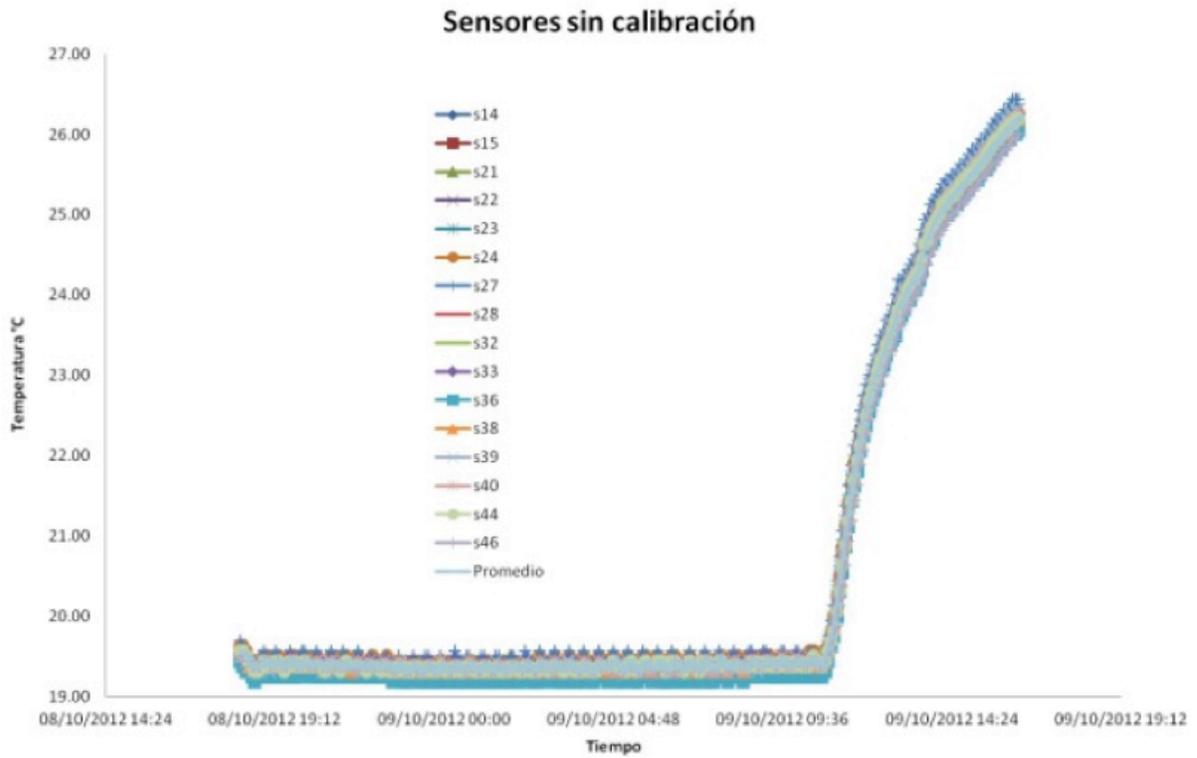
- Capacitor de polímero para detección de humedad.
- Rango de medición de humedad relativa de 0 – 100 %.
- Interface de comunicación bus-digital.
- Precisión de 2 – 5 %.
- Alimentación de 3.3V a 6.0V.



**Figura 8.** a) Sensor sumergible de temperatura DS18B20 con recubrimiento de acero inoxidable. b) Sensor de temperatura DS18B20. c) Sensor de humedad relativa DHT22.

### 8.2.2 Calibración de sensores de temperatura

Las mediciones de los sensores de temperatura presentaban una dispersión entre ellas, a pesar de tener una alta resolución y precisión, especificada por el productor (MAXIM DS18B20 1-Wire Digital Thermometer). Debido a lo anterior, se decidió aplicar una calibración de las lecturas de temperatura derivando así una lectura corregida para cada sensor. La calibración se basó en una regresión lineal de las lecturas medidas respecto al promedio del grupo obteniendo así los valores de corrección para cada sensor. Los resultados pueden apreciarse en la Figura 9 donde se ejemplifican el efecto de la calibración



**Figura 9.** Comparación de la dispersión de las variaciones de lectura antes (izquierda) y después (derecha) de la calibración

### 8.2.3 Funcionamiento del código

El funcionamiento del código del maestro Arduino Mega® (ANEXO II) comienza con la inicialización de un reloj con el cual se realiza la sincronización de las operaciones de cada incubadora. Continúa con la inicialización del lector de una tarjeta SD y la creación de un archivo “.csv”, con el nombre de la fecha y hora de creación, en donde se recopilarán todos datos colectados (fecha y hora, temperaturas, humedad, output, entre otros). El primer ciclo comienza realizando una interrupción de la medición de temperaturas, mediante el protocolo de comunicación “I2C[i]”, siendo “i” el número de incubadora, al funcionamiento del esclavo para solicitar las temperaturas de las últimas cinco mediciones de temperatura y humedad almacenadas en la variable “Temps[i]” con los cuales se obtiene un promedio de temperaturas. Si alguno de los valores de “Temps[i]” proporcionados por el esclavo es menor a 0 o mayor a 99.99 se considera como valor erróneo y se solicita una nueva medición de todos los parámetros para considerarlos en el promedio. Con el promedio corregido de errores se ejecuta la rutina “myPIDi.Compute que se encarga de realizar el cálculo de la potencia requerida (proporcional al voltaje por aplicar) de salida (Output), mediante el mecanismo de control por realimentación de un algoritmo que considera tres parámetros en función del error: Proporcional, Integral y Derivativo (nombre del cual se obtienen las siglas PID), para cada incubadora el cual es transmitido al esclavo por el mismo protocolo de comunicación “I2C”. Una vez finalizada la comunicación de recepción y transmisión de datos en cada incubadora se inicia el ciclo de guardado de la información generando una cadena de todos los valores, medidos y calculados, los cuales se agregan como un nuevo guión al archivo “.csv” inicialmente creado. Estos ciclos se realizan en un intervalo de tiempo de 10 segundos para cada incubadora, teniendo así lecturas de los promedios de las temperaturas y cálculos de las nuevas variables de salida cada 10 segundos.

El funcionamiento del código de cada esclavo Arduino Uno® (ANEXO I) comienza con la inicialización de las librerías de los sensores de temperatura y humedad, identificados mediante su número de serie, en el orden especificado según su

ubicación dentro de la incubadora los cuales se almacenan en la variable "Temps[i]". Así como los pines del sistema regulador de voltaje (control TRIAC). Los sensores realizan una medición permanente cada segundo y corrigen las mediciones, en función de su calibración, durante todo el tiempo que se encuentre trabajando la tarjeta "Esclavo", hasta el momento de recibir la interrupción del maestro que solicite la información de la variable "Temps[i]" y proporcione los valores "Output" de la salida de potencia (proporcional al voltaje) de cada incubadora, calculados para calentamiento de cada incubadora, convirtiéndolos en valor de la variable "DutyC(i)". Al recibir los cálculos el "Esclavo" ajusta (de ser necesario) el nuevo valor de salida de voltaje (DutyC(i)) para llevar a cabo el nuevo nivel de calentamiento, hasta la siguiente interrupción, y continua con las lecturas de los parámetros cada segundo.

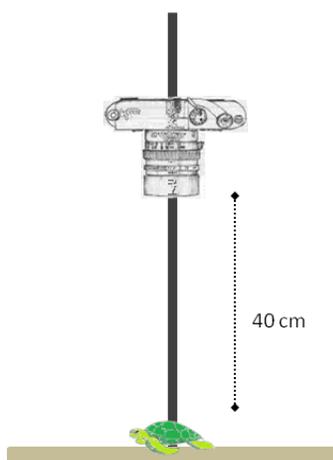
#### **8.2.4 Incubación y monitoreo**

Quince huevos de cada nidada fueron distribuidos en cada incubadora siguiendo la numeración consecutiva antes marcada; representando tres réplicas (5 huevos por réplica) de cada nidada en cada tratamiento. Las seis temperaturas corresponden al rango de desarrollo embrionario abarcando temperaturas de escaso o nulo desarrollo ( $< 26^{\circ}\text{C}$ ), promotora de machos (TPM  $28^{\circ}\text{C}$ ), temperatura pivote (TP  $30^{\circ}\text{C}$ ), temperatura promotora de hembras (TPH  $32^{\circ}\text{C}$ ), y temperaturas subletal y letal superiores ( $34^{\circ}\text{C}$ ) (Merchant-Larios *et al.* 1997).

Los huevos fueron incubados hasta término sobre charolas con vermiculita, la cual los cubría hasta un 90%, bajo temperaturas constantes y humedad controlada (ej. Mrosovsky 1988), ambos parámetros fueron registrados y controlados en intervalos de 10 s para cada incubadora por el sistema de microprocesadores. A lo largo del periodo de incubación, los huevos fueron revisados ocasionalmente para verificar la viabilidad y llevar un registro de la supervivencia.

### 8.3 Registro fotográfico

Se obtuvo un registro fotográfico de imágenes digitales de alta resolución, del carapacho de cada una de las 162 crías eclosionadas, utilizando una cámara réflex “Nikon D3100” de 14.2 millones de pixeles acoplada a un lente “Macro Nikkor 55mm”. La cámara se encontraba fijada a un pedestal para mantener una altura fija de 40 cm y una posición constante, respecto a la horizontal, en cada toma como se ilustra en la Figura 10.



**Figura 10.** Sistema de toma de fotografías.

### 8.4 Determinación de sexo

#### 8.4.1 Obtención de gónadas

De las crías eclosionadas y los embriones se tomaron muestras representativas de cada nido para cada tratamiento (Tabla II). El sacrificio de las crías se realizó por eutanasia, al menos al tercer día después de su eclosión, basados en las consideraciones descritas por la ANZCCART (2001) y la AVMA (2007), inyectando 2.5  $\mu\text{L}$  de una solución anestésica (pentobarbital sódico 60 mg/mL) directamente en la vena caudal. Después de una observable inconsciencia de las crías se procedió a la decapitación.

**Tabla II.** Número de muestras tomadas para cada nido y cada tratamiento.

<b>Tratamiento (°C)</b>	<b>Nido A</b>	<b>Nido B</b>	<b>Nido C</b>	<b>Total Tratamiento</b>
24	6	10	10	26
26	8	10	8	26
28	9	7	8	24
30	7	7	7	21
32	9	8	7	24
34	8	3	5	16
<b>Total Nido</b>	<b>47</b>	<b>45</b>	<b>45</b>	<b>137</b>

Se realizó la disección de los complejos gónada-riñón para cada muestra los cuales fueron colocadas por pares en casetes histológicos marcados con el número de cría de procedencia. Estas muestras de tejido fueron fijadas en una solución de formalina al 10% en agua de mar.

De cada par de muestras una de ellas fue seleccionada para ser analizada mediante técnicas histológicas de determinación sexual (Spotila *et al.* 1987). Del restante de los pares de gónadas 27 fueron donadas al CIAD (Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Unidad Mazatlán) para ser usadas en un estudio de diferenciación sexual, y las restantes fueron separadas de todo resto del tejido de riñón (Van der Heiden *et al.* 1985) antes de ser procesada por la técnica de aclaración con glicerol.

#### **8.4.2 Histología**

El procesamiento de las muestras por histología se realizó en el laboratorio de Histopatología del “Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo Unidad Mazatlán” bajo la supervisión de la MC. Selene María Abad Rosales. Las muestras se retiraron de la solución de formalina al 10% y fueron lavadas con agua de grifo durante 20 minutos para eliminar los restos de formol. Luego del lavado, los tejidos

fueron deshidratados en una batería de alcoholes de concentración creciente hasta llegar a xileno y ser pasados a parafina de inclusión tisular. Previamente las muestras se embebieron, orientadas para realizar cortes transversales, en parafina. Se obtuvieron cortes de 5  $\mu\text{m}$ , con un micrtomo de rotación "Leica", los cuales fueron teñidos mediante la técnica hematoxilina-eosina y fijados sobre portaobjetos identificados con el número de cría. Las muestras montadas se observaron mediante microscopio óptico para identificar su estructura y diferenciar las características de cada sexo siguiendo los criterios de Morreale *et al.* (1982), Merchant-Larios *et al.* (1989) y Wibbels *et al.* (1991).

#### **8.4.3 Aclaración de gónadas**

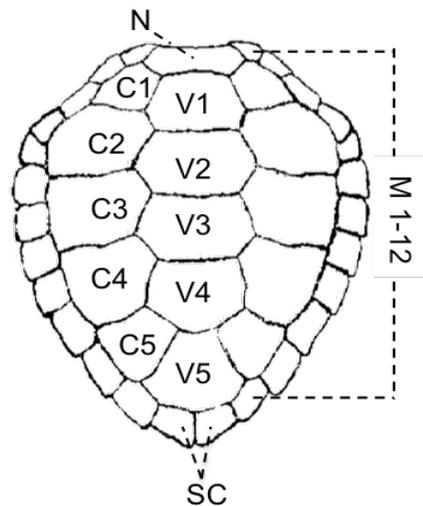
De las muestras de gónadas restantes solo 110 fueron procesadas por aclaración con glicerol. Estas gónadas se encontraban completamente separadas y limpias de tejido de riñón para evitar interferencias como lo recomiendan Van der Heiden *et al.* (1985). Las muestras fueron trasladadas, dentro de los casetes histológicos identificados, a un recipiente de vidrio el cual contenía una mezcla de formalina 4% y glicerol con un traza de sulfato cúprico para evitar el crecimiento de moho. El recipiente se colocó sobre una plancha de calentamiento alcanzando los 40°C, por al menos una noche, para eliminar la solución de formol dejando las gónadas inmersas completamente en glicerol (Van der Heiden *et al.*, 1985). Las muestras aclaradas fueron observadas con un estereoscopio de disección utilizando luz transmitida para identificar las características descritas por Spotila *et al.* (1983) y Van der Heiden *et al.* (1985).

#### **8.5 Número de escudos**

El conjunto típico de escudos de quelonios, término introducido por Deraniyagala (1939), consiste de escudos vertebrales, que es una serie media longitudinal de elementos no apareados, flanqueado a cada lado por escudos costales en series bilaterales emparejadas. A su vez, en su borde existe otra serie de escudos bilaterales emparejados denominados marginales. Ubicado anteriormente, entre el primer par de

marginales se encuentra un escudo nuczal. De manera posterior, entre el último par de marginales se encuentran pareados los escudos supracaudales. Entre las tortugas marinas, la mayor variación en el patrón y el número típico de escudos se encuentra en el género *Lepidochelys* (Mast y Carr 1989).

Para evaluar los efectos que los regímenes térmicos de incubación tienen sobre el número de escudos del carapacho se determinó el número de escudos para cada una de las crías a partir de sus registros fotográficos, contabilizando por series de escudos de acuerdo a Deraniyagala (1939) identificándolos como vertebrales, costales y marginales por lado, nuczal y supracaudales (Figura 11).



**Figura 11.** Carapacho de cría de *Lepidochelys olivacea*. Identificación de escudos: (N) nuczal, (V) vertebrales, (C) costales, (M) marginales y (SC) Supracaudales.

Adicionalmente, debido a la presencia de escudos supernumerarios dentro de las series mencionadas, se realizó una clasificación del tipo de escudo supernumerario en función de los tamaños relativos de los escudos anómalos (Figura 12). Se identificaron como “1/2 escudo” aquellos que tienen contacto con los dos bordes laterales de cada sección y cuyo origen se debía a la división de un escudo completo manteniendo, entre los dos medios escudos, la geometría de un escudo completo. Se identificó como “1/4 escudo” aquellos que solamente estaban en contacto con unos de los bordes laterales

de cada sección y presentaban una geometría triangular, que en algunos casos modifica la geometría general del escudo entero. Se definió como “inserto” aquellos escudos que no tienen contacto con ninguno de los bordes laterales de cada sección y se encontraban inmersos en la división de dos escudos mayores.



**Figura 12.** Clasificación de escudos según sus características geométricas

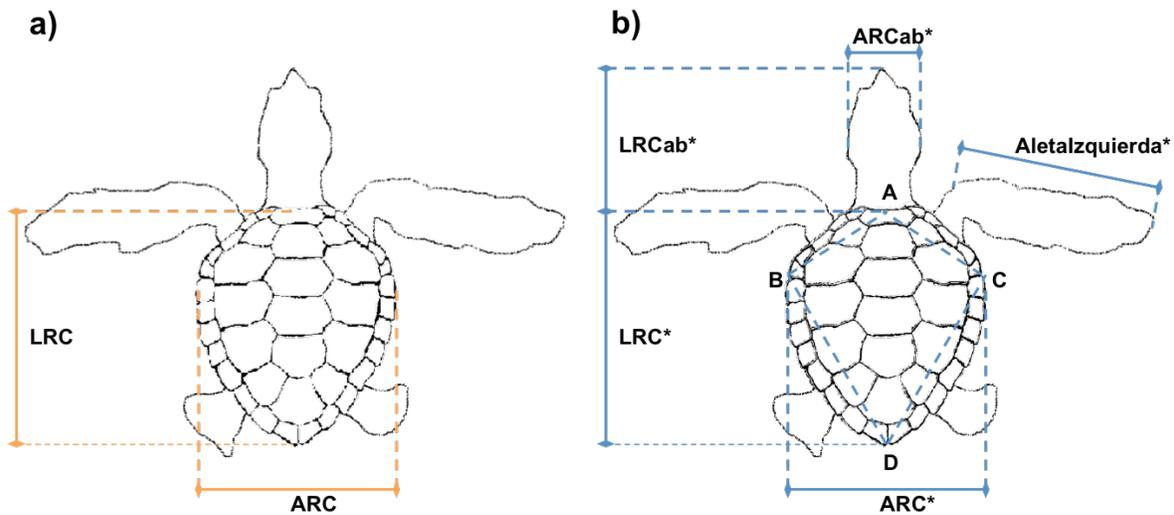
El patrón más frecuentemente observado de escudos en el presente trabajo fue adoptado como el patrón “normal” de escudos: 1 escudo nucal, 5 escudos vertebrales, 1 par de escudos supracaudales, 6 pares de escudos costales y 12 pares de escudos marginales, catalogando las composiciones diferentes como patrones “anormales” de escudos. Utilizando el número total de escudos del patrón normal (44 escudos) se evaluó el número, distribución y frecuencia (%) de escudos del carapacho de las crías, así como el número total de diferentes tipos de variaciones de los escudos del carapacho para cada tratamiento.

## 8.6 Morfometría lineal

Las medidas lineales tomadas en las tortugas marinas pueden ser de dos tipos: medidas rectas tomadas con un vernier o las medidas curvas tomadas con una cinta métrica flexible. En crías es recomendado realizar medidas rectas considerando las complicaciones para evitar distorsiones por la forma del carapacho tan pequeño (Eckert *et al.* 2000). Después de haber eclosionado, justo antes de ser fotografiadas, se tomaron las medidas recomendadas por Bjorndal y Bolten (1989) y Gerosa (1995) del

largo recto mínimo de caparazón desde el punto medio anterior (escudo nugal) a la muesca posterior de la parte media entre los escudos supracaudales, registrándolo como LRC. El ancho recto de carapacho, registrado como ARC, de cada una de las crías se midió en el punto más amplio del carapacho al no contar con una referencia específica para su medición (Eckert *et al.* 2000). Estas medidas se realizaron con un vernier (calibrador) para cada una de las crías muestreadas registrándolas como LRC y ARC respectivamente.

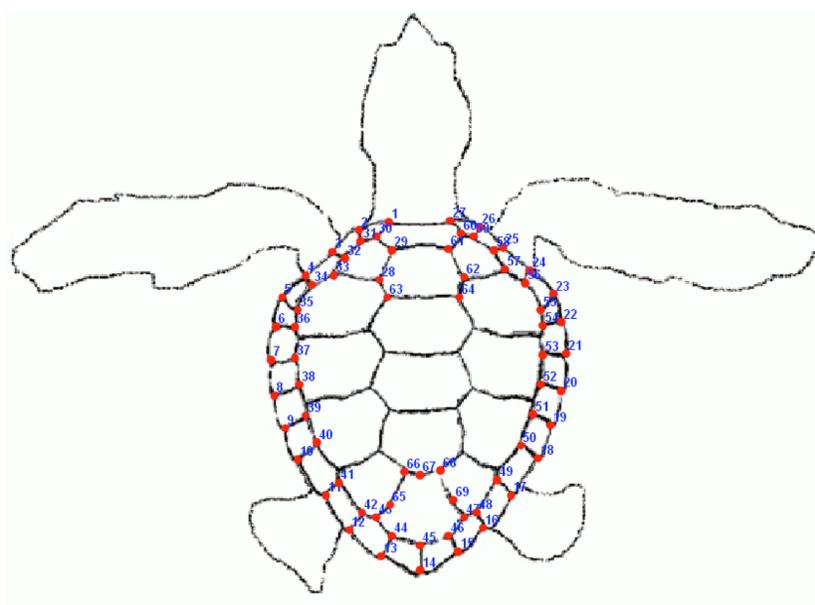
De las fotografías de cada cría se obtuvieron 10 medidas morfométricas digitales mediante el software de procesamiento de imágenes ImageJ versión 1.46r que se identifican con el sufijo “\*” de aquí en adelante. Las medidas morfométricas se corresponden a: ancho recto del carapacho (ARC\*), largo recto del carapacho (LRC\*), ancho recto de la cabeza (ARCab\*), largo recto de la cabeza (LRCab\*), distancia entre los puntos A-B (AB\*), distancia entre los puntos A-C (AC\*), distancia entre los puntos B-D (BD\*), distancia entre los puntos C-D (CD\*) (Figura 13b).



**Figura 13.** a) Medidas lineales del carapacho obtenidas mediante vernier. b) Medidas lineales digitales obtenidas de fotografías digitales mediante el software ImageJ 1.46r.

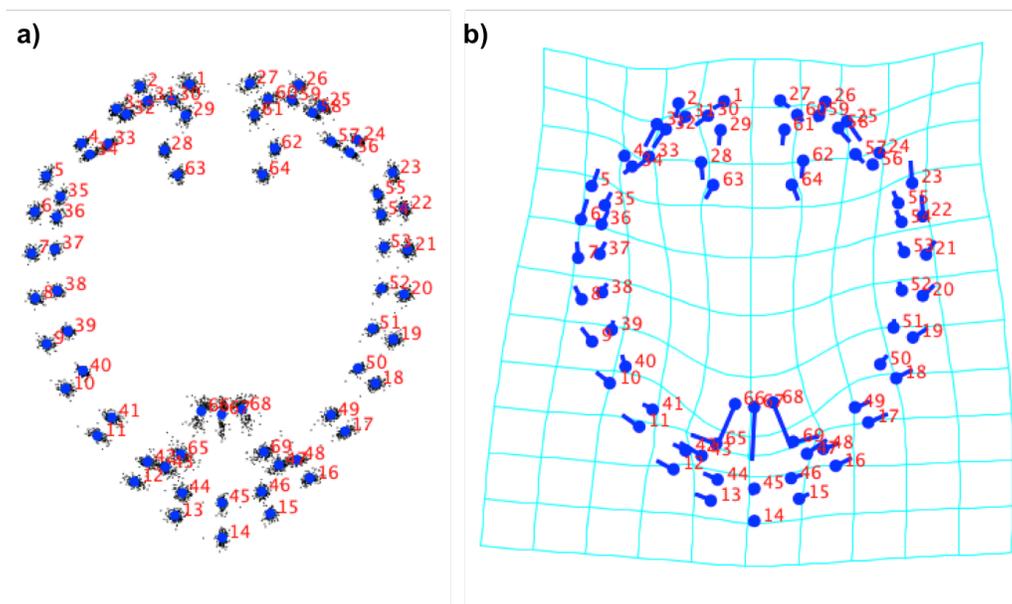
## 8.7 Morfometría geométrica

La evaluación de la forma del carapacho de las crías de tortuga golfinia fue cuantificada utilizando métodos de *morfometría geométrica* basados en el uso de marcas anatómicas homólogas también referidas como “landmarks” por el nombre en inglés (Rohlf y Marcus 1993; Adams *et al.* 2004). Un archivo de datos en el que se almacenaron las coordenadas (x, y) de cada “landmark” en cada imagen, fue creado utilizando el programa “tpsUtil” (Rohlf 2006a). De cada imagen de las 162 crías se obtuvieron las coordenadas de 69 landmarks del carapacho (Figura 14) utilizando el programa “tpsDig2” (Rohlf 2006b). Las landmarks se ubicaron sobre las intersecciones de las líneas que delimitan los escudos marginales, supracaudales, nucal, vertebral superior, vertebral inferior y costales superiores los cuales se consideraron como puntos anatómicos biológicamente repetibles. Los análisis consecuentes se realizaron utilizando el programa “MorphoJ v1.05f”. Se desarrollo un análisis generalizado procrustes (GPA, por sus siglas en inglés) sobre el conjunto completo de coordenadas x, y, para superimponer los individuos sobre un sistema común de coordenadas obteniendo geometrías promedio (geometría consenso), mediante el cual matemáticamente se eliminan los efectos de escala, posición y orientación (Rohlf y Slice 1990).



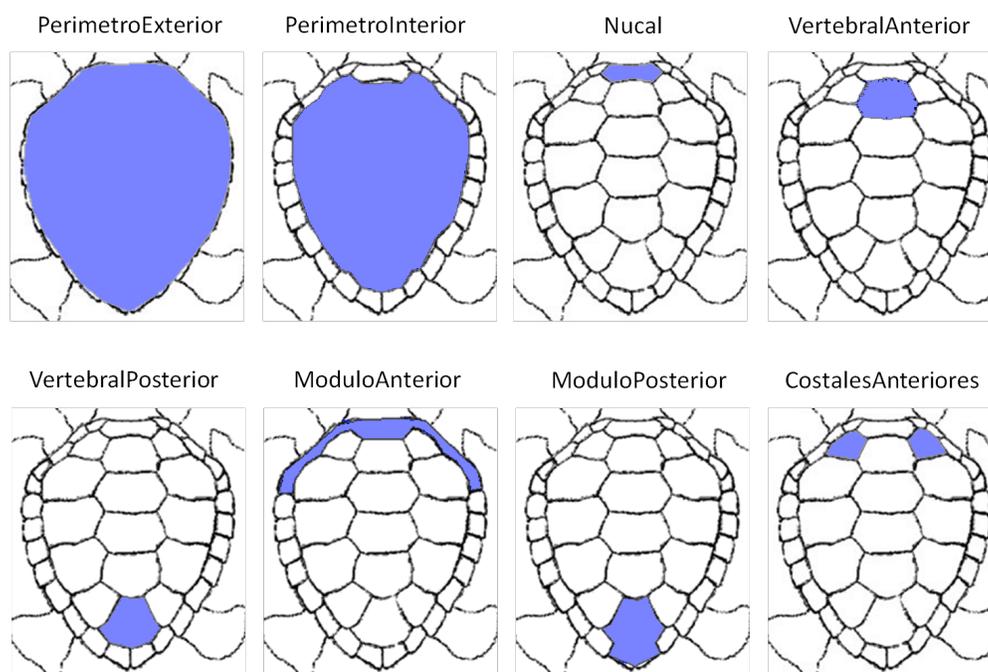
**Figura 14.** Ilustración de cría de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) de las 69 landmarks utilizadas en el estudio.

Con las landmarks de los 162 especímenes alineados (Figura 15a) se obtuvo una geometría consenso y las variaciones de forma fueron calculadas generando una rejilla fina de deformación (Figura 15b). Este análisis deriva un valor vectorial para cada landmark que permite visualizar la dirección de la variación observada en el espacio bidimensional, así como la magnitud de dicha variación por el tamaño (longitud) del vector. Las variables obtenidas del GPA capturan los aspectos de la variación lineal y no lineal de la forma, y pueden ser utilizadas para probar hipótesis de variación y covariación de la forma entre y dentro de grupos utilizando procedimientos estadísticos multivariados estándares (Adams y Rohlf 2000; Rüber y Adams 2001; Adams 2004).



**Figura 15.** a) Superposición generalizada Procrustes de todas las crías de tortuga en la que se aprecia la variación total en cada landmark. b) Promedio de forma presentado como rejilla fina de deformación.

Con las coordenadas ajustadas por el GPA se generaron ocho módulos de análisis (Figura 16) (Tabla III) basados en escudos y conjuntos de escudos en los que se apreciaron los niveles más altos en la variación en la rejilla de deformación promedio.



**Figura 16.** Módulos de conjuntos de escudos seleccionados a partir de las landmarks ajustadas por el GPA que presentaron las mayores diferencias. La descripción de escudos incluidos en cada módulo se detalla en la Tabla III.

**Tabla III.** Nombre de escudos involucrados y número de landmarks en cada módulo.

Nombre usado en este trabajo	Escudos	Número de Landmarks
PerimetroExterno	Marginales, nucal y supracaudales	29
PerimetroInterno	Marginales, nucal y supracaudales	29
Nucal	Nucal	6
VertebralAnterior	Vertebral Anterior	6
VertebralPosterior	Vertebral Posterior	7
ModuloAnterior	Nucal y primeros 5 pares marginales	28
ModuloPosterior	Vertebral Posterior y supracaudales	9

## 8.8 Análisis estadísticos

Se realizaron pruebas de t para muestras repetidas con el paquete IBM® SPSS® Statistics V.20 para evaluar si existían diferencias entre los métodos de obtención de las mediciones morfométricas de ancho recto de carapacho y largo recto de carapacho. Ya que las comparaciones de las mediciones entre las crías pueden verse influenciadas por factores previos a los tratamientos, se analizó el efecto del peso del huevo como covariante en un análisis de modelo lineal general multivariado. Por otro lado, las redundancias en las variables dependientes pueden influenciar las tendencias obtenidas en los resultados. Para abordar este tema, se realizó una matriz de correlaciones de Spearman para identificar variables redundantes entre las mediciones morfométricas. Se realizaron análisis multivariados para identificar agrupaciones por factores (Temperatura, Nido y Sexo) y la significancia de las agrupaciones. Entre éstos, se realizó (1) análisis de componentes principales para identificar las posibles agrupaciones debido a las características compartidas de cada individuo, (2) análisis discriminante por los factores conocidos *a priori* (Temperatura, Nido y Sexo) para elucidar las diferencias entre grupos y la combinación lineal de las variables que mejor describen estas diferencias, (3) prueba de MANOVA por factor de agrupación para evaluar si las agrupaciones obtenidas en el análisis discriminante eran significativamente diferentes.

Se realizaron análisis de estadística multivariada para evaluar si existían agrupaciones relacionadas con nuestros factores experimentales (Temperatura, Nido y Sexo), y existían diferencias significativas entre estas agrupaciones para cada módulo. Para cada uno de los módulos definidos, considerando las 162 crías, se realizó un análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) para maximizar la varianza de las variables independientes (landmarks) con el fin de identificar posibles agrupaciones naturales. Con las 81 crías sexadas por histología se realizaron análisis

de correspondencias canónicas (CCA, por sus siglas en inglés) para identificar si existe una relación entre los grupos asignados (Temperatura y Sexo). Utilizando las 81 crías sexadas se realizaron análisis de función discriminante (DFA, por sus siglas en inglés) para definir una función de agrupación por sexo (Hembra y Macho). De haber grupos separados, se evaluó la función discriminante en el resto de las crías que no fueron sexadas por histología para definir la pertenencia a alguno de los grupos. Finalmente se realizaron análisis de varianza multivariados (MANOVA, por sus siglas en inglés) para definir la significancia de las diferencias entre agrupaciones. Todos los análisis fueron desarrollados en el paquete “IBM® SPSS® Statistics V.20”.

## 9 RESULTADOS

### 9.1 Eclosión

Se obtuvo desarrollo de los embriones de todos los nidos y en todos los tratamientos. Sin embargo, solamente se logró eclosión en cuatro de los seis tratamientos (26-32°C), con periodos de incubación de 42 a los 97 días de mayor a menor temperatura de incubación. En el tratamiento de 34 °C el desarrollo embrionario se detuvo en diferentes etapas del periodo de incubación, la mayoría apenas a mitad del proceso. En contraste, en el tratamiento de 24 °C, la mayoría de los embriones continuaron su desarrollo a pesar del largo tiempo de incubación, llegando prácticamente a término pero observamos altos niveles de mortalidad ya sea por el debilitamiento, por el prolongado período a bajas temperaturas, o esto en combinación con una infección por hongos en los huevos y embriones. Estos resultados eran esperados para temperaturas de escaso o nulo desarrollo (< 26°C) y temperaturas subletal y letal superiores (34°C).

Se encontraron huevos sin desarrollo aparente (HSDA), condición que interpretamos como ausencia de fertilización, en todos los tratamientos. Pese a que se encontraron diferencias del número de HSDA en los tratamientos no existe evidencia suficiente para aceptar que esta inviabilidad se deba al efecto de los tratamientos ( $X^2_{(5)} = 9.97, p > 0.05$ ). Debido a lo anterior se obtuvo el porcentaje de éxito de eclosión de las nidadas por tratamiento descartando los HSDA y aquellos que murieron por accidentes en el manejo, teniendo porcentajes de eclosión por tratamiento superiores al 85% (Tabla IV).

**Tabla IV.** Eclosiones y porcentajes de eclosión por nido en cada tratamiento descartando los HSDA.

Nido	Temp (°C)	# Huevos Incubados	# HSDA	# Eclosiones Nido	% Eclosión Nido	% Eclosión Incubadora
A		15	0	0	0.0	
B	24	15	1	1	7.1	2.3
C		15	0	0	0.0	
A		15	1	13	92.9	
B	26	15	1	14	100.0	97.6
C		15	1	14	100.0	
A		15	0	15	100.0	
B	28	15	0	15	100.0	97.7
C		15	1	13	92.9	
A		14**	1	12	92.3	
B	30	15	0	15	100.0	97.6
C		15	1	14	100.0	
A		15	2	10	76.9	
B	32	15	0	12	80.0	85.7
C		14*	0	14	100.0	
A		15	2	0	0.0	
B	34	15	3	0	0.0	0.0
C		15	2	0	0.0	

\* Un huevo roto durante la colecta.

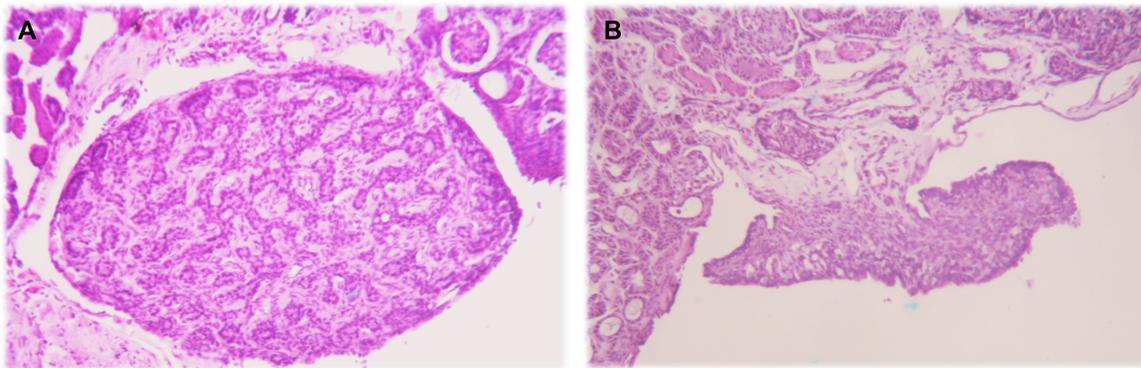
\*\* Un huevo roto durante la incubación.

## 9.2 Determinación de sexo por métodos invasivos

### 9.2.1 Histología

De las gónadas obtenidas de las crías y embriones de tortuga golfina un total de 137 fueron procesadas mediante técnicas **histológicas** obteniendo las proporciones sexuales para cada tratamiento. Se identificaron las estructuras características para

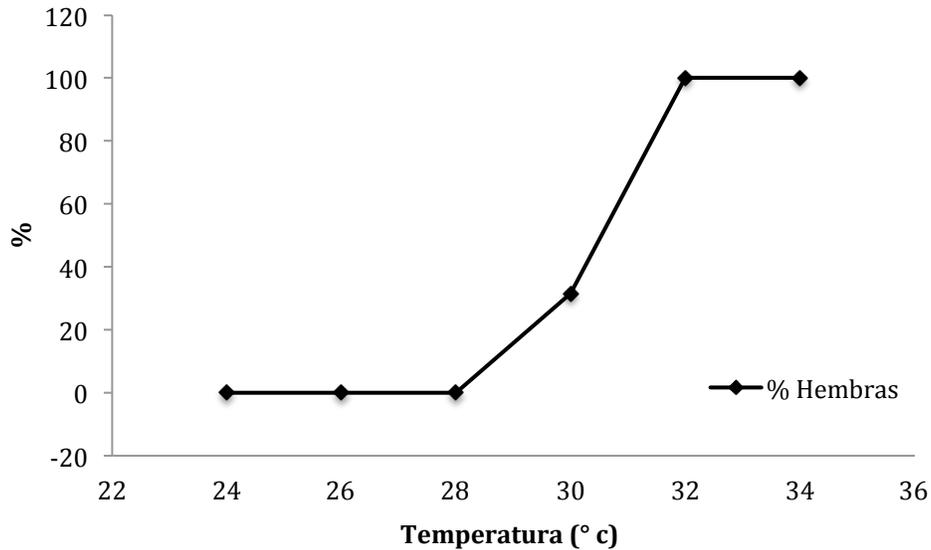
cada sexo observando, en caso del ovario, el engrosamiento de la capa que forma el epitelio germinal, una conformación homogénea del área central de la gónada, sin detalles reconocibles, que denota la ausencia de cuerdas o túbulos medulares (seminíferos) como estructuras típicas de ovarios. Por otro lado, la gónada masculina se identifica debido a que ésta no se ha diferenciado como ovario (Merchant-Larios *et al.* 1989). Es decir, no se aprecia el engrosamiento de la superficie epitelial y se puede observar la presencia detallada de una complicada red conformada por los túbulos seminíferos.



**Figura 17.** Cortes transversales de gónadas de crías de tortugas marinas *L. olivacea*. A. Gónada masculina que se observa la presencia de túbulos seminíferos. B. Gónada femenina en la que se aprecia la ausencia de cuerdas medulares y el engrosamiento de de la superficie epitelial formando la corteza ovárica.

En 31 del total de muestras fue imposible identificar el sexo por esta técnica, de las cuales 21 corresponden a muestras de embriones que murieron antes de término en los tratamientos de 24°C y 34°C. En ningún tratamiento se encontraron diferencias en las proporciones sexuales asociada al nido de procedencia. De todos los tratamientos, únicamente en 30°C se observaron ambos sexos, con 32 % de hembras (Figura 18).

## Proporción de Sexos



**Figura 18.** Proporción sexual de los nidos combinados para los tratamientos de 24°C a 34°C representado por la proporción de hembras

### 9.2.2 Aclaración de gónadas

Para la técnica de **aclaración de gónadas en glicerol** solamente se disponía de 110 muestras. De éstas 37 fue imposible identificar el sexo, de las cuales 25 corresponden a embriones de los tratamientos donde no se alcanzó eclosión (24 y 34°C). Los criterios de clasificación del sexo son los descritos por Van der Heiden *et al.* (1985): la gónada femenina presenta estrías en el borde con una zona medial más opaca que las partes laterales debido a los repliegues del epitelio germinal (Figura 19 A y B), y la gónada masculina presenta un patrón granular sin repliegues en su superficie (Figura 19 C y D).



**Figura 19.** Gónadas de *L. olivacea* procesadas por aclaración con glicerol en las cuales se puede apreciar la diferenciación sexual. **A** Acercamiento de una gónada femenina en la cual se observan estrías en el borde, con una tonalidad más opaca en la parte medial de la gónada que en el borde. **B** Gónada femenina completa. **C** Gónada masculina completa. **D** Gónada masculina en la cual se observa una patrón granular, debido a la presencia de túbulos seminíferos, sin estrías en su superficie.

### 9.2.3 Comparación histología vs aclaración de gónadas

Los resultados de determinación del sexo por histología se usaron como referencia para evaluar la efectividad del método de aclaración. En comparación con histología la aclaración arrojó valores distintos de clasificación por sexo (Tabla V). Solamente tomando en cuenta la evaluación de crías con transparentación, la proporción estimada de machos fue muy similar a la obtenida por histología (62.1% vs 63.0%, respectivamente), no encontrando diferencias significativas ( $X^2_{(2)} = 1.68, p = 0.43$ ). En los embriones se encontró que la proporción de machos obtenida por transparentación fue considerablemente menor que la histología (24.3% vs 38.1%, respectivamente) siendo estadísticamente diferentes ( $X^2_{(2)} = 6.71, p = 0.04$ ). No se obtuvieron diferencias significativas entre las proporciones en el conjunto completo de muestras (70.8% vs 745.3% machos a partir de histología y aclaración, respectivamente;  $X^2_{(2)} = 4.15, p = 0.13$ ). No obstante, resalta el hecho que, en comparación con la experiencia con histología, en la transparentación hubo una mayor proporción de muestras de embriones (50.0% vs 67.6%) y de crías (10.5% vs

16.4%) que fueron imposibles de evaluar y, con transparentación la proporción estimada de machos para el conjunto completo de muestras fue considerablemente mayor (70.8% vs 75.3%, respectivamente), lo cual cambiaría los resultados de proporción sexual obtenidos con cada técnica.

**Tabla V.** Clasificación de sexos a partir de histología y transparentación.

Muestras disponibles y resultados	Histología		Transparentación	
	n	% total	n	% total
<b>Total Global de muestras</b>	137	100.0	110	100.0
<b>Número de crías</b>	95	69.3	73	66.4
<b>Número de embriones</b>	42	30.7	37	33.6
<b>Crías Machos</b>	59	62.1	46	63.0
<b>Crías Hembras</b>	26	27.4	15	20.5
<b>Crías imposible de evaluar</b>	10	10.5	12	16.4
<b>Embriones Machos</b>	16	38.1	9	24.3
<b>Embriones Hembras</b>	5	11.9	3	8.1
<b>Embriones imposible de evaluar</b>	21	50.0	25	67.6
<b>Global Identificadas</b>	106	77.4	73	66.4
<b>Global imposible de evaluar</b>	31	22.6	37	33.6
<b>Global Machos</b>	75	70.8	55	75.3
<b>Global Hembras</b>	31	29.2	18	24.7

Ya que no todas las muestras de gónadas fueron individualmente evaluadas por ambas técnicas se analizó también los resultados exclusivamente con aquellas (de embriones y crías) que se procesaron por las dos metodologías. Debido a que este conjunto representa un menor número de especímenes, el análisis se realizó con 70 muestras pareadas, procedentes de mismos especímenes, y consideramos que representa una mejor opción para determinar la eficacia en la identificación sexual comparando la transparentación de gónadas por glicerol con los resultados obtenidos por histología. En este análisis se consideraron los resultados de histología como los valores esperados en pruebas de  $X^2$  (Tabla VI). En este caso, se encontró que los valores observados de la transparentación de gónadas por glicerol, fueron

significativamente diferentes a los resultados obtenidos por histología ( $X^2_{(3)} = 11.70, p < 0.05$ ). Adicionalmente, en esta comparación usando mismas muestras, (1) mientras que ambas técnicas estimaron una proporción similar de hembras, con la transparentación se estimó una menor proporción de machos, y (2) mientras que todas las muestras procesadas por histología pudieron ser evaluadas, el 10% de las muestras evaluadas por transparentación permanecieron indeterminadas porque fueron imposibles de clasificar. Esto sugiere que la problemática por identificar machos con transparentación es más elevada que para hembras y por lo tanto existe un sesgo metodológico que reduce la efectividad en las evaluaciones con transparentación.

**Tabla VI.** Identificación de sexos en mismas muestras, comparando los resultados de histología y transparentación.

	Histología		Transparentación	
	Individuos	%	Individuos	%
<b>Totales</b>	70	100.0	70	100.0
<b>Machos</b>	55	78.6	48	68.6
<b>Hembras</b>	15	21.4	14	20.0
<b>Incorrectamente identificadas</b>	0	0.0	1	1.4
<b>Indeterminado</b>	0	0.0	7	10.0
<b>Total Correctamente Clasificado</b>	70	100.0	62	88.6

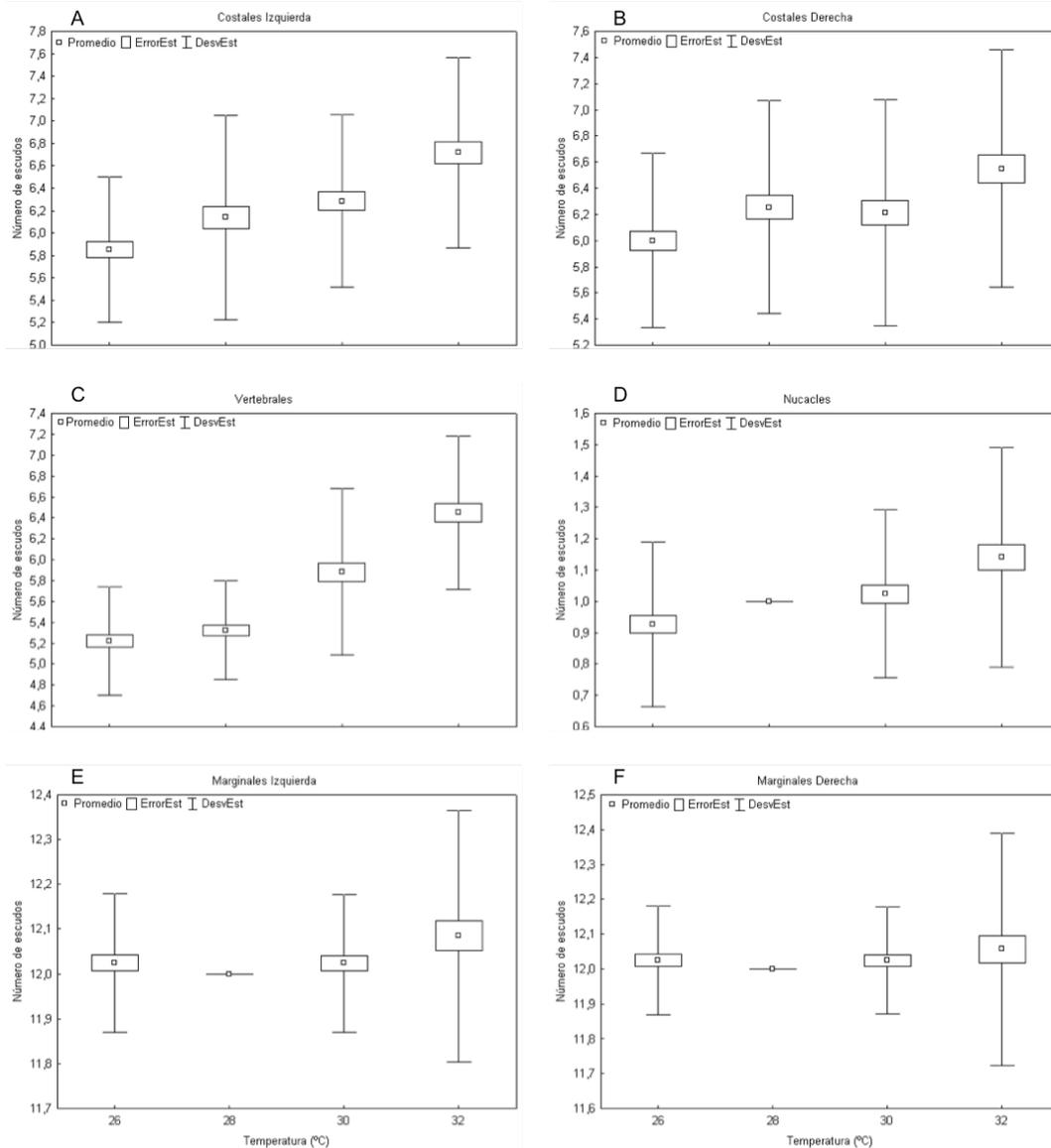
### 9.3 Número de escudos

Un total de 162 fotografías de un mismo número de crías provenientes del experimento fueron examinadas y sus escudos contados y registrados. Se realizó estadística descriptiva (Tabla VII) para evaluar si existía algún indicio de relación entre el número de escudos y las temperaturas de incubación. Se realizaron pruebas

de Kruskal-Wallis de independencia de grupos para determinar si las tendencias en las distribuciones eran estadísticamente significativas para ser atribuidas al efecto de la temperatura sobre el número de escudos del carapacho de las crías. Se encontró que el efecto de la temperatura de incubación es significativo sobre el número de escudos costales izquierdos ( $X^2_{[3]} = 25.811$ ,  $p < 0.05$ ), vertebrales ( $X^2_{[3]} = 56.610$ ,  $p < 0.05$ ), costales derechos ( $X^2_{[3]} = 9.856$ ,  $p < 0.05$ ) y nucales ( $X^2_{[3]} = 13.010$ ,  $p < 0.05$ ). No se encontró evidencia estadística del efecto de la temperatura de incubación sobre el número de escudos supracaudales ( $X^2_{[3]} = 0.000$ ,  $p > 0.05$ ), marginales izquierdos ( $X^2_{[3]} = 4.780$ ,  $p > 0.05$ ) y marginales derechos ( $X^2_{[3]} = 1.122$ ,  $p > 0.05$ ) (Figura 20).

**Tabla VII.** Estadística descriptiva de los escudos del carapacho de las crías de tortuga *Lepidochelys olivacea*. Con asterisco los conjuntos de escudos cuya abundancia fue afectada significativamente ( $P < 0.05$ ) por el tratamiento (temperatura de incubación).

	<b>N crías</b>	<b>Promedio</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Desv. Est.</b>
<b>Costales Izquierda*</b>	162	6.23	5.00	9.00	0.85
<b>Vertebral*</b>	162	5.69	5.00	8.00	0.80
<b>Costales Derecha*</b>	162	6.25	5.00	9.00	0.83
<b>Totales</b>	162	18.17	15.00	24.00	1.95
<b>Nucales*</b>	162	1.02	0.00	2.00	0.26
<b>Supracaudales</b>	162	2.00	2.00	2.00	0.00
<b>Marginales Izquierda</b>	162	12.03	12.00	13.00	0.17
<b>Marginales Derecha</b>	162	12.02	12.00	14.00	0.19
<b>Entero</b>	162	14.19	12.00	18.00	0.09
<b>Medio</b>	162	3.30	0.00	8.00	0.92
<b>Cuarto</b>	162	0.66	0.00	6.00	0.13
<b>Inserto</b>	162	0.04	0.00	2.00	-0.77



**Figura 20.** Efecto de la temperatura de incubación sobre el número de escudos para cada conjunto de escudos.

### 9.3.1 Variaciones en número de escudos

Para realizar las evaluaciones en el número de escudos, éstos fueron identificados como se muestra en la Tabla VIII. El número de escudos *nucacales* fluctuó de 0 a 2. Los individuos con 1 escudo nucal, con una frecuencia de 93.2%, fueron los más comunes en el total de las muestras. El número de los *vertebrales* varió de 5 a 8, siendo el patrón más común 5 con una frecuencia de 51.2%. El número de los escudos *costales* varió en un rango de 6 a 9 en cada lado y 15 combinaciones de estos fueron

encontradas. Los individuos más comunes fueron aquellos con el patrón 6-6 (# izquierda-# derecha) con una frecuencia de 38.9%. El número de *marginales* fluctuó entre 12 y 14, encontrando 4 combinaciones en los conteos de estos escudos. El patrón más común encontrado entre los individuos fue 12-12 con una frecuencia 95.1%. Los escudos *supracaudales* fueron los más constantes siendo 2 los encontrados en el 100% de las muestras.

**Tabla VIII.** Variación en la abundancia y frecuencia de los escudos del carapacho de crías de *Lepidochelys olivacea* y sus frecuencias (%). Izq-Der = distribución Izquierda – Derecha.

	Izq-Der	n	%
Nucal	0	4	2.5
	1	151	93.2
	2	7	4.3
Vertebral	5	83	51.2
	6	47	29.0
	7	31	19.1
	8	1	0.6
Supracaudal	2	162	100.0
Costal	6-6	63	38.9
	6-7	16	9.9
	5-6	15	9.3
	6-5	14	8.6
	7-6	14	8.6
	5-5	8	4.9
	7-7	8	4.9

	Izq-Der	n	%
	7-8	8	4.9
	8-7	6	3.7
	9-8	4	2.5
	6-8	2	1.2
	7-5	1	0.6
	8-6	1	0.6
	8-8	1	0.6
	8-9	1	0.6
	12-12	154	95.1
Marginales	12-13	2	1.2
	12-14	1	0.6
	13-12	5	3.1

De las 162 crías de *Lepidochelys olivacea* 124 de ellas (76.5%), en todos los tratamientos, tuvieron variación en el patrón de escudos del carapacho respecto al patrón “normal” que definimos a partir de la abundancia más común (promedio) de escudos para cada grupo de escudos: 1 escudo nucal, 5 escudos vertebrales, 1 par de escudos supracaudales, 6 pares de escudos costales y 12 pares de escudos marginales (Tabla IX). Usamos este patrón para calcular la incidencia de variaciones en las crías respecto a la abundancia normal en cada grupo de escudos. Se encontró que existían diferencias significativas en la incidencia en las variaciones respecto al patrón normal de escudos debido a la temperatura de incubación ( $X^2_{[3]} = 7.875$ ,  $p < 0.05$ ). Considerando sólo los 44 escudos del número total normal como estándar, sin tomar en cuenta la relación pareada bilateral del patrón normal de escudos, se encontró que un total de 118 crías tuvieron al menos una variación en el número de escudos respecto al normal (Tabla X).

**Tabla IX.** Ocurrencia de diferentes niveles de variación en la abundancia de escudos del carapacho de crías de tortuga golfina para los tratamientos de temperatura de

incubación.

Tratamiento	Sin Variación	Con Variación	Total
<b>26°</b>	14	27	41
%	34.1	65.9	100.0
<b>28°</b>	14	29	43
%	32.6	67.4	100.0
<b>30°</b>	8	34	42
%	19.0	81.0	100.0
<b>32°</b>	2	34	36
%	5.6	94.4	100.0
<b>Total</b>	38	124	162
%	23.5	76.5	100

**Tabla X.** Número de variaciones de escudos del carapacho de crías de tortuga golfina comparado con el patrón normal y su relación con los tratamientos.

Temperatura de incubación	Variaciones									Total
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
<b>26°</b>	17	14	7	2	1	0	0	0	0	41
%	41.5	34.1	17.1	4.9	2.4	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
<b>28°</b>	19	15	3	2	1	2	1	0	0	43
%	44.2	34.9	7.0	4.7	2.3	4.7	2.3	0.0	0.0	100.0
<b>30°</b>	7	17	7	4	4	2	1	0	0	42
%	16.7	40.5	16.7	9.5	9.5	4.8	2.4	0.0	0.0	100.0
<b>32°</b>	1	7	5	9	5	8	0	0	1	36
%	2.8	19.4	13.9	25.0	13.9	22.2	0.0	0.0	2.8	100.0

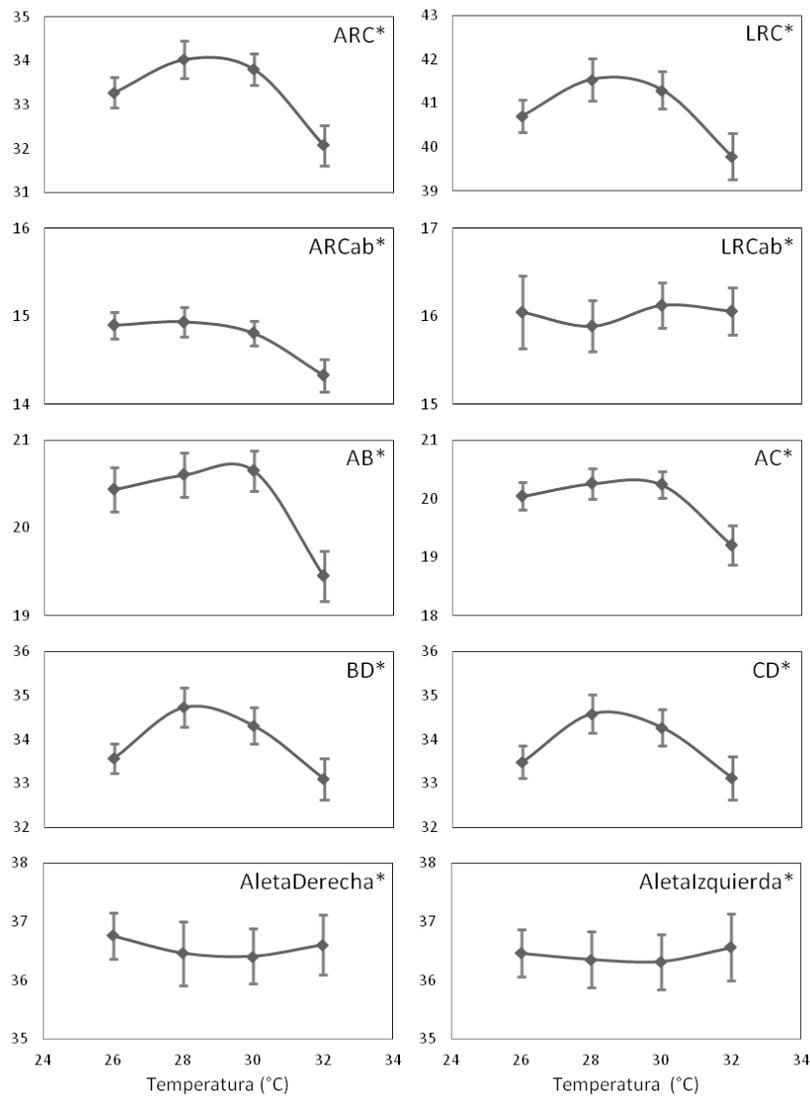
## 9.4 Determinación de sexo por morfometría

### 9.4.1 Morfometría lineal

En las mediciones de Ancho Recto del Carapacho no se encontraron diferencias significativas entre aquellas tomadas con vernier y las estimadas de manera digital con el programa "ImageJ" (ARC y ARC\*, respectivamente) ( $t_{161} = -1.52$ ,  $p = 0.13$ ) ni tampoco para las mediciones de Largo Recto del Carapacho ( $t_{161} = -1.83$ ,  $p = 0.07$ ). Por lo tanto, los análisis subsecuentes se realizaron con las medidas obtenidas de manera digital exclusivamente.

**Tabla XI.** Estadística descriptiva de las medidas lineales con vernier y digitales de las crías de tortuga *Lepidochelys olivácea*. Las ubicaciones de los rasgos morfométricos analizados están descritas en la Figura 11.

	N	Promedio	Mínimo	Máximo	Desv.Est.
ARC	162	33.23	29.30	36.40	1.33
LRC	162	39.35	35.79	42.52	1.42
ARC*	162	33.34	29.18	37.43	1.45
LRC*	162	39.38	35.66	43.01	1.56
ARCab*	162	14.76	13.16	16.34	0.56
LRCab*	162	16.03	14.00	19.90	1.00
AB*	162	20.31	16.85	24.00	0.92
AC*	162	19.96	17.44	21.64	0.92
BD*	162	33.97	30.21	37.59	1.45
CD*	162	33.90	30.69	37.85	1.47
AletaDerecha*	162	36.54	31.39	39.75	1.52
AletaIzquierda*	162	36.40	32.65	40.61	1.50



**Figura 21.** Gráfica de los promedios y desviación estándar de las diez mediciones morfométricas realizadas sobre fotografías digitales (longitud en mm) de las crías eclosionadas en cada tratamiento (Tabla XI).

Se realizaron análisis multivariados factoriales (GLM, por sus siglas en inglés) de las diez medidas digitales para evaluar los efectos de la temperatura de incubación, nido, sexo y sus interacciones, utilizando el peso del huevo como covariante (Booth *et al.* 2004; Booth *et al.* 2011; Booth *et al.* 2013) para controlar el efecto de diferencias al inicio de las incubaciones. Se encontraron diferencias significativas en función de la temperatura de incubación ( $F_{30,165} = 3.73$ ,  $p = 0.00$ ) y el nido de procedencia ( $F_{20,112} = 2.39$ ,  $p = 0.00$ ). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas para sexo

( $F_{10,56} = 1.46$ ,  $p = 0.17$ ) ni para interacciones Temperatura-Nido ( $F_{60,298} = 1.15$ ,  $p = 0.22$ ) y Nido-Sexo ( $F_{20,112} = 1.06$ ,  $p = 0.40$ ).

Dado que las medidas del cuerpo se correlacionan fuertemente con el tamaño del cuerpo, las medidas morfométricas fueron normalizadas a la longitud total media global del carapacho, resultando en una medida estandarizada ( $M_C$ ) que se derivó por:

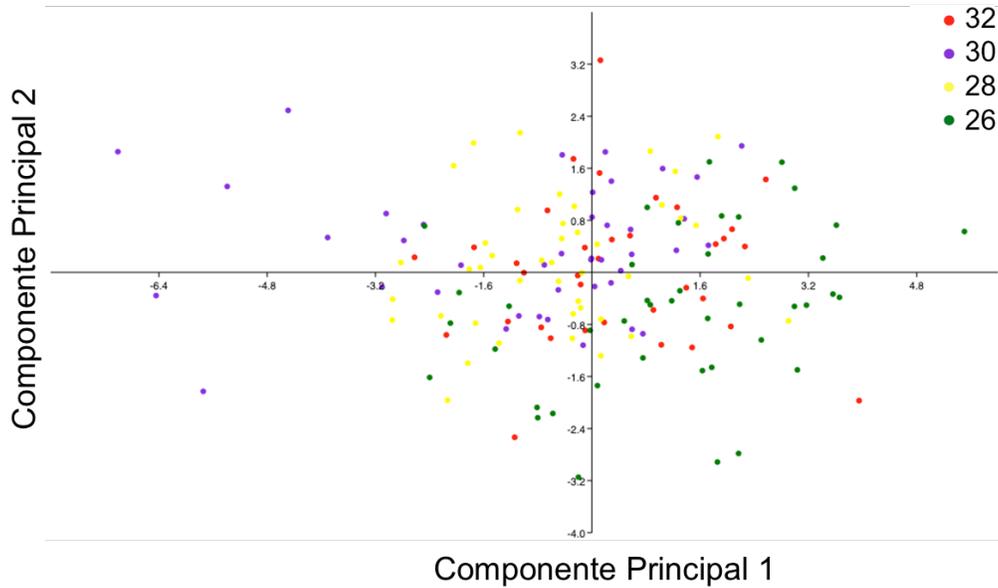
$$M_C = M_X \left( \frac{TL}{\overline{TL}} \right)^b$$

(Ihsen *et al.* 1981, Hurlbut y Clay 1998), donde TL es la longitud total,  $M_X$  es la medida por estandarizar,  $\overline{TL}$  es la longitud total media global y b es el cociente  $M_X/TL$ . Este modelo de regresión fue elegido porque ninguna de las variables puede ser considerada independiente o dependiente, sin embargo al ser la variable LRC\* la utilizada como referencia para la normalización quedó eliminada de los análisis siguientes. Se calcularon los coeficientes de correlación de Spearman entre cada par de las 9 medidas morfométricas restantes para evaluar la eficacia de transformación de datos en la reducción de la influencia del tamaño de las mediciones. Las variables altamente correlacionadas (Coef. de Correlación > 0.8,  $p < 0.05$ ) después de la eliminación de efecto de tamaño se consideraron redundantes y se realizaron análisis subsecuentes con y sin éstas (Tabla XII).

**Tabla XII.** Matriz de correlaciones y significancia de las mediciones morfométricas. Las mediciones altamente correlacionadas se indican con letras en negritas itálicas.

		ARC*	ARCab*	LRCab*	AB*	AC*	BD*	CD*	Aleta Derecha*
<b>ARCab*</b>	Rho de Spearman	0.474							
	Sig.	0.000							
<b>LRCab*</b>	Rho de Spearman	0.053	0.317						
	Sig.	0.505	0.000						
<b>AB*</b>	Rho de Spearman	0.501	0.468	0.135					
	Sig.	0.000	0.000	0.087					
<b>AC*</b>	Rho de Spearman	0.620	0.515	0.109	0.585				
	Sig.	0.000	0.000	0.169	0.000				
<b>BD*</b>	Rho de Spearman	0.402	0.360	0.106	-0.027	0.027			
	Sig.	0.000	0.000	0.178	0.729	0.736			
<b>CD*</b>	Rho de Spearman	0.378	0.404	0.190	-0.077	0.008	<b>0.828</b>		
	Sig.	0.000	0.000	0.016	0.331	0.916	<b>0.000</b>		
<b>Aleta Derecha*</b>	Rho de Spearman	0.011	-0.046	0.057	-0.231	-0.183	0.079	0.092	
	Sig.	0.890	0.563	0.468	0.003	0.020	0.320	0.242	
<b>Aleta Izquierda*</b>	Rho de Spearman	0.049	-0.048	0.044	-0.288	-0.203	0.146	0.191	<b>0.841</b>
	Sig.	0.532	0.543	0.578	0.000	0.010	0.063	0.015	<b>0.000</b>

Se descartaron las mediciones morfométricas CD\* y AletaIzquierda\* debido a su alta correlación con por lo menos una del resto de las mediciones. Con las siete mediciones morfométricas restantes se realizaron los análisis multivariados de componentes principales para identificar posibles agrupaciones en función de las características de cada individuo (Figura 22) y un análisis discriminante para evaluar las diferencias de las variables clasificadoras a partir de los grupos asignados *a priori* de acuerdo al sexo identificado por histología.



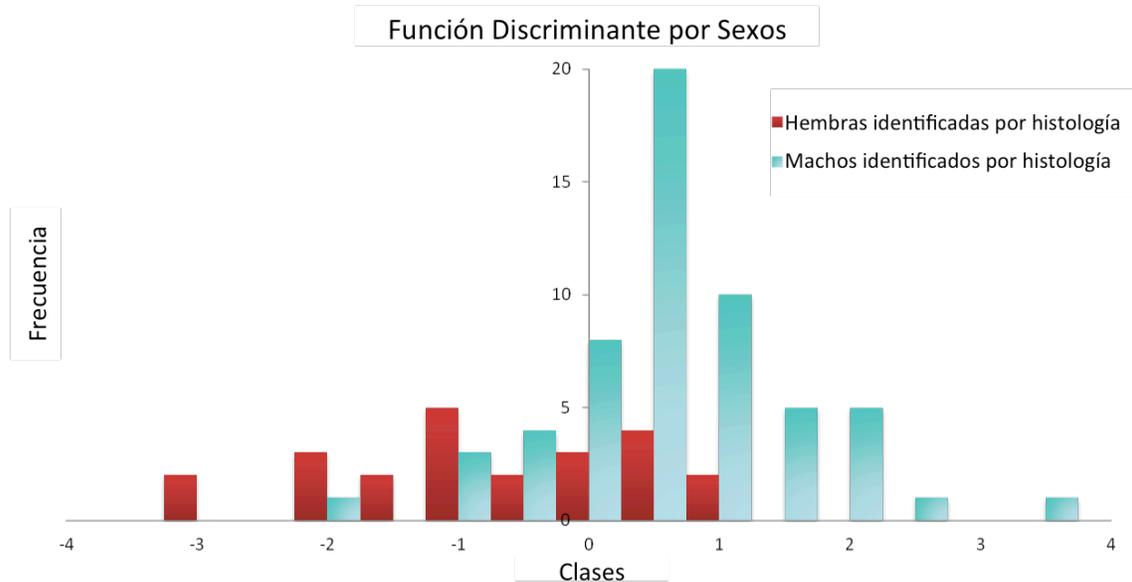
**Figura 22.** Análisis de componentes principales de las mediciones morfométricas. El Componente Principal 1 explica el 52.3% de la varianza total y el Componente Principal 2 explica el 17.0%.

Con el análisis de componentes principales se observó que no existía relación de los factores de agrupación (temperatura de incubación) con alguno de los componentes principales obtenidos. El 75% de la varianza total se explica con los primeros tres componentes principales de los nueve obtenidos en el análisis. El componente principal 1 (CP1), explica el 52.3% de la varianza total pero no muestra relación alguna con ninguno de los factores conocidos *a priori*. Las variables morfológicas con mayor asociación a la varianza del CP1 son AletaDerecha\*, AB\* y AC\*.

De las 162 crías medidas solamente de 81 se conocía el sexo y con éstas se desarrolló el análisis discriminante del que se derivó una función discriminante sobre la base de las variables con la cual clasificar el sexo de los individuos:

$$F_d = 15.73 + (0.003 * ARC^*) + (0.012 * ARCab^*) - (0.007 * LRCab^*) + (0.005 * AB^*) + (0.002 * AC^*) - (0.001 * BD^*) - (0.003 * AletaDerecha^*)$$

Esta evaluación arrojó un 75.3% de clasificaciones correctas del sexo de las crías (hembra o macho; Figura 23).



**Figura 23.** Gráfico de la función discriminante por sexos usando las siete medidas morfométricas lineales estandarizadas no correlacionadas.

También se realizó el análisis de discriminantes para todas las temperaturas y considerando solamente dos de las temperaturas (28°C y 32°C), nidos de procedencia, las medidas con estandarización y sin estandarización, y con todas las variables, solo con las variables no correlacionadas o solo las variables correlacionadas para determinar qué combinación permitía la mejor clasificación (Tabla XIII). Considerando el mismo caso en el que se evaluó la función discriminante por sexos (todas las temperaturas sin las variable correlacionadas) se generaron las funciones discriminantes para clasificación por temperaturas y por nidos. Sin embargo, éstas arrojaron porcentajes muy bajos de correcta clasificación (56% y 63% respectivamente) lo que implica que al hacer la estandarización no es posible encontrar diferencias de tamaños obtenidos con medidas lineales, en función de estos factores. Por esta razón, de carencia de relevancia informativa, estas funciones no se incluyen en este documento.

**Tabla XIII.** Porcentaje de correcta clasificación de crías en las categorías de cada tratamiento (temperatura, nido de procedencia, sexo) con estandarización y sin estandarización de datos; con y sin variables correlacionadas.

	Estandarizados					
	Todas las Temperaturas			28 y 32		
	Sin variables Correlacionadas	Todas	Con variables Correlacionadas	Sin variables Correlacionadas	Todas	Con variables Correlacionadas
Temp	56.2	61.1	39.5	73.4	86.1	64.6
Nido	63.0	53.7	46.3	53.2	58.2	43.0
Sexo	75.3	80.2	55.6	81.6	89.5	68.4

	No Estandarizados					
	Todas las Temperaturas			28 y 32		
	Sin variables Correlacionadas	Todas	Con variables Correlacionadas	Sin variables Correlacionadas	Todas	Con variables Correlacionadas
Temp	48.8	59.9	67.1	55.7	84.8	67.1
Nido	53.7	54.3	55.7	58.2	60.8	55.7
Sexo	67.9	77.8	66.7	68.4	94.7	66.7

Entre las crías a las que no se les determinó el sexo por histología aun se puede conocer con alto grado de certeza su sexo en temperaturas de incubación en las cuales es conocido que se obtiene el 100% de un solo sexo. Por ejemplo, para los tratamientos de 26° y -28°C hubo solo machos y en el de 32°C solo hembras. Con los datos de estos tratamientos se estimó la proporción de crías que serían correctamente clasificadas por sexo según la función discriminante (Tabla XIV)

**Tabla XIV.** Porcentaje de correcta asignación del sexo para crías de los tratamientos en los que se obtiene un solo sexo.

Temp (°C)	% sexo deducido por la temperatura de incubación	% Correctamente Clasificado	% Incorrectamente Clasificado
32	100% Hembras	89.5	10.5
28	100% Machos	72.7	27.3
26	100% Machos	76.5	23.5
<b>Promedio</b>		<b>79.6</b>	<b>20.4</b>

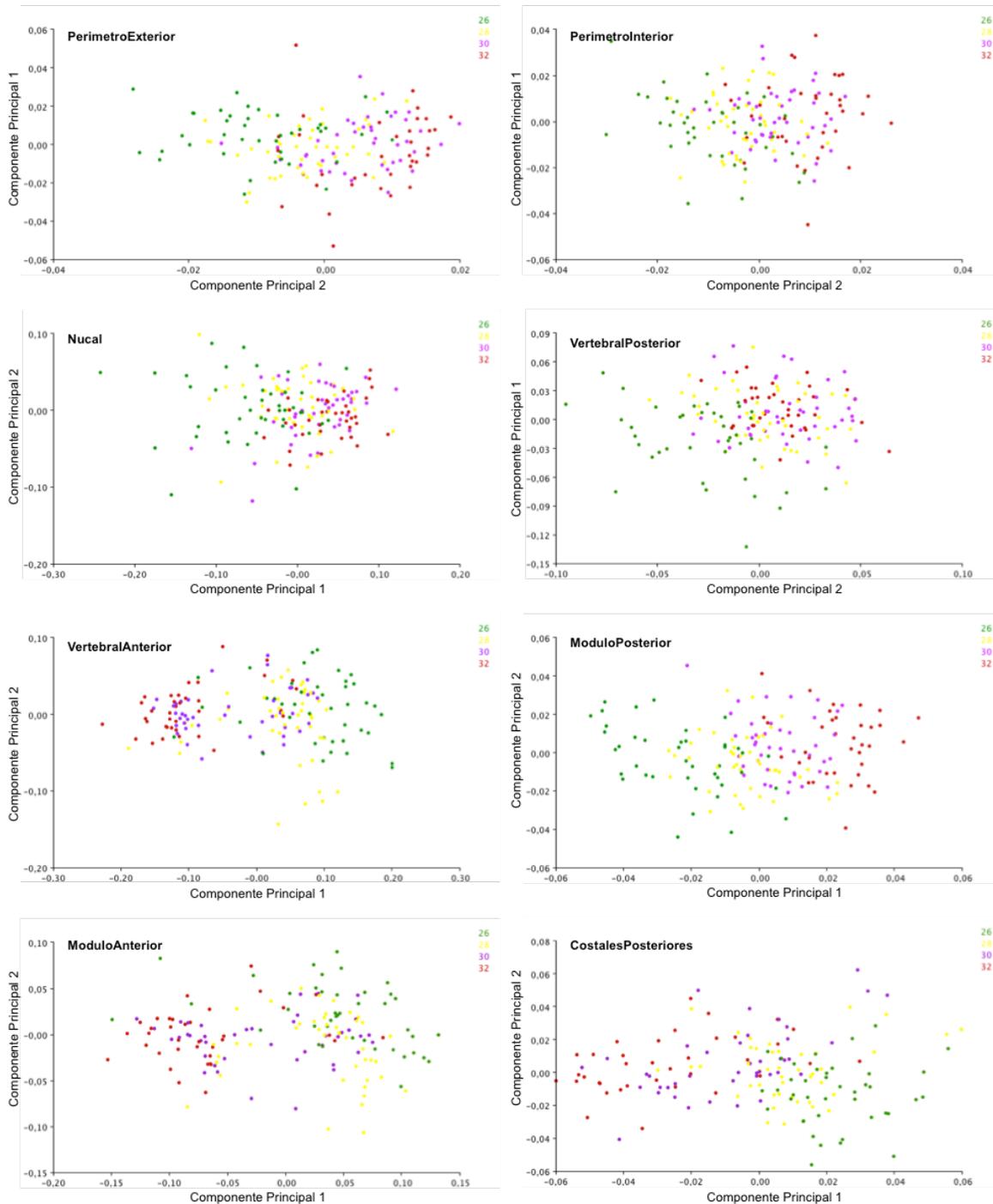
Para determinar si el tamaño de las agrupaciones de macho y hembra, obtenidas en el análisis discriminante, era estadísticamente diferente a la clasificación conocida de acuerdo a la temperatura se realizó un análisis multivariado MANOVA. Se encontró que las agrupaciones hembra y macho obtenidas con el análisis discriminante de mediciones morfométricas son significativamente diferentes ( $F_{9,71} = 3.01$ ,  $p < 0.05$ ). Es decir, que las distribuciones por sexos obtenidas de la aplicación de la función discriminante son diferentes entre sí, aunque el grado de traslape entre estas no permite realizar una discriminación de los grupos con una precisión mayor.

#### **9.4.2 Morfometría geométrica**

Mediante el PCA se identificó el porcentaje de la varianza explicada por el primer componente y el porcentaje de la varianza explicada en dirección ortogonal por el segundo componente calificando de esta manera la posibilidad de que estos módulos puedan contener relación directa con los factores de interés (temperatura, sexo y nido) como se observa en la Tabla XV. Con los resultados de este análisis se encontraron agrupaciones naturales relacionadas con dos de los tres factores experimentales (Temperatura y Sexo) para los módulos de escudos usados en este estudio (ver Figura 16). Los módulos VertebralPosterior y ModuloPosterior presentaron grupos naturales (Figura 24), mejor definidos que los demás, con asociación respecto con la temperatura de incubación y, por ende, también con el sexo de las crías. El rasgo distintivo entre sexos fue definido principalmente por la longitud del escudo vertebral posterior. Los módulos de PerimetroExterno, PerimetroInterno, CostalesAnteriores y ModuloAnterior presentaron agrupaciones naturales graduales a lo largo del segundo componente principal relacionadas con la temperatura de incubación, y por ende con el sexo de las crías producidas. Los módulos Nucal y VertebralAnterior no tuvieron agrupaciones naturales relacionadas con nuestros factores experimentales, que es el primer indicio de la baja capacidad de estos módulos para clasificar entre los factores de interés (Temperatura, Sexo y Nido).

**Tabla XV.** Número de componentes principales y porcentaje de varianza explicada para los primeros dos componentes principales.

	número de CPs	%Varianza CP1	%Varianza CP2	Total
VertebralPosterior	10	68.97	10.25	79.22
ModuloPosterior	14	56.03	13.47	69.50
Nucal	8	50.05	17.40	67.45
VertebralAnterior	8	33.12	24.87	58.00
ModuloAnterior	52	27.64	18.06	45.69
CostalesAnteriores	20	26.04	16.00	42.04
PerimetroExterno	54	27.89	13.48	41.36
PerimetroInterno	54	26.48	14.50	40.97



**Figura 24.** Gráficas de los componentes principales 1 y 2 de todos los módulos con las muestras identificadas según su temperatura de incubación por distintos colores (verde = 26, amarillo = 28, violeta = 30, rojo = 32).

Para abordar el objetivo principal de este estudio, mediante las pruebas de Análisis de Función Discriminante se evaluaron las agrupaciones respecto al sexo de las crías

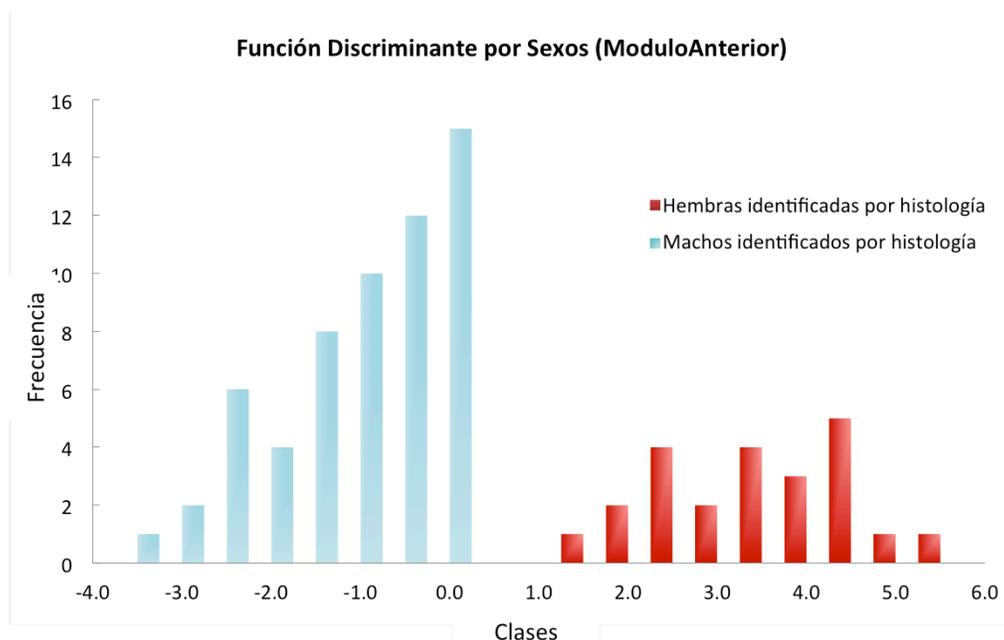
para todos los módulos, pero enfocándose en aquellos en los que en el PCA se observó buena definición de grupos. Con esto se obtuvieron mayores porcentajes de agrupación correcta en los módulos que involucran los escudos marginales. Con la distancia de Mahalanobis se evaluó la media y varianza de las variables predictoras, como en la matriz de covarianza de todas las variables, y por lo tanto utiliza como ventaja la covarianza entre variables (Jenness, 2014), por lo que es una medida que nos permite determinar la distancia no euclídea de las distribuciones de los grupos evaluados (hembra y macho) dimensionando cuan separadas están estas entre sí.

**Tabla XVI.** Tabla de resumen de resultados de la clasificación de sexos utilizando el DFA y significancia de los grupos (sexo) por módulos. En rojo se indican los valores significativos ( $P < 0.05$ ).

Módulo	Grupos	Correlación Canónica			Función Discriminante		MANOVA
		Distancia Mahalanobis	T <sup>2</sup>	Valor p	% por Grupo	% Clasificación Correcta (promedio)	Valor p
ModuloAnterior	Hembra	4.53	337.61	0.010	100.0	100.0	< 0.05
	Macho				100.0		
PerimetroInterno	Hembra	4.97	406.06	0.007	100.0	99.1	< 0.05
	Macho				98.3		
CostalesAnteriores	Hembra	2.33	89.43	0.000	87.0	85.7	< 0.05
	Macho				84.5		
VertebralPosterior	Hembra	1.71	48.27	0.000	82.6	81.8	< 0.05
	Macho				81.0		
VertebralAnterior	Hembra	1.50	36.94	0.000	87.0	81.4	< 0.05
	Macho				75.9		
Nucal	Hembra	0.96	15.30	0.103	82.6	75.8	> 0.05
	Macho				69.0		
PerimetroExterno	Hembra	3.90	250.20	0.121	91.3	75.8	< 0.05
	Macho				60.3		
ModuloPosterior	Hembra	1.58	40.88	0.008	78.3	75.3	< 0.05
	Macho				72.4		

Se realizaron análisis de MANOVA para evaluar la significancia de los grupos en ambos sexos (Hembra y Macho) que fueran evaluados por el DFA (Tabla XVI). Las principales variaciones relacionadas con la temperatura de incubación y el sexo de las crías, se encontraron en las landmarks ubicadas en la parte anterior de los escudos marginales y en el nugal y se obtuvo un 100% de correcta clasificación del sexo de las crías utilizando el ModuloAnterior, que es el que involucra estos dos escudos.

Aunque este módulo fue el único con el que se logró una discriminación de sexos con 100% de asignaciones correctas (Figura 25), otros módulos (PerimetroInterno, VertebralAnterior, VertebralPosterior y CostalesAnteriores) arrojaron valores de correcta clasificación superiores al 80.2%, que fue el valor máximo aplicando la morfometría lineal con las medidas estandarizadas (Tabla XIII). Curiosamente, a pesar de que el conjunto del ModuloAnterior que contiene el escudo nugal es el que permitió la mejor clasificación, el escudo Nugal por si mismo ofreció una clasificación de los sexos relativamente pobre (75.8%)



**Figura 25.** Valores de la función discriminante por sexos para el ModuloAnterior para todos los tratamientos. En el eje de las abscisas, los valores a la derecha del cero identifican a la clase “Hembra”, a la izquierda la clase “Macho”.

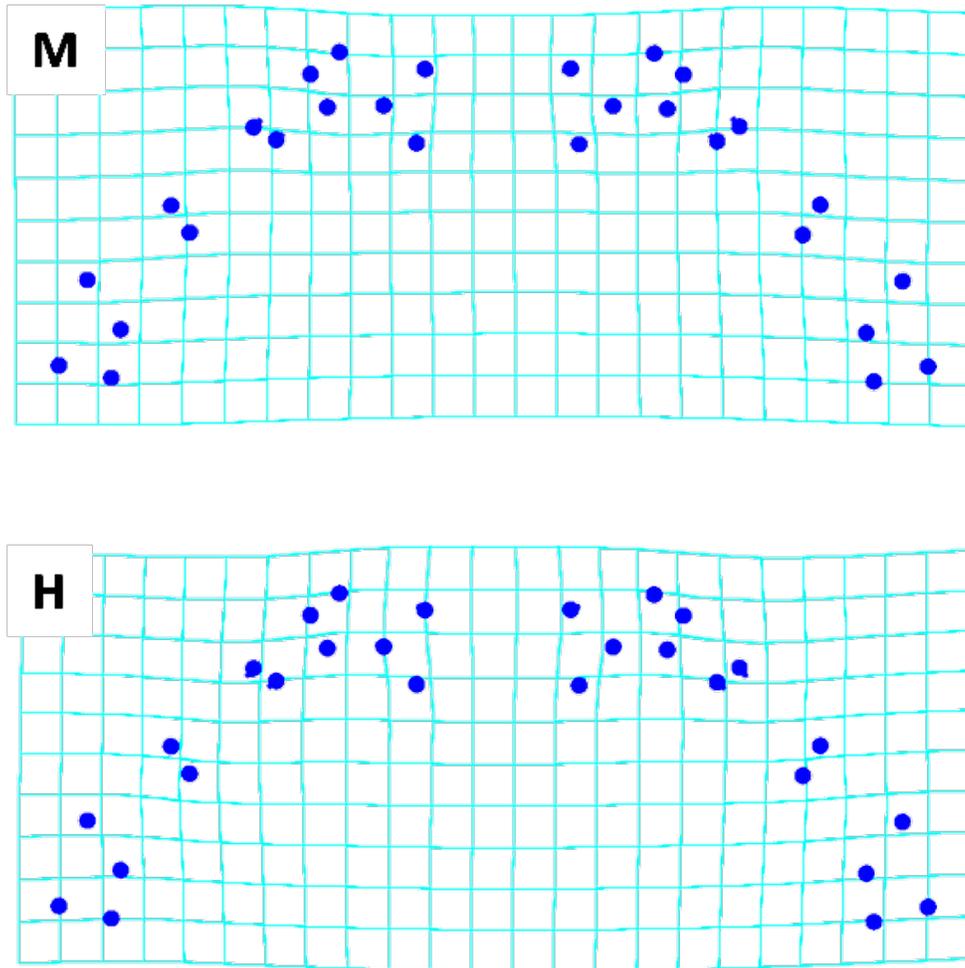
Del resultado del DFA para el ModuloAnterior con la mejor capacidad de identificación de sexos, se derivó una función discriminante de clasificación con los valores de coordenadas ajustados por Procrustes para este módulo. En esta función se consideran las coordenadas Procrustes (CP#) de las 28 landmarks de este modulo. Esta función (**FD**) es una función lineal que consta de un valor constante sumado del producto de un coeficiente y su coordenada Procrustes (CP#) correspondiente (Figura 26)

$$\begin{aligned}
 FD = & 2305.62 + 254.50*CPX1 - 113.80*CPY1 + 210.22*CPX2 - 395.40*CPY2 + \\
 & 255.83*CPX3 - 570.60*CPY3 + 856.25*CPX4 - 390.30*CPY4 + 338.52*CPX5 - \\
 & 371.20*CPY5 + 1221.80*CPX6 - 249.40*CPY6 + 928.82*CPX7 - 431.90*CPY7 + \\
 & 972.63*CPX8 - 328.50*CPY8 + 930.38*CPX9 - 314.40*CPY9 + 524.93*CPX10 - \\
 & 197.60*CPY10 - 9.53*CPX11 - 335.50*CPY11 + 213.44*CPX12 - 619.50*CPY12 \\
 & + 133.05*CPX13 - 97.09*CPY13 + 348.07*CPX14 - 450.00*CPY14 + \\
 & 107.40*CPX15 + 352.10*CPY15 - 121.40*CPX16 - 264.80*CPY16 - \\
 & 233.90*CPX17 + 243.39*CPY17 - 453.80*CPX18 + 539.70*CPY18 - \\
 & 311.40*CPX19 + 480.16*CPY19 - 237.50*CPX20 + 858.73*CPY20 - \\
 & 117.80*CPX21 + 574.81*CPY21 - 376.50*CPX22 + 953.88*CPY22 - \\
 & 96.48*CPX23 + 831.60*CPY23 - 418.30*CPX24 + 114.34*CPY26 - \\
 & 512.00*CPX27 - 136.30*CPY27 - 195.00*CPX28 + 114.14*CPY28
 \end{aligned}$$

**Figura 26.** Función discriminante del ModuloAnterior construida a partir de los coeficientes para cada coordenada Procrustes X, Y derivados del Análisis de Función Discriminante (DFA) para la clasificación por sexos.

De igual manera, con esta función se obtuvieron las geometrías promedio que definen cada grupo de sexo. En la Figura 27 se observa una rejilla de deformación de cada una de estas geometrías en la cuales se aprecia cuáles son los puntos que presentan mayor variación y hacia a dónde se encuentran deformadas estas variaciones. En la rejilla “M” se observa que las deformaciones de la geometría de los machos se encuentran enfocadas en el escudo nucal y el primer par de escudos marginales adyacente a éste.

Por otro lado, en la rejilla “H” (hembras) se observa cómo la deformación se encuentra enfocada en los puntos que delimitan el segundo y tercer par de escudos marginales.



**Figura 27.** Rejilla de deformación representando la forma promedio del ModuloAnterior de las crías de *Lepidochelys olivacea* para ambos sexos (M=macho H=hembra).

Entre las crías a las que no se les determinó el sexo por histología se puede conocer con alto grado de certeza su sexo en temperaturas de incubación donde se obtiene el 100% de un solo sexo. Para los tratamientos de 26-28°C hubo solo machos y en 32° solo hembras. Con una mezcla de los datos morfométricos de todas estas crías (con y sin evaluación histológica) de estos tratamientos se estimó la proporción de crías que

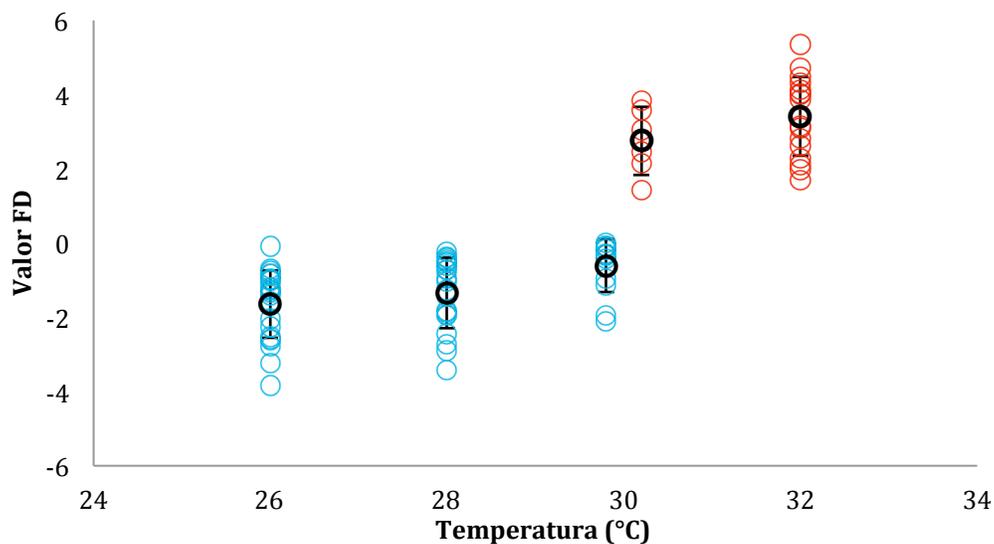
serían correctamente clasificadas por sexo según la función discriminante (Tabla XVII).

**Tabla XVII.** Clasificación de crías de los tratamientos en los que por la temperatura de incubación hay certeza que hubo proporciones sexuales del 100% para un solo sexo usando la función discriminante derivada de la clasificación por sexos (FD) del Modulo Anterior.

Temp (°C)	% sexo deducido por la temperatura de incubación	N	% Correctamente Clasificado	% Incorrectamente Clasificado
32	Hembra 100%	24	100	0.0
28	Macho 100%	24	100	0.0
26	Macho 100%	26	100	0.0
<b>Promedio</b>			<b>100</b>	<b>0.0</b>

Aplicando la función discriminante que se determinó anteriormente a las crías con sexo conocido mediante histología, fue posible estimar un valor de la forma (FD) para cada cría que reflejara las posibles diferencias entre ellas en función de las variables a contrastar (Temperatura y Sexo). Con este valor FD se realizó una gráfica usando las temperaturas de incubación en el eje X (Figura 28) en donde se observa la distribución de estos valores para cada temperatura de incubación, así como la distribución de los grupos sexo. Mediante una prueba de comparación de muestras independientes (U de Mann-Whitney para los grupos Hembra y Macho) se determinó que la dispersión de los valores de FD para sexos son estadísticamente diferentes ( $Z = -6.986$ ,  $p < 0.05$ ). Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para comparar las distribuciones de los valores de FD entre las temperaturas de incubación en las que se obtuvieron machos (26, 28 y 30 °C) encontrando que estas presentan diferencias significativas entre ellas ( $X^2_{[2]} = 12.352$ ,  $p < 0.05$ ). Es decir, que aun cuando estos valores de forma son clasificados dentro del grupo Machos existe un efecto propiciado por la temperatura de incubación que se mantiene enmascarado por el efecto mayor que el factor sexo tiene sobre la variable de forma. A diferencia de los machos los datos FD para las temperaturas en las que se obtuvieron hembras (30°C y 32°C) no presentan diferencias significativas entre sus distribuciones ( $Z = -1.4$ ,  $p > 0.05$ ). Esto probablemente se deba a que en el grupo Hembras solo se evalúan dos temperaturas

de incubación, mientras que en el grupo machos se evalúan tres temperaturas teniendo un rango de comparación más amplio. Estos resultados reflejan una ligera tendencia de cambio en el valor FD conforme aumenta el valor de la temperatura (ver figura 7), sin embargo, por mucho, la mayor diferencia se observa al comparar los FD entre machos y hembras (tratamientos 26-28 vs 32) lo que ilustra la excelente capacidad de discriminación entre sexos lograda. No obstante, el mayor reto sería el poder discriminar entre sexos para condiciones en las que se producen ambos sexos, como el tratamiento de 30° en este estudio. Los resultados obtenidos son altamente satisfactorios ya que (Figura 28) los valores de FD para los individuos en este tratamiento distinguen perfectamente ( $Z = -3.421$ ,  $p < 0.05$ ) entre dos formas que corresponden al 100% con el sexo conocido para los especímenes por histología.



**Figura 28.** Gráfica de distribución de los valores calculados de FD para los conjuntos de landmarks del ModuloAnterior de las crías provenientes de las cuatro temperaturas de incubación. Valores de FD < 0 identifican a la clase macho, FD > 0 a hembras. Para cada tratamiento (temperatura) se graficó la distribución de los valores de FD y se designó el sexo deducido por histología de cada cría por color (rojo=hembras; azul=machos). El error estándar para cada temperatura = barras de error; promedio =círculo vacío negro.

# 10 DISCUSIÓN

## 10.1 Sistema de incubación

La incubación artificial de huevos de tortuga marina ha tenido un incremento en los últimos tiempos con el propósito de realizar investigación científica (Phillott 2002). Se han descrito diferentes tipos de incubadoras en la literatura desde los inicios de la cría de reptiles. Considerando que una incubadora es un aparato con la función de regular condiciones ambientales de temperatura y humedad que permitan el desarrollo de los huevos (Köhler 2005). El éxito de eclosión y supervivencia se relaciona con factores ambientales como la humedad, temperatura, salinidad y tamaño de grano de arena durante la incubación de huevos de tortuga marina (Arzola y Armenta 1994). El movimiento de las nidadas después de la ovoposición es un punto crítico sobre el éxito de eclosión de los huevos de tortuga marina incubados (Limpus *et al.* 1979; McGehee 1979). De la misma manera Bautista-Huerta (1992) reporta que el contenido de agua en el medio tiene influencia en el intercambio entre el huevo y el sustrato. La temperatura tiene un efecto inverso en la duración de la incubación (Miller 1985). Es decir, a mayor temperatura menor tiempo de incubación. Desarrollamos un sistema modular completo de seis incubadoras capaces de controlar la temperatura de incubación dentro de un error de  $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$  de manera independiente y con un costo menor a \$13,000 MN, calculado en base al precio de los componentes comprados durante el 2011 y 2012. En términos de su precisión y costos se compara muy favorablemente con incubadoras comerciales cuyos costos oscilan sobre algunos miles de dólares. Además, la ventaja de que sea un sistema modular significa que puede ser escalado fácilmente con un costo de \$3,700 MN por cada par de incubadoras adicional a nuestro sistema.

En los tratamientos de 26-32 °C los periodos de incubación fueron de 42 a los 97 días de mayor a menor temperatura de incubación, teniendo porcentajes de eclosión por tratamiento superiores al 85%. No se encontró evidencia suficiente para aceptar que la inviabilidad presentada en los HSDA se deba a algún efecto derivado de las

temperaturas de incubación. Con un rango tan amplio de temperaturas de incubación fue posible observar el comportamiento completo de la estrecha relación que presenta la temperatura de incubación con la morfometría de las crías producidas en cada tratamiento, ya que en trabajos anteriores (Michel-Morfin *et al.* 2001) la limitante de solo utilizar dos temperaturas de incubación (28°C y 32°C) no permitió apreciar dicha relación.

## **10.2 Determinación de sexo por métodos invasivos**

El método histológico para el sexado de crías de tortuga golfina que carecen de caracteres dimórficos, es considerado el más confiable y preciso. Sin embargo, requiere de un proceso elaborado, equipo especializado y experiencia en la identificación de las características de cada sexo que puede derivar en un resultado costoso y tardado. La segunda técnica de sexado que se aplicó es la de aclaración de gónadas por medio de glicerol. Esta técnica no requiere de equipo especializado y entre sus ventajas está el hecho que mucho más barata, aunque sí requiere de una cuidadosa revisión de cada una de las muestras para identificar las características especificadas de cada sexo. Comparando los dos métodos, encontramos que con ninguno fue posible sexar la totalidad de muestras. Por histología, y probablemente al no contar con entrenamiento previo sobre la técnica, obtuvimos que el 77% de las muestras procesadas fueran identificables. El aclaramiento de gónadas es más sencillo pero sin embargo fue posible identificar solo el 66% de las muestras procesadas. En ambas técnicas de sexado las muestras con mayor grado de dificultad fueron las gónadas provenientes de embriones que murieron durante la incubación, falleciendo en diferentes etapas de desarrollo. Quizá por su tamaño o por provenir de especímenes que permanecieron muertos durante un período indefinido, se afectó la calidad del tejido. O quizá la gónada no se había diferenciado aún.

A pesar de que el procesamiento de las muestras por histología resulta más elaborado que con aclaración por glicerol, las características observables resultan más claras y

fáciles de distinguir en las muestras teñidas que en las aclaradas. En la técnica por aclaramiento, la ventaja de no necesitar entrenamiento en el procesamiento del aclarado se ve opacada por la necesidad de contar con ojos experimentados en la identificación monocromática de los caracteres específicos de cada sexo, que en sí es muy difícil. Incluso, en ocasiones, es necesario realizar cortes transversales muy delgados (de algunos  $\mu\text{m}$ ) de las gónadas para identificar las mismas características específicas de cada sexo observadas en las técnicas histológicas. En la Tabla XVIII se presenta un comparativo de las técnicas utilizadas para la determinación del sexo de las crías y embriones en la cual se puede observar que los resultados de las técnicas invasivas claramente favorecen a la histología por encima de la transparentación. Pese a que el costo de procesamiento de las muestras por transparentación es sustancialmente más bajo que el costo de procesamiento por histología se requiere una experiencia similar en el momento de la identificación de las características distintivas de cada sexo. A pesar de que ambas sean técnicas requieran experiencia previa para la identificación, que el tiempo de procesamiento sea un poco más lento y los materiales más caros, con la histología, con un 100% de correcta clasificación, sigue manteniéndose como la técnica por excelencia o “Gold Standard” para la determinación del sexo. No obstante que debe de considerarse siempre como la técnica de referencia, resulta muy interesante y alentador el que las técnicas de morfometría fueron capaces de procesar el 100% de las muestras y la morfometría geométrica logró también un 100% de correcta clasificación.

**Tabla XVIII.** Comparación de los costos y efectividad de las diferentes técnicas utilizadas para la evaluación del sexo.

Técnica	Instalaciones o Equipo Requerido	Tiempo Neto Evaluación (Horas x Muestra)	Materiales de Consumo (Costo* x Muestra)	Efectividad	
				Proporción de Crías Factibles de Evaluar** (N total)	% Correcta Clasificación
Histología	Laboratorio de Histología	4.0	\$ 31.04	59% (95)	100
Transparentación	Laboratorio con microscopio	2.5	\$ 21.08	43% (70)	88.6
Morfometría Lineal	Vernier	0.3	--	100% (162)	75.3
Morfometría Geométrica	Cámara fotográfica y computadora	0.3	--	100% (162)	100

\*Los costos presentados se calcularon en base al costo de los materiales comprados durante el 2012.

\*\*Eliminando los embriones que no se evaluaron por morfometría

### 10.3 Número de escudos

Las variaciones en el número de escudos y presencia de escudos supernumerarios son de ocurrencia natural y se ha reportado en prácticamente todas las especies de tortugas marinas (Gadow 1899; Newman 1906). Diversos estudios han abordado la presencia de escudos supernumerarios y las variaciones como indicadores de diferentes factores externos como la temperatura, humedad, manejo de las nidadas, contaminantes, entre otros (Mast y Carr 1989; Başkale y Kaska 2003). Reid *et al.* (2009) encontró que un aumento en la temperatura de incubación de los huevos hace que las crías se encuentren más propensas a tener escudos supernumerarios o irregularidad en sus patrones. En concordancia con las conclusiones de estos autores, las crías de tortuga golfina incubadas a una gama de temperaturas constantes mostraron que existe una relación entre la temperatura de incubación y la presencia de escudos supernumerarios, siendo que a mayor temperatura de incubación se incrementa la presencia de escudos supernumerarios. Al hacer una identificación de

los diferentes tipos de escudos supernumerarios se pudo observar que no todos los escudos del carapacho se ven afectados por la temperatura de incubación. Los escudos Costales (izquierdos y derechos), vertebrales y nucales fueron los que presentaron significancia dependiendo de la temperatura de incubación ( $p < 0.05$ ). La temperatura de incubación tiene gran relevancia en el desarrollo embrionario porque, además de la determinación del sexo, también determina el éxito de sobrevivencia durante la incubación (Miller 1985). Dado que, a temperaturas superiores al límite del rango óptimo deriva en incrementos de las anormalidades morfológicas de las crías y un decremento en el éxito de eclosión (Miller 1985, Miller *et al.* 2003). Hildebrend (1938) reporta la variación de las concentraciones de oxígeno durante la incubación como la causa probable de la presencia de anormalidades en carapacho de tortuga espalda de diamante (*Malaclemys terrapin*). Kazmaier y Robel (2001) describen que las variaciones en la temperatura y la humedad producen estrés durante el desarrollo embrionario y la incubación provocando anormalidades en el número de escudos de *Terrapene ornata*. Mast y Carr (1989) deducen de sus observaciones que el manejo de las nidadas de tortuga lora (*Lepidochelys kempii*) anterior a la ovoposición tiene un efecto significativo sobre las variaciones estructurales del carapacho de las crías eclosionadas. Yntema y Mrosovsky (1982) sugieren que el patrón de escudos del caparazón también debe tener un período crítico para la determinación del número, así como la diferenciación gonadal en las tortugas que se lleva a cabo en el segundo tercio de la incubación. Por otra parte Hill (1971) reportó que el manejo de los huevos en ciertos estados de desarrollo incrementaba la variación de escudos en crías de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*). Bujes y Verrastro (2007) rechazan esta hipótesis y sugieren que la ocurrencia de los escudos supernumerarios es multifactorial.

Los resultados obtenidos en esta tesis identifican a la temperatura de incubación como la promotora del aumento en el número de escudos del carapacho en las crías de tortugas marinas, por encima de otros factores sugeridos.

#### 10.4 Determinación de sexo por morfometría lineal

Ha habido mucha discusión sobre los diferentes factores que pueden influenciar las variaciones merísticas y morfométricas en las crías de tortuga marina. En peces se ha observado que los caracteres morfométricos y merísticos están principalmente influenciados por las condiciones ambientales, y parcialmente determinados por las variaciones genéticas (Barlow 1961; Ihssen *et al.* 1981; Lindsey 1988). Harrington y Crossman (1976) reportan la influencia directa de la temperatura de crianza sobre el número de vertebras desarrolladas de clones homocigotos de *Rivulus marmoratus*. En reptiles, un dimorfismo sexual de las crías sólo se ha encontrado en cocodrilos, *Alligator mississippiensis*, para los cuales las temperaturas de incubación de los huevos afectan a la pigmentación y el tamaño de los neonatos (Deeming y Ferguson, 1989). En las tortugas de caparazón blando, *Apalone spinifera*, que presenta Diferenciación Sexual Genética (GSD, por sus siglas en inglés), se observa desarrollo de coloración dicromática del carapacho distintiva de cada sexo en crías (Graham y Cobb. 1998).

Suponiendo una influencia genética sobre las crías, es complicado cuantificar la influencia de cada padre sobre la morfología de la progenie porque además de las diferencias genéticas y de salud que distingue a diferentes madres, los óvulos de tortuga marina son frecuentemente fecundados por esperma de múltiples padres (Parker *et al.* 1996; Fitzsimmons 1998; Ireland *et al.* 2003). No obstante, que este tema rebasa los alcances del presente estudio, si fue posible observar que las incubaciones provenientes de hembras que pusieron los huevos mas grandes produjeron también las crías mas grandes dentro de cada una de las temperaturas de incubación ( $F_{20,112} = 2.39, p < 0.001$ ). El que existan otros componentes que afectan los tamaños de las crías, adicionalmente al tratamiento primario de nuestro interés, la temperatura, podría complicar los análisis. Por ello, y al no contar con la capacidad de separar los componentes parentales relacionados con las morfologías observadas dentro de los alcances del presente trabajo, se estandarizaron las mediciones morfométricas en función de la longitud total del carapacho descartando el efecto del tamaño y obteniendo así que las diferencias puedan ser comparadas respecto a la

forma proporcional de cada una de las crías. Con este tratamiento se le confiere mayor robustez a los datos y se logró realizar la evaluación meramente de la forma.

Una ventaja del diseño experimental empleado fue la utilización de una gama de seis temperaturas de incubación que, además de reflejar en mayor grado la diversidad real de los regímenes térmicos en el ambiente natural de la especie, permitió observar que la relación entre la morfología lineal de las crías no guarda una relación lineal con la temperatura. La relación es más compleja y los resultados con las diez mediciones morfométricas para las diferentes temperaturas de incubación (Figura 21) manifiestan una "U" invertida, con una tendencia a dimensiones máximas alrededor de las incubaciones entre 28-30°C y disminuciones hacia las temperaturas en los extremos. Esta observación tiene implicaciones importantes dentro del contexto del uso de mediciones morfológicas para inferir el sexo de las crías, tema central de esta tesis. Por ejemplo, debido a la forma de la relación, es posible encontrar diferentes temperaturas de incubación en las cuales se generarían mismas dimensiones, incluso en temperaturas produciendo machos en las menores y hembras en las mayores. Por el contrario, también se puede observar que existen temperaturas de incubación en donde se producen diferentes sexos y que las morfometrías (lineales) resultantes son altamente contrastantes. Este probablemente sea el caso del estudio por Michel-Morfin *et al.* (2001) en el que también se utilizó un análisis discriminante pero se reportó una capacidad del 95% para identificar el sexo de las crías con base en nueve caracteres de morfometría lineal. La clave de este resultado reside en el hecho que se emplearon solo dos temperaturas, una promotora de machos (28°C) y la otra de hembras (32°C). Los resultados de nuestro análisis utilizando exclusivamente estas mismas temperaturas de incubación determinaron que solo el caso en el que no se realizó la estandarización y se consideraron las diez mediciones que realizamos (Tabla XIII) nos arrojaría un nivel de identificaciones correctas muy similar al de los anteriores autores (95 %).

El usar una amplia gama de temperaturas de incubación logra evaluar los límites de la capacidad de discriminación de los sexos de crías de tortuga golfinia por mediciones

morfométricas lineales. Los mejores resultados usando las medidas estandarizadas y el conjunto completo de temperaturas de incubación indican que se obtiene una discriminación correcta en apenas un 75.3 % de los casos en donde se contaba con una determinación verificada por histología y en un 79.6 % para crías derivadas de incubaciones en las que la temperatura solo produce 100% de un solo sexo (Tabla XIV). Estos resultados sugieren fuertemente que la morfometría lineal no es lo suficientemente confiable como para usarla para determinar el sexo en crías de tortuga golfina. En gran medida esta dificultad está asociada con el hecho que la relación entre temperatura de incubación y la morfometría lineal de las crías es compleja y no puede ser acomodada adecuadamente por modelos lineales.

### **10.5 Determinación de sexo por morfometría geométrica**

La proporción sexual es un parámetro fundamental en el estudio de la dinámica de poblaciones. La proporción sexual de crías puede ser diferente a la proporción sexual de los adultos, cuya comparación informaría acerca de factores importantes como la mortalidad diferencial, migración y dispersión diferencial entre sexos (Bulmer, 1994). Mientras que muchas especies de tortugas presentan dimorfismo sexual en adultos, las crías de éstas no parecen presentar un dimorfismo sexual que permita su identificación por observaciones externas (Ernst y Barbour, 1989). La forma es uno de los principales aspectos fenotípicos sobre los cuales la selección natural actúa. Uno de los principales problemas de la evaluación de la forma es la influencia que otros aspectos fenotípicos pueden tener como el tamaño de los individuos. Las mediciones lineales de la longitud y el ancho corporal no permiten una clara separación de la morfología de los organismos en sus componentes de tamaño y forma. Debido a lo anterior, herramientas como la morfología geométrica pueden ser usadas para cuantificar la variación de la forma (Bookstein 1989; Rohlf y Marcus 1993; Adams *et al.* 2004). Particularmente, estos métodos permiten la evaluación directa de la forma descartando los efectos de escala, posición y orientación (Rohlf y Slice 1990). Por lo tanto, desde una perspectiva teórica, los métodos de morfometría geométrica son

preferibles a los métodos de distancias lineales para la cuantificación de la morfología. Valenzuela *et al.* (2004) reportaron el uso de la morfometría geométrica como un método con precisión aceptable en la determinación del sexo de crías de un par de tortugas dulceacuícolas, con porcentajes de correcta clasificación superiores al 90% siendo estos resultados superiores a los reportados utilizando medidas de distancia lineal. A pesar de que las diferencias en la forma entre los machos y las hembras de tortugas dulceacuícolas son suficientemente sutiles para pasar inadvertidas para el ojo humano, el uso de métodos de morfometría geométrica son lo suficientemente sensibles para la estimación de estas diferencias (Valenzuela et al. 2004).

Con el antecedente de los estudios de Valenzuela et al. (2004) y la ausencia de trabajos en este campo sobre tortuga golfina, además de la importancia de contar con un método no invasivo ni mortal para determinar el sexo de crías de tortuga marina, el 100% de correcta clasificación mediante métodos de morfometría geométrica que nos arrojó nuestro estudio constituye la principal contribución de este trabajo. Resulta alentador en extremo, enfatizado por el incremento sobre el 75.3 % obtenido por métodos de mediciones lineales. La confiabilidad de los resultados también puede verificarse por el hecho que no solamente fue posible distinguir entre sexos en individuos incubados a distintas temperaturas, unas totalmente masculinizantes (26, 28°C), otras totalmente feminizantes (32°C) sino también y con igual capacidad discriminatoria en el único tratamiento en el que se obtuvieron ambos sexos (30°C).

La formación de escudos durante el desarrollo embrionario presenta un comportamiento peculiar debido a que en este estudio pudimos observar que está estrechamente relacionado con la temperatura de incubación pero es inverso al tiempo total de incubación. Es decir, a mayor temperatura de incubación se acelera el desarrollo embrionario lo cual disminuye el tiempo total de incubación. Merchant-Larios *et al.* (2009) encontraron que para crías incubadas a temperatura promotora de machos (26°C) el periodo termosensible (TSP, por sus siglas en ingles), o de diferenciación sexual, corresponde a la etapa de desarrollo 24 y el periodo de determinación sexual corresponde a partir de la etapa de desarrollo 25. Para crías

incubadas a temperatura promotora de hembras (33°C) el TPS corresponde a la etapa de desarrollo 25 y el periodo de determinación sexual a partir de la etapa de desarrollo 26. Según lo reportado por Miller (1985), donde describe las principales características del desarrollo embrionario, en la etapa de desarrollo 23 no se observa la diferenciación de los escudos del carapacho, en la etapa 24 se observa una ligera diferenciación de los escudos centrales, en la etapa 25 los escudos centrales, laterales y marginales se encuentran definidos y los escudos inframarginales son visibles y en la etapa 26 todos los escudos del carapacho y plastrón son distinguibles. Debido a lo anterior, existe una fuerte coincidencia entre la formación de escudos de acuerdo a la descripción de etapas realizada por Miller (1985) y las etapas relacionadas con la diferenciación y determinación sexual reportadas por la Merchant-Larios *et al.* (2009). Por ello es posible que los procesos fisiológicos y moleculares de diferenciación sexual tengan repercusiones directas o indirectas sobre la formación de los escudos que ocurre al mismo tiempo, de tal manera que las diferencias en las rutas hacia la masculinización y la feminización ocasionen diferencias en la forma misma de los escudos. Estas diferentes influencias sobre la morfología de los escudos entre sexos podrían ser accidentales o adaptativas. Slice (1993) realizó una comparación utilizando métodos de morfometría geométrica en la que describe que el carapacho de las hembras adultas de *Trachemys scripta* es más profundo en la zona central, más amplio en la parte anterior, estrecho en la parte posterior y contraído lateralmente en mayor proporción que el carapacho de los machos adultos de la misma especie. Valenzuela *et al.* (2004) reportan, mediante métodos de morfometría geométrica, la existencia de dimorfismo en el carapacho, imperceptible a simple vista, entre los sexos de crías de dos especies de tortugas dulceacuícolas (*Podocnemis expansa* y *Chrysemys picta*), y a partir de éstos especula sobre una posible función biológica de diferencias en la forma del carapacho asociada a la reproductiva de los quelonios. En el caso de la tortuga golfina no se cuenta con información sobre una posible función de las diferencias entre sexos encontradas en este estudio, incluso no se conoce si estas diferencias persisten hasta la etapa de adultos. Sin embargo, debido a las coincidencias entre nuestros resultados con la revisión de Valenzuela *et al.* (2004) se debe mantener como una posibilidad por indagar en el futuro.

## 10.6 Trabajo a futuro

Como se manifestó en la justificación del presente estudio, una de las consecuencias más preocupantes de incrementos en la temperatura ambiental por el cambio climático será la afectación sobre la proporción sexual de las tortugas marinas debido a que el sexo es determinado por la temperatura de incubación. Conocer si el cambio climático ocasiona modificaciones en la proporción sexual es crítico para evaluar los impactos sobre tortugas marinas (Hamann *et al.* 2011) pero para evaluar las tendencias en estos valores se requiere un seguimiento en poblaciones naturales que en la actualidad depende principalmente de evaluaciones por histología que representa sacrificio de animales o aplicarlo a crías que mueren por causas naturales (Hernández-Echeagaray *et al.* 2012). Los excelentes resultados del análisis por morfometría geométrica del presente estudio sugiere que finalmente se cuenta con un método no-invasivo y confiable para aplicarse de manera general en la tarea mencionada anteriormente. Sin embargo, es indispensable validar los resultados en condiciones naturales en donde las temperaturas de incubación son variables en escalas diurnas y mensuales, además de que en ocasiones las nidadas son afectadas por cambios bruscos derivados de fenómenos atmosféricos. Adicionalmente, es recomendable en el corto plazo repetir el estudio en el laboratorio y condiciones controladas para incrementar los tamaños de muestra, particularmente en temperaturas en la que se produzcan ambos sexos (alrededor de 30°C) para verificar la capacidad discriminadora en las condiciones con mayor dificultad analítica.

La persistencia y el significado biológico de las diferencias morfológicas descubiertas para los dos sexos en etapa de cría deberían ser estudiadas en etapas posteriores (juveniles y adultos). Aunque no tengan un valor biológico en la etapa reproductiva, si las diferencias morfométricas se mantienen en etapas de pre-adulto se convertirían en rasgos relativamente fáciles de evaluar y ofrecerían una alternativa poderosa para el sexado de juveniles que en la actualidad depende de estimaciones por niveles hormonales (ej. Hawkes *et al.* 2013).

Como consecuencia, es necesario realizar nuevos enfoques del análisis de morfología geométrica, que abarque condiciones diferentes a la incubación a temperatura constante, para corroborar que pese a las fluctuaciones de la temperatura la relación de la determinación sexual y la determinación de la forma del carapacho, dada por la formación de escudos, está fuertemente relacionada que es posible caracterizar una en función de la otra.

De igual manera, un análisis de crías incubadas en condiciones naturales, con fluctuaciones de temperatura de incubación, que permita deslindar la variación de la forma del carapacho de la temperatura de incubación, siendo el efecto proporcionado por la determinación sexual quien tenga el mayor aporte sobre esta diferenciación. Con la necesidad de cotejar ambos trabajos con determinaciones realizadas por histología la cual hemos acordado como la técnica por excelencia en la determinación de sexo de crías de tortugas marinas.

## 11 CONCLUSIONES

Se desarrolló un sistema de **seis incubadoras independientes y controladas por microprocesador** Arduino central. Estas incubadoras de diseño de “fuente abierta”, fueron capaces de mantener temperaturas de incubación constante durante la incubación con una variación de menos de  $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$  y almacenar los registros de temperatura obtenidos cada 10 segundos. El contar con un registro continuo de datos de las condiciones de incubación durante todo el periodo da soporte y trazabilidad a los resultados obtenidos en las incubaciones. Aunado a esto, el bajo costo del sistema completo de incubación, el cual es solo una fracción del costo de una sola incubadora de marca comercial para huevos de reptiles, y la universalidad de los componentes empleados permiten una mayor accesibilidad para su reproducción en cualquier parte del mundo en donde se cuente con una modesta infraestructura básica para su funcionamiento. La validación de las hieleras como sistemas de incubación se demuestra al observar un desarrollo embrionario en todas las temperaturas de incubación y consecuentemente los niveles de mortalidad y tasas de crecimiento pueden ser atribuidos a las condiciones experimentales, concordantes con lo publicado en la literatura, y no a un mal funcionamiento de las incubadoras.

El **sexado de crías por histología**, considerada como la técnica por excelencia, permitió evaluar un 77.4% de las muestras disponibles cuyos resultados fueron usados como referencia para las demás metodologías.

El **sexado por aclaramiento de gónadas** resultó ser una técnica más problemática que la anterior y se pudo evaluar una menor proporción de muestras (66.4%). La correcta clasificación de sexo fue menor (88.6%), respecto al 100% de clasificación de histología, por lo que se concluye no puede ser considerada como una metodología alternativa viable a la histología.

Pese a que la mayor variación en el **número de escudos del carapacho** en tortugas marinas ha sido reportada en la tortuga golfina, nunca había sido posible identificar sus causas de manera conclusiva. Los resultados de este trabajo permitieron identificar una relación entre las temperaturas de incubación y la abundancia de escudos supernumerarios, costales y vertebrales en crías incubadas a una gama de seis temperaturas constantes. Los escudos marginales, nucales y supracaudales fueron los más constantes. Se identificó el patrón más común de escudos del carapacho (1 escudo nual, 5 escudos vertebrales, 1 par de escudos supracaudales, 6 pares de escudos costales y 12 pares de escudos marginales) y, a pesar de que coincide con lo reportado como el “estándar” para la especie, el 76.5% de las crías obtenidas exhibieron un conjunto diferente a este patrón. Los resultados permiten descartar la hipótesis de que el manejo de las nidadas influye sobre la presencia de escudos supernumerarios (Hill 1971) ya que todos los huevos de las tres nidadas se sometieron a la misma influencia del manejo al ser colectados, pesados, medidos y transportados desde su ovoposición hasta su destino dentro de las incubadoras, por lo que se habrían esperado un mismo efecto sobre los escudos supernumerarios en todas las crías. Por medio del presente estudio se demuestra una relación directa entre la cantidad de los escudos supernumerarios y las temperaturas de incubación de la fase embrionaria.

Probablemente debido a que la relación entre temperatura de incubación y la mayoría de las dimensiones lineales de las crías es compleja, la **efectividad de la morfometría lineal para identificar el sexo de crías** de tortuga golfina es menor al 80% por lo que no puede considerarse una técnica suficientemente confiable como para emplearse ampliamente para este propósito.

La agrupación de escudos en módulos para la **estimación de sexo por morfometría geométrica** resultó útil para evitar los efectos sobre abundancia de escudos supernumerarios ocasionados por la temperatura.

La principal contribución del presente trabajo fue la demostración que por medio de **morfometría geométrica** utilizando el módulo de escudos que incluyó el escudo nugal y los primeros cinco pares marginales (MóduloAnterior) se logró una excelente capacidad para discriminar entre los sexos de las crías analizadas (100% de correcta clasificación). Con estos resultados y debido a que es una técnica relativamente sencilla y no requiere sacrificio de crías, parece tener todas las características para ser empleada como una alternativa confiable al sexado por histología que comúnmente implica sacrificar los especímenes. Sin embargo, estos resultados se derivan de incubaciones a temperaturas constantes y bajo condiciones de laboratorio por lo que aun se requiere evaluar su confiabilidad para crías incubadas en condiciones naturales que implican variaciones importantes de temperatura en diversas escalas temporales.

## 12 LITERATURA CITADA

Abreu-Grobois, A y Plotkin, P. (IUCN SSC Marine Turtle Specialist Group) 2008. *Lepidochelys olivacea*. En: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2012.2. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>.

Adams, D. C. 2004. Character displacement via aggressive interference in Appalachian salamanders. *Ecology* 85: 2664–2670.

Adams, D. C., y Rohlf F. J. 2000. Ecological character displacement in *Plethodon*: biomechanical differences found from a geometric morphometric study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4106–4111.

ANZCCART. 2001. Australian and New Zealand Council for the Care of Animals in Research and Teaching. Dept Env. Biol., Adelaide University, 136.

Arzola, F., y Armenta, J. 1994. Análisis comparativo de dos factores ambientales en nidos naturales y nidos trasladados y su efecto en crías de tortuga golfina, *Lepidochelys olivacea* en la playa El Verde, Mazatlán, Sinaloa, durante la temporada 1992-1993. Tesis de Biología, Instituto Tecnológico de Los Mochis, México, 72 pp.

AVMA. 2007. AVMA Guidelines on Euthanasia. American Veterinary Medical Association. 36.

Barlow, G.W. 1961. Causes and significance of morphological variation in fishes. *Syst. Zool.* 10, 105–117.

Başkale, E. y Kaska, Y. 2003. Conservation and Research Aspects of Hatchery Practices, 67-70. En: Margaritoulis, D. and Demetropoulos, A. (Editors) *Proceedings of the First*

Mediterranean Conference on Sea Turtles (24-28 October 2001). Barcelona Convention-Bern Convention-Bonn Convention (CMS). Nicosia, Cyprus. 270 pp.

Bautista-Huerta, F. 1992. Relación de la humedad del ambiente incubatorio en el avivamiento de *Lepidochelys olivacea* (tortuga golfina) en la playa de Escobilla, Oaxaca. Tesis profesional ENEP Zaragoza, UNAM, México.

Bookstein, F. L. 1982. Foundations of morphometrics. Annual Review of Ecology and Systematics, 451-470.

Bookstein, F. L. 1989. Principal warps: thin-plate splines and the decomposition of deformations. IEEE Trans. Patt. Anal. Mach. Intell. 11:567-585.

Bookstein, F. L. 1991. Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. 435. New York: Cambridge University Press. xvii.

Bookstein, F. L. 1996. Biometrics, biomathematics and the morphometric synthesis. Bulletin of Mathematical Biology, 58(2), 313-365. doi:10.1007/BF02458311.

Booth, D., E. Burgess, J. McCosker, J. Lanyon. 2004. The influence of incubation temperature on post-hatching fitness characteristics of turtles. Int Congr Ser. 1275: 226-233.

Briseño-Dueñas, R. 1980. Tesis Profesional Aspectos biológicos y protección de la tortuga golfina *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz) en el Verde, Sinaloa. Instituto Politécnico Nacional, CICIMAR, 54 pp.

Bujes, C. S. y Verrastro, L. 2007. Supernumerary epidermal shields and carapace variation in Orbigny's slider turtles, *Trachemys dorbignii* (Testudines, Emydidae). Revista Brasileira de Zoologia 24 (3): 666-672.

Bulmer, M. 1994. Theoretical evolutionary ecology. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.

CAMBIO CLIMÁTICO. 2010. Fundamentos del Cambio climático. Disponible en <http://www.cambioclimatico.gob.mx/index.php/fundamentos.html>.

CONANP. 2010. Estrategia de Cambio Climático para Áreas Protegidas, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, Semarnat. México.

Davenport, J. 1997. Temperature and the life-history strategies of sea turtles. *Journal of Thermal Biology* 22(6): 479-488.

Deeming, D. C. y Ferguson, M. W. J. 1989. The mechanism of temperature dependent sex determination in crocodilians: An hypothesis. *Amer. Zool.* 29: 973-985.

Deraniyagala, P. E. P. 1939. The tetrapod reptiles of Ceylon. Vol. 1. Testudines and Crocodilians. Colombo Museum of Natural History Series, 307-391.

Eckert, K. L., Bjorndal, K. A., Abreu-Grobois, F. A. y Donnelly, M. (Editores). 2000 (Traducción al español). Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas. Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE Publicación No. 4.

Ernst, C. H. y Barbour, R. W. 1989. *Turtles of the world*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.

Fitzsimmons, N. N. 1998. Single paternity of clutches and sperm storage in the promiscuous green turtle (chelonian mydas). *Mol Ecol* 7: 575-584

Frazier, G. J., 1983. Análisis estadístico de la tortuga golfina *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829) de Oaxaca, México. Ciencia Pesquera. Instituto Nacional de la Pesca. México. 125 (4): 49-7.

Gadow, H. 1899. Orthogenetic variation in the Shell of *Chelonia*. Willey's Zoological Results 3:207-222. W. G. Lynn & M. C. Ullrich. 1950 Experimental production of shell anomalies in turtles. Copeia 1950 (4): 253-262.

Graham, T.E. y Cobb, C.B. 1998. Sexual dimorphism of neonate eastern spiny softshells, *Apalone spinifer spinifer*. *Chelonian Conserv. Biol.* **31**, 111-12.

Hamann, M., Grech, A., Wolanski, E., Lambrechts, J. 2011. Modelling the fate of marine turtle hatchlings. *Ecological Modelling*, 222: 1515–1521.

Harrington Jr, R.W. y Crossman, R.A. 1976. Temperature induced meristic variation among three homozygous clones of the self-fertilizing fish *Rivulus marmoratus*. *Can. J. Zool.* 54: 1143–1155

Hawkes, L. A., Broderick, A. C., Godfrey, M. H. and Godley, B. J. 2009 Climate change and marine turtles. *Endangered Species Research* 7: 137-154.

Hawkes, L. A., McGowan, A., Godley, B.J., Gore, S., Lange, A., Tyler, C.R., Wheatley, D., White, J., Witt, M.J., Broderick, a., 2013. Estimating sex ratios in Caribbean hawksbill turtles: testosterone levels and climate effects. *Aquatic Biology* 18(1), 9-19.

Hays, G. C., Fossette, S., Katselidis, K. A., Schofield, G. y Gravenor, M. B. 2010, Breeding Periodicity for Male Sea Turtles, Operational Sex Ratios, and Implications in the Face of Climate Change. *Conservation Biology*, 24: 1636–1643.

Hendrickx M, Flores-Verdugo, F., Van der Heiden, A., Briseño-Dueñas, R. 1983. Fauna survey of the decapod crustaceans, reptiles and coastal birds of the Estero El Verde,

Sinaloa, Mexico, with some notes on their biology. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología*. Universidad Nacional Autónoma de México. 10(1): 187-194.

Hernández-Echeagaray, O. E., Hernández-Cornejo, R., Harfush-Meléndez, M., García-Gasca, A. 2012. Evaluation of sex ratios of the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*) on the arribada nesting beach, La Escobilla, Mexico. *Marine Turtle Newsletter*, 133, 12-16.

Hildebrend, S. F. 1938. Twinning in Turtles. *Journal of Heredity* 29: 143-253.

Hill, R.L. 1971. Surinam turtle notes-1. Polymorphism of costal and vertebral laminae in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Mededelingen van de Stichting Natuurbehoud Suriname (Stinasu)*. 2: 1-9.

Hurlbut, T., Clay, D., 1998. Morphometric and meristic differences between shallow- and deep-water populations of white hake (*Urophycis tenuis*) in the southern Gulf of St Lawrence. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55, 2274–2282.

Ihssen, P.E., Evans, D.O., Christie, W.J., Reckahn, J.A., DesJardine, R.L., 1981. Life history, morphology, and electrophoretic characteristics of five allopatric stocks of late whitefish (*Coregonus clupeaformis*) in the Great Lakes region. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38, 1790–1807.

IPCC, 2007: Cambio climático 2007: Informe de síntesis. Contribución de los Grupos de trabajo I, II y III al Cuarto Informe de evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático [Equipo de redacción principal: Pachauri, R.K. y Reisinger, A. (directores de la publicación)]. IPCC, Ginebra, Suiza, 104.

Ireland, J. S., Broderick, A. C., Glen, F., Godley, B. J. 2003. Multiple paternity assessed using microsatellite markers, in green turtles *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) of Ascension Island, South Atlantic. *J Exp Mar Biol Ecol* 291:149–160.

IUCN. 2009. The IUCN Red List of Threatened Species. Turtle-y exposed to climate change. Disponible en [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org).

Jenness Enterprises. *Arc View Extension: Mahalanobis Description*. [En línea]. Disponible en <[http://www.jennessent.com/arcview/mahalanobis\\_description.htm](http://www.jennessent.com/arcview/mahalanobis_description.htm)> [Consulta: 20-09-2014]

Kazmaier, R.T. y Robel, R.J. 2001. Scute anomalies of ornate box turtles in Kansas. *Transactions of the Kansas Academy of Science*. 104: 178-182.

Kendall, D. 1984. Shape manifolds, Procrustean metrics and complex projective spaces. *Bulletin of the London Mathematical Society*, 16(2), 81-121. doi:10.1112/blms/16.2.81.

Köhler, G. 2005. *Incubation of reptile eggs*. Krieger Publishing Company, Florida, 214.

Limpus, C. J., Baker, V., y Miller, J. D. 1979. Movement induced mortality of loggerhead eggs. *Herpetologica* 34:335-338.

Lindsey, C. C. 1988. Factors controlling meristic variation. *Fish Physiol*. 11, 197-274.

Loy, A. 1996. An introduction to geometric morphometrics and intraspecific variation: a fascinating adventure. In: MarcusLF, CortiM, LoyA, NaylorGJP, SliceDE, eds. *Advances in morphometrics*. New York, NY: Plenum Press, 271-273.

Mast, R.B. and Carr J.L. 1989. Carapacial scute variation in Kemp's ridley sea turtle (*Lepidochelys kempi*) hatchlings and juveniles. *Proceedings of the First International Symposium on Kemp's Ridley Sea Turtle Biology, Conservation and Management*, TAMU-SG-89-105, 202-219.

McGehee, M. A. 1979. Factors affecting the hatching success of loggerhead sea turtles eggs. Unpubl. Tesis de Maestria, Univ. of Orlando, Orlando, FL.

Merchant-Larios, H., Villalpando, F. I., Urruiza, C. B. 1989. Gonadal morphogenesis under controlled temperature in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Herpetological Monographs* 3:43–61.

Merchant-Larios, H., Ruiz-Ramírez, S., Moreno-Mendoza, N. y Marmolejo-Valencia, A. 1997. Correlation among thermosensitive period, estradiol response, and gonad differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Gen Com Endocrinol* 107:373–385.

Merchant-Larios, H., Díaz-Hernández, V., Marmolejo-Valencia, A. 2009. Gonadal Morphogenesis and Gene Expression in Reptiles with Temperature-Dependent Sex Determination. *Sex Dev*; 4:50-61.

Michel-Morfin, J. E., Gómez Muñoz, V. M., y Navarro, R. C. 2001. Morphometric Model for Sex Assessment in Hatchling Olive Ridley Sea Turtles. *Chelonian Conservation and Biology*, 2001, 4(1): 53-58.

Miller, J. D. 1985. Embryology of marine turtles. Gans C, Billet F, Maderson PFA (eds): *Biology of the Reptilia*, Vol 14, 270–328.

Miller, J. D., Limpus, C., Godfrey, M. 2003. Nest site selection, oviposition, eggs, development, hatching, and emergence of loggerhead turtles. *Loggerhead Sea Turtles*. A. Bolten, B. Witherington. 125-143.

Montenegro, S. B., N. Bernal G. 1982. Análisis del contenido estomacal de *Lepidochelys olivacea*. Tesis profesional. E.N.E.P. Iztacala, U.N.A.M. México.

Morreale, S. J., G. J. Ruiz, J. R. Spotila and E. A. Standora. 1982. Temperature dependent sex-determination: current practices threaten conservation of sea turtles. *Science* 216:1245-1247.

Mrosovsky, N. 1988. Pivotal temperatures for loggerhead turtles from northern and southern nesting beaches. *Can J Zool.* 66: 661-669.

Newman, H. H. 1906. The significance of scute and plate "abnormalities" in Chelonia. *Biological Bulletin* 10: 68-114.

Parker, P. C., Waite T. A., Pearce T. 1996. Paternity studies in animal populations. En: Smith TB, Wayne RK (eds) *Molecular genetic approaches in animal conservation*. Oxford University Press, New York, 413-423.

Parque Nacional Lagunas de Chacahua. 2008. Programa de Monitoreo de la Tortuga Golfina (*Lepidochelys olivacea*) en el Parque Nacional Lagunas de Chacahua. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas.

Phillott, A. 2002. Minimizing Fungal Invasion During the Artificial Incubation of Sea Turtle Eggs. *Herpetological Review.* 33(1),41-42.

Reid, K., Margaritoulis, D., Speakman, J. 2009. Incubation temperature and energy expenditure during development in loggerhead sea turtle embryos. *J Exp Mar Biol Ecol.* 378: 62-68.

Reece, S., Broderick, A., Godley, B. y West, S. 2002. The effects of incubation environment, sex and pedigree on the hatchling phenotype in a natural population of loggerhead turtles. *Evol Ecol Res.* 4: 737-748.

Rohlf, F. J. 2006a. *TPS Utility Program. Ver. 1.38*. Stony Brook, NY: Department of Ecology and Evolution, State University of New York.

Rohlf, F. J. 2006b. *TPSDig. Ver. 2.05*. Stony Brook, NY: Department of Ecology and Evolution, State University of New York.

Rohlf, F. J. y Marcus, L. F. 1993. A revolution in morphometrics. *Trends Ecol. Evol.* 8:129–132.

Rohlf, F. J., y Slice, D. 1990. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology*, 39(1), 40–59.

Rüber, L., y Adams, D. C. 2001. Evolutionary convergence of body shape and trophic morphology in cichlids from Lake Tanganyika. *J. Evol. Biol.* 14: 325–332.

Slice, D. E. 1993. Extensions, comparisons, and application of superimposition methods for morphometric analysis. Unpubl. Ph.D. diss., State Univ. of New York, Stony Brook.

Spotila, J.R., E.A. Standora, S.J. Morreale, G.J. Ruiz, and C. Puccia. 1983. Methodology for the study of temperature related phenomena affecting sea turtles eggs. U.S.F.W.S. Endangered Species Report 11.

Spotila, J. R., Standora, E. A., Morreale, S. J. y Ruiz, G. J. 1987. Temperature dependent sex determination in the green turtle (*Chelonia mydas*): effects on the sex ratio on a natural nesting beach. *Herpetologica* 43: 74-81.

Valenzuela, N., Adams, D. C., Bowden, R. M. y Gauger, A. C. 2004. Geometric Morphometric Sex Estimation for Hatchling Turtles: A Powerful Alternative for Detecting Subtle Sexual Shape Dimorphism. *Copeia*, 2004(4): 735-742.

Van der Heiden, A. M., Briseno-Duenas, R. y Rios-Olmeda, D. 1985. A simplified method for determining sex in hatchling sea turtles. *Copeia* 1985: 779–782.

Wibbels, Bull, T. J., y CREWS, D. 1991. Chronology and morphology of temperature-dependent sex determination. *Journal of Experimental Zoology* 260: 371–381.

Yntema, C.L. y Mrosovsky, N. 1982. Critical periods and pivotal temperatures for sexual differentiation in loggerhead sea turtle. *Canadian Journal of Zoology*. 60: 1012-1016.

# 13 ANEXOS

## 13.1 ANEXO I

### Código Arduino de programación de tarjeta “Esclavo”

```
#include <Wire.h>
#include <OneWire.h>
#include <DallasTemperature.h>
#include <DHT.h>

#define dir_Esclavo 0 // Este dato cambia para cada esclavo, puede ir desde 0-127.
#define nIncubadoras 2 // Determina el número de incubadoras
#define nSensores 9 // Determina el número de sensores de temperatura (Por incubadora).
#define Calentador0 12 // MOC3011 conectado al pin digital 12, calentador 0.
#define Calentador1 13 // MOC3011 conectado al pin digital 13, calentador 1.
#define DHTOPIN 8
#define DHT1PIN 9
#define DHTTYPE DHT22

DHT dht0(DHTOPIN, DHTTYPE);
DHT dht1(DHT1PIN, DHTTYPE);

float Temps[nIncubadoras][nSensores]; // Para almacenar temperaturas de las nIncubadoras
/** Se almacenan los datos para las correcciones individuales */
float pendiente0[nSensores - 1] =
{1.02083611514056,1.04512306520645,1.01351215160869,0.993248842962406,1.00278187151745,1.01994560097462,1.01769658206456,
1.00261809962238};
float pendiente1[nSensores - 1] =
{1.01338397686677,0.998561069231189,0.979332232227882,0.97420490698719,1.00376125220992,1.02602081440794,0.99808889302165
9,0.991718211373164};
float ordenada0[nSensores - 1] = {-0.408818051734862,-0.852565528274766,-
0.258407586901065,0.134217931391369,0.0828137391290653,-0.371586687408573,-0.335658258275345,-0.0823307183090982};
float ordenada1[nSensores - 1] = {-0.191269355041698,0.0396221566802133,0.371236683856033,0.503919889412742,-
0.132406522951467,-0.515801760785116,0.0421104765384612,0.130353494358602};

char s1[nSensores/3][8]; // Almacenará los bytes de los floats
char s2[(nSensores/3)*8]; // Tendrá la cadena de bytes que representan a las temperaturas de una incubadora

byte RW, i, j, k, LSB, MSB, Incubadora;

word DutyC[2]; // Datos para los temporizadores 1 y 2 (Control del PWM)

OneWire oneWire0(6); // pin6 del Arduino
OneWire oneWire1(7); // pin7 del Arduino

DallasTemperature Sensores0(&oneWire0); // Clase Sensores1 con la clase oneWire1
DallasTemperature Sensores1(&oneWire1); // Clase Sensores2 con la clase oneWire2

DeviceAddress gposSensores[nIncubadoras][nSensores - 1] = // Direcciones de los sensores de la incubadora #1
{
  { { 0x28, 0x46, 0x07, 0x34, 0x04, 0x00, 0x00, 0x50 },
    { 0x28, 0xF1, 0xF7, 0x33, 0x04, 0x00, 0x00, 0xF2 },
    { 0x28, 0x6E, 0x60, 0x11, 0x04, 0x00, 0x00, 0xF6 },
    { 0x28, 0x3F, 0xA7, 0x40, 0x04, 0x00, 0x00, 0xCB },
    { 0x28, 0xB7, 0x2F, 0x41, 0x04, 0x00, 0x00, 0xFA },
    { 0x28, 0x79, 0xD3, 0x40, 0x04, 0x00, 0x00, 0x7E },
    { 0x28, 0x13, 0x34, 0x06, 0x04, 0x00, 0x00, 0x10 },
    { 0x28, 0x65, 0x97, 0x11, 0x04, 0x00, 0x00, 0xF9 },
  },
  { { 0x28, 0xF4, 0xF9, 0x33, 0x04, 0x00, 0x00, 0xBB },
    { 0x28, 0x4E, 0xF4, 0xBF, 0x03, 0x00, 0x00, 0x2E },
    { 0x28, 0xB0, 0x77, 0x11, 0x04, 0x00, 0x00, 0x0C },
    { 0x28, 0xC1, 0x2A, 0x41, 0x04, 0x00, 0x00, 0x02 },
    { 0x28, 0x9B, 0x7A, 0x11, 0x04, 0x00, 0x00, 0xAE },
    { 0x28, 0xD4, 0xEB, 0x40, 0x04, 0x00, 0x00, 0xD2 },
    { 0x28, 0x9F, 0x66, 0x40, 0x04, 0x00, 0x00, 0x78 },
    { 0x28, 0xF9, 0x69, 0x11, 0x04, 0x00, 0x00, 0x31 },
  },
}
```

```

}
};

void setup()
{
  /** Inicializamos el protocolo I2C modo esclavo, con la dirección especificada **/
  Wire.begin(dir_Esclavo); // Activar bus I2C con dirección #?, definida en "dir_Esclavo"
  Wire.onRequest(PeticionI2C); // Registrar evento de petición por parte del maestro
  Wire.onReceive(RecepcionI2C); // Registrar evento de escritura al esclavo
  Serial.begin(9600); // Se inicia el puerto serie, con una velocidad de 19200 baudios

  /** Inicializamos los sensores conectados al bus 1-Wire **/
  Sensores0.begin();
  Sensores1.begin();
  for (i = 0; i < nSensores; i++)
    Sensores0.setResolution(gposSensores[0][i], 12); // Resolución del grupo 1, a 12 bits
  for (i = 0; i < nSensores; i++)
    Sensores1.setResolution(gposSensores[1][i], 12); // Resolución del grupo 2, a 12 bits

  /** Inicializamos el sensor DHT **/
  dht0.begin();
  dht1.begin();

  /** Se configuran los Pines de los MOC3011 como salidas y se ponen a 0 */
  pinMode(Calentador0, OUTPUT); // Pin del MOC como salida
  pinMode(Calentador1, OUTPUT);
  digitalWrite(Calentador0, LOW); // Puesta a cero del pin del MOC
  digitalWrite(Calentador1, LOW);

  /* Definición de la interrupción para la detección de cruce por cero */
  attachInterrupt(0, PWM_TRIAC, FALLING); // Interrupción para detección de los cruces por cero (Pin2)

  /** Configuración del Temporizador 1 para activación del TRIAC */
  TCCR1A = 0; // TCCR1A y TCCR1B se configuran para:
  TCCR1B = (1<<CS11); // Timer1 modo Normal, prescaler de 8 (con frecuencia XTAL=16MHz)
  TCNT1 = 51526; // El Timer desborda al llegar a 65535,
  //Partiendo de 51526 pasarán 7010 microsegundos (14mil cuentas de 0.5 us)
  TIMSK1 = (1<<TOIE1); // Se habilita la interrupción Timer1 al desbordar (0xFFFF, o 65535)

  /** Configuración del Temporizador 2 para activación del TRIAC */
  TCCR2A = 0; // TCCR2A y TCCR2B se configuran para:
  TCCR2B = (1<<CS20)|(1<<CS21)|(1<<CS22); // Timer2 modo Normal, prescaler de 1024 (con frecuencia XTAL=16MHz)
  TCNT2 = 245; // El Timer desborda al llegar a 256,
  //Partiendo de 246 pasarán 7040 microsegundos (110 cuentas de 64 us)
  TIMSK2 = (1<<TOIE2); // Se habilita la interrupción al desbordar Timer2 (0xFF, o 255)
}

void loop()
{
  Obtener_Temperaturas();
  Serial.println("");
  Serial.println("Las temperaturas de la incubadora #0 son:");
  for (i = 0; i < nSensores; i++)
    Serial.println(Temps[0][i]);

  Serial.println("Las temperaturas de la incubadora #1 son:");
  for (i = 0; i < nSensores; i++)
    Serial.println(Temps[1][i]);

  delay(1000);
}

/* ===== */
/* INICIA COMUNICACIÓN I2C */
/* ===== */
void PeticionI2C()
{
  for (i = 0; i < 3; i++) // Convierte cada float de temperatura a 8 bytes y los almacena en s1[][]
    dtostrf(Temps[Incubadora][(k*3)+i], 8, 3, s1[i]);
  for (i = 0; i < 3; i++) // De la matriz s1[], arma un vector s2[] para enviarlo
    for (j = 0; j < 8; j++)
      s2[8*i + j] = s1[i][j];
  Wire.write(s2); // Envía el vector s2[] que contiene nSensores/3 * 8 bytes
}

void RecepcionI2C(int bytesRecibidos)

```

```

{
Incubadora = Wire.read();      // ¿De qué incubadora se trata?
RW = Wire.read(); // ¿Es para modificar el DutyC o leer datos?
LSB = Wire.read(); // El byte 3 contiene la parte baja del número entero se la señal de control
MSB = Wire.read(); // El byte 4 contiene la parte alta del número entero se la señal de control

if (RW == 0)
k = LSB;

if (RW == 1)
DutyC[Incubadora] = word(MSB, LSB);
}
/* ===== */
/* TERMINA COMUNICACIÓN I2C */
/* ===== */
/* INICIA OBTENCIÓN DE TEMPERATURAS */
/* ===== */
void Obtener_Temperaturas()
{
const byte reintentos = 1; // Número de intentos de re-lectura por sensor
byte err_lect = 0; // Contador de errores de lectura

Sensores0.requestTemperatures();
for (i = 0; i < nSensores - 1; i++)
{
Temps[0][i] = Sensores0.getTempC(gposSensores[0][i]); //Lee sensores
if ((Temps[0][i] < 0) || (Temps[0][i] > 80)) // Si hay algún error en la lectura entra a este ciclo
{
while (err_lect < reintentos)
{
Temps[0][i] = Sensores0.getTempC(gposSensores[0][i]); // Toma una lectura del sensor i y lo pone en Temps[i]
if ((Temps[0][i] >= 0) && (Temps[0][i] <= 80)) // Si la lectura es correcta
err_lect = reintentos; // Se termina el ciclo
err_lect++;
}
err_lect = 0; // Reinicia el contador de errores
}
if ((Temps[0][i] < 0) || (Temps[0][i] > 80)) {
Temps[0][i] = 99.99; // Si persiste error
// Serial.println(Temps[0][i]);
}
else Temps[0][i] = Temps[0][i] * pendiente0[i] + ordenada0[i]; // Aplica el factor de corrección
}
Temps[0][nSensores - 1] = dht0.readHumidity();

Sensores1.requestTemperatures();
for (i = 0; i < nSensores - 1; i++)
{
Temps[1][i] = Sensores1.getTempC(gposSensores[1][i]); //Lee sensores
if ((Temps[1][i] < 0) || (Temps[1][i] > 80)) // Si hay algún error en la lectura entra a este ciclo
{
while (err_lect < reintentos)
{
Temps[1][i] = Sensores0.getTempC(gposSensores[1][i]); // Toma una lectura del sensor i y lo pone en Temps[i]
if ((Temps[1][i] >= 0) && (Temps[1][i] <= 80)) // Si la lectura es correcta
err_lect = reintentos; // Se termina el ciclo
err_lect++;
}
err_lect = 0; // Reinicia el contador de errores
}
if ((Temps[1][i] < 0) || (Temps[1][i] > 80)) Temps[1][i] = 99.99; // Si persiste error
else Temps[1][i] = Temps[1][i] * pendiente1[i] + ordenada1[i]; // Aplica el factor de corrección
}
Temps[1][nSensores - 1] = dht1.readHumidity();
}
/* ===== */
/* TERMINA OBTENCIÓN DE TEMPERATURAS */
/* ===== */
/* INTERRUPCIÓN CRUCES POR CERO */
/* ===== */
void PWM_TRIAC()
{
TCNT1 = 51526 + DutyC[0]; // Se actualiza el registro del Timer1 para que inicie la cuenta
TCNT2 = 145 + DutyC[1]/127; // Se actualiza el registro del Timer2 para que inicie la cuenta
}
}

```

```

}
/* ===== */
/* TERMINA INTERRUPCIÓN CRUCES POR CERO */
/* ===== */
/* ===== */
/* INTERRUPCIÓN DEL TIMER 1 */
/* ===== */
ISR(TIMER1_OVF_vect)
{
digitalWrite(Calentador0, HIGH); // Se activa el Pin del MOCO
digitalWrite(Calentador0, LOW); // Se desactiva el Pin del MOCO
}
/* ===== */
/* TERMINA INTERRUPCIÓN DEL TIMER 1 */
/* ===== */
/* ===== */
/* INTERRUPCIÓN DEL TIMER 2 */
/* ===== */
ISR(TIMER2_OVF_vect)
{
digitalWrite(Calentador1, HIGH); // Se activa el Pin del MOC1
digitalWrite(Calentador1, LOW); // Se desactiva el Pin del MOC1
}
/* ===== */
/* TERMINA INTERRUPCIÓN DEL TIMER 2 */
/* ===== */

```

## 13.2 ANEXO II

### Código Arduino para la programación de tarjeta “Maestro”

```
#include <SD.h>
#include <Wire.h>
#include <RTClib.h>
#include <stdlib.h>
#include <PID_v1.h>
#include <string.h>

#define nEsclavos 3
#define nIncub_esclavo 2
#define nIncubadoras 6
#define nSensores 9
#define ECHO_TO_SERIAL 0 // echo data to serial port

File dataFile; // logging file
RTC_DS1307 RTC; // define the Real Time Clock object

byte j;
byte dato_I2C[4] = {0,0,0,0}; // Sirve para la comunicación I2C
byte daynow;
byte daystart = 0;
byte difunix = 0;
char s1[nSensores][8]; // Almacenará los bytes de los floats
char s2[nSensores * 8]; // Tendrá la cadena de bytes que representan a todas las temperaturas de una incubadora
char fn[] = "YMDDHHMM.csv";
char s[32];
const int chipSelect = 53;
double Setpoint0, Input0, Output0, Input_prev0;
double Setpoint1, Input1, Output1, Input_prev1;
double Setpoint2, Input2, Output2, Input_prev2;
double Setpoint3, Input3, Output3, Input_prev3;
double Setpoint4, Input4, Output4, Input_prev4;
double Setpoint5, Input5, Output5, Input_prev5;
float Temps[nSensores]; // Almacena las temperaturas leídas
float currentMillis = 0;
float previousMillis = 0;
long interval = 0;
long stepTime = 0;
long stepTimeReq = 1667;
unsigned long nctime;
unsigned long unixpast;
unsigned long unixnow;
char header[] = "N,Timestamp , Hora ,Sens0,Sens1,Sens2,Sens3,Sens4,Sens5,Sens6,Sens7,Humid,PrmCh,Input,Otput,Setpt";
char d_str[100];

PID myPID0(&Input0, &Output0, &Setpoint0,1000,0.2,10, DIRECT);
PID myPID1(&Input1, &Output1, &Setpoint1,1000,0.2,10, DIRECT);
PID myPID2(&Input2, &Output2, &Setpoint2,1000,0.2,10, DIRECT);
PID myPID3(&Input3, &Output3, &Setpoint3,1000,0.2,10, DIRECT);
PID myPID4(&Input4, &Output4, &Setpoint4,1000,0.2,10, DIRECT);
PID myPID5(&Input5, &Output5, &Setpoint5,1000,0.2,10, DIRECT);

// call back for file timestamps
void dateTime(uint16_t* date, uint16_t* time)
{
  DateTime now = RTC.now();
  *date = FAT_DATE(now.year(), now.month(), now.day()); // return date using FAT_DATE macro to format fields
  *time = FAT_TIME(now.hour(), now.minute(), now.second()); // return time using FAT_TIME macro to format fields
}

void setup()
{
  Serial.begin(9600);
  Wire.begin(); // Activar bus I2C con Maestro
  if (!RTC.begin())
  {
    Serial.println("RTC failed");
    while(1);
  }
};
```

```

SdFile::dateTimeCallback(dateTime); // set date time callback function
/** following line sets the RTC to the date & time this sketch was compiled***/
//RTC.adjust(DateTime(__DATE__, __TIME__)); //ONLY TO BE USED TO SYNCH ONCE WITH PRIOR SKETCH

if (!SD.begin(chipSelect))
{
Serial.println("SD failed");
while(1);//??COMO HACER PARA EVITAR QUE SE QUEDE TRABADA!!
}

//Crear archivo para guardar los datos
make_file();

//Ajustar valores prev a temperaturas que causen output = 0
Input_prev0= 24;
Input_prev1= 26;
Input_prev2= 28;
Input_prev3= 30;
Input_prev4= 32;
Input_prev5= 34;

//Definir setpoints para las 5 incubadoras
Setpoint0 = 24;
Setpoint1 = 26;
Setpoint2 = 28;
Setpoint3 = 30;
Setpoint4 = 32;
Setpoint5 = 34;
myPID0.SetMode(AUTOMATIC); //turn the PID on
myPID1.SetMode(AUTOMATIC);
myPID2.SetMode(AUTOMATIC);
myPID3.SetMode(AUTOMATIC);
myPID4.SetMode(AUTOMATIC);
myPID5.SetMode(AUTOMATIC);
}

void loop()
{
byte m = 0;// contador del numero de incubadora
for (byte j = 0; j < nEsclavos; j++) {
for (byte k = 0; k < nIncub_esclavo; k++) {
byte ceros = 0;// contador de veces que salen ceros
Pedir_Informacion(j, k); // Las temperaturas de la incubadora requerida, queda en la variable Temps[]
for (byte i = 0; i < nSensores; i++)
{
if (Temps[i]== 0.00)
{
ceros = 1;
Serial.print("INCUBADORA ");
Serial.print(m);
Serial.println(" Se pediran de nuevo porque hubo ceros");
Pedir_Informacion(j, k);// Si llegaron ceros, pedir datos otra vez
}
}
if (ceros != 0)
{
for (byte i = 0; i < nSensores; i++)
{
if (Temps[i]== 0.00)
{
Serial.print("INCUBADORA ");
Serial.print(m);
Serial.println(" Se pediran de nuevo porque hubo ceros");
Pedir_Informacion(j, k);// Si llegaron ceros, pedir datos otra vez
}
}
}
switch (m) {
case 0:
Input0 = Eliminar_Error(k, Temps[0],Temps[1], Input_prev0); //Revisar si hay error en lectura de agua y sacar promedio
if (Input0 == 0)
{
Serial.println("PROBLEMA: INPUT0 = 0! ");
Input0 = Input_prev0;
}
}
else

```

```

{
Input_prev0 = Input0;
}
Serial.print(nextime);
Serial.print(", ");
myPID0.Compute();//Calcula valores del PID para incubadora m
Escribir_Informacion(j, k, 1, Output0);
Convert_to_Char(m, Input0, Output0, Setpoint0);
break;
case 1:
Input1 = Eliminar_Error(k, Temps[0], Temps[1], Input_prev1);//Revisar si hay error en lectura de agua y sacar promedio
if (Input1 == 0)
{
Serial.println("PROBLEMA: INPUT1 = 0! ");
Input1 = Input_prev1;
}
else
{
Input_prev1 = Input1;
}
Serial.print(nextime);
Serial.print(", ");
myPID1.Compute();//Calcula valores del PID para incubadora m
Escribir_Informacion(j, k, 1, Output1);
Convert_to_Char(m, Input1, Output1, Setpoint1);
break;
case 2:
Input2 = Eliminar_Error(k, Temps[0], Temps[1], Input_prev2);//Revisar si hay error en lectura de agua y sacar promedio
if (Input2 == 0)
{
Serial.println("PROBLEMA: INPUT2 = 0! ");
Input2 = Input_prev2;
}
else
{
Input_prev2 = Input2;
}
Serial.print(nextime);
Serial.print(", ");
myPID2.Compute();//Calcula valores del PID para incubadora m
Escribir_Informacion(j, k, 1, Output2);
Convert_to_Char(m, Input2, Output2, Setpoint2);
break;
case 3:
Input3 = Eliminar_Error(k, Temps[0], Temps[1], Input_prev3);//Revisar si hay error en lectura de agua y sacar promedio
if (Input3 == 0)
{
Serial.println("PROBLEMA: INPUT3 = 0! ");
Input3 = Input_prev3;
}
else
{
Input_prev3 = Input3;
}
Serial.print(nextime);
Serial.print(", ");
myPID3.Compute();//Calcula valores del PID para incubadora m
Escribir_Informacion(j, k, 1, Output3);
Convert_to_Char(m, Input3, Output3, Setpoint3);
break;
case 4:
Input4 = Eliminar_Error(k, Temps[0], Temps[1], Input_prev4);//Revisar si hay error en lectura de agua y sacar promedio
if (Input4 == 0)
{
Serial.println("PROBLEMA: INPUT4 = 0! ");
Input4 = Input_prev4;
}
else
{
Input_prev4 = Input4;
}
Serial.print(nextime);
Serial.print(", ");
myPID4.Compute();//Calcula valores del PID para incubadora m
Escribir_Informacion(j, k, 1, Output4);
Convert_to_Char(m, Input4, Output4, Setpoint4);

```

```

break;
case 5:
Input5 = Eliminar_Error(k, Temps[0], Temps[1], Input_prev5);//Revisar si hay error en lectura de agua y sacar promedio
if (Input5 == 0)
{
Serial.println("PROBLEMA: INPUT5 = 0! ");
Input5 = Input_prev5;
}
else
{
Input_prev5 = Input5;
}
Serial.print(nexttime);
Serial.print(", ");
myPID5.Compute();//Calcula valores del PID para incubadora m
Escribir_Informacion(j, k, 1, Output5);
Convert_to_Char(m, Input5, Output5, Setpoint5);
break;
}
Serial.println(header);
Serial.println(d_str);
OpenWriteSD(d_str); // manda datos a funcion para escritura en SD
currentMillis = millis();
interval = currentMillis - previousMillis;
stepTime = stepTimeReq - interval;
Serial.print("interval = ");
Serial.println(interval);
Serial.println("\n");
//if interval is more than stepTimeAct then continue!
if (interval < stepTimeReq) delay(stepTime);
previousMillis = millis();
m = m + 1;
}
}
}
}

```

```

void Pedir_Informacion(int nEsclavo, byte Incubadora)

```

```

{
for (j = 0; j < 3; j++)
{
Escribir_Informacion(nEsclavo, Incubadora, 0, j);
Wire.requestFrom(nEsclavo, 24);
for (byte i = 0; i < 24; i++)
s2[24*j + i] = Wire.read();
}

for (byte i = 0; i < nSensores; i++)
{
for (j = 0; j < 8; j++)
s1[i][j] = s2[8*i + j];
Temps[i] = atof(s1[i]);
// Serial.print(i);
// Serial.print(" ");
// Serial.println(Temps[i]);
if ((Temps[i] < 0) || (Temps[i] > 99.99)) {
Serial.print("Valor llegeo errado para Incubadora: ");
Serial.print(Incubadora);
Serial.print(" con un valor de ");
Serial.print(Temps[i]);
Serial.println(" Se sustituyo el valor por 99.99");
Temps[i] = 99.99;
}
}
}
}

```

```

void Escribir_Informacion(byte nEsclavo, byte Incubadora, byte RW, word PID_Salida)

```

```

{
dato_I2C[0] = Incubadora;
dato_I2C[1] = RW;
dato_I2C[2] = (PID_Salida & 0xFF);
dato_I2C[3] = ((PID_Salida >> 8) & 0xFF);
Wire.beginTransmission(nEsclavo);
for (byte i = 0; i < 4; i++)
Wire.write(dato_I2C[i]);
Wire.endTransmission();
}

```

```

double Eliminar_Error(byte inc, double Agua0, double Agua1, double avg_prev)
{
double res;
res = avg_prev;
if ((Agua0 != 99.99) && (Agua1 != 99.99)) {
res = (Agua0+Agua1)/2; // Caso correcto
}
else if ((Agua0 == 99.99) && (Agua1 == 99.99)) {
res = avg_prev;// Ambos erróneos
Serial.print("CUIDADO! ... LOS DOS SENSORES AGUA TIENEN ERROR! EN INCUBADORA # ");
Serial.println(inc);
}
else if ((Agua0 != 99.99) && (Agua1 == 99.99)) {
res = Agua0;// Agua0 es correcta
Serial.print("CUIDADO! ... EL SENSOR AGUA #1 TIENEN ERROR! EN INCUBADORA # ");
Serial.println(inc);
}
else if ((Agua0 == 99.99) && (Agua1 != 99.99)) {
res = Agua1;// Agua1 es correcta
Serial.print("CUIDADO! ... EL SENSOR AGUA #0 TIENEN ERROR!! EN INCUBADORA # ");
Serial.println(inc);
}
}
if (res <= 0)
{
Serial.print("CUIDADO, res salio <= 0!! EN INCUBADORA # ");
Serial.println(inc);
Serial.println(res);
res = avg_prev;
}
return res;
}

void Convert_to_Char(byte Incubadora, double Inp, double Outp, double Setp)
{
char buffer[15];
strcpy(d_str, "");
DateTime now = RTC.now(); //get time stamp now that the temperatures have been obtained
daynow = now.day();//para probar si hay cambio de dia
nxttime = now.unixtime();
difunix = nxttime - unixpast;
if (abs(difunix) > 10) {
Serial.print("Valor DateTime anomala. Valor Unixtime = ");
Serial.println(nxttime);
delay (100);
DateTime now = RTC.now();
daynow = now.day();
nxttime = now.unixtime();
}
if (daynow != daystart) {
make_file();
}
//nxttime = now.unixtime();
strcat(d_str, itoa(Incubadora, buffer, 10));
strcat(d_str, ",");
strcat(d_str, ltoa(nxttime, buffer, 10));
strcat(d_str, ",");
strcat(d_str, itoa(now.hour(), buffer, 10));
strcat(d_str, ":");
strcat(d_str, itoa(now.minute(), buffer, 10));
strcat(d_str, ":");
strcat(d_str, itoa(now.second(), buffer, 10));
strcat(d_str, ",");
//Convertir a char y calcular promedio de sensores en charola
double sumChar = 0;
for (byte i = 0; i < nSensores; i++)
{
strcat(d_str, dtostrf(Temps[i],4,2,s)); //dtostrf(value, width, precision, output) dtostrf(FLOAT,WIDTH,PRECISION,BUFFER)
strcat(d_str, ",");
if ((i > 1) && (i < 7))
{
sumChar += Temps[i];
}
}
double avgChar = sumChar/5;
strcat(d_str, dtostrf(avgChar,4,2,s)); //dtostrf(value, width, precision, output) dtostrf(FLOAT,WIDTH,PRECISION,BUFFER)
}

```

```

strcat(d_str, ",");
strcat(d_str, dtostrf(Inp,4,2,s));
strcat(d_str, ",");
strcat(d_str, dtostrf(Outp,5,0,s));
strcat(d_str, ",");
strcat(d_str, dtostrf(Setp,4,2,s));

unixpast = nctime;
}

void OpenWriteSD(char* texto)
{ // receives file name and data string to write on SD***
dataFile = SD.open(fn, FILE_WRITE);
if (dataFile) {
dataFile.println(texto);
dataFile.close();
}
else {
Serial.print("error opening "); //?? EVITAR QUE SE QUEDE TRABADA??
Serial.println(fn);
}
}

void make_file()
{ // generates new file at start of new day
DateTime now = RTC.now();
String file_name = String(now.year()-2000, HEX);
file_name += String(now.month(), HEX);
file_name.toUpperCase();
daystart = now.day();
Serial.println(daystart);
if (now.day() < 10) { file_name = String(file_name + '0' + String(now.day(), DEC)); }
else { file_name = String(file_name +String(now.day(), DEC)); }
if (now.hour() < 10) { file_name = String(file_name + '0' + String(now.hour(), DEC)); }
else { file_name = String(file_name +String(now.hour(), DEC)); }
if (now.minute() < 10) { file_name = String(file_name + '0' + String(now.minute(), DEC)); }
else { file_name = String(file_name +String(now.minute(), DEC)); }

file_name = String(file_name + ".csv");
Serial.println(file_name);

int i;
for (i=0;i<=file_name.length();i++)
{
fn[i] = file_name.charAt(i);
}
Serial.print("SE ABRE ARCHIVO CON File Name: ");
Serial.println(fn);
OpenWriteSD(header);
}

```