

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

“PROPORCIÓN SEXUAL, ESTADO NUTRICIONAL Y ORIGEN  
NATAL DE LAS TORTUGAS MARINAS *CHELONIA MYDAS* y  
*ERETMOCHELYS IMBRICATA* EN UN SITIO DE ALIMENTACIÓN EN  
EL PACÍFICO NORTE DE COSTA RICA”

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de  
Estudios de Posgrado en Biología para optar al grado y título de  
Maestría Académica en Biología

YENNI NATALI CASANOVA SALAZAR

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2022

## **DEDICATORIA**

A mi niña interior y mujer adulta que soñaban con esto,

A una de mis más grandes fortalezas, la Dra. Jessica Esquivel,

Y a uno de mis más grandes soportes y ejemplos de vida el Ing. Guadalupe  
Cardozo.

No solo me acompañaron en cada una de las etapas académicas de este posgrado, sino que me sostuvieron en los momentos más oscuros y confusos.

Toda mi gratitud hacía ustedes.

## AGRADECIMIENTOS

Deseo dejar constancia del agradecimiento a las siguientes personas e instituciones que de alguna forma estuvieron implicadas en la realización de este proyecto:

A cada uno de los miembros de mi familia, que directa o indirectamente contribuyeron a que esto pudiera realizarse, pero sobre todo a mi madre, la señora Verónica Salazar que siempre me ha brindado los mejores consejos para no rendirme ante las adversidades.

A la Dra. Cristina Pascual Jiménez deseo expresar mi más profundo agradecimiento por cada uno de sus sabios consejos académicos y también personales. Ha sido pieza clave para la conclusión de este proyecto. Por científicos como usted, con esa calidad humana que la caracterizan, los alumnos continúan creyendo en la ciencia. Mi admiración y respeto hacía usted.

Un agradecimiento especial a mi Tutor el Dr. Mahood Sasa Marín, por todo el apoyo brindado, sus valiosas aportaciones a la mejoría de este trabajo y compromiso para la conclusión de la misma.

A mi asesor *M.Sc.* Fernando Flores por toda su ayuda académica para la realización de esta tesis, pero sobre todo por esas palabras de motivación y consejos puntuales cada vez que lo necesite. Usted es un profesional muy valioso en la ciencia.

A la *M.Sc.* Maike Heidemeyer por darme la oportunidad de conocer este mundo fantástico de las tortugas marinas.

Expreso mi gratitud a la ONG Equipo Tora Carey, pues sin su experiencia y disponibilidad no hubiese sido posible la obtención de las muestras.

Al *PhD* Mario Espinoza Mendiola por hacer factible la obtención de muestras en cada una de sus giras de campo a Bahía Matapalito.

Un especial agradecimiento al *Dr. rer. nat.* Federico Albertazzi por facilitar mi trabajo en el laboratorio de bioquímica del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) que fue eje central para el análisis de esta investigación.

A la M.Sc. Karla Escalante por su ayuda incondicional, guía y consejos en el análisis de los datos genéticos.

Un agradecimiento especial para dos colegas que se volvieron amigas: la Ing. Rossy Guillen y la Ing. Daniela Marín, gracias por el soporte y ayuda durante esta etapa. Son un ejemplo para mí.

Agradezco especialmente a Hannia Ramírez, pues no solo fue una ayuda eficiente para los procedimientos administrativos del posgrado, si no que tuvo la iniciativa de hacernos menos pesadas las adversidades académicas con cada una de las reuniones organizadas para nosotros, los alumnos extranjeros.

Al laboratorio de Química del Centro de Investigación en Ciencias del Mar y Limnología (CIMAR) liderado por *PhD* Eddie Gómez y Br. Juan Guillermo Sagot por las facilidades al procesamiento de muestras de testosterona.

A *MSc.* Laura Garita y Lic. Sofía Carvajal del laboratorio de Fitopatógenos del CIBCM por su asesoría y disponibilidad para uso de equipo.

Esta tesis fue financiada con fondos del proyecto: “Pry01-1340-2019- Investigación integral de las tortugas marinas en sitios de alimentación y reproducción: ¿Qué tipo de manejo se requiere para conservar sus poblaciones a la vista del calentamiento global?” siendo la investigadora responsable la *MSc.* Maike Heidemeyer Thielemann.

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Biología”



---

M. Sc. Federico Bolaños Vives  
**Representante de la Decana del Sistema de Estudios de Posgrado**



---

PhD. Mahmood Sasa Marín  
**Profesor Consejero**



---

PhD. Cristina Pascual Jiménez  
**Lectora**



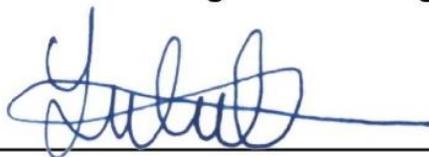
---

M.Sc. Fernando Flores Mora  
**Lector**



---

M. Sc. Gerardo Chaves Cordero  
**Representante del Director del Programa de Posgrado en Biología**



---

Yenni Natali Casanova Salazar  
**Sustentante**

## Índice general

Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos .....	iii
Hoja de aprobación.....	iv
Resumen general .....	viii
Abstract .....	ix
Índice de tablas .....	x
Lista de abreviaturas .....	xiii
<b>CAPÍTULO I.</b> Proporción sexual de las tortugas carey juveniles, <i>eretmochelys imbricata</i> , en bahía matapalito en el pacífico norte de costa rica.....	1
<b>Resumen</b> .....	1
<b>Introducción</b> .....	2
<b>Materiales y metodos</b> .....	6
<b>Resultados</b> .....	11
<b>Discusión</b> .....	14
<b>Conclusiones y recomendaciones</b> .....	20
<b>Bibliografía</b> .....	22
<b>CAPÍTULO II.</b> Proporción sexual de las tortugas verdes juveniles ( <i>chelonia mydas</i> ) de bahía matapalito en el pacífico norte de costa rica .....	28
<b>Resumen</b> .....	28
<b>Introducción</b> .....	29
<b>Materiales y métodos</b> .....	35
<b>Resultados</b> .....	39
<b>Discusión</b> .....	46
<b>Conclusiones y recomendaciones</b> .....	56
<b>Bibliografía</b> .....	58
<b>CAPÍTULO III.</b> Origen natal de las tortugas <i>chelonia mydas</i> y <i>eretmochelys imbricata</i> (testudines:cheloniidae) en una zona de forrajeo en el pacífico norte de costa rica”.....	67
<b>Resumen</b> .....	67
<b>Introducción</b> .....	68
<b>Materiales y metodos</b> .....	71
<b>Resultados</b> .....	75
<b>Discusión</b> .....	81

<b>Conclusiones y recomendaciones</b> .....	86
<b>Bibliografía</b> .....	88
<b>Anexo I</b> .....	95
<b>Anexo II</b> .....	105

## RESUMEN GENERAL

Todas las especies de tortugas marinas suelen pasar un importante periodo de sus vidas concentradas en distintas áreas de alimentación, sitios donde distintos grupos etarios mantienen una convivencia simpátrica para alimentarse y crecer. Bahía Matapalito (BM), en el Pacífico Norte de Costa Rica, recientemente fue identificada como sitio de forrajeo de *Chelonia mydas* y *Erethmochelys imbricata*, por lo tanto, en este estudio examinamos, la proporción de sexo, estado nutricional y los orígenes natales de ambas especies presentes en la zona. Para conocer la proporción sexual se recurrió al análisis de la hormona testosterona (T) por medio de una ELISA, la cual permitió conocer la concentración de T para cada individuo y determinar el sexo en ambas especies de tortugas marinas. La proporción sexual de esta población inmadura de carey mostró un sesgo inclinado hacia los machos, 1:45:1 (M:H), lo cual contrarresta la mayoría de los reportes previos, en donde en su mayoría se expone la feminización de estos reptiles. Mientras que en los juveniles de *C. mydas* la proporción de sexos fue de 3.15:1 (H:M), mostrando un sesgo inclinado hacia las hembras, tal como se ha reportado en la mayoría de las áreas de forrajeo. Respecto al índice de condición corporal, reveló que todos los juveniles de ambas especies se encontraban en un óptimo estado nutricional ( $> 1.20$ ), estimando indirectamente que los inmaduros cuentan con las reservas energéticas para hacer frente a las demandas de un crecimiento oportuno. A través del análisis de secuencias de la región control de ADN mitocondrial (776 bp) exhibimos el origen natal. Obteniendo que la mayoría de la población de *C. mydas* de BM tienen su origen natal en el Océano Pacífico Oriental (OPO, 77.5%), pero también estaría conformado por individuos que realizan una migración transpacífica (22.5%) provenientes de colonias del Pacífico central y occidental. En contraste con los individuos de *E. imbricata* que mostraron tener su origen natal en el Pacífico Oriental, exhibiendo así, un claro patrón de filopatría natal de forrajeo. Estos resultados exponen la importancia de Bahía Matapalito como sitio de alimentación, al hospedar agregaciones de tortugas marinas con un importante sesgo hacia ambos sexos, pero también con múltiples orígenes natales y su conectividad con las diferentes colonias dentro y fuera del Pacífico Oriental.

## ABSTRACT

All species of sea turtles usually spend an important period of their lives concentrated in different feeding areas, places where different age groups maintain a sympatric coexistence to feed and grow. Bahía Matapalito (BM), in the North Pacific of Costa Rica, was recently identified as a foraging ground for *Chelonia mydas* and *Erethmochelys imbricata*, therefore, in this study we examined the sex ratio, nutritional status and natal homing of both species present in this area. To know the sex ratio, testosterone hormone (T) analysis was used by means of an ELISA, which allowed knowing the concentration of T for each turtle and determining the sex in both species of sea turtles. The sex ratio of this immature population of hawksbills showed a bias towards males, 1:45:1 (M: F), which counteracts most previous reports, which mostly exposed the feminization of these reptiles. While in immature green turtles the sex ratio was 3.15:1 (M:M), showing a bias towards females, as has been reported in most foraging areas. Regarding the body condition index, it reveals that all the immatures of both species were in an optimal nutritional state ( $> 1.20$ ), indirectly estimating that they have the energy reserves to face the demands of opportune growth. Through sequence analysis of the control region of mitochondrial DNA (776 bp) we exhibited the natal homing. Obtaining that the majority of the population of *C. mydas* of BM has its native origin in the Eastern Pacific Ocean (EPO, 77.5%), but it would also be made up of individuals that make a transpacific migration (22.5%) from colonies of the central Pacific and western. In contrast to *E. imbricata* that were shown to have their natal origins in the Eastern Pacific, thus exhibiting a clear pattern of natal foraging philopatry. These results expose the importance of Bahía Matapalito as a feeding site, hosting sea turtle aggregations with an important bias towards sexes, but also with both multiple natal origins and their connectivity with the different colonies inside and outside the Eastern Pacific.

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Promedio $\pm$ desviación estándar y rangos de concentraciones (pg/ml) de muestras de plasma obtenidas de diferentes estados de madurez entre machos y hembras de la tortuga Carey que se encontraban forrajeando Bahía Matapalito en el Pacífico Norte de Costa Rica.....	95
<b>Tabla 2.</b> Media $\pm$ SD y rango del Índice de condición corporal de tortugas carey del Pacífico Norte de Costa Rica en diferentes grupos de edad.....	13
<b>Tabla 3.</b> Estudios previos sobre proporción sexual en juveniles de carey ( <i>E. imbricata</i> ) y los resultados obtenidos en este estudio.....	95
<b>Tabla 4.</b> Concentración de testosterona, testosterona con transformación logarítmica y largo recto del caparazón (SCL) de juveniles y adultos de <i>C. mydas</i> del estudio de Allen et al. 2015. ....	96
<b>Tabla 5.</b> Media $\pm$ SD e intervalos del Índice de condición corporal (ICC) de tortugas verdes del Pacífico Norte de Costa Rica en diferentes grupos de edad. ....	41
<b>Tabla 6.</b> Promedio $\pm$ desviación estándar e intervalos de concentraciones (pg/mL) de muestras de plasma obtenidas de diferentes estados de madurez entre machos y hembras de la tortuga verde que se encontraban forrajeando BM en el Pacífico Norte de Costa Rica. El estado de madurez ha sido clasificado de acuerdo al tamaño de largo curvo del caparazón (CCL). ....	98
<b>Tabla 7.</b> Coeficientes de regresión logística binaria del ajuste de modelo de juveniles y adultos de <i>C. mydas</i> calculado en R. Todos los individuos utilizados en el ajuste son de sexo conocido. ....	45
<b>Tabla 8.</b> Proporción sexual de diferentes sitios de alimentación de <i>C. mydas</i> , incluyendo Bahía Matapalito (Este estudio). ....	52
<b>Tabla 9.</b> Frecuencias de los haplotipos ADNmit de <i>C. mydas</i> encontrados en los individuos que forrajeaban en Bahía Matapalito, así como de los reportados en colonias de anidación establecidas en el del Pacífico Oriental, Central y Sur usados como “stocks” en el análisis de poblaciones mixtas. Estos últimos han sido adaptados de Dutton et al. 2014 & Heidemeyer, 2015.....	99
<b>Tabla 10.</b> Frecuencias de los haplotipos de ADNmit de <i>E. imbricata</i> encontrados en los individuos que forrajeaban en Bahía Matapalito, así como de los reportados en colonias de anidación establecidas en el del Pacífico Oriental usados como “stocks” en el análisis de poblaciones mixtas. Estos últimos han sido adaptados de Gaos et al. 2016. ....	100
<b>Tabla 11.</b> Estimación de la contribución de las colonias “stock” calculadas mediante el análisis de poblaciones mixtas (MSA) de la tortuga verde <i>C. mydas</i> para el sitio de alimentación de Bahía Matapalito. ....	100
<b>Tabla 12.</b> Estimación de la contribución de las colonias “stock” calculadas mediante el análisis de poblaciones mixtas (MSA) de la tortuga verde <i>E. imbricata</i> para el sitio de alimentación de Bahía Matapalito. ....	101

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Bahía Matapalito (BM) 10°56'06" N, 85°47'42" W (estrella roja), zona de forrajeo de tortugas marinas en Pacífico Norte de Costa Rica..... 8
- Figura 2.** Concentración de testosterona log (pg/mL) y testosterona (pg/ml) del plasma de tortugas de carey, *E. imbricata*, capturadas en Bahía Matapalito en el Pacífico Norte de Costa Rica. .... 12
- Figura 3.** Concentración de testosterona (pg/mL) y testosterona log (pg/ml) del plasma de juveniles de tortugas de carey capturadas en Bahía Matapalito en el Pacífico Norte de Costa Rica. .... 102
- Figura 4.** Concentraciones de testosterona log y testosterona (pg/mL) de juveniles de tortugas verdes (*C. mydas*) que se encontraban forrajeando en Bahía Matapalito en el Pacífico Norte de Costa Rica. El estado de madurez ha sido clasificado de acuerdo al tamaño de largo curvo del caparazón (LCC)..... 42
- Figura 5.** Concentraciones de testosterona (pg/mL) de muestras de plasma obtenidas en machos y hembras de tortugas verdes (*C. mydas*) de diferentes grupos de edad que se encontraban forrajeando en BM en el Pacífico Norte de Costa Rica. El estado de madurez ha sido clasificado de acuerdo al tamaño de largo curvo del caparazón (LCC)..... 43
- Figura 6.** Distribución de los datos de entrenamiento para el modelo de regresión logística binaria para la predicción del sexo de tortugas verdes juveniles de BM. La población para entrenamiento está conformada únicamente por individuos de sexo conocido, en los cuales hay 69 juveniles y 44 adultos de *C. mydas*. .... 102
- Figura 7.** Curva ROC de la regresión logística binaria de muestras de concentración de testosterona de *C. mydas*. .... 44
- Figura 8.** Frecuencia de los haplotipos de *C. mydas* presentes en las distintas colonias "stocks" (zona de anidación) de la región del Pacífico Oriental, Central y Sur y los que fueron identificados en los individuos que forrajeaban Bahía Matapalito. BM=Bahía Matapalito; PF=Polinesia Francesa; AS=American Samoa; IM=Islas Marshall; GA.LS= Galápagos, Las Salinas; GA.LB=Galápagos, Las Bacha; CR.PC=Costa Rica, Playa Colorada; CR.ISJ= Costa Rica, Isla San José; CR.NJ= Costa Rica, Nombre de Jesús; MX.CO: México, Colala; IR.IS= Islas Revillagigedo, Isla Socorro; IR.IC=Islas Revillagigedo, Isla Clarion; NEH.LI= Noroeste de Hawaii, Laysan Island; NEH.FFS=Noroeste de Hawaii, French Frigate Shoals. .... 103
- Figura 9.** Frecuencia de los haplotipos de *E. imbricata* presentes en las distintas colonias "stocks" (zona de anidación) de la región del Pacífico Oriental y los que fueron identificados en los individuos que forrajeaban Bahía Matapalito. BM=Bahía Matapalito; EC.ISCG=Isla San Cristóbal (Galápagos); EC.M=Machalilla; PA.PA=Panamá, Península Azuero; CR.PO= Costa Rica, Península de Osa;

NI.SR=Nicaragua, Southern Rivas; NI.A=Nicaragua, Aserradores; NI.EPR=Nicaragua, Estero Padre Ramos; ES.PA=El Salvador, Punta Amapola; ES.B=El Salvador, Bahía de Jiquilisco; ES.LC=El Salvador, Los Cobanos; MX.CC=México, Costa Careyes. .... 104

**Figura 10.** Contribución obtenida del análisis de poblaciones mixtas para *C. mydas* en Bahía Matapalito. .... 77

**Figura 11.** Contribución obtenida del análisis de poblaciones mixtas para *E. imbricata* en Bahía Matapalito..... 80

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ADNmit:** ADN mitocondrial

**APM:** Análisis de poblaciones mixtas

**BM:** Bahía Matapalito

**BSA:** Albúmina de suero bovino

**CITES:** Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres

**ELISA de T:** Técnica de inmunoensayo de testosterona

**ELISA:** Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

**ICC:** Índice de condición corporal

**IPCC:** Panel Intergubernamental del Cambio Climático

**LCC:** Longitud curva del caparazón

**LiCl:** Cloruro de litio

**LRC:** Largo recto del caparazón

**nGBR:** Gran Barrera de Coral del norte

**OPO:** Océano Pacífico oriental

**PBS:** Solución salina tamponada con fosfato

**PSO:** Proporción sexual operativa

**RIA:** Radioinmunoensayo

**SINAC:** Sistema Nacional de Áreas de Conservación

**T:** Testosterona

**TMA:** Tamaño medio de anidación

**TP:** Temperatura pivote

**TSD:** Determinación del sexo dependiente de la temperatura

**UICN:** Unión Internacional para la conservación



UNIVERSIDAD DE  
COSTA RICA

SEP Sistema de  
Estudios de Posgrado

**Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.**

Yo, Yenni Natali Casanova Salazar, con cédula de identidad 148400473210, en mi condición de autor del TFG titulado "PROPORCIÓN SEXUAL, ESTADO NUTRICIONAL Y ORIGEN NATAL DE LAS TORTUGAS MARINAS CHELONIA MYDAS y ERETMOCHELYS IMBRICATA EN UN SITIO DE ALIMENTACIÓN EN EL PACÍFICO NORTE DE COSTA RICA"

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI  NO \*

\*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: \_\_\_\_\_ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

**FIRMA ESTUDIANTE**

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

## **CAPÍTULO I.** Proporción sexual de las tortugas Carey juveniles, *Eretmochelys imbricata*, en Bahía Matapalito en el Pacífico Norte de Costa Rica

### **RESUMEN**

La determinación del sexo de todas las especies de tortugas marinas es dependiente de la temperatura de incubación del nido, el cual se define en el segundo tercio de la incubación. En todas las tortugas marinas la estimación de la proporción sexual ha resaltado por la feminización de las poblaciones actuales, por lo que es necesario conocer la proporción de sexos de los individuos en cada zona de alimentación de la región para fortalecer estrategias de conservación dirigidas hacia estas especies. En este estudio reportamos por primera vez la proporción de sexos de los juveniles de la tortuga *Eretmochelys imbricata* en una zona de alimentación, en el Océano Pacífico Norte de Costa Rica, Bahía Matapalito (BM). En total se encontraron 33 tortugas carey: 31 juveniles de  $41.98 \pm 12.05$  cm de largo recto de caparazón (LRC) y un índice de condición corporal (ICC) de  $1.13 \pm 0.21$ , y además de 2 adultos de tortuga carey, un macho y una hembra. A través de la medición de la concentración de testosterona (T) mediante una técnica de inmunoensayo (ELISA) fue clasificado el sexo de cada individuo inmaduro de *E. imbricata*, dando como resultado 11 hembras y 16 machos (16-239 pg/mL y 878.3-27236.1 pg/mL, respectivamente) y 4 individuos juveniles sin poder clasificar (352.5-553.3 pg/mL). La proporción sexual de esta población juvenil de tortugas carey mostró un sesgo inclinado hacia los machos, 1:45:1 (M:H), lo cual contrarresta la mayoría de los reportes previos, en donde en su mayoría se expone la feminización tanto en sitios de forrajeo como en zonas de anidación.

### **Palabras clave**

Tortuga de Carey, Reptiles, Zonas de forrajeo, Testosterona, ELISA, Proporción sexual, Costa Rica.

## INTRODUCCIÓN

La población de tortugas carey, *Eretmochelys imbricata*, se encuentra distribuida en el Océano Pacífico Oriental (OPO) desde México hasta Ecuador y son las más amenazadas en todo su rango de distribución a nivel mundial, se estiman menos de 600 hembras anidadoras en toda la región del OPO (Gaos et al. 2017b). Se considera que las tortugas carey del OPO anidan principalmente en Nicaragua y El Salvador (81% de los nidos registrados en la región), seguidos de Costa Rica y Ecuador (Gaos et al. 2017b). No obstante, en México, Costa Rica, El Salvador y Panamá, se han identificado zonas de forrajeo para la especie, lo que sugiere su importancia potencial como área de desarrollo y alimentación de juveniles y adultos (Seminoff et al. 2003; Chacón-Chaverri et al. 2014; Gaos et al. 2010, 2017b; Heidemeyer et al. 2014; Liles et al. 2017; Llamas et al. 2017; Méndez-Salgado et al. 2020).

La tortuga *E. imbricata* está considerada en peligro crítico por la Unión Internacional para la conservación (UICN, 2021) y está incluida en el Apéndice I de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES, 2021). Se considera que alrededor de nueve millones de tortugas carey han muerto en los últimos 150 años para satisfacer el comercio de artículos de lujos a base de su caparazón (Miller et al. 2019). Además de las amenazas como la mortalidad por captura incidental, el tráfico ilegal de huevos, la degradación de los hábitats de anidación por el desarrollo costero y la depredación de huevos por especies invasoras (Lam et al. 2011; Mortimer & Donnelly, 2008), una de las más alarmantes para todas las especies de tortugas marinas es el calentamiento global. Para el año 2100 se pronostica que la temperatura media global experimente un aumento de 2.6 °C (IPCC, 2014), amenazando las playas de anidamiento de un incremento en la temperatura de la arena ocasionando en las nidadas de tortugas marinas un posible incremento en la mortalidad de los huevos incubados y feminización de los neonatos, ya que, a mayor temperatura, más hembras son producidas (Morreale et al. 1982; Spotila et al. 1987).

Es claro que uno de los patrones exhibidos por las tortugas marinas, sobre todo en juveniles o adultos, es su congregación en los sitios de alimentación o forrajeo, que en algunas ocasiones puede ser por períodos muy prolongados (Limpus et al. 1994). Por lo que, un parámetro métrico como el índice de condición corporal (ICC), medida derivada de la relación existente entre el peso y el largo recto del caparazón, significaría una herramienta útil que permitiría conocer de manera indirecta el estado nutricional y de salud de estos reptiles en vida libre, así como evaluar la disponibilidad del alimento en el sitio de agregación (Bjorndal et al. 2000; Norton & Wyneken, 2015). Además, el ICC nos permite conocer de manera indirecta el éxito reproductivo, la supervivencia y por ende la dinámica poblacional de los organismos (Jones et al. 1999; Stevenson y Woods, 2006; Velez-Zuazo et al. 2014). Según la interpretación del estado físico de las tortugas marinas mediante el ICC, son los individuos que están  $>1$ , los que se encontrarían en una “óptima” condición nutricional, lo cual haría más probable que cada uno de los individuos tenga los requerimientos nutricionales que el desarrollo y crecimiento demandan (Norton & Wyneken, 2015; Flint et al. 2009).

En todas las especies de tortugas marinas el sexo es dependiente de la temperatura de incubación del nido (Wibbels, 2003). La temperatura a la cual cada embrión tiene igual probabilidad de diferenciarse en macho o hembra es conocida como temperatura pivote (TP) y el aumento o la disminución de la temperatura en relación con la TP desplaza la proporción sexual hacia un sexo u otro (Mrosovsky & Yntema, 1980). En las tortugas marinas, la proporción de sexos está sesgada hacia los machos a temperaturas por debajo de la TP y hacia las hembras a temperaturas por encima de la TP (Salame Méndez, 1998). Dado que la TP para todas las tortugas marinas está entre 28 y 30 °C (Hawkes et al. 2009), el aumento de temperatura debido al calentamiento global del planeta podría sesgar la proporción de sexos.

Las tortugas marinas juveniles carecen de dimorfismos sexuales visibles, estos se observan hasta llegar a su madurez sexual entre 20-50 años de edad (Avens & Snover, 2013), morfológicamente los machos adultos tienen colas largas y musculosas en comparación con las hembras (Wibbels, 1999). Entre los métodos

más frecuentes para la determinación de sexo de las tortugas inmaduras está la laparoscopia (Wood et al. 1983), la cual se usa para observar el estadio de desarrollo gonadal, requiere capacitación técnica y es sumamente invasiva. El examen histológico de las gónadas de tortugas varadas vivas o muertas (Maffucci et al. 2013), lo cual requiere el sacrificio del animal para obtener la muestra gonadal. Por otro lado, está el análisis hormonal de la concentración de testosterona (T) en el plasma sanguíneo (Owens et al. 1978) que se ha medido típicamente mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA, Owens, 1997). Recientemente, Allen et al. (2015) han evaluado una técnica de inmunoensayo para medir la concentración de testosterona en el plasma de las tortugas verdes juveniles (ELISA de T), corroboraron el sexo de cada tortuga mediante laparoscopia y establecieron los intervalos de concentración de esta hormona para cada sexo. A su vez, los mismos autores realizaron la comparación entre ambas metodologías, RIA y ELISA de T, encontrando una correspondencia del 97% entre las dos técnicas, por lo tanto, destacan la alta confiabilidad de la ELISA de T para la determinación del sexo de *C. mydas* y por ende la proporción sexual.

Se han realizado varios estudios evaluando la proporción de sexos en juveniles de diferentes poblaciones de la tortuga *E. imbricata* (Limpus, 1992; Leon & Diez, 1999; Diez & Van Dam, 2003; Geis et al. 2003;) y con excepción del estudio realizado en la población de tortugas carey de Puerto Rico (Diez & Van Dam, 2003) todas mostraron un sesgo inclinado hacia las hembras. Se desconocen aún las razones de la tendencia a la feminización de estas poblaciones, pero una de las hipótesis más aceptadas es que el incremento de la temperatura en las playas ocasionado por el calentamiento global está favoreciendo el nacimiento de más tortugas hembra que machos. Según los reportes de algunos estudios respecto al monitoreo de temperaturas en los nidos de las tortugas carey, las temperaturas inferiores a 28.4 °C impulsarían el nacimiento de machos, mientras que las temperaturas entre 28,9 y 29,8 °C producirían ambos sexos, y las temperaturas que sólo producirían hembras serían de 30,4 °C y superiores (Loop et al. 1995; Godfrey et al. 1999; Dobbs et al. 2010).

Comprender las variaciones de la proporción de sexos es clave para entender la dinámica de las poblaciones de tortugas marinas, especialmente en un mundo amenazado por el cambio climático. Sin embargo, determinar el sexo de tortugas marinas inmaduras es logísticamente difícil, es por esta razón que la mayor parte de la información disponible sobre la proporción de sexos se ha centrado en métodos indirectos como la medición de la temperatura de la arena en el nido en las zonas de anidación (Godfrey et al. 1996; Laloë et al. 2016, 2020). Hasta ahora las proporciones de sexos en los sitios de anidación, determinadas mediante temperatura, suelen estar sesgadas en su mayoría por las hembras, especialmente en las playas más cálidas donde las hembras pueden representar más del 90% de los neonatos (Godley et al. 2002 & Hays et al. 2014). Las proporciones de sexos en las zonas de alimentación son más difíciles de acceder, pero también pueden proporcionar información importante sobre la dinámica de la población de las tortugas marinas de diferentes grupos de edad, lo que permite conocer las proporciones de sexo en un aspecto temporal más amplio (Casale et al. 2016 & Maffucci et al. 2013). Dentro de la región del Pacífico Oriental se han identificado cerca de 50 áreas de alimentación de tortuga carey con base en avistamientos en el mar, pero la información sobre los patrones de movimiento individuales, la persistencia dentro de estas áreas y proporción de sexos es limitada (Carrión-Cortez et al., 2013; Chacón-Chaverri et al., 2015; Gaos et al., 2012a, 2018a; Llamas et al., 2017).

Como ocurre con la mayoría de las especies de tortugas marinas, las estrategias de conservación de la tortuga carey se han centrado principalmente en la preservación de los sitios de anidación. Sin embargo, está bien establecido que la supervivencia en las etapas de la vida juvenil también es de gran importancia para la persistencia de la población, y las tortugas inmaduras son vulnerables a una serie de amenazas en el mar (Crouse et al., 1987; Crouse, 1999). El conocimiento sobre las poblaciones de tortugas marinas en las zonas de forrajeo es un elemento clave para desarrollar estrategias de conservación efectivas, comprender tasas de reclutamiento y tendencias de la población. Esto con el propósito de medir la eficacia de los esfuerzos de conservación en las playas de anidación, así como para una

mejor orientación en las futuras decisiones en temas referente a su conservación. Teniendo como objetivo poder contribuir con la información respecto a los juveniles de carey en los sitios de alimentación, en este estudio se pretende dar a conocer la proporción de sexos de los juveniles de la tortuga carey en un sitio de alimentación del OPO ubicado en el Pacífico Norte de Costa Rica, Bahía Matapalito. En donde se determina el sexo de cada individuo de *E. Imbricata* a través de la concentración de testosterona obtenida mediante una técnica de inmunoensayo (ELISA de T), pero también se evaluó el estado nutricional de estos individuos mediante el índice de condición corporal (ICC) como medida para conocer indirectamente el estado de salud de estos individuos.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Sitio de estudio y muestreo.**

En este estudio se realizaron múltiples giras de campo de manera irregular entre marzo del 2018 y julio del 2021, durante el año 2020 no fue posible realizar las giras planeadas debido a las restricciones provocadas por la pandemia del SARS-CoV-2. Estas giras de campo permitieron la recopilación de la información morfométrica de cada individuo de *E. imbricata*, así como la toma de sangre y tejido en la aleta para sus respectivos análisis en laboratorio. Todos los juveniles de tortugas carey, así como los adultos capturados en agua son provenientes de Bahía Matapalito (BM), ubicado en el Pacífico Norte de Costa Rica. BM (10°56'06" N, 85°47'42" W) está ubicado al este de la entrada a Bahía Santa Elena, que consiste en una pequeña entrada de menos de un kilómetro de diámetro (Figura 1). BM posee el fondo arenoso con parches de coral dispersos hacia el este, hacia el oeste el fondo alberga una gran comunidad de arrecifes de coral que está parcialmente expuesta durante la marea baja y que se extiende hasta la vecina Bahía de Santa Elena.

Capturamos las tortugas carey a mano durante inmersiones de buceo en zonas someras (5-10 m de profundidad) a lo largo de BM, se usaron redes de

enmalle y fueron colocadas en el agua y monitoreadas durante todo el muestreo en campo. Las tortugas fueron trabajadas a bordo de la embarcación para la toma de medidas y muestras y de no contener etiquetas fueron marcadas con tags metálicos, aplicados en la segunda escala de cada aleta delantera. Una vez capturadas usamos la medida de la longitud curva del caparazón (LCC) para estimar el estado de madurez. Antes de realizar las mediciones morfométricas, extrajimos muestras de sangre del seno cervical (volumen máximo  $\leq 3$  ml/kg) colocando las tortugas en posición esternal con la cabeza dirigida hacia abajo para facilitar la extracción de sangre, usamos agujas de 1.5 pulgadas calibre 21, desinfectamos el sitio de punción con alcohol al 70%. Depositamos la sangre obtenida en tubos de heparina de litio de 4 ml (Vacuette®). Al final del trabajo de campo, se obtuvo el plasma de cada individuo, centrifugamos a 3000 rpm, durante 10 min. El plasma fue separado en alícuotas de 500  $\mu$ l en crioviales (Corning Inc.) y almacenado en un tanque con nitrógeno líquido mientras se trasladaba al Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, en donde se mantuvieron resguardados a  $-80$  °C hasta la realización del ensayo. Los permisos de este estudio han sido otorgados por Sistema Nacional de Áreas de Conservación (SINAC) R-SINAC-ACG-PI-042-2019 y la Comisión de Biodiversidad No. 206-2019.

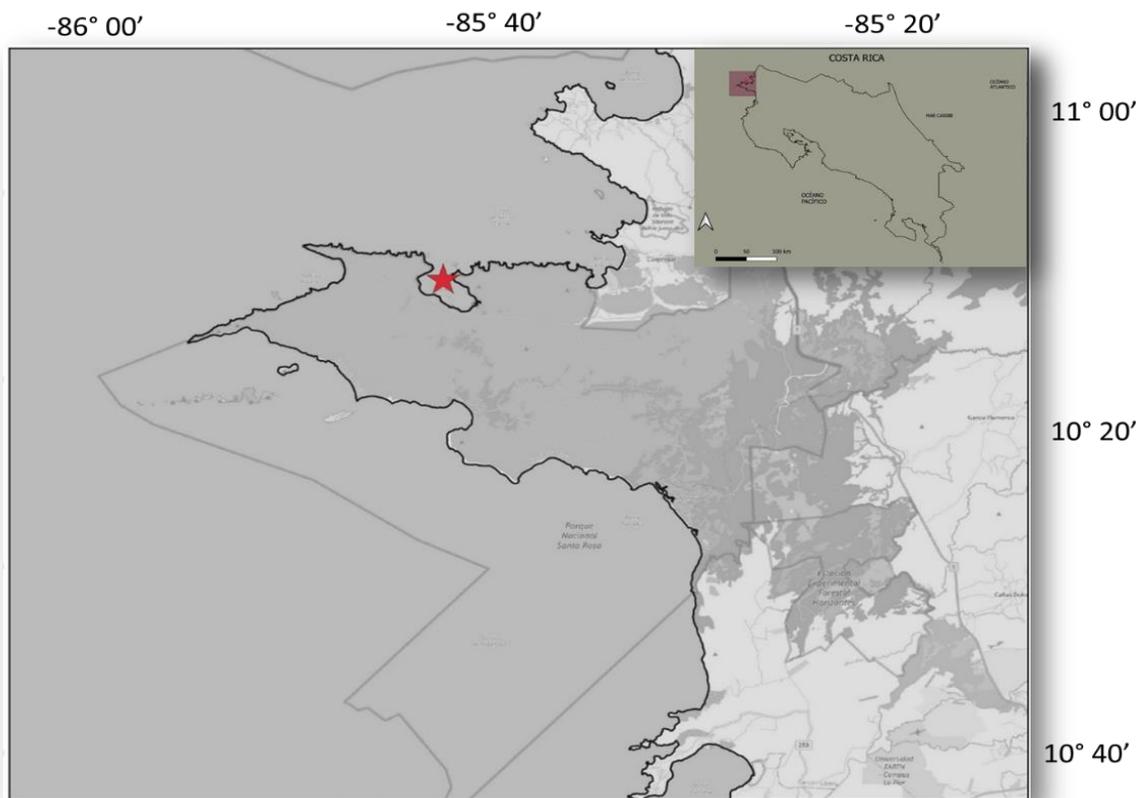


Figura 1. Bahía Matapalito (BM) 10°56'06" N, 85°47'42" W (estrella roja), zona de forrajeo de tortugas marinas en Pacífico Norte de Costa Rica.

### Índice de condición corporal y LRC.

El índice de condición corporal (ICC) fue calculado mediante la relación del largo recto del caparazón (LRC) y el peso corporal, denominada ecuación K de Fulton:  $ICC = \frac{\text{Peso corporal}}{LRC^3} \times 10000$  (Bjorndal, 2000). Fue necesario hacer la conversión del LRC a partir de la longitud curva del caparazón (LCC) usando la ecuación  $LRC = 0.9355 \times LCC + 0.4486$  usando la fórmula de Limpus (1992) aplicadas para *E. imbricata*. El LCC de cada individuo se obtuvo mediante la medición realizada durante los monitoreos de campo a través de una cinta flexible. Con el fin de proporcionar un contexto para las puntuaciones obtenidas del ICC, se calculó el promedio en cada sexo y además se comparó con los criterios de categorización del ICC reportados (Thomson et al. 2009; Flint et al. 2009; Norton & Wyneken, 2015). En donde se consideró que los animales con ICC superiores a

1.20 se encontraban en “muy buenas” condiciones, los que tenían un ICC entre 1.11 y 1.19 estaban en “buenas” condiciones, los que estaban entre 1.00 y 1.10 eran “promedio” y los que se encontraban por debajo de 1.00 como “pobre”.

Las tortugas fueron clasificadas como juveniles o adultos de acuerdo con el tamaño medio de anidación (TMA) publicados en estudios de las poblaciones de tortugas verdes a lo largo del OPO, el cual se estima que es de 81 cm (Liles et al. 2011). Por lo tanto, se consideraron juveniles a los individuos con  $LCC < TMA$  (81 cm) y adultos a las tortugas verdes con  $LCC > TMA$ . Con excepción de la hembra adulta que tenía 77.50 cm de LCC, la cual fue encontrada anidando.

### **Extracción de la Hormona.**

La extracción de testosterona estuvo apegada al protocolo indicado por Wibbels et al. (1987). De manera breve, se depositaron alícuotas de 500  $\mu$ L de plasma en tubos de vidrio agregando 4 ml de éter etílico anhidro (Merck KGaA, Alemania) para extraer T del plasma (T puede estar unido a proteínas en la sangre). Luego cada tubo de vidrio (con plasma y éter) fue colocado en nitrógeno líquido en donde la capa de plasma se congelo y la capa de éter (que contiene las hormonas) se decantó a un nuevo tubo de vidrio y se secó bajo una corriente constante de gas nitrógeno (~ 20 min). Las muestras fueron reconstituidas con 1,1 ml de acetona al 100% (Merck KGaA, Alemania) para aumentar la eficiencia de extracción (o recuperación de T de la muestra). Después de la reconstitución de acetona, alícuotas de 1 ml se secaron al aire durante la noche (~ 16 h) y se reconstituyeron en 250  $\mu$ l de solución salina tamponada con fosfato 0,01 M (PBS) con albúmina de suero bovino al 0,1% (BSA, Amresco, Solon, OH), agitándolos en vórtex durante 15 min y luego incubando en un baño de agua durante 30 min a 4 °C.

### **Testosterona ELISA.**

Para la determinación de concentración de testosterona (T) se utilizó un kit T ELISA disponible comercialmente (Catálogo # ADI-900-065, ENZO Life Sciences,

Plymouth, PA), cada muestra de plasma extraída y todas las muestras se cuantificaron por duplicado. Los estándares ( $n = 7$ ) de concentración de T conocida (7.81–2,000 pg/mL) se prepararon de acuerdo con el protocolo del kit de ensayo usando PBS (con BSA) y, por lo tanto, PBS (con BSA) se usó como 'cero' (B0) estándar. Según la casa comercial, el kit de T ELISA, (ENZO Life Sciences, Plymouth, PA) tiene 100% de reactividad con testosterona, 14,64% de reactividad con 19-hidroxitestosterona, 7,20% de reactividad con androstenediona, 0,72% de reactividad con dehidroepiandrosterona, 0,40% de reactividad con estradiol, así como <0,001% de reactividad cruzada con estriol, corticosterona, cortisol, cortisona, estrona, progesterona y pregnolona. Fue medida la densidad óptica para la estimación de T mediante un espectrofotómetro Multiskan FC (Thermo Scientific) a 405 nm. Los resultados de las concentraciones de T se calcularon utilizando un programa de ajuste de curvas logísticas de cinco parámetros (My assays online).

Para obtención de la proporción sexual se utilizó la fórmula 1:

$$P = \frac{A}{B} \quad (1)$$

Donde:

**A**= número de hembras y **B**= número de machos

### **Análisis estadístico.**

Se realizó estadística descriptiva mediante el software Minitab ® 20.4, en donde se indicaron las medias, desviaciones estándar, intervalos máximos y mínimos para cada sexo de los juveniles de carey según la asignación de sexo que se realizó mediante los intervalos de referencia testosterona obtenidos en la misma especie en estudios previos de Blanvillain et al. 2007.

## RESULTADOS

Un total de 27 salidas de campo a Bahía Matapalito fueron realizadas para la recopilación de los datos morfométricos, muestras de plasma y tejidos de aleta de un total de 33 tortugas *E. imbricata* con LCC entre 34.5-92 cm ( $44.39 \pm 12.88$  cm,  $\text{prom} \pm \text{SD}$ ). Los individuos juveniles capturados se encontraban en reposo o alimentándose en las inmediaciones de BM y no fue posible distinguir el sexo de cada inmaduro, ya que en ese grupo de edad aun no son evidentes los dimorfismos sexuales como ocurre en los adultos. Del total de las tortugas carey muestreadas, 31 fueron juveniles ( $41.79 \pm 7.61$  cm de LCC) y 2 adultos, un macho y una hembra anidadora (92 y 77.5 cm de LCC, respectivamente).

### **Proporción sexual de juveniles de carey de Bahía Matapalito.**

Como se observa en la figura 2, los intervalos de concentración de T para ambos sexos de tortuga carey fue de 16-27236.1 pg/mL. Utilizando los niveles de concentración de testosterona en estudios anteriores para hembras y machos juveniles de *E. imbricata* (Blanvillain et al. 2007; Diez & Van Dam. 2003; Geis et al. 2003), nosotros estimamos que 11 individuos son hembras y 16 son machos, además de 4 individuos “desconocidos”, los cuales no se relacionaron a ninguno de los intervalos de concentración de T pertenecientes a los dos sexos. El intervalo de concentración de T de las hembras juveniles fue de 16–239 pg/mL, mientras que el de machos juveniles fue de 878.3-27236.1 pg/mL (tabla 1). Únicamente se capturaron dos individuos adultos, una hembra anidadora y un macho maduro, los cuales presentaron concentraciones de 15.6 pg/mL y 1106.7 pg/mL, respectivamente. El promedio de T en hembras juveniles fue de  $68.9 \pm 43.19$  pg/mL y los machos juveniles de  $7563.5 \pm 6143.9$  pg/mL (Tabla 1). Por lo tanto, la proporción sexual de los juveniles de *E. imbricata* fue de 1.45:1 (M:H) con un sesgo inclinado hacia los machos o interpretado de otra forma observamos 1.45 machos por cada hembra.

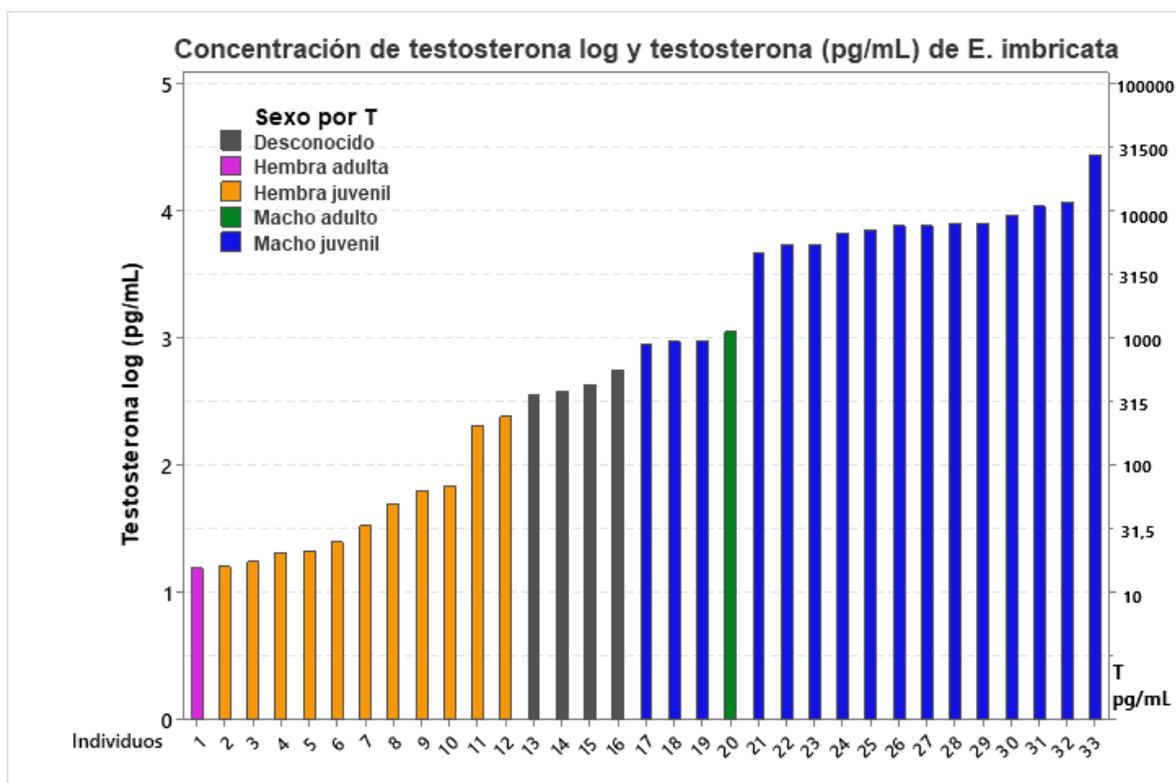


Figura 2. Concentración de testosterona log (pg/mL) y testosterona (pg/ml) del plasma de tortugas de carey, *E. imbricata*, capturadas en Bahía Matapalito en el Pacífico Norte de Costa Rica.

### Índice de condición corporal.

La longitud recta del caparazón (LRC) de esta población de juveniles de tortugas carey mostró un promedio de  $40.72 \pm 8.68$  cm y  $39.24 \pm 6.29$  cm (LRC promedio  $\pm$  SD) para hembras y machos juveniles, respectivamente. Los intervalos de LRC obtenidos fueron de 32.72–57.51 cm para hembras juveniles y de 33.85–53.77 cm para los machos juveniles. El macho adulto tenía un LRC de 86.51 cm y la hembra anidadora 72.95 cm. El ICC para las hembras juveniles fue de  $1.10 \pm 0.13$  (Promedio  $\pm$  SD), y según la categoría reportada están estarían en condición “promedio”. En cuando a los machos inmaduros se obtuvo un ICC de  $1.14 \pm 0.24$  (Promedio  $\pm$  SD) lo cual, según la categoría, estarían en “buenas” condiciones nutricionales. Los intervalos del ICC que se encontraron en estos individuos fue entre 0.85-1.37 para las hembras y 0.75-1.75 para los machos juveniles de carey (tabla 2).

**Tabla 2.** Media  $\pm$  SD y rango del Índice de condición corporal de tortugas carey del Pacífico Norte de Costa Rica en diferentes grupos de edad.

	Juveniles		Adultos	
	Hembras	Macho	Hembra	Macho
<b>ICC</b>	1,10 $\pm$ 0,13	1,14 $\pm$ 0,24	1,18	1,13
<b>Intervalo de ICC</b>	0.86 – 1.37	0.75 – 1.75	-	-
<b>N</b>	11	16	1	1

## DISCUSIÓN

Este estudio sería el primero en mostrar una proporción de sexos inclinada hacia los machos juveniles de *Eretmochelys imbricata* en la región del Pacífico Oriental, reportando masculinización en el área de forrajeo de Bahía Matapalito (tabla 3). Incluso si suponemos que los 4 individuos que no se relacionaron con ninguno de los sexos (352.5 pg/mL- 553.3 pg/mL de T) fueran hembras, la proporción seguiría ligeramente inclinada hacia los machos 1.10:1 (M:H). La clasificación del sexo de cada juvenil de carey fue estimada mediante la concentración de testosterona reportada para esta especie y este grupo de edad que obtuvieron Blanvillain et al. 2007; Diez & Van Dam. 2003 & Geis et al. 2003, que en el caso de las hembras fue 134.4-260.8 pg/mL y para los machos juveniles de 720.5-13181 pg/mL. A pesar de que en estos estudios previos se emplea la técnica de radioinmunoensayo (RIA) para determinar la concentración de T, en el nuestro determinamos la concentración de T mediante una técnica de inmunoensayo (ELISA). Se ha evidenciado que tanto RIA como ELISA resultan comparables con un nivel muy alto de correspondencia entre las dos de 97% (Allen et al. 2015). Estos autores propusieron el uso de una ELISA para evaluar la concentración de Testosterona (T) y poder clasificar el sexo de las tortugas verdes, técnica que resulta menos costosa y más fácil de implementar en el laboratorio. La clasificación del sexo de las tortugas verdes de ese estudio fue corroborada mediante laparoscopia, dando como resultado que todos los juveniles fueron clasificados correctamente. Resaltando una hembra adulta, reproductivamente activa, que inicialmente fue clasificada como macho por ambas técnicas (RIA y ELISA de T), pero que mediante laparoscopia se observó que tenía huevos sin cascara. La testosterona está involucrada en la síntesis de hormonas femeninas (p. ej., estradiol) y se sabe que los valores altos de T en tortugas verdes hembra, reproductivamente activas, son frecuentes (coincidiendo con la migración, el apareamiento y la actividad de anidación) (Blanvillain et al. 2011 & Wibbels et al. 1992). Por lo tanto, puede ocasionar que sea imposible distinguir entre hembras reproductivamente activas y machos inmaduros/maduros únicamente considerando

la concentración de T. Sin embargo, esto plantea un problema para las agregaciones de forrajeo solo si hay hembras reproductivamente activas, en nuestro estudio el objetivo principal fue establecer las concentraciones de T, pero en inmaduros, por lo que no representaría un inconveniente para este grupo de edad.

En cuanto al tamaño de los inmaduros de carey de BM, lo estimamos mediante el largo recto del caparazón (LRC), lo cual es consistente con lo reportado para este grupo de edad en zonas de alimentación del OPO, por ejemplo: Heidemeyer et al. 2014 ( $40.17 \pm 17.55$ , prom  $\pm$  SD) cuando informo por primera vez a Bahía Matapalito como zona de forrajeo para juveniles de carey. Además, nuestros resultados de LRC son similares a los reportados para zonas de forrajeo cercanas como las del Coiba National Park, reserva marina de la costa Pacífica de Panamá donde se reporta un LRC de  $42.24 \pm 0.71$  cm (Llamas et al. 2017). A su vez, el LRC de los juveniles de carey de BM fue inferior a los reportados para este mismo grupo de edad, pero en las agregaciones del caribe. (Blanvillain et al., 2007 & Diez & Van Dam. 2003; Geis et al. 2003,  $54.7 \pm 8.23$  y  $49.7 \pm 9.6$ , respectivamente). Se considera que gran parte de los primeros años de vida de las tortugas carey están sujetos a hábitats oceánicos (Reich et al., 2007), durante una etapa comúnmente conocida como los años perdidos (Carr, 1987), antes de reclutar hábitats neríticos con un tamaño de 20 a 35 cm LCC (Witzell, 1983). Sin embargo, investigaciones recientes sugieren que las tortugas carey en el OPO pueden carecer de fase pelágica durante el desarrollo temprano posterior a la eclosión (Liles et al., 2017; Gaos et al., 2017). Nuestra investigación plantea que BM es un sitio de reclutamiento de juveniles de carey, ya sean originarios de sistemas pelágicos u otros neríticos oceánicos, ya que la tortuga más pequeña etiquetada durante este estudio fue de 32.0 cm de LCC.

Por otro lado, la temperatura superficial del agua en el Pacífico Norte de Costa Rica ha mantenido una media entre 26.51 °C en temporada seca y 29.29 °C en temporada lluviosa (Saravia-Arguedas et al. 2021), temperaturas que corresponden a la temporada de obtención de las muestras de plasma de este estudio. En estudios previos se ha evaluado el efecto estacional sobre las

concentraciones de T en tortugas marinas inmaduras (Gregory et al. 1996; Morris, 1982; Owens, 1997 & Braun-Mcneill et al. 2007) y se ha observado que en la temporada en la que las tortugas se encuentran a temperaturas de 14-16 °C las concentraciones de hembras y machos se superponen (19-147 pg/mL y 61-737 pg/mL, respectivamente). Por el contrario, cuando estos juveniles se encuentran en estaciones más cálidas a temperaturas entre 24-28 °C la concentración de esta hormona no se traslapa entre ambos sexos (6.7-128 pg/mL y 372-1884 pg/mL, respectivamente). Lo anterior sugiere que es posible que la expresión de concentración de T refleje una afectación ante un componente estacional como la temperatura del agua, fotoperiodo, disponibilidad de alimentos o comportamiento alimenticio estacional (Braun-Mcneill et al. 2007). La técnica ELISA utilizada en este estudio, primeramente, fue probada en muestras de plasma de juveniles de *C. mydas* obtenidas en la Bahía San Diego, ubicada en las inmediaciones de un canal de descarga de una planta de energía en South Bay, donde las temperaturas oscilaron entre 20-31 °C según fuera la estación del año. Considerando que las muestras de plasma de los juveniles de tortugas verde de nuestro estudio se obtuvieron durante temporadas donde la temperatura fluctuó entre 26-29 °C, es muy poco probable que este factor ambiental pueda tener algún efecto de estacionalidad sobre las concentraciones de T en cada una de las tortugas de carey usadas en este ensayo.

Tomando en cuenta la propuesta para categorizar la puntuación obtenida del ICC (Thomson et al. 2009; Flint et al. 2009; Norton & Wyneken, 2015) observamos que la población de los juveniles de carey de Bahía Matapalito no alcanza el nivel más alto de esta clasificación, dado que en ninguno de los sexos se alcanzan valores del ICC por encima de 1.20. Por lo tanto, las hembras muestran una condición “promedio”, mientras que en los machos hay una ligera mejoría con una “buena” condición nutricional según los criterios de esta categoría. Estos valores de ICC obtenidos en los inmaduros congregados en BM se asemejan a los reportados por Van Dam (2002) en Puerto Rico (entre 1.16 y 1.24) y también a lo observado por Bjorndal y Bolten (2010) en la reserva Unión Creek en Bahamas (1.17). Las diferencias de ICC entre individuos podrían deberse a su habilidad para conseguir

e ingerir alimento dependiendo de su disponibilidad (Diez y Van Dam, 2002) y a su vez al tipo de hábitat del sitio de alimentación, se han identificaron dos tipos de habitats críticos de forraje para la tortuga carey en el Pacífico Oriental: estuarios costeros asociados a manglares y ecosistemas arrecifales (Gaos et al. 2012). Y para el caso de nuestro sitio de alimentación (Bahía Matapalito) alberga una gran comunidad de arrecifes de coral que se extiende hasta la vecina Bahía de Santa Elena (Heidemeyer et al. 2014), lo cual lo haría una recomendable alternativa de área de forrajeo para esta especie. Aunque sabemos que el ICC es una variable indirecta del estado nutricional, dado los resultados de este estudio, podríamos considerar que la mayoría de los inmaduros de carey cuentan con la disponibilidad de las fuentes alimenticias a través de su ruta migratoria, pero hay una parte de la población que estaría por debajo del valor de 1.00 de ICC, lo cual indicaría una “pobre” condición nutricional para estos individuos. Por lo tanto, sería incierto que estos individuos pudieran llevar a cabo las demandas energéticas que implican las diferentes etapas del crecimiento y desarrollo de los animales, entre ellas la segregación hormonal.

Las proporciones sexuales primarias (en neonatos) varían entre colonias y nidadas, así como durante el transcurso de una temporada de anidación, pero están sesgadas hacia las hembras en casi todas las colonias (Hawkes et al. 2009), algunos estudios sugieren que este sesgo no se mantiene en etapas posteriores (Wibbels et al. 1993, Diez & Van Dam, 2003). Se ha observado que la proporción sexual en juveniles de las tortugas marinas tiene un menor sesgo hacia las hembras de lo que se reporta en neonatos (Kichler et al. 1999, Jensen et al. 2006, Theissinger et al. 2009, Hays et al. 2010, Joseph & Shaw 2011, Stewart & Dutton 2011, Wright et al., 2012a, 2012b). Una posible explicación podría ser la preferencia de hábitat entre ambos sexos, es decir las hembras se reclutan en zonas de forrajeo diferente a los machos (Casale et al. 2002) o que los neonatos de las hembras sufren una mayor mortalidad que los machos. Una posible hipótesis son los hallazgos en nidos fríos (probablemente nidos de producción de machos), donde los neonatos de estos nidos tenían un mejor rendimiento locomotor y mayor tamaño corporal en comparación con los neonatos de los nidos más cálidos, en donde se producirían

más hembras (Booth & Evans, 2011; Booth & Astill, 2001), consecuentemente, habría un aumento en el rendimiento de la natación y tamaño de los neonatos de nidos fríos (machos), lo cual podría reducir su exposición relativa a la depredación en las próximas etapas de su ciclo vida (Janzen et al. 2000).

Varios estudios, sobre todo en el Atlántico y Caribe, han evidenciado la feminización de diferentes poblaciones de juveniles de *E. imbricata* (Limpus, 1992; Leon & Diez, 1999; Blanvillain et al. 2007) (Tabla 3). Solo en un caso (Diez & Van Dam, 2003) en una población de tortuga carey en el caribe (Puerto Rico) se estimó una proporción de sexos no sesgada hacia las hembras (0.8:1, H:M). Recientemente, en la Bahía de Jiquilisco, El Salvador (Chavarría-Pérez et al. 2020) evaluaron la proporción de sexos mediante la medición de concentración de testosterona en plasma de juveniles de carey con la técnica de ELISA de T (Allen et al. 2015), clasificando el sexo de cada individuo de tortuga carey respecto a los intervalos de referencia de T que Allen et al. (2015) obtuvo para tortugas verdes juveniles. Si bien en nuestro estudio no clasificamos el sexo de los juveniles con los intervalos de referencia de T que Chavarría-Pérez et al. (2020) reportaron para ambos sexos (7.7-77.20 pg/mL y 660-3083.20 pg/mL, para hembras y machos, respectivamente) dado que consideramos que era más óptimo usar un marco de referencia de esta hormona que también fuera corroborada mediante laparoscopia, pero en nuestra especie de estudio, *E. imbricata* (Blanvillain et al. 2007; Diez & Van Dam. 2003; Geis et al. 2003), es importante destacar que los niveles de concentración de T que reportan para los machos juveniles de carey son tan altos como los nuestros y muestran un amplio intervalo entre las concentraciones de T cuando son medidas mediante la técnica de inmunoensayo (ELISA de T), así como con RIA. Esta constancia en los niveles elevados de T para machos juveniles de carey concuerda con lo observado por Kobayashi et al. (2010) durante la medición de esta hormona durante dos años consecutivos en el mismo mes, pero en juveniles de carey que se encontraban en cautiverio en la isla de Ishigaki, Japón (Media de 1200 y 4800 pg/mL de T en 2007 y 2008, respectivamente).

Aún desconocemos las razones de la inclinación de los sesgos hacia un sexo, en particular las hembras. Aunque la teoría de Fisher (1930) predice que la producción de ambos sexos debería ser 1:1, es necesaria una presión selectiva para que esto suceda, porque si un sexo se vuelve “más escaso”, ese sexo tendría más oportunidades de reproducirse y por lo tanto contribuiría con una proporción más alta de descendencia al acervo genético. El beneficio de ser el sexo “más escaso” debe continuar hasta que la proporción de sexo llegue a 1:1, una estrategia estable evolutiva (Smith & Price, 1973). En los sistemas de determinación del sexo genético, los cromosomas sexuales parentales se recombinan de una manera predecible para producir una proporción de sexo aproximadamente equilibrada (Hawkes et al. 2013). En sistemas donde la determinación de sexo está dada por factores ambientales (por ej. La temperatura o el fotoperíodo) a menudo se produce proporciones de sexos muy sesgadas. Una posible explicación del sesgo hacia algún sexo en las zonas de alimentación en las tortugas marinas, son las diferencias en la preferencia de hábitat entre machos y hembras. Investigaciones anteriores en otros reptiles (cocodrilos recién nacidos y tortugas juveniles *Chelydra serpentina*) han encontrado que el comportamiento térmico fue influenciado por la temperatura de incubación (Lang, 1987; O’Steen, 1998). Por ejemplo, los cocodrilos recién nacidos incubados a temperaturas más altas se introdujeron en gradientes térmicos y seleccionaron un gradiente que mantuvo una temperatura corporal más alta en comparación con sus contrapartes incubados a una temperatura más baja. Ambos estudios sugirieron que la selección de la temperatura puede influir en la elección del hábitat térmico y posiblemente se deba directa o indirectamente a la temperatura de incubación y, por lo tanto, al sexo de los animales. Debido a que el promedio de la fluctuación de temperatura superficial del agua en BM está más asociado al gradiente térmico que produce más machos de *E. imbrica* (<28 °C), es posible que se capturaran más machos que hembras de tortugas carey. No obstante, creemos que el número de inmaduros de carey evaluados en este estudio es una muestra representativa para la población de BM por lo que se requieren más estudios para respaldar las diferencias de sexo en la preferencia de hábitat de estos reptiles.

Otra de las posibles explicaciones y no menos importante en el sesgo hacia un sexo en la proporción sexual (mayormente hembras) de las tortugas marinas es el inminente incremento de las temperaturas globales, de hasta 2 °C, pronosticada para el año 2100 (IPCC, 2014), es razonable suponer que la temperatura en las playas podría favorecer una mayor proporción de hembras en todas las colonias de tortugas marinas (Hawkes et al. 2007; Hays et al. 2014; Jensen et al. 2018). Por esta razón la información sobre la proporción de sexos obtenida durante largos períodos de tiempo puede ayudar a comprender los impactos del cambio climático global en las poblaciones (Fuller *et al.*, 2013). Ante la amenaza crítica de peligro de extinción que presenta *E. imbricata* en el OPO y los escenarios de incremento de temperatura que podría llevar a la eliminación de los machos de las tortugas marinas (Janzen, 1994), resulta de mucha relevancia dar a conocer un sitio de alimentación en donde no solo habitan juveniles de carey, sino que se encuentren más machos que hembras como el caso de nuestra área de estudio.

### *Conclusiones y recomendaciones*

La aplicación de la técnica de ELISA de T resulta una opción útil para estimar el sexo de las tortugas carey, no obstante, es necesario corroborar estos resultados en las distintas poblaciones de forrajeo de la región, recomendando la confirmación de esta clasificación de sexo a través de laparoscopia. Y de esta manera poder establecer un perfil hormonal consistente en los distintos grupos de edad de la especie y confirmar la utilidad de la técnica para dicho fin.

La proporción de sexo (1.45:1, M:H) muestra un sesgo inclinado a los machos de los juveniles de carey, por lo que se podría considerar el único sitio de alimentación en el OPO que hasta el momento ha mostrado este sesgo masculinizado.

El ICC promueve un “óptimo” estado nutricional para estos inmaduros de tortuga carey, tomando en cuenta que BM como muchas otras zonas de alimentación son parte de un corredor migratorio para esta y muchas especies marinas, lo observado en el ICC para estas tortugas podría representar de manera indirecta la suma de

disponibilidad de alimento en todas estas áreas a lo largo de su distribución. No obstante, hay un número de individuos en este estudio que se encontrarían en pobres condiciones nutricionales, lo cual, indirectamente, promovería la falta de alimento a través de su ruta migratoria.

Bahía Matapalito representa un hábitat importante que conecta las poblaciones de tortugas marinas del Pacífico Oriental, este estudio muestra que en su mayoría los juveniles de carey agregados a área de alimentación fueron machos. Ante la amenaza del cambio climático y los constantes reportes de feminización para la especie que se encuentra en peligro crítico de extinción, estos resultados ofrecen una perspectiva distinta y esperanzadora para la especie. Por lo se resalta la importancia de la protección de la zona, que por ahora continúa sujeto a una alta presión pesquera por parte de comunidades cercanas.

## BIBLIOGRAFÍA

Allen, C.D., Robbins M. N., Eguchi T., Owens D. W., Meylan A. B. & Meylan P. A. (2015). First Assessment of the sex ratio for an east Pacific green sea turtle foraging aggregation: Validation and application of a testosterone ELISA. *Plos one*, 10(10): e0138861. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138861>

Bjorndal, K.A., Bolten, A.B., & Chaloupka, M.Y. (2000). Green turtle growth: evidence for density dependence. *Ecological Applications*, 10:269-282. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(2000\)010\[0269:GTSGME\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(2000)010[0269:GTSGME]2.0.CO;2)

Bjorndal, K.A. y Bolten, A.B. (2010). Hawksbill sea turtles in seagrass pastures: Success in a peripheral habitat. *Marine Biology*, 157(1), 135–145. <https://doi.org/10.1007/s00227-009-1304-0>

Blanvillain G, Owens D.W. & Kuchling G. (2011). Hormones and reproductive cycles in turtles. *Hormones and Reproduction of Vertebrates, Volume 3-Reptiles. Elsevier Inc.* pp. 277–303.

Blanvillain, G, Wood L.D., Meylan, A.B. & Meylan, P.A. (2007). Sex ratio prediction of juvenile hawksbill sea turtles (*Eretmochelys imbricata*) from South Florida, USA. *Herpetol Conserv Biol*, 3:21–27.

Booth, D.T. & Astill, K. (2001). Incubation temperature, energy expenditure and hatchling size in the green turtle (*Chelonia mydas*), a species with temperature-sensitive sex determination. *Australian Journal of Zoology*, 49:389–396. <https://doi.org/10.1071/ZO01006>

Booth, D.T. & Evans, A. (2011). Warm water and cool nests are best. How global warming might influence hatchling green turtle swimming performance. *PLoS ONE*, e23162, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023162>

Carrión-Cortez, J., Canales-Cerro, C., Arauz, R. & Riosmena-Rodríguez, R. (2013). Habitat use and diet of juvenile eastern Pacific hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) in the north Pacific coast of Costa Rica. *Chelonian Conservation and Biology*, 12, 235–245. <https://doi.org/10.2744/CCB-1024.1>

Casale, P., Laurent, L., Gerosa, G. & Argano, R. (2002). Molecular evidence of male-biased dispersal in loggerhead turtle juveniles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 267:139–145. [https://dx.doi.org/10.1016/S0022-0981\(01\)00365-3](https://dx.doi.org/10.1016/S0022-0981(01)00365-3)

Casale, P., Lazar, B., Pont, S., Toma's, J., Zizzo, N., Alegre, F., Badillo, J., et al. (2006). Sex ratios of juvenile loggerhead sea turtles *Caretta caretta* in the Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 324: 281–285. <https://doi.org/10.3354/MEPS324281>

Chacón-Chaverri, D., Martínez-Cascante, D.A., Rojas, D. & Fonseca, L.G. (2015). Golfo Dulce, Costa Rica, an important foraging ground for the Pacific hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*). *Revista de Biología Tropical*. 63, 351–362. <https://doi.org/10.15517/RBT.V63I1.23114>

Chacón-Chaverri, D., Martínez-cascante, D.A., Rojas, D. & Fonseca, L.G. (2014). La tortuga Carey del Pacífico Oriental (*Eretmochelys imbricata*). *Revista de Biología Tropical*, 63(1), 351–362. <https://doi.org/10.15517/RBT.V63I1.23114>

Chavarria-Pérez, I.M., Melara Soriano, M., Liles, M.J. & Castro-Menjivar, J.A. (2020). Determinación de la proporción sexual de tortugas Carey (*Eretmochelys imbricata*) inmaduras, mediante la detección de testosterona por medio de la prueba ELISA. *Revista Agrociencia*, 16, 73-80.

CITES (17 de octubre del 2021). *Convention of international trade and in endangered species. Appendix I, II and III.* <https://cites.org/esp>.

Diez, C. E. & Van Dam, R. P. (2002). Habitat effect on hawksbill turtle growth rates on feeding grounds at Mona and Monito Islands, Puerto Rico. *Marine Ecology Progress Series*, 234, 301–309. <https://doi.org/10.3354/meps234301>

Diez, C.E., & Van Dam, R.P. (2003). Sex ratio of an immature Hawksbill Sea Turtle aggregation at Mona Island, Puerto Rico. *Journal of Herpetology* 37:533-537. <https://www.jstor.org/stable/1566057>

Dobbs, K. A., Miller, J. D., Limpus, C. & Landry, A. M. (2010). Hawksbill Turtle hatchling sex ratios and incubation and pivotal temperatures from Milman Island, Great Barrier Reef, Australia. *Marine Turtle Newsletter* 128: 12–16. <https://n9.cl/xr50p>

Fisher, R.A. (1930). *The Genetical Theory of Natural Selection*. Clarendon Press, Oxford, UK.

Fuller, W.J., Godley, B.J., Hodgson, D.J., Reece, S.E., Witt, M.J. & Broderick, A.C. (2013). Importance of spatio-temporal data for predicting the effects of climate change on marine turtle sex ratios. *Marine Ecology Progress Series*, 488: 267–274. <https://doi.org/10.3354/meps10419>

Flint, M., Kane, J.P., Mills, P. & Limpus, C. (2009). *A veterinarian's guide for sea turtle post mortem examination and histological investigation*. The University of Queensland, Australia.

Gaos, A.R., Abreu-Grobois, F.A., Alfaro-Shigueto, J., Amorocho, D., Arauz, R., Baquero, A. & Zárate, P. (2010). Signs of hope in the eastern Pacific: International collaboration reveals encouraging status for a severely depleted population of hawksbill turtles *Eretmochelys imbricata*. *Oryx*, 44(4), 595–601. <https://doi.org/10.1017/S0030605310000773>

Gaos, A.R., Lewison, R.L., Wallace, B.P., Yañez, I.L., Liles, M.J., Nichols, W.J., Baquero, A., Hasbún, C.R., Vasquez, M., Urteaga, J., Seminoff, J.A. (2012a). Spatial ecology of critically endangered hawksbill turtles *Eretmochelys imbricata*: implications for management and conservation. *Marine Ecology Progress Series*, 450, 181–194. <https://doi.org/10.3354/meps09591>

Gaos, A.R., Lewison, R.L., Yañez, I.L., Wallace, B.P., Liles, M.J., Nichols, W.J., Yan, I.L. (2012b). Shifting the life-history paradigm: discovery of novel habitat use by hawksbill turtles. *Biology Letters*, (8), 54–56. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2011.0603>

Gaos, A. R., Lewison, R. L., Liles, M. J., Henriquez, A., Chavarría, S., Yañez, I. L., Stewart, K., Frey, A., Jones, T. T., Dutton, P. H. (2018b). Prevalence of polygyny in a critically endangered marine turtle population. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology*, 506, 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2018.06.004>

Gaos, A.R., Liles, M.J., Gadea, V., Pena, A., Vallejo, F., Miranda, C. & Seminoff, J.A. (2017b). Living on the Edge: Hawksbill turtle nesting and conservation along the Eastern Pacific Rim. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 45(3), 572–584. <https://doi.org/10.3856/vol45-issue3-fulltext-7>

Geis, A.T., Wibbels, B., Phillips, Z., Hillis-Starr, A., Meylan, P., Meylan, C., Diez, C.E. & Van Dam, R. (2003). Predicted sex ratio of juvenile Hawksbill Sea Turtles inhabiting Buck Island Reef National Monument, U.S. Virgin Islands. *Journal of Herpetology* 37:400-404. [https://doi.org/10.1670/0022-1511\(2003\)037\[0400:PSROJH\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1670/0022-1511(2003)037[0400:PSROJH]2.0.CO;2)

Godley, B.J., Barbosa, C., Bruford, M., Broderick, A.C., Catry, P., Coyne, M. S. & Formia, A. (2010). Unravelling migratory connectivity in marine turtles using multiple methods. *Journal of Applied Ecology*, 47: 769–778. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2010.01817.x>

Godley, B.J., Broderick, A.C., Glen, F. & Hays, G.C. (2002). Temperature-dependent sex determination of Ascension Island green turtles. *Marine Ecology Progress Series*, 226: 115–124. <https://doi.org/10.3354/MEPS226115>

Godfrey, M. H., D'Amato, A.F., Marcovaldi, M.A. & Mrosovsky, N. (1999). Pivotal temperature and predicted sex ratios for hatchling Hawksbill Turtles from Brazil. *Canadian Journal of Zoology* 77(9): 1,465–1,473. <https://doi.org/10.1139/z99-117>

Hawkes L.A., Broderick, A.C., Godfrey, M.H. & Godley B.J. (2007). Investigating the potential impacts of climate change on a marine turtle population. *Global Change Biology*, 13:923–932. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2007.01320.x>

Hawkes, L.A., Broderick, A.C., Godfrey, M.H. & Godley, B.J. (2009). Climate change and marine turtles. *Endangered Species Research* 7(2): 137–154. <https://doi.org/10.3354/esr00198>

Hays, G.C., Fossette, S., Katselidis, K.A., Schofield, G. & 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. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2010.01531.x>

Hays, G.C., Mazaris, A.D., and Schofield, G. (2014). Different male vs. female breeding periodicity helps mitigate offspring sex ratio skews in sea turtles. *Frontiers in Marine Science*, 1: 1–9, <https://doi.org/10.3389/fmars.2014.00043>

Heidemeyer, M., Arauz-Vargas, R., & E. López-Agüero. (2014). New foraging grounds for hawksbill (*Eretmochelys imbricata*) and green turtles (*Chelonia mydas*) along the northern Pacific coast of Costa Rica, Central America. *International Journal for Tropical Biology*, 62(4): 109–118. <https://doi.org/10.15517/RBT.V62I4.20037>

IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 2014. Climate Change 2014: Synthesis Report. Core writing team, Pachauri, R. K. & Meyer L. A. (eds.). Geneva, Switzerland, 151 pp.

IUCN (15 de octubre del 2021). *International Union for Conservation of Nature, Red List of Threatened Species*. <http://www.iucnredlist.org/>

Janzen, F.J. & Phillips, P.C. (2006). Exploring the evolution of environmental sex determination, especially in reptiles. *Journal of Evolutionary Biology*, 19:1775–1784. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2006.01138.x>

Janzen, F.J. (1994). Climate change and temperature-sex determination in reptiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 91:7487–7490. <https://doi:10.1073/pnas.91.16.7487>

Jensen, M. P., Abreu-Grobois, F. A., Frydenberg, J. & Loeschcke, V. (2006). Microsatellites provide insight into contrasting mating patterns in arribada vs. non-arribada olive ridley sea turtle rookeries. *Molecular Ecology*, 15:2567–2575. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02951.x>

Jensen, M. P., Allen, C. D., Eguchi, T., Bell, I. P., LaCasella, E. L., Hilton, W. A., Hof, C. A. M., et al. (2018). Environmental warming and feminization of one of the largest sea turtle populations in the world. *Current Biology*, 28: 154–159. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.11.057>

Jones, R.E., Petrell, R.J. & Pauly, D. (1999). Using modified length–weight relationships to assess the condition of fish. *Aquacultural Engineering*, 20: 261–276. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(99\)00020-5](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(99)00020-5)

Joseph, J. & Shaw, P. (2011). Multiple paternity in egg clutches of hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*). *Conservation Genetics*, 12:601–605. <https://doi.org/10.1007/s10592-010-0168-7>

Kichler, K., Holder, M. T., Davis, S. K., Marquez, R. & Owens, D. W. (1999). Detection of multiple paternity in the Kemp's ridley sea turtle with limited sampling. *Molecular Ecology*, 8:819–830. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1999.00635.x>

Kobayashi, M., Shimizu, T. & Okuzawa, K. (2010) Determination of maturity in male hawksbill turtle *Eretmochelys imbricata* in captivity based on tail elongation and plasma testosterone level. *Fish Sci* 76, 777–784. <https://doi.org/10.1007/s12562-010-0283-x>

Laloë, J.O., Esteban, N., Berkel, J., & Hays, G.C. (2016). Sand temperatures for nesting sea turtles in the Caribbean: implications for hatchling sex ratios in the face of climate change. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 474: 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2015.09.015>

Laloë, J.O., Monsinjon, J., Gaspar, C., Touron, M., Genet, Q., Stubbs, J., Girondot, M., et al. (2020). Production of male hatchlings at a remote South Pacific green sea turtle rookery: conservation implications in a female-dominated world. *Marine Biology*, 167: 1–13. <https://doi.org/10.1007/s00227-020-03686-x>

Lam, T., Ling, X., Takahashi, S. & Burgess, E.A., (2011). Market forces: An examination of marine turtle trade in China and Japan. TRAFFIC East Asia, Hong Kong.

León, Y.M., & Diez, C.M. (1999). Population structure of Hawksbill Turtles on a foraging ground in the Dominican Republic. *Chelonian Conservation and Biology*, 3:230-236.

Liles, M. J., Jandres, M. V., López, W. A., Mariona, G. I., Hasbún, C. R., & Seminoff, J. A. (2011). Hawksbill turtles *Eretmochelys imbricata* in El Salvador: nesting distribution and mortality at the largest remaining nesting aggregation in the Eastern Pacific Ocean. *Endangered Species Research*, 14, 23-30.

Liles, M.J., Gaos, A.R., Bolaños, A D., Lopez, W.A., Arauz, R., Gadea, V. & Peterson, M.J. (2017). Survival on the rocks: high bycatch in lobster gillnet fisheries threatens hawksbill turtles on rocky reefs along the Eastern Pacific coast of Central America. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 45(3), 521–539. <https://doi.org/10.3856/vol45-issue3-fulltext-3>

Liles, M.J., Peterson, M.J., Seminoff, J.A., Altamirano, E., Henríquez, A.V., Gaos, A.R. & Peterson, T.R. (2015). One size does not fit all: Importance of adjusting conservation practices for endangered hawksbill turtles to address local nesting habitat needs in the eastern Pacific Ocean. *Biological Conservation*, 184, 405–413. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2015.02.017>

Limpus, C.J. (1992). The Hawksbill Turtle, *Eretmochelys imbricata*, in Queensland: population structure within a southern Great Barrier Reef feeding ground. *Wildlife Research* 19:489-506. <https://doi.org/10.1071/WR9920489>

Llomas, I., Flores, E., Abrego, M., Seminoff, J.A., Hart, C., Pena, B., Alvarez, G., Poveda, W., Amorocho, D., Gaos, A. (2017). Distribution, size range and growth rates of hawksbill turtles at a major foraging ground in the eastern Pacific Ocean. *Latin American Journal Aquatic Research*. 45, 597–605. <https://doi.org/10.3856/vol45-issue3-fulltext-9>

Loop, K. A., Miller, J.D. & Limpus, C. J. (1995). Nesting by the Hawksbill Turtle (*Eretmochelys imbricata*) on Milman Island, Great Barrier Reef, Australia. *Wildlife Research* 22: 241–252. <https://doi.org/10.1071/WR9950241>

Maffucci F., D'Angelo I., Hochscheid S., Ciampa M., Martino G. & Travaglini A. (2013). Sex ratio of juvenile loggerhead turtles in the Mediterranean Sea: is it really 1:1? *Marine Biology*, 160: 1097–1107. <https://doi.org/10.1007/s00227-012-2160-x>

Méndez-Salgado, E., Chacón-Chaverri, D., Fonseca, L.G., Rojas-Morales, D.W. & Seminoff, J.A., (2020). Trophic Ecology of Hawksbill Turtles (*Eretmochelys imbricata*) in Golfo Dulce, Costa Rica: Integrating Oesophageal Lavage and Stable Isotope ( $\delta^{13}C$ ,  $\delta^{15}N$ ) Analysis. *Lat. J. Aquat. Res.* 48. pp. 114–130. <https://doi.org/10.3856/vol48-issue1-fulltext-2230>

Merchant-Larios H. (1999). Determining hatchling sex. In: Eckert, K.L., Bjorndal, K.A., Abreu-Grobois, F.A. & Donnelly, M. (eds). *Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles*. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication No. 4. pp. 130–135. Available: <http://mtsg.files.wordpress.com/2010/11/techniques-manual-full-en.pdf>.

Miller, E.A., MLCCenachan, L., Uni, Y., Phocas, G., Hagemann, M.E. & Van Houtan, K.S., (2019). The historical development of complex global trafficking networks for marine wildlife. *Sci. Adv.* 5, eaav5948. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav5948>

Mortimer, J.A., Donnelly, M. (IUCN SSC Marine Turtle Specialist Group). (2008). *Eretmochelys imbricata*. The IUCN Red List of Threatened Species. e. T8005A12881238. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T8005A12881238>.

Mrosovsky N & Pieau C. (1991). Transitional range of temperature, pivotal temperatures, and thermosensitive stages for sex determination in reptiles. *Amphibia- Reptilia* 12: 169–179.

Mrosovsky, N. & Yntema, C.L. (1980). Temperature dependence of sexual differentiation in sea turtles: implications for conservation practices. *Biological Conservation* 18:271-280. [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(80\)90003-8](https://doi.org/10.1016/0006-3207(80)90003-8)

Norton, T.M. & Wyneken, J. (2105). Body Condition Scoring the Sea Turtle. <http://lafeber.com/vet/body-condition-scoring-the-sea-turtle/>

Owens, D.W. (1997). Hormones in the life history of sea turtles. In: Lutz, P. L. & Musick, J. A. Editors. *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, Boca Raton, Florida. Pp. 315–341.

Owens, D.W., Blanvillain, G., Alderson, J. & Segars, A. (2012). Endocrine based health and reproductive diagnostic protocols. In: Jones, T. T. & Wallace, B. P. editors. *Proceedings of the Thirty-first Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*. San Diego, California: NOAA Technical Memorandum NOAA NMFSSSEFSC-631; pp. 184–185.

Owens, D.W., Hendrickson, J.R., Lance, V. & Callard, I. P. (1978). A Technique for determining sex of immature *Chelonia mydas* using a radioimmunoassay. *Herpetologica*. 34: 270–273. <https://www.jstor.org/stable/3891551>

Saravia-Arguedas, A.Y., Vega-Bolaños, H., Vargas-Hernández, J.M., Suárez-Serrano, A., Sierra-Sierra, L., Tisseaux Navarro, A., Cambronero-Solano, S. & Lugioyo-Gallardo, G.M. (2021). Surface-Water Quality of the Gulf of Papagayo, North Pacific, Costa Rica. *Water*, 13(17): 2324. <https://doi.org/10.3390/w13172324>

Seminoff, J.A., Jones, T.T., Resendiz, A., Nichols, J.W. & Chaloupka M. (2003). Monitoring green turtles (*Chelonia mydas*) at a coastal foraging area in Baja California, Mexico: multiple indices describe population status. *Journal Marine Biology Association*. UK, 83: 1355-1362. <https://doi.org/10.1017/S0025315403008816>

Smith, J. M. & Price, G. R. (1973). The logic of animal conflict. *Nature* 246:15–18

Stevenson, R.D. & Woods, W.A. (2006) Condition indices for conservation: new uses for evolving tools. *Integrative and Comparative Biology*, 46(6):1169–1190. <https://doi.org/10.1093/icb/icl052>

Stewart, K.R. & Dutton, P.H. (2011). Paternal genotype reconstruction reveals multiple paternity and sex ratios in a breeding population of leatherback turtles (*Dermodochelys coriacea*). *Conservation Genetics*, 12:1101–1113. <https://doi.org/10.1007/s10592-011-0212-2>

Thomson, J.A., Burkholder, D., Heithaus, M.R. & Dill, L.M. (2009) Validation of a rapid visual- assessment technique for categorizing the body condition of green turtles (*Chelonia mydas*) in the field. *Copeia* 2, 251–255

Theissinger, K., FitzSimmons, N., Limpus, C., Parmenter, C. & Phillott, A. (2009). Mating system, multiple paternity and effective population size in the endemic flatback turtle (*Natator depressus*) in Australia. *Conservation Genetics*, 10:329–346. <https://doi.org/10.1007/s10592-008-9583-4>

Velez-Zuazo, X., Quiñones, J., Pacheco, A. S., Klinge, L., Paredes, E., Quispe, S. & Kelez, S. (2014). Fast growing, healthy and resident green turtles (*Chelonia mydas*) at two neritic sites in the central and northern coast of Peru: implications for conservation. *PLoS ONE*, 9(11): e113068. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0113068>.

Wallace, B.P., DiMatteo, A.D., Bolten, A.B., Chaloupka, M.Y., Hutchinson, B.J., Abreu-Grobois, F.A., Mortimer, J.A., Seminoff, J.A., Amorocho, D., Bjorndal, K.A., Bourjea, J., Bowen, B.W., Briseño Dueñas, R., Casale, P., Choudhury, B.C., Costa, A., Dutton, P.H., Fallabrino, A., Finkbeiner, E.M., Girard, A., Girondot, M., Hamann, M., Hurley, B.J., Lopez-Mendilaharsu, M., Marcovaldi, M.A., Musick, J.A., Nel, R., Pilcher, N.J., Troëng, S., Witherington, B. & Mast, R.B. (2011). Global conservation priorities for marine turtles. *Plos one*, 6 (9), e24510. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024510>

Wibbels, T. (2000). Determinación del sexo de Tortugas marinas en hábitats de alimentación. En Eckert, K.L., K.A. Bjorndal, F.A. Abreu-Grobois, y M. Donnelly, 2000 (Ed.) *Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas*. Grupo de Especialistas En tortugas Marinas UICN/CSE Publicación. No 4: 160-164 p.

Wibbels, T. (2003). Critical approaches to sex determination in sea turtles. In: Lutz, P. L., Musick, J.A. & Wyneken, J. editors. *The Biology of Sea Turtles Volume II*. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 103–134.

Wibbels, T., Owens, D.W., Licht, P., Limpus, C.J., Reed, P.C. & Amoss, M.S. (1992). Serum gonadotropins and gonadal steroids associated with ovulation and egg production in sea turtles. *General and Comparative Endocrinology*, 87: 71–8. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1624099>

Wibbels, T., Owens, D.W., Morris, Y.A. & Amoss M.S. (1987). Sexing techniques and sex ratios for immature loggerhead sea turtles captured along the Atlantic coast of the United States. In: Witzell WN, editor. Ecology of East Florida Sea Turtles Proceedings of the Cape Canaveral, Florida Sea Turtle Workshop. Miami, Florida: NOAA Technical Report NMFS 53; pp. 65–74.

Wood, J.R., Wood. F.E., Critchley, K.H., Wildt, D.E. & Bush, M. (1983). Laparoscopy of the green sea turtle, *Chelonia mydas*. *British Journal of Herpetology*, 6: 323–327.

Wright, L. I., Fuller, W. J., Godley, B. J., McGowan, A., Tregenza, T. & Broderick, A. C (2012a). Reconstruction of paternal genotypes over multiple breeding seasons reveals male green turtles do not breed annually. *Molecular Ecology*, 21:3625–3635. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05616.x>

Wright, L. I., Stokes, K. L., Fuller, W. J., Godley, B. J. and others. (2012b) Turtle mating patterns buffer against disruptive effects of climate change. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279: 2122–2127 <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.2285>

Yntema, C.L. & Mrosovsky, N. (1980). Sexual differentiation in hatchling loggerheads (*Caretta caretta*) incubated at different controlled temperatures. *Herpetologica*, 36: 33–36. <http://www.jstor.org/stable/3891850>.

## **CAPÍTULO II.** Proporción sexual de las tortugas verdes juveniles (*Chelonia mydas*) de Bahía Matapalito en el Pacífico Norte de Costa Rica

### **RESUMEN**

En años recientes se dio a conocer un importante sitio de alimentación para las tortugas marinas *Chelonia mydas*, ubicado en el Pacífico Norte de Costa Rica, con poco más de un kilómetro de diámetro, Bahía Matapalito (BM). La BM ha resultado de gran importancia al albergar a juveniles y adultos principalmente de las tortugas marinas *C. mydas* y *Eretmochelys imbricata*. Por lo que es imperativo conocer la proporción sexual y el estado de salud de la población de tortugas verdes juveniles presente en BM puesto que, son parámetros importantes que permiten estimar el crecimiento de la población y desarrollar estrategias efectivas de conservación en el sitio de alimentación. Por lo tanto, este estudio tuvo como objetivo principal conocer la proporción de sexos de los juveniles de *C. mydas* mediante la determinación del sexo de los individuos a través de la concentración de testosterona (T). Se utilizó un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) resultando que de un total de 33 juveniles (< 85 cm de LCC), se estimó el sexo de 22 hembras ( $39.7 \pm 23.9$  pg/mL) y 7 machos ( $2056.70 \pm 2461.8$  pg/mL). Además, fueron 4 individuos juveniles a los que no fue posible asignarles el sexo, dado que se situaron en el intervalo de los “indefinidos” ( $155.30 \pm 30.3$  pg/mL). La proporción sexual de los juveniles fue de 3.15:1 (H:M) mostrando un sesgo inclinado hacia las hembras. El índice de condición corporal mostró que todos los juveniles se encontraban en un muy buen estado nutricional (> 1.20). La estimación del sexo fue estimada mediante un modelo de regresión logística binaria, el cual se ajustó con individuos de sexo conocido reportados con anterioridad para la región, considerando como variables la edad, largo recto del caparazón y concentración de T, esta última resultó estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ).

### **PALABRAS CLAVE**

Costa Rica, Reptiles, Tortugas marinas, *Chelonia mydas*, Testosterona, ELISA, Proporción sexual.

## INTRODUCCIÓN

A lo largo de la costa del Pacífico Oriental, *C. mydas* se encuentra distribuida en aguas costeras principalmente de México (Alvarado & Figueroa, 1990), pero también en El Salvador (Márquez, 1990), Costa Rica (Blanco, 2010), Ecuador (Peña et al. 2009) y Perú (Velez-Zuazo & Kelez et al. 2010). Costa Rica posee la tercera colonia de anidación más importante de la región del OPO posicionando al Pacífico Norte costarricense como el área de anidación más importante para esta especie en el istmo centroamericano (Cornelius, 1976; Drake et al. 2003; Blanco et al. 2012a; 2012b; Santidrián Tomillo et al. 2015a; Fonseca et al. 2018). Las tortugas marinas son animales longevos con un ciclo de vida caracterizado por múltiples cambios de hábitat, incluido el uso directo de la tierra durante las actividades de anidación (McCauley et al. 2015), y zonas de forrajeo o sitios de alimentación donde se incorporan, después de un período de desarrollo en el océano, los ejemplares juveniles, abandonando el hábitat pelágico-oceánico e incorporándose a hábitats neríticos, cambiando su dieta y pasando a adquirir una alimentación bentónica (Bjorndal, 1980; Balazs, 1982; Musick y Limpus, 1997; Reich et al. 2007). Los juveniles pueden permanecer en los sitios de alimentación o forrajeo durante períodos prolongados de hasta 20 años (Limpus et al. 1994). Las áreas de alimentación de los juveniles y adultos se encuentran generalmente en aguas costeras con profundidades de 2 hasta 20 m, pero también se ha registrado modos de forrajeo en hábitats pelágicos (Seminoff et al. 2008, Zárata et al. 2015).

En el Pacífico Norte de Costa Rica se ha evidenciado la existencia de zonas de alimentación frágiles y no protegidas donde forrajean en su mayoría tortugas verdes y carey (*Eretmochelys imbricata*), encontrando tortugas verdes juveniles y adultos en cuatro lugares: Cabo Blanco, Punta Coyote y Bahía Matapalito en el Pacífico Norte y Golfo Dulce en el Pacífico Sur de Costa Rica (Heidemeyer et al. 2014; Chacón-Chaverri et al. 2015 a,b). Por otro lado, la información derivada de transmisores satelitales ha mostrado que las aguas de Costa Rica son un corredor biológico importante para la tortuga verde del Pacífico durante su migración post-anidatoria (Blanco et al. 2012a), ya que al menos una parte de la población del

Archipiélago de Galápagos transita por aguas costarricenses para llegar hasta sitios de alimentación en Nicaragua y Panamá (Seminoff et al. 2008).

La población de tortugas verdes de *Chelonia mydas* en el Pacífico está clasificada como en peligro de extinción por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, por sus siglas en inglés) y es considerada altamente vulnerable a la extinción (Seminoff, 2004). En la región del OPO, las tortugas verdes enfrentan una amplia gama de amenazas relacionadas con la baja e impredecible disponibilidad de recursos y presiones antropogénicas. Entre las más destacadas esta la pérdida de hábitat y la mortalidad tanto directa como incidental, además del saqueo de huevos en los nidos, la matanza de individuos adultos durante la anidación, la degradación del hábitat por el desarrollo y contaminación de playas de anidación y alimentación (Alvarado Díaz et al. 2001; Hays et al. 2003; Seminoff 2004; Fischer & Wolff 2006; Koch et al. 2006; Dapp et al. 2013; Senko et al. 2014); así como el calentamiento global y el aumento de la temperatura de las aguas del mar (Sarmiento-Devia et al. 2015). El calentamiento global representa una amenaza potencial para las diferentes especies en el planeta. Un grupo de especies que están expuestos directamente a esta amenaza son los reptiles con determinación del sexo dependiente de la temperatura (TSD) incluyendo todas las especies de tortugas marinas (Janzen et al. 1994; Mitchell & Jenzen, 2010). En estas especies el incremento de la temperatura puede conducir a proporciones de sexos sesgadas, que frente a la reducción de un sexo puede ocasionar dificultades para encontrar pareja, por lo tanto, a la imposibilidad de la reproducción y disminución de la población (Berec et al. 2001).

El sexo de todas las especies de tortugas marinas tiene una determinación dependiente de la temperatura de incubación, por lo que el sexado mediante la comparación de secuencias genéticas está excluido (Wibbels, 2000). Estos reptiles carecen de cromosomas sexuales y no se conocen diferencias genéticas consistentes entre machos y hembras (Valenzuela *et al.* 2003), por lo que es inherentemente difícil el uso de herramientas moleculares para este fin. El sexo se determina durante el tercio medio de la incubación, conocido como período

termosensible, durante el cual las temperaturas de incubación más frías producen machos y las temperaturas más cálidas producen hembras (Yntema & Mrosovsky, 1980; Mrosovsky & Pieau, 1991; Merchant-Larios, 1999). La información sobre la proporción de sexos obtenida durante largos períodos de tiempo puede ayudar a comprender los impactos del cambio climático global en las poblaciones (Fuller *et al.* 2013). Para el año 2100 se pronostica que la temperatura media global experimente un aumento de 2.6 °C (IPCC, 2014), amenazando las playas de anidamiento de un incremento en la temperatura de la arena ocasionando en las nidadas de tortugas marinas un posible incremento en la mortalidad de los huevos incubados y feminización de los neonatos, ya que, a mayor temperatura, más hembras son producidas (Morreale *et al.* 1982; Spotila *et al.* 1987).

Para conocer la proporción sexual de los animales es necesario tener conocimiento del sexo de los individuos que conforman la población, en el caso de las tortugas marinas, el sexo no se distingue en etapas inmaduras, solo se puede distinguir en los adultos, los machos porque tienen colas largas y musculosas en comparación con las hembras (Wibbels, 1999). Entre los métodos más frecuentes y certeros que se han utilizado para determinar el sexo de las tortugas marinas esta la laparoscopia (Wood *et al.* 1983), la cual se usa para observar el estadio de desarrollo gonadal, requiere de capacitación técnica y resulta sumamente invasiva. También se ha utilizado el examen histológico de las gónadas de tortugas varadas vivas o muertas (Maffucci *et al.* 2013), lo cual requiere del sacrificio del animal para obtener la muestra gonadal o la necropsia. Del mismo modo, está el análisis hormonal de la concentración de testosterona (T) en el plasma sanguíneo (Owens *et al.* 1978). Los niveles circulantes de T en las tortugas marinas se han medido generalmente mediante la técnica de radioinmunoensayo (RIA, Owens, 1997). Sin embargo, se ha estandarizado una técnica inmunoabsorbente ligada a enzimas para la medición de la testosterona (ELISA de T) que consiste en la utilización de un kit comercial, la metodología de la ELISA de T es preferible a RIA porque no requiere reactivos radiactivos, permisos especiales y equipos costosos (Owens *et al.* 2012). La técnica de inmunoensayo ELISA tiene un menor impacto negativo y con menos desafíos logísticos, ya que solo implica la recolecta de muestras de

sangre. Allen et al. (2015), demostraron que la técnica de ELISA de T para evaluación de testosterona, es una herramienta confiable y conveniente para la evaluación rápida del sexo de juveniles y adultos de *C. mydas* distribuidas en la Bahía de San Diego en California, pero no para hembras reproductivamente activas, ya que estas muestran niveles altos de esta hormona. A su vez, los mismos autores han realizado la comparación entre ambas metodologías, RIA y ELISA de T, encontrando una correspondencia del 97% entre las dos técnicas, por lo tanto, destacan que es confiable el uso de ELISA de T para la determinación del sexo de *C. mydas* y por ende la proporción sexual.

La evidencia hormonal existente de las tortugas marinas indica que, como en la mayoría de los vertebrados, los esteroides sexuales están estrechamente vinculados con los patrones reproductivos estacionales / anuales (Owens, 1997). En las hembras que anidan, la testosterona parece mostrar una ligera disminución con cada episodio de anidación, y es típicamente más baja después de la última puesta de la temporada (Owens, 1997; Whittier et al. 1997; Rostal et al. 1998). Morris (1982), presenta una correlación positiva entre la temperatura ambiente y los niveles de testosterona en organismos juveniles, reforzando la idea de que machos juveniles y subadultos con la edad segregan más testosterona. El rango de concentraciones de T para tortugas marinas machos y hembras, juveniles o adultos, puede variar entre especies e incluso entre sitios de alimentación dentro de una especie (Wibbles, 1999; Blanvillain, 2011). Aunque se ha expuesto un alto nivel de confianza en la clasificación del sexo de las tortugas marinas mediante perfiles hormonales, es necesario un enfoque que integre más estudios en los sitios de agregación. Por lo que es recomendable que esta medición vaya acompañado de algunos datos morfológicos como el tamaño del caparazón y la longitud de la cola, dado que la información sobre el estado reproductivo y el tamaño en la madurez sexual, mejoran en gran medida la interpretación de los resultados de los estudios de proporción de sexos (Allen et al. 2015).

Del mismo modo y relacionado a medidas métricas un parámetro de mucha utilidad para conocer indirectamente el estado de salud de una población es el

índice de condición corporal (ICC), una medida derivada de la relación existente entre el peso y la longitud recta del caparazón, la cual se ha utilizado como un predictor indirecto del estado nutricional o estado de salud de los organismos de múltiples especies silvestres (Bjorndal et al. 2000; Velez-Zuazo et al. 2014). La factibilidad de obtener el ICC y la información que puede brindar sobre el estado nutricional hace importante poder estudiar este parámetro en las zonas de alimentación de los individuos que habitan en estas áreas, porque estima de manera indirecta el estado de salud, pero también la disponibilidad de alimento en el sitio (Bjorndal et al. 2000), el éxito reproductivo, la supervivencia y por ende la dinámica poblacional de los organismos (Jones et al. 1999; Stevenson & Woods, 2006). En diferentes estudios realizados en diferentes sitios de alimentación del OPO (desde América del Norte a América del Sur) se ha evaluado el ICC y subjetivamente se considera que si los individuos muestran valores superiores a 1.20 de ICC se puede indicar que se encuentran en una “muy buena” condición nutricional (Thomson et al. 2009; Flint et al. 2009), pero un valor de ICC menor a 1.00 permitiría vislumbrar una “pobre” condición nutricional en las tortugas marinas. Álvarez et al. (2017) ha reportado valores superiores entre 1.19 y 2.02 en juveniles de *C. mydas* que se encuentran en zonas de alimentación de Bahía Salado en Chile, mientras que Seminoff et al. (2003) han obtenido un ICC de  $1.42 \pm 0.02$  para tortugas verdes en la península de Baja California en México; a su vez Koch et al. (2007) estimaron valores de  $1.35 \pm 0.13$  en Bahía Magdalena, México; y Vélez-Zuazo et al. (2014) de 1.50 para tortugas verdes en El Ñuro y Paracas, Perú.

Conocer algunos parámetros demográficos como tasas de crecimiento, sobrevivencia, reclutamiento, edad reproductiva y la proporción sexual de cada población es esencial para el desarrollo de modelos poblacionales con propósitos de conservación y manejo de especies clasificadas como amenazadas (Owens, 1997). Por consiguiente, en un contexto de conservación para las tortugas marinas hay una necesidad apremiante por obtener mayor información acerca de su demografía y la proporción de sexos. Este parámetro estima el estatus y la dinámica de la población y los resultados permiten fomentar estrategias efectivas de conservación y un mejor manejo de la especie (Eckert et al. 2000). Además, la

información sobre la proporción de sexos obtenida durante largos períodos puede ayudar a predecir los impactos del cambio climático global en las diferentes poblaciones de tortugas marinas. Hawkes et al. (2007) sostienen que el aumento de temperatura en las playas de anidación podría estar feminizando poblaciones de tortugas marinas y que, de ser ciertos dichos pronósticos, el calentamiento global del planeta se perfila como un riesgo para estas especies. Ciertamente muchos son los esfuerzos para conocer los cambios en las proporciones de sexo de estos reptiles, pero a menudo se centran en las playas de anidación, donde el sexo se infiere mediante la temperatura de la arena del nido o el examen de histología gonadal y debido a la baja supervivencia después de la eclosión, no está claro hasta qué punto se conserva la proporción de sexo en las siguientes etapas. Por lo tanto, estudiar la proporción de sexos en zonas de forrajeo o de alimentación, donde se congregan tortugas de diferentes etapas ontogénicas puede brindar mayor comprensión de la proporción funcional de sexos de una población.

En consecuencia, el presente estudio ha tenido dos objetivos principales, el primero: conocer el estado nutricional de las tortugas verdes que habitan en una zona de alimentación del Océano Pacífico Norte de Costa Rica, con una considerable frecuencia de juveniles de *C. mydas*, Bahía Matapalito. Esta medida fue estudiada a través del ICC, dado que no hay evidencia de esta evaluación para este sitio de alimentación, y resulta importante conocer si los individuos podrían estar en condiciones nutricionales apropiadas para continuar con su desarrollo ontogénico y si indirectamente podrían contar con los recursos alimentarios necesarios. Así mismo, otro de los objetivos de este estudio ha sido estimar la proporción sexual de las tortugas verdes juveniles presentes en esta área de forrajeo mediante la técnica ELISA de T, que ya ha sido evaluada y estandarizada con anterioridad en una población de la misma región del OPO. De igual forma la obtención de las concentraciones hormonales en adultos de estas tortugas marinas, permitirá reforzar los valores de referencia reportados en esta hormona para la especie, de modo que ayudará a conocer más sobre el comportamiento hormonal en estas etapas ontogénicas de los individuos de *C. mydas*. Por lo tanto, toda la información obtenida en este proyecto, resulta relevante para la formulación de

futuras estrategias, gestiones de conservación y mejoras en el manejo de estos individuos en la zona del Pacífico Norte de Costa Rica, especie que, como se mencionó al inicio, desde hace algunos años se encuentra amenazada de peligro de extinción.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Sitio de estudio y muestreo.**

En este estudio se realizaron múltiples giras de campo de manera irregular entre marzo del 2018 y julio del 2021, durante el 2020 no fue posible realizar las giras planeadas debido a las restricciones provocadas por la pandemia del SARS-CoV-2. Estas giras de campo permitieron la recopilación de la información morfométrica de cada individuo de *C. mydas*, así como la toma de sangre y tejido en la aleta para sus respectivos análisis en laboratorio. Todos los juveniles de tortugas verdes, así como los adultos capturados en agua son provenientes de Bahía Matapalito (BM), ubicado en el Pacífico Norte de Costa Rica. BM (10 ° 56' 06" N, 85 ° 47' 42" W) está ubicado al este de la entrada a Bahía Santa Elena, que consiste en una pequeña entrada de menos de un kilómetro de diámetro (figura 1). En la bahía se observa el fondo arenoso con parches de coral dispersos hacia el este, hacia el oeste el fondo alberga una gran comunidad de arrecifes de coral que está parcialmente expuesta durante la marea baja y que se extiende hasta la vecina Bahía de Santa Elena. El sitio está sujeto a una alta presión pesquera por parte de comunidades pesqueras cercanas (Heidemeyer *et al.* 2014).

Capturamos las tortugas verdes a mano durante inmersiones de buceo en zonas someras (5-10 m de profundidad) a lo largo de BM, se usaron redes de enmalle y fueron colocadas en el agua y monitoreadas durante todo el muestreo en campo. Las tortugas fueron trabajadas a bordo de la embarcación y de no contener etiquetas, fueron marcadas con tags metálicos, aplicados en la segunda escala de cada aleta delantera. Una vez capturados usamos la medida de la longitud curva

del caparazón (LCC) para estimar el estado de madurez. Antes de realizar las mediciones morfométricas, extrajimos muestras de sangre del seno cervical (volumen máximo  $\leq 3$  ml/kg) colocando las tortugas en posición esternal con la cabeza dirigida hacia abajo para facilitar la extracción de sangre, usamos agujas de 1.5 pulgadas calibre 21, desinfectamos el sitio de punción con alcohol al 70%. Depositamos la sangre obtenida en tubos de heparina de litio de 4 ml (Vacuette®). Al final del trabajo de campo, se obtuvo el plasma de cada individuo, centrifugamos a 3000 rpm, durante 10 min. El plasma fue separado en alícuotas de 500  $\mu$ l en crioviales (Corning Inc.) y almacenado en un tanque con nitrógeno líquido mientras se trasladaba al Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular en donde se mantuvieron resguardados a  $-80$  °C hasta la realización del ensayo. Los permisos de este estudio han sido otorgados por Sistema Nacional de Áreas de Conservación (SINAC) R-SINAC-ACG-PI-042-2019 y la Comisión de Biodiversidad No. 206-2019.

### **Índice de condición corporal y LRC.**

El índice de condición corporal (ICC) fue calculado mediante la relación del largo recto del caparazón (LRC) y el peso corporal, denominada ecuación K de Fulton:  $ICC = \frac{\text{Peso corporal}}{LRC^3} \times 10000$  (Bjorndal & Bolten, 2010). Este índice fue usado como un indicador indirecto del estado nutricional o condición de salud del animal (Bjorndal et al. 2000; Velez-Zuazo et al. 2014). Fue necesario hacer la conversión de la LRC a partir de la longitud curva del caparazón (LCC) usando la ecuación  $LRC = \frac{LCC - 0.64}{1.06}$  usando la fórmula de Eguchi et al. (2012) aplicadas para *C. mydas*. El LCC de cada individuo se obtuvo mediante la medición realizada durante los monitoreo de campo a través de una cinta flexible. Con el fin de proporcionar un contexto para los valores obtenidos del ICC, se calculó el promedio en cada sexo y además se comparó con los criterios de categorización del ICC reportados por Thomson et al. 2009; Flint et al. 2009 & Norton & Wyneken, 2015. Estudios en donde se consideró que los animales con ICC superiores a 1.20 se encontraban en “muy buenas” condiciones, los que tenían un ICC entre 1.11 y 1.19 estaban en “buenas”

condiciones, los que estaban entre 1.00 y 1.10 eran “promedio” y los que se encontraban por debajo de 1.00 como “pobre”.

Las tortugas fueron clasificadas como juveniles o adultos de acuerdo al tamaño medio de anidación (TMA) publicados en estudios de las poblaciones de tortugas verdes a lo largo del Pacífico de Costa Rica, el cual se estima que es de 85 cm (Fonseca et al. 2013). Por lo tanto, se consideraron juveniles a los individuos con  $LCC < TMA$  y adultos a las tortugas verdes con  $LCC > TMA$  (Seminoff et al. 2002a) a excepción de un macho adulto que tenía 84 cm de LCC, pero 43 de total de cola y todas las evidencias morfológicas del mismo sexo.

### **Extracción de la Hormona.**

La extracción de testosterona estuvo apegada al protocolo indicado por Wibbels et al. (1987). De manera breve, se depositaron alícuotas de 500  $\mu$ L de plasma en tubos de vidrio agregando 4 ml de éter etílico anhidro (Merck KGaA, Alemania) para extraer T del plasma (T puede estar unido a proteínas en la sangre). Luego cada tubo de vidrio (con plasma y éter) fue colocado en nitrógeno líquido en donde la capa de plasma se congelo y la capa de éter (que contiene las hormonas) se decantó a un nuevo tubo de vidrio y se secó bajo una corriente constante de gas nitrógeno (~ 20 min). Las muestras fueron reconstituidas con 1,1 ml de acetona al 100% (Merck KGaA, Alemania) para aumentar la eficiencia de extracción (o recuperación de T de la muestra). Después de la reconstitución de acetona, alícuotas de 1 ml se secaron al aire durante la noche (~ 16 h) y se reconstituyeron en 250  $\mu$ l de solución salina tamponada con fosfato 0,01 M (PBS) con albúmina de suero bovino al 0,1% (BSA, Amresco, Solon, OH), agitándolos en vórtex durante 15 min y luego incubando en un baño de agua durante 30 min a 4 °C.

### **Testosterona ELISA.**

Para la determinación de concentración de testosterona (T) se utilizó un kit T ELISA disponible comercialmente (Catálogo # ADI-900-065, ENZO Life Sciences,

Plymouth, PA), cada muestra de plasma extraída y todas las muestras se cuantificaron por duplicado. Los estándares ( $n = 7$ ) de concentración de T conocida (7.81–2,000 pg / ml) se prepararon de acuerdo con el protocolo del kit de ensayo usando PBS (con BSA) y, por lo tanto, PBS (con BSA) se usó como 'cero' (B0) estándar. Según la casa comercial, el kit de T ELISA, (ENZO Life Sciences, Plymouth, PA) tiene 100% de reactividad con testosterona, 14,64% de reactividad con 19-hidroxitestosterona, 7,20% de reactividad con androstenediona, 0,72% de reactividad con dehidroepiandrosterona, 0,40% de reactividad con estradiol, así como <0,001% de reactividad cruzada con estriol, corticosterona, cortisol, cortisona, estrona, progesterona y pregnolona. Fue medida la densidad óptica para la estimación de T mediante un espectrofotómetro Multiskan FC (Thermo Scientific) a 405 nm. Los resultados de las concentraciones de T se calcularon utilizando un programa de ajuste de curvas logísticas de cinco parámetros (My assays online).

Para obtención de la proporción sexual se utilizó la fórmula 1:

$$P = \frac{A}{B} \quad (1)$$

Donde:

**A**= número de hembras y **B**= número de machos

### **Análisis estadístico.**

Se realizó estadística descriptiva mediante el software Minitab ® 20.4, en donde se indicaron las medias, desviaciones estándar, intervalos máximos y mínimos para cada sexo de los juveniles de tortuga verde según la asignación de sexo que se realizó mediante los intervalos de referencia testosterona obtenidos en la misma especie en estudios previos de Allen et al. (2007, Tabla 4).

Se utilizó un modelo de regresión logística binomial para discernir el sexo de cada juvenil de *C. mydas*, el cual fue diseñado y automatizado en R por Flores-Mora, (2021), el modelo fue ajustado usando valores de concentración de testosterona de juveniles y adultos de tortugas verdes con sexo conocido,

publicados por Allen et al. 2015 (tabla 4), en donde se empleó la misma técnica para obtener T que se realizó en este estudio. El modelo de regresión logística se ajustó utilizando la función `glm()` (función del modelo lineal generalizado) en R (versión 3.5.2). Un argumento en la función "glm" es "familia", y elegimos la "familia binomial" que se caracteriza por una función de enlace. La función de enlace predeterminada para la familia binomial es "logit" y la evaluación de la salida de la regresión es el logaritmo de la razón de probabilidades (logit) y se da como  $\log(P / (1-P))$ , donde P es la probabilidad de clasificación como "macho" y el denominador (1-P) es la probabilidad de clasificación como "Hembra" y, por lo tanto, el término "razón de posibilidades". La salida general de la función `glm` tiene la forma  $a + b * x$ , donde a, b y x representan la constante, el coeficiente y el valor de la variable predictora, respectivamente. La clasificación de datos, el clasificador, la curva ROC (*En sus siglas en inglés, receiver operating characteristic curve*) y cualquier otro código requerido para el modelo se realizó utilizando funciones integradas nativas de R sin la ayuda de paquetes adicionales, lo que garantiza que cualquier plataforma R o R-Studio estándar pueda ejecutar la secuencia de comandos (Flores-Mora, 2021). El punto de corte óptimo se seleccionó de acuerdo con Soureshjani & Kimiagari, (2013), mientras que el AUC se calculó mediante la regla trapezoidal lineal. Con el propósito de minimizar el error al estimar el AUC y el corte óptimo, se seleccionó la partición de corte en un óptimo 1/2000. El guion está disponible como material complementario o bajo pedido.

## RESULTADOS

Durante 27 salidas de campo a Bahía Matapalito entre los años 2018 y 2021 se recolectaron los datos de un total de 44 tortugas de *C. mydas* con LCC entre 45-92 cm ( $72.21 \pm 13.35$  cm, prom  $\pm$  SD). Los individuos juveniles capturados se encontraban en reposo o alimentándose en las inmediaciones de la Bahía, los adultos en su mayoría fueron capturados mediante la red de enmalle. Del total de organismos muestreados, 33 fueron juveniles y 11 adultos. A su vez se obtuvieron

8 muestras de plasma de las tortugas anidadoras en la Isla San José con LCC entre 82-96 cm ( $87.21 \pm 5.31$  cm, prom  $\pm$  SD).

### **Índice de condición corporal.**

El índice de condición corporal (ICC) es una medida derivada de la relación existente entre el peso y la longitud de un organismo. A partir de esta relación se calculó del ICC de las tortugas verdes juveniles de BM, para la estimación de este parámetro fue necesario el cálculo de la longitud recta del caparazón (LRC) mediante el LCC de cada individuo de tortuga verde juvenil ( $67.62 \pm 11.65$  cm, prom  $\pm$  SD) y adultos capturados en agua ( $87.81 \pm 2.09$  cm, prom  $\pm$  SD). En lo que respecta a las hembras adultas capturadas en agua el LRC obtenido fue de  $87.38 \pm 2.16$  cm (prom  $\pm$  SD) y para los machos adultos de  $82.22 \pm 5.05$  cm (prom  $\pm$  SD).

En el caso de las *C. mydas* juveniles de este estudio la asignación del sexo de fue estimada mediante los niveles de concentración de testosterona encontradas en estos individuos para este grupo de edad. Por lo tanto, se observó que el LRC las hembras juveniles se encontraban en un intervalo (mínimo-máximo) de 41.85-79.11 cm ( $63.67 \pm 10.44$  cm, prom  $\pm$  SD), mientras que los machos juveniles se observaron relativamente más pequeños que las hembras con un intervalo de 43.73-77.32 cm ( $62.78 \pm 13.04$  cm, prom  $\pm$  SD). En relación con el ICC se obtuvo  $1.42 \pm 0.22$  y  $1.53 \pm 0.44$  (prom  $\pm$  SD) para hembras y machos juveniles, respectivamente. A pesar de que los intervalos de esta condición (ICC) fueron diferentes en ambos sexos, 1.16-2.22 (prom  $\pm$  SD) para hembras juveniles y 1.12-2.71 (prom  $\pm$  SD) para los machos de esta misma edad. Por lo tanto, el ICC estimado para ambos sexos favoreció a los machos juveniles (Tabla 5), pero en ambos casos se obtuvo una “óptima” condición de estado nutricional (ICC > 1.20 según la categorización de Thomson et al. 2009; Norton & Wyneken, 2015)

**Tabla 5.** Media  $\pm$  SD e intervalos del Índice de condición corporal (ICC) de tortugas verdes (*C. mydas*) del Pacífico Norte de Costa Rica en diferentes grupos de edad.

	JUVENILES		ADULTOS	
	Hembra	Macho	Hembra	Macho
<b>ICC</b>	1.42 $\pm$ 0.22	1.53 $\pm$ 0.54	1.22 $\pm$ 0.09	1.18 $\pm$ 0.23
<b>INTERVALO DE ICC</b>	1.16 – 2.22	1.12 – 2.71	0.97 – 1.22	1.02 - 1.36
<b>N</b>	22	7	9	2

### Proporción sexual de juveniles de tortuga verde de BM.

Primeramente, se obtuvieron los niveles de concentración de testosterona (T) de todas las tortugas verdes de BM, incluyendo adultos y juveniles, clasificando el sexo de los juveniles mediante los niveles de referencia de T para este grupo de edad obtenida por Allen et al. 2015, en donde asignaron como hembras a las que presentaban concentraciones entre 4.1-113.1 pg/mL, como machos a los de 198.4-2613 pg/mL y se nombraron “Desconocidos” a los que no se encontraron dentro de los valores de concentración de T de ambos sexos (113.2-198.3 pg/mL). Por lo tanto, como se muestra en la tabla 6 y según la clasificación antes mencionada obtuvimos 22 hembras juveniles [39.7  $\pm$  23.9 pg/mL (prom  $\pm$  SD)] con un intervalo de 15.83-104.7 pg/mL de T, 7 machos juveniles [2056.70  $\pm$  2461.8 pg/mL (media  $\pm$  SD)] en un intervalo de 237.19-7494.6 pg/mL de T y 4 individuos “desconocidos” con una concentración de T de 155.30  $\pm$  30.3 pg/mL (media  $\pm$  SD) en un intervalo de 121.29-192.90 pg/mL (Figura 4).

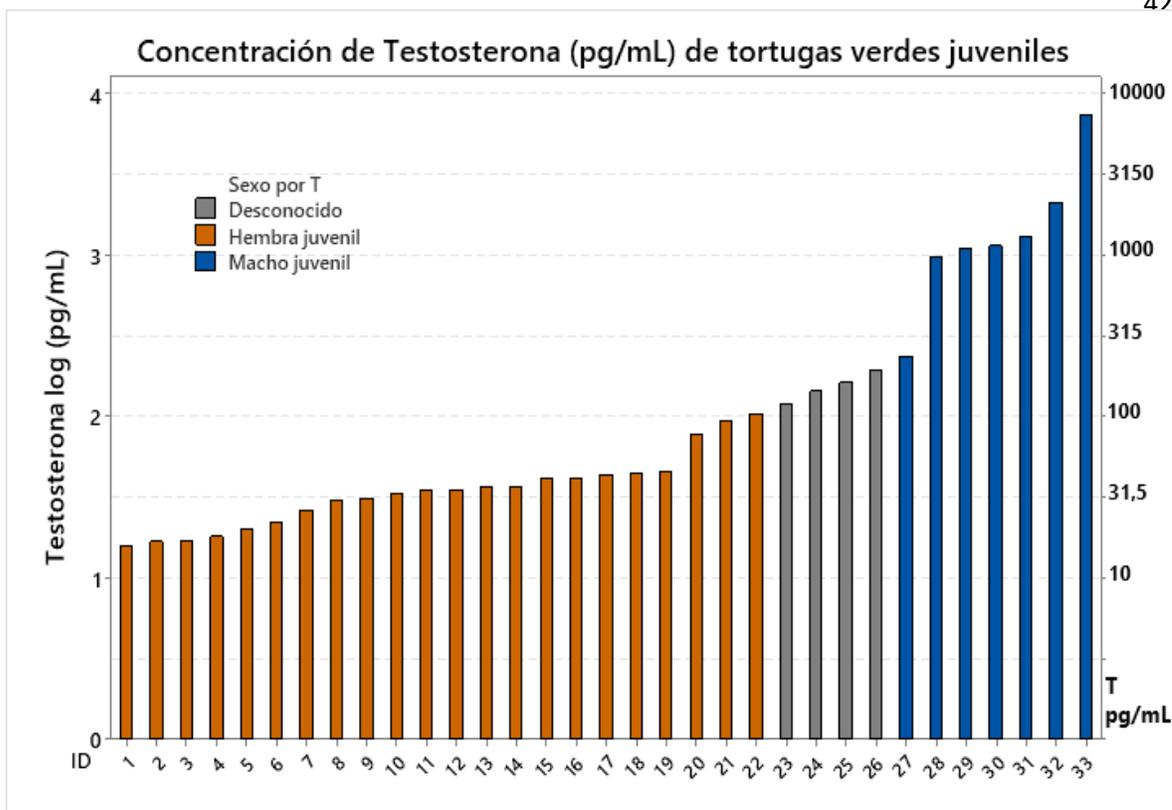


Figura 4. Concentraciones de testosterona log y testosterona (pg/mL) de juveniles de tortugas verdes (*C. mydas*) que se encontraban forrajeando en Bahía Matapalito en el Pacífico Norte de Costa Rica. El estado de madurez ha sido clasificado de acuerdo al tamaño de largo curvo del caparazón (LCC).

Además, se obtuvieron las concentraciones de T de los adultos de *C. mydas*, los cuales, pese a que ya era “conocido” el sexo de cada individuo, sirvió para poder ajustar el modelo de regresión logística junto con los individuos que reportaron Allen et al. 2015, en total fueron 19 adultos, de los cuales resultaron 9 hembras adultas capturadas en agua [ $72.20 \pm 28.6$  pg/mL (media  $\pm$  SD)] en un intervalo de 17.74 – 114.6 pg/mL, 8 hembras anidadoras [ $50.87 \pm 37.66$  pg/mL (media  $\pm$  SD)] en un intervalo de 5.87 – 114.48 pg/mL y 2 machos capturados en agua de 101.94 - 481.90 pg/mL, el total de las tortugas analizadas en este estudio, entre juveniles y adultos se puede apreciar en la figura 5.

Para conocer si la asignación de sexos se realizó correctamente mediante el intervalo de referencia de T (Allen et al. 2015) se realizó una regresión logística binaria, en donde se ajustó el modelo únicamente con individuos de sexo conocido, por lo tanto, se usaron 69 juveniles y 25 adultos entre machos y hembras de estudio realizado por Allen et al. 2015 y 19 adultos evaluados en este ensayo.

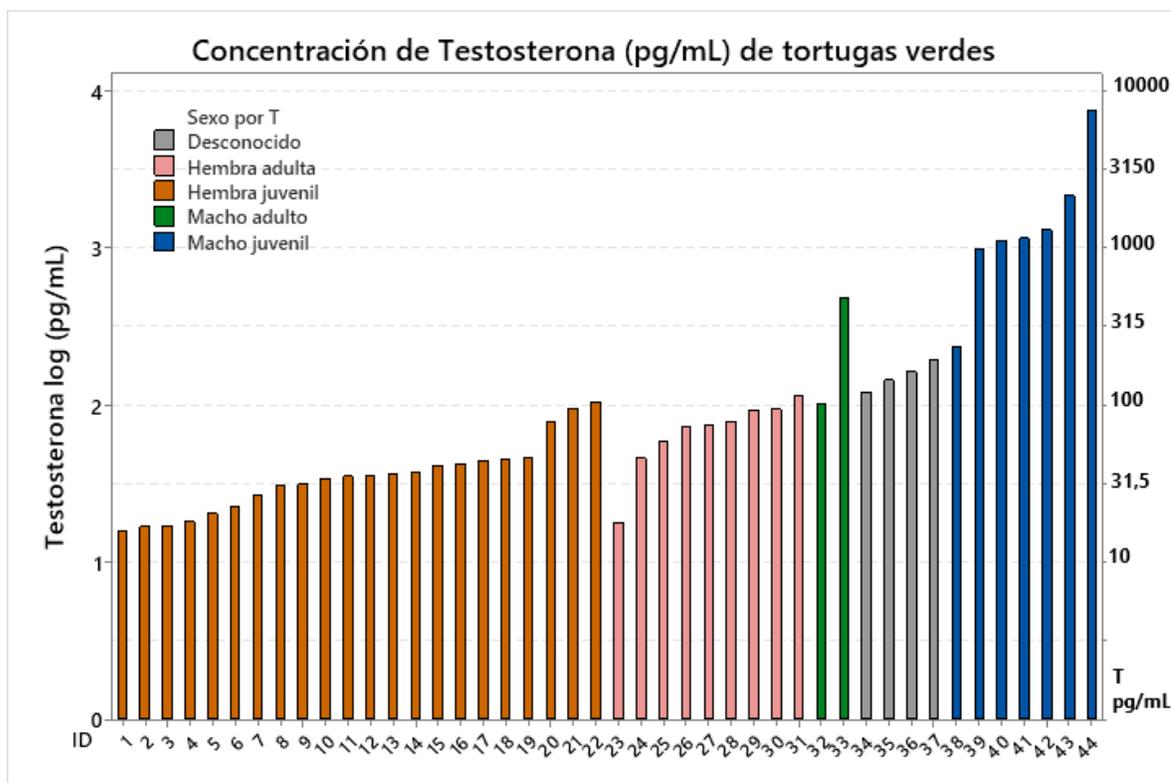


Figura 5. Concentraciones de testosterona (pg/mL) de muestras de plasma obtenidas en machos y hembras de tortugas verdes (*C. mydas*) de diferentes grupos de edad que se encontraban forrajeando en BM en el Pacífico Norte de Costa Rica. El estado de madurez ha sido clasificado de acuerdo al tamaño de largo curvo del caparazón (LCC).

### Asignación de sexo a través de regresión logística

En la tabla 7 se indican los coeficientes de regresión logística binaria, en donde los datos de entrenamiento o ajuste de modelo estuvieron conformados únicamente por individuos en donde el sexo era conocido. Para el modelo se utilizaron 113 tortugas verdes en donde 44 fueron adultos y 69 eran juveniles, distribuidos en 73.45% de hembras y el 26.55% de machos (Figura 6). Se realizaron diferentes formas de entrenar el modelo, por ejemplo, solo con los individuos juveniles conocidos, o incluso solo con los individuos del estudio de Allen et al. (2015) y fue cuando se ajustó con las 113 tortugas verdes que el criterio de información de Akaike (AIC) obtuvo el puntaje más bajo (29.87) y el punto de corte de la curva ROC fue de 74.20 % (figura 7). La curva ROC es un parámetro que sirve para evaluar la bondad de la prueba, que mientras más cercano sea a 1 (100%) pero no menor a 0.5 (Hanley & McNeil, 1983), mayor es la confianza en esta prueba,

es decir, la probabilidad de que la prueba clasifique correctamente el sexo de los juveniles de *C. mydas*. El valor de ROC en esta prueba nos indica que es adecuada para la estimación del sexo de estos individuos de tortuga verde.

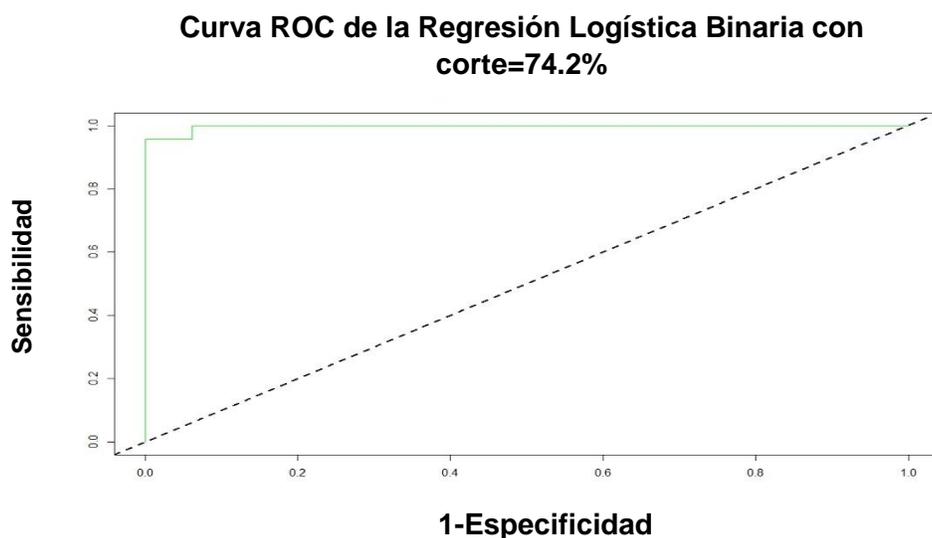


Figura 7. Curva ROC de la regresión logística binaria de muestras de concentración de testosterona de *C. mydas*.

La ecuación de la regresión logística de obtenida en este modelo fue  $\text{sexo} = \text{edad} + \text{LRC} + \text{Testosterona}$  ( $\text{Sexo} = 0.26 - 0.05 + 6.19$ ) (tabla 7). De las tres variables mencionadas, fue la concentración de testosterona la que resulto estadísticamente significativa ( $< 0.01$ ). La predicción del sexo de los juveniles de BM realizada a través del modelo de regresión logística coincide al 100% con la realizada mediante la asignación de sexos de los intervalos de concentración de testosterona expuesta por Allen et al. (2015) para las tortugas verdes juveniles de la Bahía de San Diego en California en USA.

**Tabla 7.** Coeficientes de regresión logística binaria del ajuste de modelo de juveniles y adultos de *C. mydas* calculado en R. Todos los individuos utilizados en el ajuste son de sexo conocido.

<b>Coeficientes de regresión logística de tortugas <i>C. mydas</i></b>			
	<b>Estimate</b>	<b>Std. Error</b>	<b>P</b>
<b>Intercept</b>	-10.7670	4.4545	<b>&lt; 0.05</b>
<b>Edad</b>	0.2644	1.8140	> 0.05
<b>SCL (cm)</b>	-0.0491	0.0474	> 0.05
<b>Testosterone log (pg/mL)</b>	6.1936	1.5553	<b>&lt; 0.01</b>

**AIC: 29.87**

**ROC: 74.20 %**

## DISCUSIÓN

Bahía Matapalito está caracterizado por un fondo arenoso y extensas formaciones de arrecifes de coral adyacentes que conecta la Bahía durante las mareas altas con la Bahía San Elena al oeste. En la zona se ha observado la presencia de tortugas verde y carey cubiertas por diferentes especies de cirrípedos y algas. Además de observar a estos reptiles descansando debajo de formaciones de corales a lo largo de la línea exterior que limita el arrecife desde el tramo arenoso, exponiendo el extremo posterior de su caparazón (Heidemeyer et al. 2014). Múltiples giras de campo a la zona de forrajeo entre marzo del 2018-Julio 2021 permitieron la captura de 33 tortugas verdes juveniles, el LCC de los juveniles de *C. mydas* encontrado en este estudio ( $67.62 \pm 11.65$ ) resultó parecido a lo encontrado en esta especie en los sitios de forrajeo de Punta Coyote y Cabo Blanco ( $69.40 \pm 9.40$  y  $67.67 \pm 19.44$  de LCC, respectivamente) al sur del Océano Pacífico en Costa Rica (Heidemeyer et al. 2014), sitios que están dominados por tortugas verdes juveniles y que presentan individuos cercanos al tamaño adulto como también se observa en este estudio. Del mismo modo, en Golfo Dulce (Pacífico sur de Costa Rica), una importante zona de alimentación para diferentes especies de tortugas marinas, incluida la tortuga verde del Pacífico Oriental (Chacón-Chaverri et al. 2015a; Méndez-Salgado et al. 2020) se ha observado con frecuencia la presencia de juveniles y subadultos (LCC entre 38-88cm), encontrándose un alto porcentaje de subadultos (78.8 %) (Howell et al. 2021). Si en este estudio clasificáramos los grupos de edad siguiendo a Howell et al. (2021) al sur de Costa Rica, obtendríamos que el 56.80 % de los individuos capturados en BM serían subadultos (<88 cm de LCC), además de que el 90 % de las tortugas verdes capturadas en la Bahía estarían conformados por juveniles y subadultos, lo cual seguiría mostrando una alta frecuencia de tortugas verdes juveniles en este sitio de alimentación. Esta distribución de tamaños en estos juveniles de *C. mydas* posiblemente pudieran reflejar sitios de alimentación de desarrollo dominado por subadultos cercanos a la madurez (Meylan et al. 2011). Por otro lado, en Bahía Salado, al norte de Chile se reportó una agregación compuesta únicamente por juveniles donde los tamaños

variaron entre 54-83.1 cm de LCC (Álvarez et al. 2017), muy similares a los encontrados en este estudio, que, si bien la población de BM no está compuesta de una sola especie de tortuga marina y únicamente por juveniles, hay un alto porcentaje de los individuos (90 %) que si pertenecen a este grupo de edad. Las clases de tamaño observadas en este estudio, no únicamente son similares a las encontradas en el Pacífico sur de Costa Rica, sino que son consistentes con la estructura demográfica de otros sitios de alimentación reportados para la región (OPO) como Baja California, las Islas Galápagos, al sur de Perú en Paracas y al Norte y Sur de Chile en playa Chinchorro y Bahía Mejillones, respectivamente (Seminoff et al. 2003; Vélez-Zuazo et al. 2014; Veliz et al. 2014 & Donoso et al. 2016).

El ICC ha sido ampliamente utilizado como referencia al estado de salud en especies silvestres como la tortuga verde (Bjorndal et al. 2000; Labrada-Martagón et al. 2010). En relación con las tortugas verdes juveniles de BM se observaron valores promedio de ICC  $1.42 \pm 0.32$ , el cual fue superior al valor categorizado como una “muy buena” condición nutricional ( $ICC > 1.20$ , Thomson et al. 2009; Flint et al. 2009 & Norton & Wyneken, 2015). Lo anterior podría poner de manifiesto, indirectamente, que la población mantiene un muy buen estado de salud y el hábitat adecuado para su alimentación en torno a las zonas de forrajeo donde migra (Bjorndal et al. 2000; Velez-Zuazo et al. 2014). Es decir, que un animal con una buena condición nutricional se considera tendrá mejores reservas energéticas para hacer frente a las demandas de un crecimiento oportuno en comparación con uno en malas condiciones de este indicador (Sterling et al 2013). Los resultados de nuestro estudio coinciden a los reportados para la región del Océano Pacífico Oriental, fueron muy similares a los reportados por Seminoff et al. (2003) donde reportaron un ICC de  $1.42 \pm 0.02$  para las tortugas verdes en Baja California, México y ligeramente superiores a los observados por Koch et al. (2007) de Bahía Magdalena en el mismo país ( $1.35 \pm 0.13$ ). Por otro lado, el ICC de las tortugas verdes de este ensayo fue relativamente menor en comparación con los obtenidos en “El Ñuro” y “Paracas” (1.50 de ICC) en Perú (Vélez-Zuazo et al. 2014) e incluso a los señalados en Bahía Salado al norte de Chile ( $1.66 \pm 0.25$ ) los cuales han sido

exhibidos como los valores más altos de ICC para las poblaciones de alimentación al sur de OPO (Álvarez et al. 2017). Por lo tanto, los resultados observados en el ICC de estas tortugas sugieren la disponibilidad de alimento en toda su ruta migratoria, pero también que BM podría constituir un hábitat favorable para esta especie de tortuga marina. La buena condición nutricional mostrada por estos inmaduros de tortuga verde, además de su frecuencia en BM podría estar indicando que el ecosistema local puede ser de gran importancia para su desarrollo, por lo que se destaca la importancia de conservar los factores bióticos y abióticos asociados en la zona.

Por otro lado, un factor ambiental que puede tener influencia en esta especie ectodermo y afectar el comportamiento de este organismo, es la temperatura (Spotila et al. 1997; Seminoff, 2000; Nichols, 2003; Koch et al. 2007). Seminoff et al. 2008 ha sugerido que aguas  $\leq 25$  °C pueden representar el umbral térmico por debajo del cual las hembras adultas migratorias evitan activamente las aguas superficiales en el OPO. No obstante, los umbrales térmicos para las tortugas verdes juveniles en la región siguen siendo poco conocidos (Álvarez et al. 2017). Se ha observado que las tortugas juveniles en Bahía Magdalena son menos activas y forrajean durante invierno a los 18 °C (Koch et al. 2007), algo similar podría ocurrir a los juveniles de la Bahía de San Diego en California, pero a temperaturas entre 12.8-18.3 °C durante el invierno (Allen et al. 2015) en donde se observa una menor cantidad de individuos. De igual manera que en Bahía Salado en Chile en donde la temperatura del mar desciende por debajo de los 13 °C durante la temporada fría, pero se puede encontrar tortugas activas durante todo el año (Brito et al. 2007; Álvarez et al. 2017). En BM todas las tortugas verdes pudieran estar expuestas a temperaturas alrededor de 28 °C entre mayo y noviembre y de 23 °C entre diciembre y abril (Jiménez 2001; Alfaro et al. 2012). Debido a los eventos de surgencia, en BM la temperatura superficial de agua de mar podría reducirse hasta 7 °C de la temperatura promedio (Stuhldreier et al. 2015), incluso estudios más recientes en el Pacífico Norte de Costa Rica (Golfo de Papagayo) evidenciá que la temperatura en ambas temporadas ha incrementado relativamente entre 26.51 y 29.29 °C (Saravia-Arguedas et al. 2021). En este estudio, nosotros observamos que la frecuencia de

los juveniles de tortugas verde fue igual en ambas temporadas, tanto en los meses donde la temperatura fluctuó a 28 °C como a 22 °C. No obstante, en el caso de las hembras adultas de *C. mydas* el patrón de comportamiento fue distinto, pues se encontraron más individuos en la temporada donde la temperatura superficial de agua de mar estaba a más caliente ( $> 25$  °C) lo cual coincide con lo observado por Seminoff et al. 2008 para este grupo de edad.

En efecto, la temperatura juega un papel muy importante en la vida de todo ser vivo, y la estación en la cual se obtiene la muestra de plasma podría influenciar en los niveles de concentración de T. No obstante, en la Bahía de San Diego en California, la investigación sobre si la recolección de plasma en diferentes estaciones del año y temperatura de agua de mar (12.8-26.4 °C) podría tener un efecto sobre la concentración de T, no mostró un fuerte patrón por lo que sugiere que no hubo un efecto estacional para esta hormona (Allen et al. 2015). A su vez, es necesario la recolección de muestras repetidas de los mismos individuos dentro de por lo menos un año para poder observar si existe alguna variación en la concentración de T en diferentes estaciones (Allen et al. 2015). No obstante, Kobayashi et al. (2010) realizaron la medición de T en juveniles de *E. imbricata* (carey) mes a mes durante dos años consecutivos, y si bien hubo una variación de esta hormona dependiendo del mes o estación, el patrón fue similar en ambos años, observando las más bajas o altas concentraciones en los mismos meses. En nuestro estudio la frecuencia de tortugas verdes juveniles se dio durante todo el año, sin mostrar una preferencia a las más bajas o altas temperaturas que se podrían observar en la Bahía (22-29.29 °C). Por lo tanto, considerando la poca influencia sobre la concentración de T observado en juveniles que estuvieron expuestos a más bajas temperaturas, o incluso a la constancia de variación de esta hormona reportado en otra especie (Allen et al. 2015; Kobayashi et al. 2010) creemos que la temperatura de esta zona de estudio difícilmente afectaría la medición de la concentración de T en nuestros juveniles de *C. mydas*.

Para estudios sobre proporción sexual en tortugas marinas es imperativo el uso de métodos confiables y robustos. Se han utilizado diversas técnicas para

determinar el sexo de estos reptiles, una de las más precisas y costosas es laparoscopia, la cual permite la observación directa de las gónadas y aunque no es letal, si es un procedimiento invasivo y potencialmente peligroso para los organismos si no se cuenta con el entrenamiento adecuado para ejecutar la técnica (Wood et al. 1983; Limpus,1985; Delgado et al. 2010). En los últimos años y en distintas especies de tortugas marinas se ha utilizado el análisis de los niveles de testosterona en sangre, a través de la prueba de radioinmunoensayo (RIA) y ha sido demostrada como apta para una identificación fisiológica y molecular del sexo (Owens et al. 1978; Wibbels et al. 1987; Wibbels, 1988; Owens, 1997), pero a pesar de lo practico que resulta el sexado de las tortugas marinas con esta técnica, las dificultades logísticas, el equipo caro y los permisos especiales para su ejecución no lo hacen muy factible para cualquier laboratorio. En relación con las dificultades que podría surgir para el análisis de T a través de RIA, Allen et al. (2015) proponen como una alternativa confiable para la medición de la concentración de esta hormona en plasma de *C. mydas*, la técnica de inmunoensayo (ELISA de T). El uso de ELISA para calcular T y por lo tanto estimar el sexo en tortugas juveniles en sitios de alimentación es un método eficaz para detectar cambios o signos de proporciones sesgadas y la validación de la misma en diferentes zonas de forrajeo e incluso distintas especies en todo el mundo permitirá ampliar sustancialmente la aplicación del análisis de proporción sexual en tortugas marinas (Allen et al. 2015). En su mayoría el análisis de hormonas y en especial de testosterona se ha realizado mediante RIA, un estudio comparativo entre RIA y ELISA, demuestra que ELISA tiene una excelente correspondencia (97 %) con RIA de T para proporcionar las concentraciones de esta hormona para la determinación del sexo (Allen et al. 2015).

Los niveles de concentración de T facilitaron la clasificación de 33 tortugas verdes juveniles capturados en BM (Figura 2), 22 hembras, 7 machos y 4 individuos sin poder asignar el sexo mediante la concentración de T. Si bien es cierto que ya han sido expuestos los primeros resultados de T para una población juvenil de *C. mydas* de la región del OPO (Allen et al. 2015), donde los datos no solo fueron analizados por técnica de inmunoensayo sino comprobados a través de laparoscopia, en este estudio también utilizamos un modelo de regresión logística

binaria para la asignación de sexo. En nuestro estudio se consideraron tres variables independientes para el modelo: Edad, LRC y Testosterona ( $p > 0.05$ ,  $p = 0.057$  y  $p < 0.001$ , respectivamente), donde fue claramente demostrado que la variable más importante de las tres fue T, lo cual cumple con el objetivo de evidenciar la importancia del análisis de T para la clasificación del sexo en juveniles de esta especie de tortugas marinas. No obstante, si necesitamos conocer el tamaño del efecto de la variable, necesitaríamos un tamaño de muestra mucho mayor ( $n > 500$ ) al que fue utilizado en este ensayo ( $N = 112$ ), sobre todo para los datos usados en el ajuste del modelo de regresión logística (Bujang et al. 2018). Por otro lado, la predicción de sexo realizada a través del modelo de regresión logística binaria en donde se usaron datos de las tortugas verdes de Allen et al. 2015 (Tabla 4) y los adultos encontrados en agua de este estudio para el entrenamiento del programa y el sexo estimado previamente con los niveles de concentración de T coinciden en su totalidad para los juveniles de tortugas verdes en ambos métodos, lo cual indicaría que el modelo actúa como un excelente clasificador. Además, la curva ROC obtenida en la regresión logística muestra que el modelo binario aquí propuesto opera como un excelente clasificador. En otras palabras, este estudio nos estaría mostrando una proporción sexual de 3.15H: 1M, lo cual evidencia un sesgo inclinado hacia las hembras en la población de juveniles de *C. mydas* de BM. Estos resultados coinciden con los sesgos inclinados hacia las hembras señalados en otros estudios donde se evaluaron hormonas (Bolten et al. 1992; Wibbels et al. 1993; Allen et al. 2015) y también los que estudiaron la proporción sexual usando laparoscopia (Wibbels et al. 1989; Limpus et al. 2009; Pilcher, 2010; Allen et al. 2015) (Tabla 8).

**Tabla 8.** Proporción sexual de diferentes sitios de alimentación de *C. mydas*, incluyendo Bahía Matapalito (Este estudio).

LUGAR	N	PROPORCIÓN SEXUAL (F:M)	METODO	REFERENCIA
Hawaii	66	1.0:0.96	Laparoscopia/necropsia	Wibbels et al. 1993
Shoalwater Bay, Australia	738	1.74:1.0	Laparoscopia	Limpus et al. 2005
Inagua, Bahamas	111	1.4:1.0	Hormonas en sangre	Bolten et al. 1992
Heron Island, Australia	200	2.0:1.0	Hormonas en sangre/laparoscopia	Wibbels et al. 1989
Shoalwater Bay, Australia	637	3.26:1.0	Laparoscopia	Limpus et al. 2005
San Diego, California	45	3.5:1.0	Testosterona ELISA/Laparoscopia	Allen et al. 2015
Sabah, Malaysia	75	4.0:1.0	Laparoscopia	Pilcher, 2010
Clark Reef, Australia	*	2.2:1.0	Laparoscopia	Limpus et al. 2009
Bahía Matapalito, Costa Rica	33	3.14:1.0	Testosterona ELISA	Este estudio

Considerando que la proporción sexual de tortugas verdes juveniles de BM se mantuviera constante entonces esta zona de alimentación estaría sesgada por las hembras juveniles. Aun no se conocen datos sobre la proporción sexual en otras zonas de alimentación del Pacífico de Costa Rica, aunque si se han identificado algunas zonas de forrajeo en el Pacífico Sur de Costa Rica por ejemplo en Punta Coyote, Cabo Blanco y Golfo dulce, donde se identifican en su mayoría juveniles de tortugas verdes (Heidemeyer et al. 2014, Chacón-Chaverri et al. 2015a; Mendez-Salgado et al. 2020). Sin embargo, en comparación con otros sitios de alimentación de juveniles de *C. mydas* a nivel mundial (Tabla 8) el sesgo de las tortugas de BM (3.15H: 1.0M) apenas estaría por debajo de la Bahía de San Diego, California (3.5H: 1.0M) que actualmente es reportado como el sitio como el más alto sesgo hacia las hembras en la región del Océano Pacífico Oriental, a su vez esta proporción sexual sería de las más altas reportadas para tortugas verdes juveniles a nivel mundial.

Se pueden hallar diversas razones para explicar la presencia de los sesgos de las hembras en las poblaciones de forrajeo, una de las más citadas son las proporciones de sexos de los neonatos inclinados hacia las hembras (Wibbels, 2003). No obstante, la estimación de la proporción sexual en los neonatos no es tan posible sin sacrificar al animal para observación de gónadas o mediante la estimación de las temperaturas en el microambiente de incubación (Mrosovsky & Yntema, 1980; Standora & Spotila, 1985), de tal manera que las elevadas temperaturas tienden a promover sesgos en las proporciones sexuales con una generación mayoritaria de hembras (Santidrián et al. 2015). Los resultados de algunos estudios en zonas de forrajeo sugieren que la proporción sexual en juveniles y subadultos de tortugas marinas mantendría un sesgo inclinado hacia las hembras (Wibbels et al. 1991; Owens, 1997; Limpus et al. 2005, 2009; Pilcher, 2010 & Allen et al. 2015). Sin embargo, el determinante clave de la viabilidad de la población no es la proporción sexual de los neonatos, sino la proporción sexual operativa (PSO), que es la proporción de machos y hembras que están listos para aparearse en un momento dado (Berglund 1994). Hays et al. 2010 observaron que las tortugas marinas macho regresan para reproducirse con más frecuencia que las hembras y que la PSO en las áreas de reproducción está mucho menos sesgada por las hembras de lo que se espera. Aunque el aumento de la frecuencia de reproducción de las tortugas macho ayudará a mitigar los impactos negativos del cambio climático y por tanto feminización en las poblaciones de tortugas marinas, una reducción en el número de tortugas macho reducirá en última instancia las probabilidades de persistencia de la población.

Otra posible explicación del sesgo de las hembras en las zonas de forrajeo son las diferencias en la preferencia de hábitat entre machos y hembras, ya que se ha evidenciado como el comportamiento térmico y la elección de las zonas de alimentación de estos reptiles puede ser influenciado por la temperatura de incubación, es decir, hay una tendencia de elegir gradientes térmicos relacionados a la temperatura a la cual fueron incubados (Lang, 1987; O'Steen, 1998). En BM la temperatura promedio varía en 26 °C por lo que resulta poco probable la preferencia de algún sexo para el sitio debido a este factor ambiental. Además de las dos

razones anteriores del posible sesgo de hembras también se podría considerar la periodicidad migratoria a las zonas de reproducción, las hembras de tortuga verde podrían reproducirse aproximadamente cada 2 o 3 años, mientras que los machos podrían hacerlo cada temporada (Limpus et al. 1994; Márquez-Millán 1982), lo cual podría provocar la ausencia de los machos adultos en la bahía, no obstante, en este estudio evaluamos juveniles, los cuales aún no se encuentran en la etapa reproductiva, y por lo tanto es poco probable que el sesgo sea por esta causa.

Finalmente, una de las amenazas más preocupantes para esta especie de tortuga marina y en general de cualquier otra especie con determinación del sexo dependiente de la temperatura (TSD) es la que representa el calentamiento global para la biodiversidad en todo el mundo, que puede conducir a proporciones de sexos sesgadas (Janzen, 1994; Mitchell & Jenzen, 2010). Se espera que las temperaturas medias mundiales aumenten entre 1 y 3.7 °C hasta el 2100 (IPCC, 2014) y aunque hay registros fósiles de tortugas de hace 120 millones de años que indican que estos reptiles han sobrevivido a varias fluctuaciones climáticas en el pasado (Reisz & Laurin, 1991; Cadena & Parham, 2015) no está claro si las especies de tortugas marinas existentes podrán adaptarse al cambio climático actual debido a la lenta rotación de la generación se ha dudado que la evolución pueda ser lo suficientemente rápida (Jensen et al. 2018). El calentamiento global provoca proporciones sexuales de neonatos cada vez más sesgadas por las hembras debido a la TSD y temperaturas de incubación de nidos más cálidas (Poloczanska et al. 2009; Jensen et al. 2018). Aún no está completamente claro hasta qué punto este proceso de feminización que se observa en neonatos afectaría a los otros grupos de edad de las poblaciones de tortugas marinas (Hays et al. 2017), dado que se ha observado que la PSO o reproductiva podría estar más equilibrada de lo que se observa en las áreas de anidación. Wright et al. (2012) utilizaron un análisis de parentesco de muestras de neonatos de la tortuga *Caretta caretta* para estimar el número de machos reproductores que engendran nidadas de un número conocido de hembras, encontrando que, si bien la proporción de sexo de neonatos era del 95% de hembras, la PSO esa solo del 42% de hembras. Dicho lo anterior y considerando que el intervalo de remigración es más corto para los

machos adultos (Limpus, 1993; Limpus et al. 2005; Hays et al 2014), las proporciones de sexos de neonatos sesgados hacia las hembras se traducen en PSO mucho más equilibradas. Del mismo modo, Lasala et al. (2013) utilizó este mismo análisis de parentesco con tortugas *C. caretta* que anidan en un sitio en Georgia, EE. UU., la PSO era solo un 27% de hembras. De manera similar, para las tortugas verdes que se reproducen en Heron Island, Australia, se han utilizado censos con drones y barcos para estimar una PSO de 39% y 49% de hembras respectivamente (Yaney-Keller et al. 2021) a pesar de las estimaciones de neonatos altamente feminizados. Por consiguiente, aunque las proporciones de sexo en los sitios de anidación está dominado por las hembras en las poblaciones de tortugas marinas en todo el mundo, hasta ahora los estudios informan PSO mucho más equilibrados y, por lo tanto, es posible que los machos no estén tan limitados como se pensaba anteriormente (Arendt et al. 2021).

Blechs Schmid et al. (2020) estudiaron un modelo estocástico basado en individuos de generaciones superpuestas, donde el propósito principal del modelo era predecir la probabilidad de supervivencia y la proporción de sexos de la población de *C. mydas* de la Gran Barrera de Coral del norte (nGBR) ante diferentes escenarios climáticos, evolutivos y de conservación, considerando el destino de la población bajo temperaturas constantes entre 25 °C y 38 °C, modelando cuatro trayectorias de temperatura durante los próximos siglos. Los resultados de su modelo muestran posibilidades interesantes para los esfuerzos de conservación destacando que la profundidad del nido fue el mecanismo de evolución que más promovió la supervivencia de la población mientras que la filopatría a las playas de anidación llevaría a la extinción a la especie. De acuerdo con las predicciones de su modelo, un aumento adicional de 0.5 °C, elevando la temperatura de referencia de los nidos a 30.6 °C, representa una amenaza para la supervivencia de la población. Por lo tanto, las medidas de conservación antropogénicas pueden apoyar la supervivencia de la población, razón de peso para suponer que la información de cada sitio de alimentación de las tortugas marinas respecto a la proporción sexual de los individuos en ella, servirá para predecir las preocupaciones de conservación ante el calentamiento global, resultando vital para inferir el estado de la población y

la supervivencia de cada sexo. Los estudios fisiológicos, como determinaciones hormonales, pueden proporcionar información demográfica valiosa para la conservación de vertebrados marinos (Labrada-Martagón et al. 2014) y el conocimiento de las proporciones sexuales de cada población de tortugas marinas y la inclusión de la misma en los planes de manejo y gestión nos podría brindar la oportunidad de mejoras en la estrategia de conservación de estas especies.

### *Conclusiones y recomendaciones*

El uso de la técnica ELISA en T es útil para estimar el sexo en las tortugas verdes juveniles, no obstante, el rango de la concentración de testosterona entre ambos sexos es muy cercano, por lo que surge la necesidad de ampliar más la base de datos con más estudios utilizando esta técnica, para de esta forma sea más consistente el perfil hormonal en los diferentes grupos de edad de esta especie.

La determinación del sexo de las tortugas marinas mediante hormonas, acompañadas de análisis estadísticos como regresiones logísticas, resultan eficientes para estimar el sexo de estos reptiles, y tienen potencial de ser una alternativa para determinar el sexo sin recurrir a una verificación por laparoscopia. Pero es sumamente importante la existencia de una base de datos suficientemente robusta para el entrenamiento del programa. Las bases de datos públicas facilitarían el trabajo, pero a pesar de la existencia de múltiples estudios donde se determinó el sexo con testosterona son escasos los que comparten los resultados obtenidos en cada individuo.

Este estudio muestra una proporción sexual de 3.15H: 1M, lo cual evidencia un sesgo inclinado hacia las hembras en la población de juveniles de *C. mydas* de BM, sin embargo, una posible explicación para un sesgo femenino en zonas de alimentación pudieran ser las diferencias en la preferencia de hábitat entre machos y hembras, así como la diferencia en sus ciclos migratorios.

El ICC nos habla de un “muy buen” estado nutricional para estos juveniles de tortuga verde, tomando en cuenta que BM como muchas otras zonas de alimentación son

parte de un corredor biológico para esta y muchas especies marinas, lo observado en el ICC para estas tortugas podría representar la suma de disponibilidad de alimento en todas estas áreas a lo largo de su distribución.

## BIBLIOGRAFÍA

Alfaro, E. J. & Cortés, J. (2012). Atmospheric forcing of cool subsurface water events in Bahía Culebra, Gulf of Papagayo, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 60:173–186. <https://doi.org/10.15517/rbt.v60i2.20001>.

Allen, C. D., Robbins M. N., Eguchi T., Owens D. W., Meylan A. B. & Meylan P. A. (2015). First Assessment of the sex ratio for an east Pacific green sea turtle foraging aggregation: Validation and application of a testosterone ELISA. *Plos one*, 10(10): e0138861. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138861>

Alvarado, J. & Figueroa, A. (1990). The ecological recovery of sea turtles of Michoacan, Mexico. Special attention: the black turtle, *Chelonia agassizii*. Final Report 1989-1990. U.S.F.W.S. & WWF US. Estados Unidos. <http://repositorio.fcencias.unam.mx:8080/xmlui/handle/11154/64901>

Alvarado-Díaz, J., Delgado-Trejo, C. & Suazo-Ortuno, I. (2001). Evaluation of the black turtle project in Michoacan, Mexico. *Marine Turtle Newsletter* 92:4–7. <http://www.seaturtle.org/mtn/archives/mtn92/mtn92p4.shtml?nocount>

Álvarez-Varas, R., Contardo, J. E., Heidemeyer, M., Forero-Rozo, L., Brito, B., Cortés, V. Y., Brain, M. J., Pereira, S. & Vianna, J. A. (2017). Ecology, health and genetic characterization of the southernmost green turtle (*Chelonia mydas*) aggregation in the Eastern Pacific: implications for local conservation strategies. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 45 (3), 540-554. <https://doi.org/10.3856/vol45-issue3-fulltext4>

Arendt, M.D., Schwenter, J.A., Owens, D.W. & Valverde, R. (2021). Theoretical modeling and neritic monitoring of loggerhead *Caretta caretta* [Linnaeus, 1758] sea turtle sex ratio in the southeast United States do not substantiate fears of a male-limited population. *Glob Change Biol* 27:4849–4859. <https://doi.org/10.1111/gcb.15808>

Balazs, G. H. 1982. Growth rates of immature green turtles in the Hawaiian archipelago. Pp. 117–125. En: Bjorndal, K. A. (Ed.). *Biology and Conservation of Sea Turtles*. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.

Berec, L., Boukal, D. S. & Berec, M. (2001). Linking the allee effect, sexual reproduction, and temperature-dependent sex determination via spatial dynamics. *The American naturalist*, 157(2), 217–230. <https://doi.org/10.1086/318626>

Bjorndal, K. A. 1980. Nutrition and grazing behavior of the green turtle *Chelonia mydas*. *Marine Biology*, 56: 147-154. <https://doi.org/10.1007/bf00397131>

Bjorndal, K.A. & Bolten, A. B. (2010). Hawksbill sea turtles in seagrass pastures: Success in a peripheral habitat. *Marine Biology*, 157(1), 135–145. <https://doi.org/10.1007/s00227-009-1304-0>

Bjorndal, K.A., Bolten, A. B. & Chaloupka, M. Y. (2000). Green turtle somatic growth model: evidence for density dependence. *Ecological Applications*, 10: 269-282. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(2000\)010\[0269:GTSGME\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(2000)010[0269:GTSGME]2.0.CO;2)

Blanco, G. S. (2010). Movements and Behavior of the East Pacific Green Turtle (*Chelonia mydas*) from Costa Rica. Tesis de Doctorado, Universidad de Drexel, Estados Unidos. <https://bit.ly/3f4nbpX>

Blanco, G. S., Morreale, S. J., Bailey, H., Seminoff, J. A., Paladino, F. V. & Spotila, J. R. (2012a). Post-nesting movements and feeding grounds of a resident East Pacific green turtle *Chelonia mydas* population from Costa Rica. *Endangered Species Research*, 18: 233–245

Blanco, G. S., Morreale, S. J., Velez, E., Piedra, R., Montes, W. M., Paladino, F. V. & Spotila, J. R. (2012b). Reproductive output and ultrasonography of an endangered population of east Pacific green turtles. *Journal of Wildlife Management*, 76: 841-846.

Blanvillain, G., Owens, D. W. & Kuchling G. (2011). Hormones and reproductive cycles in turtles. *Hormones and Reproduction of Vertebrates, Volume 3-Reptiles. Elsevier Inc.*; pp. 277–303.

Blechsmidt, J., Wittmann, M. J. & Blüml, C. (2020). Climate Change and Green Sea Turtle Sex Ratio-Preventing Possible Extinction. *Genes*, 11(5), 588. <https://doi.org/10.3390/genes11050588>

Bolten, A. B., Bjorndal, K. A., Grumbles, J. S. & Owens, D. W. (1992). Sex ratio and sex-specific growth rates of immature green turtles, *Chelonia mydas*, in the Southern Bahamas. *Copeia*, 4: 1098–1103. <http://www.jstor.org/stable/1446647>

Brito, J. L., Domínguez, G., Marambio, M. & Gysel, P. (2007). La necesidad de proteger a las tortugas marinas de Chascos, Bahía Salado, Región de Atacama, Chile. In: C. Guerra-Correa, A. Fallabrino, P. Bolados-Díaz & C. Turner (eds.). VII Simposio sobre medio ambiente: estado actual y perspectivas de la investigación y conservación de las tortugas marinas en las costas del Pacífico Sur Oriental. Universidad de Antofagasta Chile. [http://www.seaturtle.org/documents/VII\\_Simp\\_Medio\\_Ambiente.pdf](http://www.seaturtle.org/documents/VII_Simp_Medio_Ambiente.pdf)

Bujang, M. A., Sa'at N., Tg Abu Bakar Sidik, T. M. I. & Lim, C. J. (2018). Sample size guidelines for logistic regression from observational studies with large population: emphasis on the accuracy between statistics and parameters based on real life clinical data. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 25(4):122–130. <https://doi.org/10.21315/mjms2018.25.4.12>

Cadena, E. A. & Parham, J. F. (2015). Oldest known marine turtle? A new protostegid from the Lower Cretaceous of Colombia. *PaleoBios*. 32, 1–42. <https://doi.org/10.5070/P9321028615>

Chacón-Chaverri, D., Martínez-cascante, D. A., Rojas, D. & Fonseca. L. G. (2015a). Golfo Dulce, Costa Rica, un área importante de alimentación para la tortuga Carey del Pacífico Oriental (*Eretmochelys imbricata*). *Revista de Biología Tropical*, 63: 351–362. <https://doi.org/10.15517/rbt.v63i1.23114>

Chacón-Chaverri, D., Martínez-Cascante, D. A., Rojas, D. & Fonseca, L. G. (2015b). Captura por unidad de esfuerzo y estructura poblacional de la tortuga verde de Pacífico (*Chelonia mydas*) en el Golfo Dulce, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 63: 363–373. <https://doi.org/10.15517/rbt.v63i1.23115>

Clyde-Brockway, C., Robinson, N. J., Blanco, G. S., Morreale, S. J., Spotila, J. R., Tomillo, P. S. & Paladino, F. V. (2019). Local variation in the internesting behavior of green turtles in the gulf of papagayo, costa rica. *Chelonian Conservation and Biology*, 18(2), 217-230. <http://dx.doi.org/10.2744/CCB-1352.1>

Cornelius, S. E. (1976). Marine turtle nesting activity at Playa Naranjo, Costa Rica. *Brenesia* 8:1-27. <http://biblioteca.museocostarica.go.cr/articulo.aspx?id=2483&art=8672>

Dapp, D., Arauz, R., Spotila, J. R. & O'Connor, M. P. (2013). Impact of Costa Rican longline fishery on its bycatch of sharks, stingrays, bony fish and olive ridley turtles (*Lepidochelys olivacea*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 448: 228–239. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2013.07.014>

Delgado, C., Canário, A. V & Dellinger, T. (2010). Sex ratios of loggerhead sea turtles *Caretta caretta* during the juvenile pelagic stage. *Marine Biology*, 157:979-990. <https://doi.org/10.1007/s00227-009-1378-8>

Donoso, M., Dutton, P. H. & LaCasella, E. (2016). Nesting population origin of a Green turtle foraging aggregation in northern Chile determined from mtDNA analysis: drawing new boundaries to management units in the southeastern Pacific. 36th Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation, 29 February-4th March 2016, Lima, Peru.

Drake, D. L., Behn, J. E., Hacerty, M. A., Mayor, P. A., Goldenberg, S. J. & Spotila, J.R. (2003). Marine turtle nesting activity at Playa Naranjo, Santa Rosa National Park, Costa Rica, for the 1998-1999 season. *Chelonian Conservation and Biology* 43:675-678. <https://bit.ly/3HHE9GX>

Eckert, K. L., Bjornal, K. A., Abreu-Grobois, F. A. & Donnelly, M. (Eds). (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. <https://bit.ly/32QOWQt>

Eguchi, T., Seminoff, J. A., LeRoux, R. A., Prospero, D., Dutton, D. L. & Dutton, P. H. (2012). Morphology and growth rates of the green sea turtle (*Chelonia mydas*) in a northern-most temperate foraging ground. *Herpetologica*, 68: 76–87. <https://doi.org/10.1655/HERPETOLOGICA-D-11-00050.1>

Fischer, S. & Wolff, M. (2006). Fisheries assessment of *Callinectes arcuatus* (*Brachyura, Portunidae*) in the Gulf of Nicoya, Costa Rica. *Fisheries Research* 77( 3): 301–311. <https://epic.awi.de/id/eprint/14474/>

Fonseca, L. G., Quirós, W., Villachica, W. N., Mora, J. G., Heidemeyer, M. & Valverde, R.A. (2013). Anidación de tortuga verde (*Chelonia mydas*) del Pacífico, en la Isla San José, Área de Conservación Guanacaste, Costa Rica (temporada 2012-2013). San José, Costa Rica: *Biocenosis Marina*. <https://bit.ly/3n5l5KU>

Fonseca, L., Tomillo, P., Villachica, W., Quirós, W., Pesquero, M., Heidemeyer, M., Joyce, F., Plotkin, P., Seminoff, J., Matarrita, E. & Valverde, R. (2018). Discovery of a Major East Pacific Green Turtle (*Chelonia mydas*) Nesting Population in Northwest Costa Rica. *Chelonian Conservation and Biology*, 17. 169. <https://doi.org/10.2744/ccb-1264.1>

Fuller, W. J., Godley, B. J., Hodgson, D. J., Reece, S. E., Witt, M. J. & Broderick, A. C. (2013). Importance of spatio-temporal data for predicting the effects of climate change on marine turtle sex ratios. *Marine Ecology Progress Series*, 488: 267–274. <https://doi.org/10.3354/meps10419>

Hawkes L. A., Broderick, A. C., Godfrey, M. H. & Godley B. J. (2007). Investigating the potential impacts of climate change on a marine turtle population. *Global Change Biology*, 13: 923–932. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2007.01320.x>

Hays, G. C., Broderick, A. C., Godley, B. J., Luschi, P. & Nichols, W. J. (2003). Satellite telemetry suggests high levels of fishing-induced mortality in marine turtles. *Marine Ecology Progress Series*, 262: 305–309. <https://doi.org/10.3354/meps262305>

Hays, G. C., Fossette, S., Katselidis, K. A., Schofield, G. & Gravenor, M. B. (2010). Breeding periodicity for male sea turtles, operational sex ratios, and implications in the face of climate change. *Conserv. Biol.* 6, 1636–1643. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2010.01531.x>

Hays, G.C., Mazaris, A.D., Schofield, G. (2014). Different male vs female breeding periodicity helps mitigate offspring sex ratio skews in sea turtles. *Frontiers in Marine Science*. <https://doi.org/10.3389/fmars.2014.00043>

Hays, G.C., Mazaris, A.D., Schofield, G. & Laloë, J-O. (2017). Population viability at extreme sex-ratio skews produced by temperature-dependent sex determination. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 284:20162576. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.2576>

Heidemeyer, M., Arauz-Vargas, R. & E. López-Agüero. (2014). New foraging grounds for hawksbill (*Eretmochelys imbricata*) and green turtles (*Chelonia mydas*) along the northern Pacific coast of Costa Rica, Central America. *International Journal for Tropical Biology*, 62(4): 109–118. <https://doi.org/10.15517/RBT.V62I4.20037>

Howell, P., Meneses, A., Suárez-Esquivel, M., Chaves, A., Chacón, D. & Blanco-Peña, K. (2021). Blood parameters of the Eastern Pacific green turtle (*Chelonia mydas*) foraging in the Golfo Dulce, Costa Rica. *Comparative Clinical Pathology*, 30, 793–800. <https://doi.org/10.1007/s00580-021-03274-5>

IPCC. Climate Change. (2014). Synthesis Report; Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change; IPCC: Geneva, Switzerland, 2014. [https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/2018/02/SYR\\_AR5\\_FINAL\\_full.pdf](https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/2018/02/SYR_AR5_FINAL_full.pdf)

Janzen, F. J. (1994). Climate change and temperature-dependent sex determination in reptiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91 (16): 7487-90. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.16.7487>

Jensen, M. P., Allen, C. D., Eguchi, T., Bell, I. P., LaCasella, E. L., Hilton, W. A., Hof, C. & Dutton, P. H. (2018). Environmental Warming and Feminization of One of the Largest Sea Turtle Populations in the World. *Current biology:CB*,28(1), 154–159.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.11.057>

Jiménez, C. (2001). Seawater temperature measured at the surface and at two depths (7 and 12 m) in one coral reef at Culebra Bay, Gulf of Papagayo, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 49(Suppl. 2):153–161. <https://bit.ly/3f3Nlsl>

Jones, R. E., Petrell, R. J. & Pauly, D. (1999). Using modified length–weight relationships to assess the condition of fish. *Aquacultural Engineering*, 20: 261–276. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(99\)00020-5](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(99)00020-5)

Kobayashi, M., Shimizu, T. & Okuzawa, K. (2010). Determination of maturity in male hawksbill turtle *Eretmochelys imbricata* in captivity based on tail elongation and plasma testosterone level. *Fisheries Science*, 76: 777–784. <https://doi.org/10.1007/s12562-010-0283-x>

Koch, V., Brooks, L. B. & Nichols, W. J. (2007). Population ecology of the green/black turtle (*Chelonia mydas*) in Bahía Magdalena, Mexico. *Marine Biology*, 153 (1): 35-46. <https://doi.org/10.1007/s00227-007-0782-1>.

Koch, V., Nichols, W. J., Peckham, H., de la Toba, V. (2006). Estimates of sea turtle mortality from poaching and bycatch in Bahía Magdalena, Baja California Sur, Mexico. *Biological Conservation*, 128, 327-334. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.09.038>

Labrada-Martagón, V., Méndez-Rodríguez, L., Gardner, S., López-Castro M. & Zenteno-Savín T. (2010). Health indices of the green turtle (*Chelonia mydas*) along the Pacific coast of Baja California Sur, Mexico. I. Blood biochemistry values. *Chelonian Conservation and Biology*, 9(2): 162-172. <https://doi.org/10.2744/CCB-0806.1>

Labrada-Martagón, V., Zenteno-Savín, T. & Mangel, M. (2014). Linking physiological approaches to marine vertebrate conservation: using sex steroid hormone determinations in demographic assessments. *Conservation Physiology*, 2: cot035. <https://doi.org/10.1093/conphys/cot035>

Lang, J. W. (1987). Crocodylian thermal selection. In: Webb GJW, Manolis SC, Whitehead PJ, editors. *Wildlife management: crocodiles and alligators*. Surrey Beatty, Sydney. pp. 301–317.

Limpus, C. J. (1985). A Study of the loggerhead turtle, *Caretta caretta*, in Queensland. Ph.D. thesis, University of Queensland, Brisbane. <https://espace.library.uq.edu.au/view/UQ:287503>

Lasala, J.A., Scott Harrison, J., Williams, K.L. & Rostal, D.C. (2013). Strong male-biased operational sex ratio in a breeding population of loggerhead turtles (*Caretta caretta*) inferred by paternal genotype reconstruction analysis. *Ecology and Evolution*, 3:4736–4747. <https://doi.org/10.1002/ece3.761>

Limpus, C. J., Bell, I. P., Miller, J. D. (2009). Mixed Stocks of Green Turtles Foraging on Clack Reef, Northern Great Barrier Reef Identified from Long Term Tagging Studies. *Marine Turtle Newsletter*. 123: 3–5. <http://www.seaturtle.org/mtn/archives/mtn123/mtn123p3.shtml>

Limpus, C. J., Egglar, P. & Miller, J. D. (1994). Long interval remigration in Eastern Australian Chelonia. In: Schroeder BA, Witherington BE, editors. Proceedings of the Thirteenth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-341; pp. 85–88. [http://www.sefsc.noaa.gov/turtles/TM\\_341\\_Schroeder\\_Witherington\\_13.pdf](http://www.sefsc.noaa.gov/turtles/TM_341_Schroeder_Witherington_13.pdf)

Maffucci, F., D'Angelo, I., Hochscheid, S., Ciampa, M., Martino, G. & Travaglini A. (2013). Sex ratio of juvenile loggerhead turtles in the Mediterranean Sea: is it really 1:1? *Marine Biology*, 160: 1097–1107. <https://doi.org/10.1007/s00227-012-2160-x>

Márquez M. R. 1990. Sea turtles of the world. An annotated and illustrated catalogue of sea turtle species known to date. FAO Species Catalog, FAO Fisheries Synopsis 11(125): 81 pp. <https://bit.ly/3F6cqhr>

Márquez-Millán, R., Penaflores, S. C., Villanueva, O. A. & Diaz, F. J. A. (1982) Model for diagnosis of populations of olive ridleys and green turtles of west Pacific tropical coasts. In: Bjorndal KA, editor. Biology and Conservation of Sea Turtles. Washington D.C.: Smithsonian Institution Press; pp. 153–158.

McCauley, D. J., Pinsky, M. L., Palumbi, S. R., Estes, J. A., Joyce, F. H. & Warner, R. R. (2015). Marine defaunation: animal loss in the global ocean. *Science*, 347. <https://doi.org/10.1126/science.1255641>

Méndez-Salgado, E., Chacón-Chaverri, D., Fonseca, L. G., Rojas-Morales, D. W. & Seminoff, J. A., (2020). Trophic Ecology of Hawksbill Turtles (*Eretmochelys imbricata*) in Golfo Dulce, Costa Rica: Integrating Oesophageal Lavage and Stable Isotope ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ) Analysis. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 48. pp. 114–130. <https://doi.org/10.3856/vol48-issue1-fulltext-2230>

Merchant-Larios, H. (1999). Determining hatchling sex. In: Eckert, K.L., Bjorndal, K.A., Abreu-Grobois, F.A. & Donnelly, M. (eds). Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication No. 4. pp. 130–135. <https://bit.ly/3G7kRdH>

Meylan, P. A., Meylan, A. B. & Gray, J. A. (2011). The Ecology and migrations of sea turtles. Tests of the Developmental Habitat Hypothesis. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 357: 77. <https://doi.org/10.1206/357.1>

Mitchell, N. J. & Janzen, F. J. (2010). Temperature-dependent sex determination and contemporary climate change. *Sexual Development*, 4 (1-2):129-40. <https://doi.org/10.1159/000282494>

Morreale, S. J., Ruiz, G. J., Spotila, J. R. & Standora, E. A. (1982). Temperature dependent sex determination: Current practices threaten conservation of sea turtles. *Science (New York, N.Y.)*, 216 (4551) 1245-1247. <https://doi.org/10.1126/science.7079758>

Morris, Y. A. (1982). Steroid dynamics in immature sea turtles. Masters thesis, Texas A&M University, College Station, Texas.

Mrosovsky, N & Pieau, C. (1991). Transitional range of temperature, pivotal temperatures, and thermosensitive stages for sex determination in reptiles. *Amphibia- Reptilia* 12: 169–179. [http://www.seaturtle.org/PDF/MrosovskyN\\_1991\\_ActaBorealA.pdf](http://www.seaturtle.org/PDF/MrosovskyN_1991_ActaBorealA.pdf)

Mrosovsky, N. & Yntema, C. L. (1980). Temperature dependence of sexual differentiation in sea turtles: implications for conservation practices. *Biological Conservation* 18:271-280. [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(80\)90003-8](https://doi.org/10.1016/0006-3207(80)90003-8)

Musick, J. A. & Limpus, C. J. (1997). Habitat utilization and migration in juvenile sea turtles. In: Lutz, P. L. & Musick, J. A. (eds.), *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, Boca Raton. Pp. 137–163. [http://www.seaturtle.org/PDF/MusickJA\\_1997\\_InTheBiologyofSeaTurtles\\_p137-163.pdf](http://www.seaturtle.org/PDF/MusickJA_1997_InTheBiologyofSeaTurtles_p137-163.pdf)

Nichols, W. J., (2003<sup>a</sup>). Biology and conservation of sea turtles in Baja California, México. Ph. D. Dissertation. University of Arizona, Tucson, 474 p. <https://repository.arizona.edu/handle/10150/280439>

Norton, T.M. & Wyneken, J. (2105). Body Condition Scoring the Sea Turtle. <http://lafeber.com/vet/body-condition-scoring-the-sea-turtle/>

O'Steen, S. (1998). Embryonic temperature influences juvenile temperature choice and growth rate in snapping turtle *Chelydra serpentina*. *Journal of Experimental Biology*, 201 (3), 439–449.. <https://doi.org/10.1242/jeb.201.3.439>

Owens, D. W. (1997). Hormones in the life history of sea turtles. In: Lutz, P. L. & Musick, J. A. Editors. *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, Boca Raton, Florida. Pp. 315–341.

Owens, D. W., Blanvillain, G., Alderson, J. & Segars, A. (2012). Endocrine based health and reproductive diagnostic protocols. In: Jones, T. T. & Wallace, B. P. editors. *Proceedings of the Thirty-first Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*. San Diego, California: NOAA Technical Memorandum NOAA NMFSEFSC-631; pp. 184–185.

Owens, D.W., Hendrickson, J.R., Lance, V. & Callard, I. P. (1978). A Technique for determining sex of immature *Chelonia mydas* using a radioimmunoassay. *Herpetologica*. 34: 270–273. <https://www.jstor.org/stable/3891551>

Peña, M., Muñoz, J., Baquero, A., Valle, C. A., Macías, J. & Chalen, X. (2009). Caracterización de la población de tortugas verdes (*Chelonia mydas*) del área marina de la Isla de la Plata, Parque Nacional Machalilla, Ecuador. Informe anual. Fundación Equilibrio Azul.

Pilcher, N. J. (2010). Population structure and growth of immature green turtles at Mantanani, Sabah, Malaysia. *Journal of Herpetology*, 44: 168–171. <https://doi.org/10.1670/08-115.1>

Reich, K. J., Bjorndal, K. A. & Bolten, A. B. (2007). The 'lost years' of green turtles: using stable isotopes to study cryptic lifestages. *Biology Letters*, 3(6): 712-714. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2007.0394>.

Poloczanska, E.S., Limpus, C.J. & Hays, G.C. (2009). Vulnerability of marine turtles to climate change. *Advances in Marine Biology*, 56:151–211. [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(09\)56002-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(09)56002-6)

Reisz, R. & Laurin, M. (1991). Owenetta and the origin of turtles. *Nature*, 349, 324–326. <https://doi.org/10.1038/349324a0>

Rostal, D. C., Owens, D. W., Grumbles, J. S., MacKenzie, D. S. & Amoss, M. S. (1998). Seasonal reproductive cycle of the Kemp's ridley sea turtle (*Lepidochelys kempi*). *General and Comparative Endocrinology*, 109: 232–243. <https://doi.org/10.1006/gcen.1997.7026>

Santidrian Tomillo, P., Roberts, S. A., Hernandez, R., Spotila, J. R. & Paladino, F. V. (2015<sup>a</sup>). Nesting ecology of east Pacific green turtles at Playa Cabuyal, Gulf of Papagayo, Costa Rica. *Marine Ecology*, 36(3): 506-516. <https://doi.org/10.1111/maec.12159>

Santidrián, P., Saba, V., Lombard C., Valiulis, J., Robinson, N., Paladino, F., Spotila, J., Fernández, C., Rivas, M., Tucek, J. & Oro D. (2015). Global analysis of the effect of local climate on the hatchling output of leatherback turtles. *Scientific Reports*, 5:16789. <https://doi.org/10.1038/srep16789>

Saravia-Arguedas, A. Y., Vega-Bolaños, H., Vargas-Hernández, J. M., Suárez-Serrano, A., Sierra-Sierra, L., Tisseaux Navarro, A., Cambroner-Solano, S. & Lugioyo-Gallardo, G. M. (2021). Surface-Water Quality of the Gulf of Papagayo, North Pacific, Costa Rica. *Water*, 13(17): 2324. <https://doi.org/10.3390/w13172324>

Sarmiento-Devia, R. A., Harrod, C. & Pacheco, A. S. (2015). Ecology and conservation of sea turtles in Chile. *Chelonian Conservation Biology*, 14(1): 21-33. <http://dx.doi.org/10.2744/ccab-14-01-21-33.1>.

Seminoff, J. A. (2004). *Chelonia mydas*. The IUCN Red List of Threatened Species: e.T4615A11037468. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2004.RLTS.T4615A11037468.en>.

Seminoff, J. A., (2000). Biology of the east Pacific green turtle, *Chelonia mydas agassizii*, at a warm temperate feeding area in the Gulf of California, Mexico. PhD thesis, University of Arizona, Tucson

Seminoff, J. A., Jones, T. T., Resendiz, A., Nichols, J. W. & Chaloupka M. (2003). Monitoring green turtles (*Chelonia mydas*) at a coastal foraging area in Baja California, Mexico: multiple indices describe population status. *Journal Marine Biology Association. UK*, 83: 1355-1362. <https://doi.org/10.1017/S0025315403008816>

Seminoff, J. A., Resendiz, A., Nichols, W. J., Jones, T. T. (2002<sup>a</sup>). Growth rates of wild green turtles (*Chelonia mydas*) at a temperate foraging area in the Gulf of California, Mexico. *The American Society of Ichthyologists and Herpetologists*, 3, 610–617. <http://www.jstor.org/stable/1448143>.

Seminoff, J. A., Zárate, P., Coyne, M., Foley, D. G., Parker, D., Lyon, B. N., & Dutton, P. H. (2008). Post-nesting migrations of Galápagos green turtles *Chelonia mydas* in relation to oceanographic conditions: integrating satellite telemetry with remotely sensed ocean data. *Endangered Species Research*, 4, 57-72. <https://doi.org/10.3354/esr00066>

Senko, J., Mancini, A., Seminoff, J. A., Koch, V. (2014). Bycatch and directed harvest drive high green turtle mortality at Baja California Sur, Mexico. *Biological Conservation*, 169, 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2013.10.017>

Soureshjani, M. H., & Kimiagari, A. M. (2013). Calculating the best cut off point using logistic regression and neural network on credit scoring problem- A case study of a commercial bank. <https://bit.ly/34qkcpz>

Spotila, J. R., O'Connor, M. P. & Paladino, F. V. (1997). Thermal biology. En: *The Biology of Sea Turtles*, Edit. Lutz P.y J. A. Musick CRC Press, New York; New York 297-314 pp.

Spotila, J. R., Standora, E. A. A., Morreale, S. J. & G. J. J. Ruiz. (1987). Temperature dependent sex determination in the green turtle (*Chelonia mydas*): effects on the sex ratio on a natural nesting beach. *Herpetologica*, 43(1): 74–81. <https://www.jstor.org/stable/3892439>

Standora E. A., & Spotila J. R. (1985). Temperature-dependent sex determination in sea turtles. *Copeia*, (3): 711-722. <https://www.jstor.org/stable/1444765>

Sterling, E. J., McFadden, K. W., Holmes, K. E., Vintinner, E. C., Arengo, F. & Naro-Macieli, E. (2013). Ecology and Conservation of Marine Turtles in a Central Pacific Foraging Ground. *Chelonian Conservation and Biology*, 12, 2-16. <https://doi.org/10.2744/CCB-1014.1>

Stevenson, R. D. & Woods, W. A. (2006) Condition indices for conservation: new uses for evolving tools. *Integrative and Comparative Biology*, 46(6):1169–1190. <https://doi:10.1093/icb/icl052>

Stuhldreier, I., Sánchez-Noguera, C., Roth, F., Jiménez, C, Rixen, T., Cortés, J. & Wild, C. (2015). Dynamics in benthic community composition and influencing factors in an upwelling-exposed coral reef on the Pacific coast of Costa Rica. *PeerJ*, 3:e1434 <https://doi.org/10.7717/peerj.1434>

Thomson, J.A., Burkholder, D., Heithaus, M.R. & Dill, L.M. (2009) Validation of a rapid visual- assessment technique for categorizing the body condition of green turtles (*Chelonia mydas*) in the field. *Copeia* 2, 251–255

Velez-Zuazo, X. & Kelez, S. (2010). Multiyear analysis of sea turtle bycatch by Peruvian longline fisheries: a genetic perspective. In: J.A. Blumenthal, A. Panagopoulou & A.F. Rees (eds.). Proceedings of the 30th Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation, 24-30 April 2010, Goa, India.

Velez-Zuazo, X., Quiñones, J., Pacheco, A. S., Klinge, L., Paredes, E., Quispe, S. & Kelez, S. (2014). Fast growing, healthy and resident green turtles (*Chelonia mydas*) at two neritic sites in the central and northern coast of Peru: implications for conservation. *PLoS ONE*, 9(11): e113068. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0113068>.

Veliz, D., Salinas, P., Sielfeld, W., Contreras, D., Azócar, C., Tobar M. & Gallardo, J. (2014). Estudio poblacional y genético de la tortuga *Chelonia mydas agassizii* (Sauria: Cheloniidae) en La Playa Chinchorro, Arica, Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(3): 589-593. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572014000300015>

Whittier, J. M., Corrie, F. & Limpus, C. (1997). Plasma steroid profiles in nesting loggerhead turtles (*Caretta caretta*) in Queensland, Australia: relationship to nesting episode and season. *General and Comparative Endocrinology*, 106:39–47. <https://doi.org/10.1006/gcen.1996.6848>

Wibbels, T. (1999). Diagnosing the sex of sea turtles in foraging habitats. In: Eckert KL, Bjorndal KA, Abreu-Grobois FA, Donnelly M, editors. Research and Management Techniques for the Conservation of Sea Turtles. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication No. 4; pp. 139–143. <http://mtsg.files.wordpress.com/2010/11/techniques-manual-full-en.pdf>

Wibbels, T. (2000). Determinación del sexo de Tortugas marinas en hábitats de alimentación. En Eckert, K.L., K.A. Bjorndal, F.A. Abreu-Grobois, y M. Donnelly, 2000 (Ed.) Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas. Grupo de Especialistas En tortugas Marinas UICN/CSE Publicación. No 4: 160-164 p. <https://bit.ly/3FaTxd8>

Wibbels, T. (2003). Critical approaches to sex determination in sea turtles. In: Lutz PL, Musick JA, Wyneken J, editors. The Biology of Sea Turtles Volume II. *CRC Press, Boca Raton, FL*. pp. 103–134. <https://doi.org/10.1201/9781420040807.ch4>

Wibbels, T. R. (1988). Gonadal steroid endocrinology of sea turtle reproduction (Order No. 8903419). Available from ProQuest One Academic. (303648711). <https://bit.ly/3G9JZ3I>

Wibbels, T., Balazs, G. H., Owens, D. W. & Amoss, M. S. Jr. (1993) Sex ratio of immature green turtles inhabiting the Hawaiian Archipelago. *Journal of Herpetology*, 27: 327–329. <http://www.jstor.org/stable/10.2307/1565155>

Wibbels, T., Owens, D. W., Limpus, C. J. & Amoss, M. S. (1989). Field testing of a sexing technique for immature sea turtles. In: Ogren LH, editor. Proceedings of the second Western Atlantic Turtle Symposium. Panama City, FL: NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFC-226; pp. 349–350. Available: [http://www.sefsc.noaa.gov/turtles/TM\\_226\\_Ogren\\_etal\\_WATSII.pdf](http://www.sefsc.noaa.gov/turtles/TM_226_Ogren_etal_WATSII.pdf)

Wibbels, T., Owens, D. W., Morris, Y. A. & Amoss M. S. (1987). Sexing techniques and sex ratios for immature loggerhead sea turtles captured along the Atlantic coast of the United States. In: Witzell WN, editor. *Ecology of East Florida Sea Turtles Proceedings of the Cape Canaveral, Florida Sea Turtle Workshop*. Miami, Florida: NOAA Technical Report NMFS 53; pp. 65–74.

Wright, L.I., Stokes, K.L., Fuller, W.J., Godley, B.J., McGowan, A., Snape, R., Tregenza, T. & Broderick, A.C. (2012). Turtle mating patterns buffer against disruptive effects of climate change. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279:2122–2127. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.2285>

Wood, J. R., Wood, F. E., Critchley, K. H., Wildt, D. E. & Bush, M. (1983). Laparoscopy of the green sea turtle, *Chelonia mydas*. *British Journal of Herpetology*, 6: 323–327.

Yaney-Keller, A., San Martin, R. & Reina, R.D. (2021). Comparison of UAV and boat surveys for detecting changes in breeding population dynamics of sea turtles. *Remote Sensing* 13:2857. <https://doi.org/10.3390/rs13152857>

Yntema, C. L. & Mrosovsky, N. (1980). Sexual differentiation in hatchling loggerheads (*Caretta caretta*) incubated at different controlled temperatures. *Herpetologica*, 36: 33–36. <http://www.jstor.org/stable/3891850>.

Zárate, P. M., Bjorndal, K. A., Seminoff, J. A., Dutton, P. H., Bolten, A. B. (2015). Somatic growth rates of green turtles (*Chelonia mydas*) and hawksbills (*Eretmochelys imbricata*) in the Galápagos Islands. *Journal of Herpetology*, 49, 641-648. <https://doi.org/10.1670/14-078>

### **CAPÍTULO III.** Origen natal de las tortugas *Chelonia mydas* y *Eretmochelys imbricata* (Testudines:Cheloniidae) en una zona de forrajeo en el Pacífico norte de Costa Rica”

#### **RESUMEN**

Las tortugas marinas suelen pasar un importante periodo de sus vidas en las llamadas zonas de forrajeo, lugares donde distintos grupos etarios se congregan para alimentarse y crecer. El origen natal de las tortugas marinas que se congregan en la mayoría de esos sitios continúa siendo desconocido, aunque se sospecha que estas áreas pueden albergar tortugas de múltiples orígenes. Bahía Matapalito, en el Pacífico Norte de Costa Rica, recientemente fue identificada como sitio de forrajeo de *Chelonia mydas* y *Eretmochelys imbricata*, por lo tanto, examinamos los orígenes natales de esta zona de alimentación. En este estudio, se analizaron secuencias de la región control de ADN mitocondrial (776 bp) en ambas especies. Un total de 27 individuos de *C. mydas* fueron capturados, y sus secuencias relacionados mediante BLAST a 12 haplotipos previamente reportados. El haplotipo más común fue el CmP4.6, seguido de CmP8.1 y CmP97.1 ( $n= 5, 4$  y  $4$ , respectivamente). Al realizar un análisis de poblaciones mixtas se observó que la mayoría de las tortugas verdes tienen su origen natal en el Océano Pacífico Oriental (OPO, 77.5%), pero también estaría conformado por individuos que realizan una migración transpacífica (22.5%) provenientes de colonias del Pacífico central y occidental. En contraste, secuencias de 25 individuos de *E. imbricata* capturados en Bahía Matapalito produjeron 5 diferentes haplotipos, predominando el haplotipo EilP74 ( $n=18$ ), seguido de EilP106 y EilP115 ( $n=2$  y  $1$ , respectivamente). El análisis de poblaciones mixtas mostró que todos los individuos de carey tienen su origen natal en el Pacífico Oriental, exhibiendo así, un patrón de filopatría natal de forrajeo. Estos resultados muestran la importancia de Bahía Matapalito como sitio de alimentación, al hospedar agregaciones de tortugas marinas de múltiples orígenes natales, así como su conectividad con las diferentes colonias dentro y fuera del Pacífico Oriental.

#### **PALABRAS CLAVE**

ADN mitocondrial, región control, haplotipos, filopatría natal de forrajeo

## INTRODUCCIÓN

La mayoría de tortugas marinas existentes, familias Cheloniidae y Dermochelyidae, presentan migraciones de largas distancias, que va de cientos a miles de kilómetros (Bolten, 2003). En general, se sabe que estos reptiles pasan parte de su ciclo de vida en una etapa pelágica temprana en el océano, conocida como “los años perdidos”, seguida de una etapa nerítica (<200m de profundidad) en la que los juveniles “tempranos” se asientan en las zonas de alimentación (Meyland, 1982; Monzon-Arguello et al. 2010). Una vez alcanzada la madurez sexual, que tarda décadas en adquirirse, estas especies migran desde las áreas de alimentación a las áreas reproductivas. Estas últimas suelen estar distanciadas geográficamente, aunque para algunas especies, como *Natator depressus* y *Lepidochelys kempii*, la zona reproductiva y de anidamiento se encuentran menos alejadas de las zonas de alimentación dado a un rango migratorio más restringido (Australia y Golfo de México, respectivamente) (Carr, 1987; Ceballos-Fonseca, 2000; Bolten, 2003; Jensen et al. 2013). Además, la fidelidad natal que caracteriza a estas especies, origina áreas reproductivas (colonias) genéticamente diferenciadas; en contraste con las áreas de alimentación, las cuales suelen estar conformadas por individuos de diversos orígenes natales (Bowen & Karl, 2007, Jensen et al. 2013).

Comprender los patrones de movimiento y su conectividad, que son características clave de la historia de vida resulta fundamental para el conocimiento básico de estos animales marinos, así como para su manejo y conservación, especialmente si se considera que todas las especies de tortugas marinas están altamente amenazadas y que una mala gestión puede conducir a su extinción (Botsford et al. 2003; Semlitsch & Bodie, 2003; Sutherland et al. 2004 & Edwards et al. 2013). Las técnicas moleculares han jugado un papel importante en la comprensión de los movimientos de especies marinas difíciles de estudiar, incluidas las tortugas marinas (Aulsebrook, 1998). Los primeros estudios de genética de población en tortugas marinas fueron hechos en playas de anidación de las tortugas cabezonas *Caretta Caretta* y la tortuga verde *C. mydas* mediante electroforesis de

proteínas (Smith et al. 1977), mostraron una baja diversidad genética, lo cual se repetiría en estudios posteriores empleando ADNmit y ADN nuclear (Avise et al. 1992, Karl et al. 1992, Martin & Palumbi, 1993). Este bajo nivel de variación genética llevo a la mayoría de los investigadores a confiar en la región control del ADNmit para las evaluaciones de la población (Bowen & Karl, 2007). El ADNmit de tortugas marinas y de vertebrados en general, consiste en una molécula circular de doble cadena entre los 16 y 17 Kpb la cual codifica para 22 ARNt, 2 ARNr, 13 proteínas, y una región mayor no codificable (región control, D-loop) la cual contiene señales para la transcripción y replicación mitocondrial (Avise, 1994; Boore, 1999; Drosopoulou et al., 2012). La región control del ADNmit, debido a la herencia materna, se caracteriza por una elevada tasa evolutiva y una mayor proporción de varianza genética entre poblaciones que los marcadores con herencia biparental (Cann, Stoneking & Wilson, 1987). La tasa de mutación generalmente es más alta en el ADNmt que en el nuclear (Ballard & Wirlock, 2004).

Los diversos estudios realizados en la región control del ADNmit, han mostrado una gran diversidad de haplotipos, los cuales han sido ampliamente utilizados para delimitar la estructura de cada colonia de anidación (stock) en unidades de manejo y los patrones de dispersión en las tortugas marinas (Bowen et al. 2007; Dutton & Squires, 2008; Bowen & Karl, 2000; Naro-Maciel et al. 2007, Bowen & Avise 1995; Dethmers et al. 2006). Además, estos resultados se han utilizado posteriormente para estimar la contribución de cada stock en las zonas de alimentación mediante distintos enfoques, entre ellos el análisis de poblaciones mixtas (APM) (Lahanas et al. 1998; Bolker et al. 2003). El APM, utiliza la información genética obtenida de los haplotipos identificados en los diferentes *stocks* o colonias de anidación para estimar la contribución de cada uno a las distintas áreas de forrajeo de las tortugas marinas, y así conocer sobre el reclutamiento y movimiento de estas especies en cada agregación (Bass et al. 1996, Bowen et al. 1996, Dutton et al. 2008, Watanabe et al. 2011, Jensen et al. 2016). Una de las contribuciones más importantes de APM ha sido la confirmación de que las áreas de alimentación a menudo están compuestas por individuos que se originan en múltiples poblaciones de anidación (Jensen et al. 2013).

Para las tortugas verdes del Océano Pacífico Oriental (OPO) se han estudiado distintas colonias para establecer los haplotipos más frecuentes en cada stock. Los principales estudios se han realizado en las Islas Revillagigedo y Colala en México, así como en tres playas de anidación en el Pacífico norte de Costa Rica (Nombre Jesús, Isla San José y Playa coloradas) y en Islas Galápagos en Ecuador (Fonseca et al. 2013; Dutton et al 2014a; Heidemeyer, 2015). En el caso de las tortugas carey *Eretmochelys imbricata*, las principales colonias establecidas para el OPO son en El Salvador (Los Cobanos, Bahía Jiquilisco y Punta Amapola) y en Nicaragua (Estero Padre Ramos, Aserradores y Southern Rivas), seguida de México (Costa Careyes), y en menor frecuencia las establecidas en las zonas de anidación de Costa Rica (Península de Osa), Panamá (Península de Azuero) y Ecuador (Machalilla e Isla San Cristóbal) (Gaos et al. 2016).

El comportamiento de dispersión específico de las tortugas marinas entre las zonas de alimentación y las playas de anidación, no está definido (Jensen et al. 2013). El modelado de simulación de partículas y el seguimiento satelital de tortugas de neonatos sugieren una variedad de vías de dispersión a lo largo de miles de kilómetros, lo que indica que el asentamiento en áreas de alimentación puede ocurrir en escalas espaciales extremadamente grandes (Blumenthal et al. 2009; Hays et al. 2010; Gaspar et al. 2012; Putman & Mansfield, 2015). Las zonas de alimentación generalmente son geográficamente distintas de las zonas de reproducción o anidación, pero constituyen áreas críticas para la conservación de todas las especies de tortugas marinas (Anderson et al. 2013).

En años recientes, se ha observado un número considerable de tortugas marinas forrajeando en Bahía Matapalito, un sitio ubicado en el Pacífico Norte de Costa Rica (Heidemeyer et al. 2014). En este lugar, es frecuente encontrar agregaciones de juveniles de la tortuga verde y la tortuga carey. En este estudio, analizamos secuencias la región control del ADNmit de tortugas verdes y carey que se encontraban forrajeando en Bahía Matapalito. El objetivo principal del presente estudio fue evaluar la distribución de ambas especies respecto a sus colonias natales y la conectividad que hay entre varias unidades de manejo (colonias) hacia

esta bahía. Se pretende que la información obtenida pueda contribuir a la toma de decisiones para mejoras en las estrategias de conservación y manejo gestionadas para las zonas de alimentación, considerando que tendrán efectos proporcionales en cada una de las colonias que contribuyen al agregado de alimentación, siendo ambas especies de tortugas marinas, amenazadas de peligro de extinción.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Sitio de estudio**

El sitio de estudio incluye Bahía Matapalito (BM) ubicada en las coordenadas (10 ° 56' 06" N, 85 ° 47' 42" W), al este de la entrada a Bahía Santa Elena, en el Pacífico Norte de Costa Rica, BM consiste en una pequeña entrada de menos de un kilómetro de diámetro (Figura 1). En la bahía se observa el fondo arenoso con parches de coral dispersos hacia el este, hacia el oeste el fondo alberga una gran comunidad de arrecifes de coral que está parcialmente expuesta durante la marea baja y que se extiende hasta la vecina Bahía de Santa Elena. Extensos afloramientos rocosos que exponen grandes plataformas durante la marea baja bordean la costa, con parches de arrecifes dispersos y una serie de pequeñas playas de arena, como Playa Avellanas y Playa Lagarto. El sitio está sujeto a una alta presión pesquera por parte de comunidades pesqueras cercanas (Heidemeyer *et al.* 2014).

Realizamos un total de 27 giras de campo a Bahía Matapalito, entre marzo del 2018 y julio del 2021. Individuos de distintos grupos de edad de tortugas marinas *C. mydas* y *E. imbricata* fueron capturados y para cada uno de ellos se recopilaron parámetros morfométricos (Anexo II), así como la toma de sangre y tejido en la aleta para sus respectivos análisis en laboratorio. Las tortugas verdes y carey fueron capturadas a mano durante inmersiones de buceo en zonas someras (5-10 m de profundidad) a lo largo de BM. Las tortugas fueron trabajadas a bordo de la embarcación y de no contener etiquetas, fueron marcadas con tags metálicos,

aplicados en la segunda escala de cada aleta delantera. Una vez capturados usamos la medida de la longitud curva del caparazón (LCC) para estimar el grupo de edad al que pertenecían. Para realizar la extracción de ADN mitocondrial de cada individuo de ambas especies fue necesaria la obtención de muestras de tejido, se obtuvo una parte pequeña de aproximadamente  $0.5 \text{ cm}^2$  del tejido muscular de la segunda escama en una de las aletas traseras, cada muestra fue cortada con una hoja estéril de bisturí desinfectando la zona con alcohol antes de realizar el corte, en cada toma de tejido se procuró el menor impacto posible en las tortugas. Cada muestra fue almacenada en tubos de 1 ml con agua salina saturada o etanol al 95% y luego fueron transportadas al Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular en donde se mantuvieron resguardados a  $-4 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta la realización del ensayo. Los permisos de este estudio han sido otorgados por Sistema Nacional de Áreas de Conservación (SINAC) R-SINAC-ACG-PI-042-2019 y la Comisión de Biodiversidad No. 206-2019.

### **Grupo de edad**

Las tortugas verdes y carey fueron clasificadas como juveniles o adultos de acuerdo al tamaño medio de anidación (TMA). En el caso de la *C. mydas* fueron clasificados según la TMA publicados en estudios de las poblaciones de tortugas verdes a lo largo del Pacífico de Costa Rica, el cual se estima que es de 85 cm (Fonseca et al. 2013). Por lo tanto, se consideraron juveniles a los individuos con  $\text{LCC} < \text{TMA}$  y adultos a las tortugas verdes con  $\text{LCC} > \text{TMA}$  (Seminoff et al. 2002a) a excepción de un macho adulto que tenía 84 cm de LCC, pero 43 de total de cola y todas las evidencias morfológicas del mismo sexo. Las tortugas *E. imbricata* fueron clasificadas como juveniles o adultos de acuerdo al TMA publicados en estudios de las poblaciones de tortugas verdes a lo largo del OPO, el cual se estima que es de 81 cm (Liles et al. 2011). Por lo tanto, se consideraron juveniles a los individuos con  $\text{LCC} < \text{TMA}$  (81 cm) y adultos a las tortugas verdes con  $\text{LCC} > \text{TMA}$ . Con excepción de la hembra adulta que tenía 77.50 cm de LCC, la cual fue encontrada anidando.

## Extracción de ADN

Para la extracción de ADN en los tejidos de ambas especies de tortugas marinas se utilizó un protocolo de digestión con proteínasa K seguida de extracción con buffer incluyendo cloruro de litio (LiCl) propuesto por Axayacatl Rocha y modificado por Julia Azanza (Ver anexos).

En todas las muestras se verificó la pureza del ADN obtenido por medio de espectrometría verificando las curvas 260/280 y 260/230 en equipo Nanodrop™ 2000c (Thermo Fischer Scientific).

## Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de la región control (D-Loop) de ADN mitocondrial (ADNmit) se llevó a cabo por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para las tortugas verdes, *C. mydas*, se utilizaron los primers LCM15382 (5'-GCTTAACCCTAAAGCATTGG-3') y H950g (5'-GTCTCGGATTTAGGGGTTT-3'), en el caso de las tortugas carey, *E. imbricata*, se usaron los primers LTEi9 (GGGAATAATCAAAAGAGAAGG-3') y H950 (GTCTCGGATTTAGGGGTTT-3'), en donde se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 900 pb mediante el método de la PCR (Abreu-Grobois et al., 2006).

La reacción de PCR fue de un volumen total de 25 uL por cada tubo de muestra, contenía una mezcla de 12.6 uL de agua para PCR, 1.3 uL de dNTP's (2.5 mM), 2 uL de MgCl<sub>2</sub> (2 mM), 2.2 uL de cada primer (10 mM), 2.5 uL de buffer de PCR 1X (+KCl, - MgCl<sub>2</sub>; Thermo Scientific), 1 U de Taq polimerasa (recombinante 5 U/ul: Thermo Scientific) y 2 ul de ADN extraído en cada muestra de tejido.

Las reacciones de PCR se efectuaron en un termociclador Applied Biosystems® 2720 Thermal Cycler, usando el siguiente perfil de amplificación: Una fase inicial de la desnaturalización de ADN a 94 °C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 3 fases: 1. Desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, 2. Fase de alineamiento de primers a 52 °C durante 30 segundos y 3. Fase de ampliación del

ADN (polimerización de primers) a 72 °C por 60 segundos; y por último una fase de extensión final a 72 °C durante 7 minutos (Heidemeyer, 2015).

Para determinar el éxito de la amplificación, los productos de PCR de cada muestra fueron separados en un 1.2% de gel de agarosa utilizando electroforesis a 90 V por 45 minutos, y controles negativos (sin ADN). Cada uno de los productos de PCR fueron enviados a la empresa Molecular Cloning Laboratory (MCLAB), para su purificación y posteriormente su secuenciación.

### **Análisis de datos**

Las secuencias obtenidas fueron editadas y alineadas manualmente con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.2.5 (Hall, 1999). Todas las secuencias se cortaron a una longitud estándar de 776 bp y fueron alineadas usando el algoritmo CLUSTALW implementado en BioEdit. Posteriormente se compararon con las secuencias reportadas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) para todas las tortugas verde y carey (tabla 1 y 2) mediante la herramienta de búsqueda de alineamiento básico local BLAST (NCBI) para determinar su identidad y de la misma forma, identificar los haplotipos correspondientes a cada muestra. Se evaluó la variación genética de la población utilizando valores descriptivos empíricos como diversidad de haplotipos ( $h$ ) y diversidad de nucleótidos ( $\pi$ ) (Nei, 1987). Estos valores fueron obtenidos usando el programa DNAsp versión 6.12.03 (Rozas et al. 2003).

Se realizó un análisis de poblaciones mixtas (APM) utilizando el enfoque bayesiano implementado en el paquete MIXSTOCK en R (Bolker, 2012). El APM es una metodología estadística para inferir el origen más probable (la contribución de cada colonia o stock) de los individuos de una especie migratoria que coexisten en un área de agregación (Pella & Milner, 1987). Los métodos estadísticos implementados en el paquete MIXSTOCK se describen en Bolker et al. (2003) y Pella y Masuda (2001), el cual es un método numérico mediante cadenas de Markov Montecarlo (MCMC), en donde el MCMC toma las frecuencias haplotípicas de los

datos originales y con información y asunciones *a priori* sobre la distribución de los parámetros, genera valores aleatorios y plausibles de estos. Las colonias de origen que se usaron para la construcción del stock de cada una de las dos especies fueron las ya reportadas para la tortuga verde y carey en la región del OPO (Tablas 9 y 10). Usamos el enfoque centrado en la zona de alimentación para estimar la distribución posterior con intervalos de confianza del 95% de proporciones desconocidas de colonias de ambas especies. Es decir, la proporción del stock de tortugas marinas verde y carey de BM que se origina en las colonias distintas.

## RESULTADOS

### *Chelonia mydas*

#### Grupos de edad en *C. mydas*

Se recolectaron un total de 44 muestras de tortugas verdes agregadas en BM con LCC entre 45–92 cm ( $72.21 \pm 13.35$ , promedio  $\pm$  SD). Cada uno de los individuos juveniles capturados se encontraban en reposo o alimentándose en las inmediaciones de la Bahía. Del total de individuos muestreados de tortuga verde, 33 fueron juveniles y 11 adultos. Solo fue posible extraer ADN y secuenciar la muestra de 21 juveniles y 6 adultos de tortuga verde.

#### Análisis de ADNmit en *C. mydas*

Mediante la secuenciación de la región control del ADNmit de 27 tortugas verdes que se encontraban agregadas en Bahía Matapalito se identificó la presencia de 12 haplotipos previamente reportados para esta especie (Figura 8). Los haplotipos en juveniles de *C. mydas* encontrados en este estudio fueron CmP4.6 (n=3), que junto con el CmP1.1 (n=1), CmP4.1 (n=1) CmP8.1 (n=3), han sido reportados como parte del linaje genético en zonas del centro y norte del OPO. También se hallaron los haplotipos CmP5.1 (n=1) y CmP17.2 (n=1) que son considerados endémicos de Michoacán, México y del Pacífico de Costa Rica, respectivamente. De igual forma fueron identificados 3 haplotipos que ya han sido

reportados en zonas de alimentación, pero no en zonas de anidación, por lo tanto, se les conoce como “huérfanos”: CmP49.9 (n=1), CmP109.1 (n=1) y CmP132.1 (n=2). Finalmente se observaron los haplotipos CmP97.1 (n=4), CmP65.1 (n=3) los cuales han sido reportados para linajes genéticos del Pacífico central occidental. Además, se identificaron en hembras adultas los haplotipos CmP4.6 (n=2), CmP4.1 (n=2), CmP4.7 (n=1) y en un macho adulto el haplotipo CmP8.1.

En los 12 haplotipos identificados para las tortugas verde de BM, encontramos que la diversidad haplotípica ( $h$ ) fue alta ( $0.896 \pm 0.021$ , promedio  $\pm$  SD) y la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) fue moderada ( $0.026 \pm 0.003$ , promedio  $\pm$  SD).

### **Análisis de poblaciones mixtas (APM) en *C. mydas***

Para el análisis de poblaciones mixtas aplicado a los individuos de *C. mydas* que forrajeaban en los alrededores de BM se utilizaron como colonias fuente o *stocks* la frecuencia relativa reportadas de 8 poblaciones anidadoras del Pacífico Oriental y 2 colonias del Pacífico central (Hawaii), estas últimas debido a la presencia de haplotipos de estas colonias en el Pacífico oriental (Tabla 9). La contribución obtenida del APM indico que la zona de alimentación está compuesta en su mayoría (48.6%) por tortugas verdes que tienen su origen natal en el Pacífico de Costa Rica (Tabla 11). El linaje más frecuente encontrado fue el de la Isla San José que tuvo una contribución del 20.2% (IC, 0-72.6%), seguido de playa Colorada con un 18.6% (IC, 0.00-57.9%) y también de la costa pacífica de Costa Rica con una contribución del 9.8% (IC, 0-68.58) playa Nombre de Jesús. A su vez el linaje de Colala, en Michoacán, México muestra una contribución del 11.2% (IC, 0-35.9%), dos localidades de Galápagos, Las Bachas y las Salinas, con un 8.4% y 7.7%, respectivamente. A su vez, se encontró una contribución del 7.2% de Islas Marshall ubicada en el Indo-Pacífico. Igualmente se obtuvo una contribución del 6.2% y 5.3% de La Samoa Americana y la Polinesia Francesa, respectivamente, ubicadas en la región del Pacífico Sur (Figura 10).

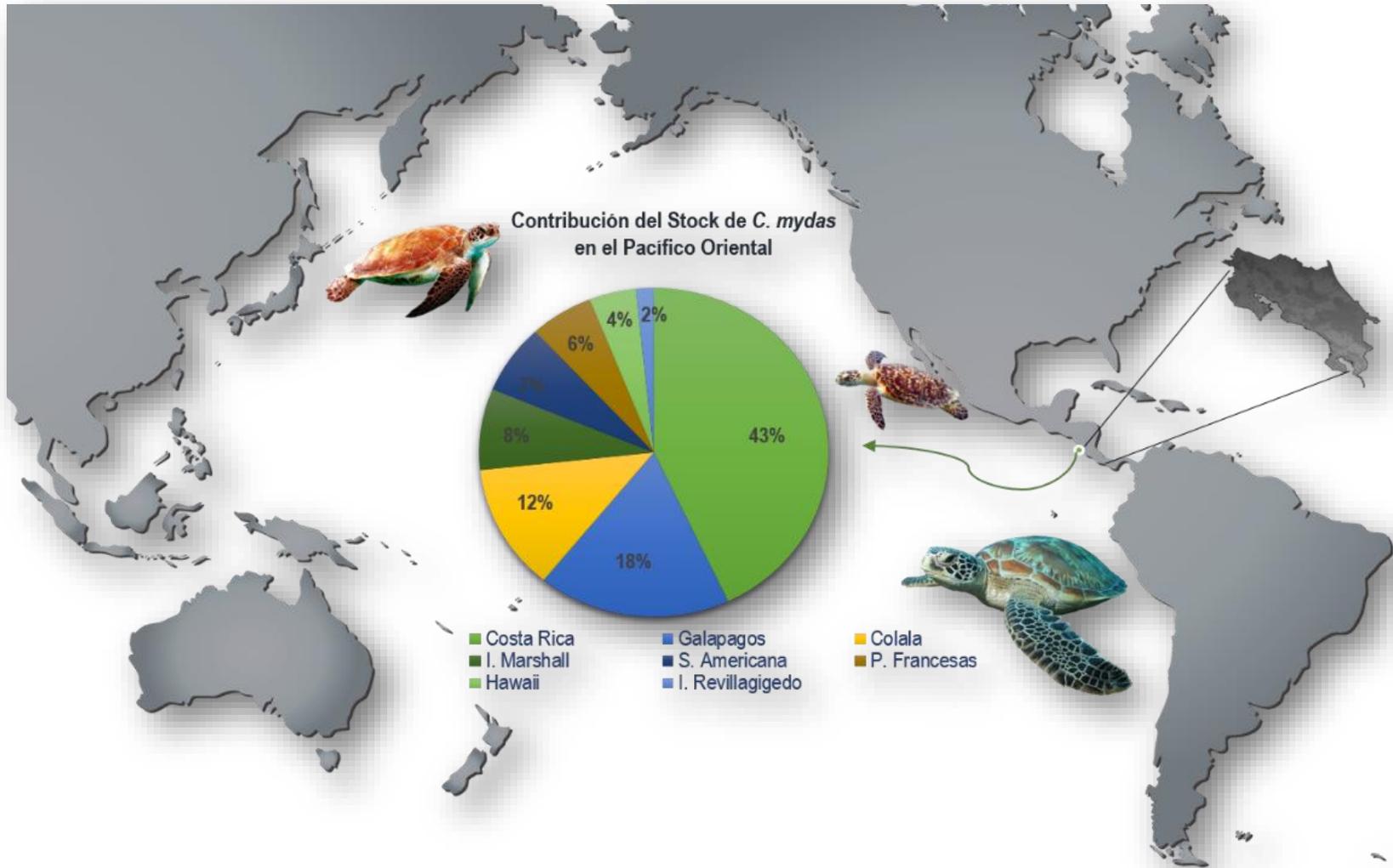


Figura 10. Contribución obtenida del análisis de poblaciones mixtas para *C. mydas* en Bahía Matapalito.

## ***Eretmochelys imbricata***

### **Grupos de edad en *Eretmochelys imbricata***

Se recolectaron un total de 33 tortugas *E. imbricata* con LCC entre 34.5-92 cm ( $44.39 \pm 12.88$  cm, promedio  $\pm$  SD) que se encontraban forrajeando en BM. Cada uno de estos reptiles fue capturado mientras se encontraban en reposo o alimentándose en la Bahía, a excepción de la hembra adulta que se encontraba anidando. Del total de las tortugas carey muestreadas, 31 fueron juveniles ( $41.79 \pm 7.61$  cm de LCC) y 2 adultos, un macho y una hembra anidadora (92 cm y 77.5 cm de LCC, respectivamente). No obstante, solo fue posible obtener ADN y secuenciar la muestra de 23 juveniles y lo 2 adultos de tortuga carey.

### **Análisis de ADNmit en *E. imbricata***

A través de la secuenciación de la región control del ADNmit de 25 tortugas carey agregadas en BM se logró identificar un total de 5 diferentes haplotipos (Figura 9) previamente reportados. El más frecuente fue el EilP74 ( $n=18$ ) que incluye los 2 adultos de esta especie en este estudio, este haplotipo está relacionado con áreas de anidación en las costas del Pacífico Americano Central del OPO. Se identificó el haplotipo EilP106 en 2 juveniles, el cual ha sido relacionado con zonas de anidación de Bahía Jiquilisco en El Salvador, y Estero Padre Ramos en Nicaragua. A su vez se relacionó un juvenil con el haplotipo EilP115, el cual ha sido reportado solo zonas de anidamiento de la Península de Osa en Costa Rica. Se encontraron dos haplotipos “huérfanos”, EilP132 ( $n=3$ ) y EilP133 ( $n=1$ ), ambos se han relacionado con juveniles forrajeando en el Pacífico colombiano.

Para las tortugas carey que se encontraban forrajeando en BM se encontraron 5 haplotipos diferentes, en los cuales observamos que la diversidad haplotípica ( $h$ ) fue alta ( $0.543 \pm 0.119$ , promedio  $\pm$  SD) y la diversidad nucleotídica fue moderada ( $0.002 \pm 0.003$ , promedio  $\pm$  SD).

### **Análisis de poblaciones mixtas (APM) en *E. imbricata***

Para el análisis de poblaciones mixtas (APM) de las tortugas *E. imbricata* que se alimentaban en la zona de forrajeo de BM se utilizaron como colonias “fuente” o “stocks” 11 poblaciones de zonas de anidación previamente estudiadas en el Pacífico Oriental (Tabla 10). En la Tabla 12 se observan los resultados del APM, el cual permitió identificar que los dos sitios que más contribuyen en esta zona de alimentación, son individuos de carey que aparentemente tienen su origen natal en Península de Osa del Pacífico costarricense, 40.23% (IC, 0-97.64%) y la Península de Azuero en Panamá con 37.74% (IC, 0-95.81%). Otra de las colonias que se observó que contribuye con individuos a esta zona de alimentación es el Southern Rivas de Nicaragua con 12.81% (IC, 0-88.74%). Finalmente, otra colonia que ha mostrado una contribución en BM es Bahía Jiquilisco en El Salvador con 3.76% (IC, 0-20%) (Figura 11).

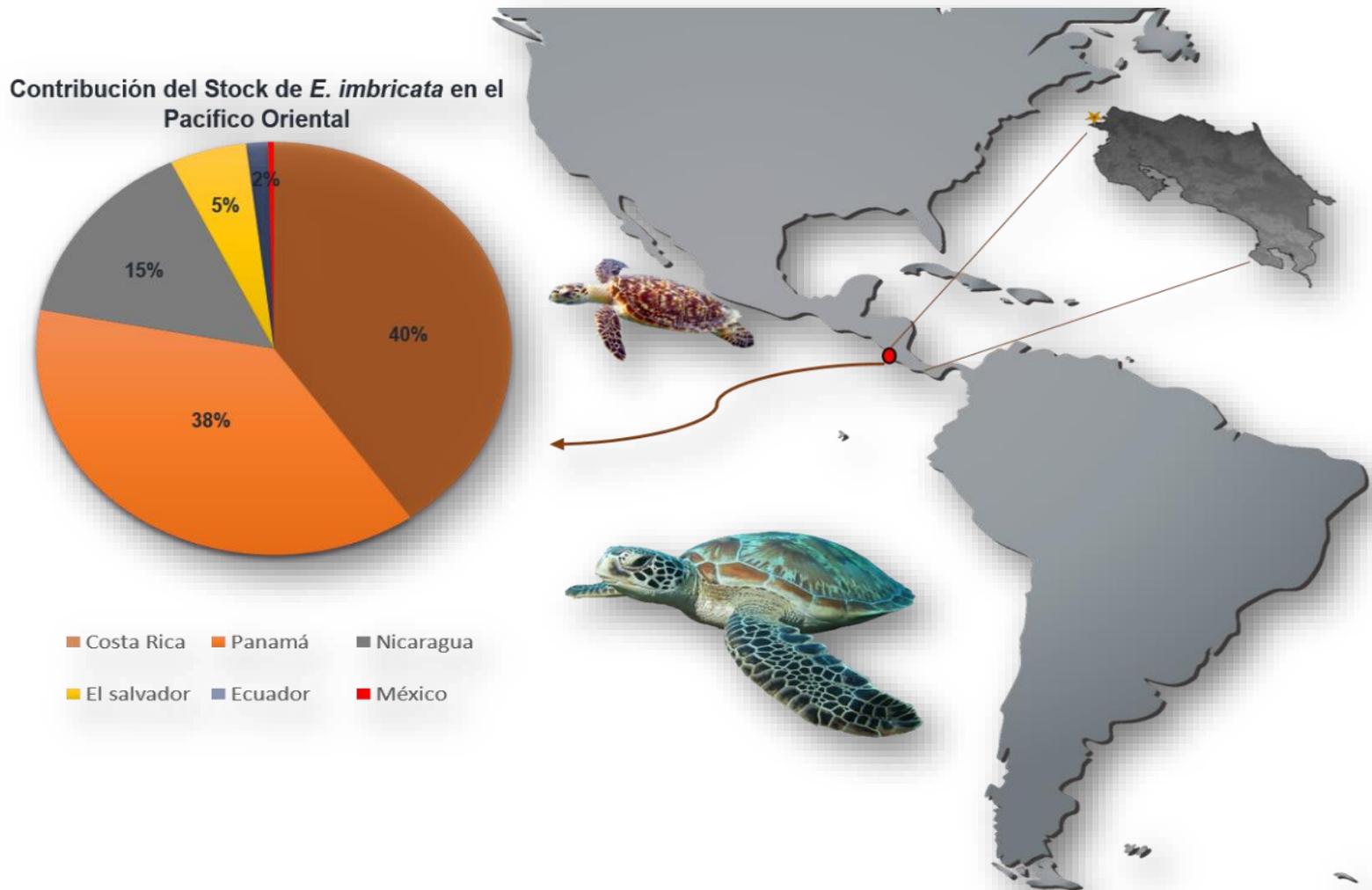


Figura 11. Contribución obtenida del análisis de poblaciones mixtas para *E. imbricata* en Bahía Matapalito.

## DISCUSIÓN

### *Origen natal Chelonia mydas*

Este estudio es el primer ensayo sobre origen natal que se realiza en una zona de alimentación identificada en la parte continental del Pacífico de Costa Rica, tanto para la tortuga verde *C. mydas*, como para la tortuga Carey *E. imbricata*, proporcionando información relevante sobre la conectividad de las agregaciones de esta área respecto a las colonias del OPO y colonias del Pacífico Occidental. Nuestra diversidad haplotípica resultó similar a lo observado en inmaduros de *C. mydas* evaluados en las zonas de forrajeo de Playa Chinchorro y Bahía Salado de Chile ( $0.860 \pm 0.002$ ) (Alvares-Varas et al. 2022). Sin embargo, la diversidad exhibida en Bahía Matapalito (BM) fue alta en comparación a lo reportado en agregaciones de juveniles en zonas de forrajeo de la Isla Gorgona en Colombia ( $0.300 \pm 0.080$ ), Hawaii ( $0.464 \pm 0.018$ ), Isla del Coco en Costa Rica ( $0.476 \pm 0.078$ ) y Palmyra Atoll en USA ( $0.619 \pm 0.005$ ) (Amorocho et al. 2012; Dutton et al. 2008; Heidemeyer, 2015; Naro-Maciel et al. 2014).

La mayoría de los haplotipos identificados para *C. mydas* en Bahía Matapalito corresponden a colonias de anidación descritas en El Pacífico Oriental, destacando CmP4.6, CmP8.1 y CmP4.1. Este último es considerado como un haplotipo regional ancestral y abundante en el OPO (Dutton et al. 2014a), pero también se ha identificado en agregaciones del Pacífico central (Atolón Palmyra; Naro-Maciel et al. 2014). El haplotipo CmP4.6 ha sido relacionado principalmente a colonias de Costa Rica y Galápagos (Dutton et al. 2014a; Chaves et al. 2017) pero también fue frecuentemente observado en inmaduros agregados en Islas del Coco (Heidemeyer, 2015). Dos de los haplotipos encontrados (CmP5.1 y CmP17.2) son considerados endémicos pues habían sido reportados sólo en sitios de anidación de Colala, Michoacán en México y en Playa Colorada y Nombre de Jesús en Costa Rica (Dutton et al. 2014a). Por otro lado, se encontraron varios haplotipos previamente reportados en colonias del Pacífico Occidental. Así, CmP65.1 fue encontrado en las Islas Marshall, Samoa Americana y la Polinesia Francesa (Dutton et al. 2014b); CmP97.1 ha sido reportado en zonas de forrajeo de Atolón Palmyra

(Naro-Maciel et al. 2014), pero también en las colonias de anidación de la Polinesia Francesa. Este último haplotipo se clasifica como un clado del Océano Índico Occidental y el Océano Pacífico Sudoccidental (Boissin et al. 2019). Tres otros haplotipos (CmP49.9, CmP109.1 y CmP132.1) han sido reportados a bajas frecuencias en las zonas de alimentación del Atolón Palmyra en el Sur-central Pacífico, pero se desconocen las colonias del origen natal (Naro-Maciel et al. 2014).

Como se desprende de nuestro APM, la mayor contribución al stock genético de *C. mydas* en BM, a partir de colonias del OPO, siendo la Isla San José y Playa coloradas de Costa Rica las que predominaron. Este patrón de conectividad en donde los haplotipos encontrados en las agregaciones de forrajeo tienen su origen en las colonias de anidamiento próximas también ha sido observado en otros sitios de alimentación para esta especie en Ecuador (Machalilla y Galapagos; Chaves et al. 2017) y Hawaii (Dutton et al. 2008). Un dato que resulta relevante en nuestro estudio es la contribución haplotípica de colonias geográficamente lejanas (>10000km) ubicadas en Pacífico occidental, como lo son las colonias alrededor de Islas Marshall, Samoa Americana y Polinesia Francesa, cuyos haplotipos también han sido identificados en sitios de alimentación de Islas del Coco (Costa Rica) e Isla de Pascua (Chile) (Heidemeyer, 2015; Alvarez-Varas et al. 2022). Además, los haplotipos “huérfanos” encontrados en BM también han sido reportadas en agregaciones del Pacífico Occidental, por lo que, aunque no disponemos de sus frecuencias natales en esta región podemos suponer que tienen su origen en ella. En consecuencia, lo anterior podría representar evidencia de un reclutamiento transpacífico entre las tortugas verdes, sugiriendo que la conectividad entre las *C. mydas* del Pacífico son espacialmente más grandes de lo que se pensaba para la especie, aunque ya ha sido observado en otras especies de tortugas marinas (*Caretta caretta*: Bowen et al. 1995, *Dermochelys coriacea*: Dutton et al. 2000).

Dutton et al. 2014b señalan que no hay evidencia de haplotipos compartidos entre el Pacífico Oriental y Occidental, presuntamente debido por una ruptura fitogeográfica al oeste del archipiélago hawaiano hace 300, 000 años. Distinto de lo que se observa con las poblaciones del Pacífico occidental, las colonias de

nidificación de Hawaii (Pacífico Central) estiman una baja contribución para este estudio (3.9%) a BM, sin embargo, también se ha reportado en bajas frecuencias en tortugas verdes que forrajeaban en sitios de alimentación de las Islas Galápagos, Islas del Coco y Gorgona (Zarate et al. 2007; Heidemeyer, 2015; Amorocho et al. 2012) y en colonias de Isla Revillagigedo en México. La contribución estimada de la región central y occidental del Pacífico hacia BM sugiere una mayor conectividad entre estas poblaciones, por lo que investigaciones más exhaustivas que incluyan las raíces clave del Pacífico y nuevos marcadores genéticos debería proporcionar estimaciones más precisas de la composición de la población y la conectividad entre las poblaciones de anidación y las de forrajeo (Bolker et al. 2007; Dutton & Frey, 2008; Hansen et al. 2007).

#### *Origen natal de Eretmochelys imbricata*

En las tortugas *E. imbricata* que se encontraban forrajeando en BM se observó una diversidad haplotípica moderada y similar a los hallazgos en las áreas de alimentación en Isla Espíritu Santo de México ( $0.538 \pm 0.034$ ) y Southern Rivas en el país vecino de Nicaragua ( $0.0523 \pm 0.105$ ) (Gaos et al. 2018). A su vez, estos resultados contrastan con los reportados para colonias nidificantes en Golfo Dulce (Pacífico sur de Costa Rica), en donde se exhibe una baja diversidad ( $0.314 \pm 0.071$ ) y en el Parque Nacional Natural Gorgona (Colombia) ( $0.285 \pm 0.196$ ) (Trujillo-Arias et al. 2014; Gaos et al. 2018). Aunque la diversidad genética que se observa en los individuos de carey de BM es moderada, más del 80 % de la población estudiada aquí en esta especie de tortuga tienen su origen natal en colonias del Pacífico Oriental, principalmente en *stocks* de América central y la otra parte ha sido identificada en zonas de alimentación con posible origen natal en la región.

Para las tortugas carey que se encontraban forrajeando en BM se identificaron 5 haplotipos, todos previamente reportados en la región del OPO, el haplotipo con mayor frecuencia relativa ( $n=18$ ) fue el EilP74, el cual es considerado como exclusivo de las colonias del Pacífico oriental, que primeramente fue identificado en inmaduros de las zonas de alimentación del Pacífico Colombiano

(Trujillo-Arias et al. 2014), y posteriormente fue relacionado con las colonias de anidación que en su mayoría eran playas de costa abiertas de Nicaragua, Costa Rica, Panamá y Ecuador, siendo más frecuente en Costa Rica (Península de Osa) (Gaos et al. 2016). Por otro lado, este haplotipo también fue identificado en sitios de alimentación de las Islas Howickcs en la Gran Barrera de Coral, Australia (Jensen & Bell, 2016), pero solo ha sido reportado su origen natal en las colonias del Pacífico Centroamericano, entonces, a menos que se descubran colonias de anidación en otras partes del Pacífico que alberguen el haplotipo EilP74, los neonatos de carey pueden estar emigrando fuera del OPO. La dispersión de estas crías hacia el oeste desde América central podría ser factible a través de las corrientes Ecuatoriales del norte o sur junto con las corrientes de California y Perú (Gaos et al. 2016).

Adicionalmente se observó la presencia del haplotipo EilP106 en dos individuos, el cual ha sido identificado exclusivamente en hembras anidando en estuarios de manglar, en colonias de El Salvador y Nicaragua. Este haplotipo ha sido reportado con una alta frecuencia relativa en estas colonias (Gaos et al. 2016), pero a pesar de la cercanía de estas colonias con BM este haplotipo solo fue hallado en 2 juveniles de carey en este sitio de alimentación. Una de las colonias que más contribuye a los individuos observados en BM es la ubicada en la Península de Osa, la cual ha sido la única en reportar también al haplotipo EilP115 (Gaos et al. 2016), mismo que se identificó en un individuo en este estudio. De la misma manera se identificaron dos haplotipos “huérfanos” (EilP132 y EilP133) en 4 individuos de carey, los cuales ya han sido reportados en áreas de forrajeo, principalmente en Colombia y Panamá (Trujillo-Arias et al.2014; Gaos et al. 2018), seguido de sitios de alimentación en Oaxaca y el Golfo de California en México (Gaos et al. 2016; Zúñiga-Marroquín et al. 2017). Aunque se desconoce el origen natal de estos haplotipos, es razonable asumir que estos individuos podrían tener su origen en alguna colonia de México o América Central, considerando la estrecha relación con los haplotipos recuperados en estas áreas de anidación (Zúñiga-Marroquín et al. 2017).

En BM se identificaron 3 haplotipos de los 7 reportados para *E. imbricata* en la región del Pacífico Oriental (Gaos et al. 2016). Esta cantidad de haplotipos es un número bajo para el stock de la región, en contraste a los ya conocidos en colonias del Indo-Pacífico (52 haplotipos) y las del Caribe (23 haplotipos), que son regiones con mayor cantidad de colonias estudiadas y más estables en comparación con las tortugas carey del Pacífico Oriental (Vargas et al. 2015; LeRoux et al. 2012; Monzón Arguello et al. 2011). La moderada diversidad observada aquí no resulta novedosa si se considera que la región del OPO alberga colonias pequeñas, estimando que al menos 5 de las 9 colonias identificadas hasta el momento, están compuestas por menos de 20 hembras, y las más grandes, Bahía Jiquilisco (El Salvador) y Estero Padre Ramos (Nicaragua) de solo 155 y 210 hembras anidadoras, respectivamente (Gaos et al. 2010; Altamirano, 2014; Liles et al. 2015).

A diferencia de lo que se observa en los individuos de las tortugas de *C. mydas* en BM, donde se estiman contribuciones importantes del Pacífico central y Occidental hacia esta población, todas las tortugas de *E. imbricata* agregadas a esta bahía tendrían su origen natal en la región del Pacífico Oriental. Mediante el APM se estimó que la contribución más alta fue de las colonias anidadoras de América central provenientes de La Península de Osa (Costa Rica), seguida de la Península Azuero (Panamá) y en menor medida la colonia de Southern Rivas (Nicaragua), a pesar de que esta última colonia es geográficamente más cercana a BM (<200km) en comparación con las dos principales (500 km aproximadamente). Es importante resaltar que, aunque las contribuciones de las colonias fuentes de las tortugas carey del OPO variaron hacia BM, las contribuciones primarias fueron dadas por las colonias de América central. Los resultados del APM de las tortugas carey en este estudio muestran un importante comportamiento de filopatría de forrajeo natal, lo cual coincide con lo que ha sido observado en tortugas cabezona (*Caretta, caretta*), tortuga verde y carey juveniles del Atlántico (Bowen et al. 2004; Bowen et al. 2007; Bass et al. 2004; Naro-Maciel et al. 2007; Naro-Maciel et al. 2012; Monzón-Arguello et al. 2010; Prosdocimi et al. 2011) pero también recientemente en la región del OPO (Gaos et al. 2017; Gaos et al. 2018). Donde se postula que algunas poblaciones de tortugas marinas usan áreas de alimentación en la región de sus

colonias de origen, es decir, exhiben un grado mucho más alto de filopatría a áreas natales en todos sus estados de vida y no solamente durante la edad reproductiva como lo que previamente se creía. A pesar de que en nuestros resultados en la tortuga verde no observamos únicamente la presencia de haplotipos regionales, la mayoría de estos fueron relacionados con haplotipos del OPO, por lo que de alguna manera estarían reflejando un grado de comportamiento filopátrico natal de forrajeo.

Se necesitan muchos más estudios en diferentes áreas de alimentación de la región y con una  $n$  más consistente para poder estimar con más claridad el efecto de filopatría natal de forrajeo en tortugas verdes del OPO, sin embargo, la omnipresencia del patrón es particularmente notable dado que puede manifestarse incluso en especies y poblaciones que se sabe que experimentan un patrón de dispersión panmíctica posterior a la cría (Bowen et al. 2004; Naro-Maciel et al. 2012; Mansfield et al. 2014). Quizá una de las razones de por qué en las tortugas carey del OPO es más claro el patrón de filopatría natal de forrajeo que en las tortugas verdes esté relacionado con que *E. imbricata* no se ajusta a la teoría de dispersión en mar abierto en la que se cree que las tortugas emergen de sus nidos para abandonar las áreas natales a través del arrastre en las corrientes marinas (Luschi et al. 2003; Bolten, 2003; Mansfield et al. 2014). Se ha observado que las tortugas carey a lo largo del Pacífico Centroamericano anidan en colonias ubicadas dentro de los estuarios de manglares costeros (Gaos et al. 2012; Liles et al. 2015) y estos sistemas están fuertemente regulados por las fluctuaciones de las mareas. Junto con la forma de nadar reducida que exhiben las tortugas carey en comparación con otras especies de tortugas marinas (Chung et al. 2009), estas corrientes podrían mantener a las crías de carey más cerca de la costa durante la fase inicial posterior a la eclosión en el Pacífico oriental (Wildermann et al. 2017).

### *Conclusiones y recomendaciones*

Pese a la observación de la convivencia simpátrica entre *C. mydas* y *E. imbricata* en BM, el hallazgo en la estructura genética de ambas especies de tortugas marinas

(verde y carey) resulta disímil, y aunque se conocen las diferencias biológicas y ecológicas en cada especie, por ejemplo, el comportamiento solitario de *E. imbricata* y gregario de *C. mydas*, tipo de dieta, áreas de distribución y fluctuaciones demográficas (Kamezaki et al. 1995; Sanches y Bellini, 1999; Amorocho & Reina 2007; Naro-Maciel et al. 2008), el papel potencial de la filopatría en las áreas de alimentación (Gaos et al. 2017) durante las etapas de juveniles, se muestra ejemplificada en este estudio, sobre todo en las tortugas carey.

Los hallazgos de los múltiples orígenes natales de la tortuga verde y carey en Bahía Matapalito, junto con la presencia de haplotipos huérfanos, sugieren que las zonas de alimentación del pacífico costarricense y el resto de Centroamérica podrían estar conformadas de un escenario complejo, ya que albergarían tortugas de orígenes natales potencialmente diferentes, por lo que se resalta la importancia de aumentar esfuerzos de muestreo genético sobre todo en la parte del Pacífico sur-central y oriental para comprender mejor la conectividad y establecer mejoras en las estrategias regionales de conservación de estas especies amenazadas de peligro de extinción.

## BIBLIOGRAFÍA

Abreu-Grobois, F. A., Horrocks, J., Formia, A., Dutton, P., LeRoux, R., Vélez-Zuazo, X. et al. (2006). New mtDNA dloop primers which work for a variety of marine turtle species may increase the resolution capacity of mixed stock analyses. Pp. 179 in M. Frick, A. Panagopoulou, A. F. Rees and K. Williams, eds. Proceedings of the twenty-sixth annual symposium on marine turtle biology and conservation. International Marine turtle Society. Crete, Greece. 1 - 8 April 2006.

Altamirano, E. (2014). Informe del Proyecto de Conservación de tortuga Carey (*Eretmochelys imbricata*) en la RN Estero Padre Ramos, Nicaragua. Temporada 2014. Technical Report. Pp. 34. Fauna y Flora International & EP Hawksbill Initiative. Managua, Nicaragua.

Álvarez-Varas Rocío, Rojas-Hernández Noemi, Heidemeyer Maike, Riginos Cynthia, Benítez Hugo A., Araya-Donoso Raúl, Reséndiz Eduardo, Lara-Uc Mónica, Godoy Daniel A., Muñoz-Pérez Juan Pablo, Alarcón-Ruales Daniela E., Alfaro-Shigueto Joanna, Ortiz-Alvarez Clara, Mangel Jeffrey C., Vianna Juliana A. and Véliz David. (2021). Green, yellow or black? Genetic differentiation and adaptation signatures in a highly migratory marine turtle Proc. R. Soc. B.2882021075420210754

Álvarez-Varas, Rocío, Carol Medrano, Hugo A. Benítez, Felipe Guerrero, Fabiola León Miranda, Juliana A. Vianna, Camila González, and David Véliz. (2022). "Genetics, Morphometrics and Health Characterization of Green Turtle Foraging Grounds in Mainland and Insular Chile" Animals 12, no. 12: 1473. <https://doi.org/10.3390/ani12121473>

Amorocho, D.F. & Reina, R.D. (2007). Feeding ecology of the East Pacific green sea turtle *Chelonia mydas agassizii* at Gorgona National Park, Colombia. Endang Species Res3: 43–51

Amorocho, D.F., Abreu-Grobois, F.A., Dutton, P.H. & Reina, R.D. (2012). Multiple distant origins for green sea turtles aggregating off Gorgona Island in the Colombian Eastern Pacific. PLoS ONE, 7, e31486.

Anderson, J. D., Shaver, D. J., & Karel, W. J. (2013). Genetic Diversity and Natal Origins of Green Turtles (*Chelonia mydas*) in the Western Gulf of Mexico. Journal of Herpetology, 47(2), 251–257. <http://www.jstor.org/stable/43287339>

Avise, J. C. (1992). Molecular population structure and the biogeographic history of a regional fauna: A case history with lessons for conservation biology. Oikos, 63, 62-76.

Avise, J. C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. New York: Chapman & Hall.

Avise, J.C. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. Mol Ecol. 7:371-379

Ballard, J.W.O. & Whitlock M.C. (2004): The incomplete natural history of mitochondria. Mol. Ecol. 13: 729–744

Bass, A.L., Epperly, S.P. & Braun-McNeill, J. 2004 Multi-year analysis of stock composition of a loggerhead turtle (*Caretta caretta*) foraging habitat using maximum likelihood and Bayesian methods. Conserv. Genet. 5, 783–796. (doi:10.1007/s10592-004-1979-1)

Bass, A.L., Good, D.A., Bjorndal, K.A., Richardson, J.I., Hillis, Z.M., Horrocks, J.A. & Bowen, B.W. (1996). Testing models of female reproductive migratory behaviour and population

structure in the Caribbean hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, with mtDNA sequences. *Mol Ecol* 5: 321–328

Blumenthal, J. M., Abreu-Grobois, F. A., Austin, T. J., Broderick, A. C., Bruford, M. W., Coyne, M. S., Ebanks-Petrie, G., Formia, A., Meylan, P. A., Meylan, A. B., & Godley, B. J. (2009). Turtle groups or turtle soup: dispersal patterns of hawksbill turtles in the Caribbean. *Molecular ecology*, 18(23), 4841–4853. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04403.x>

Boissin, E., Neglia, V., Boulet Colomb D'hauteserre, F., Tatarata, M. & Planes, S. (2019). Evolutionary history of green turtle populations, *Chelonia mydas*, from French Polynesia highlights the putative existence of a glacial refugium. *Mar. Biodivers*, 49, 2725–2733.

Bolker, B.M., Okuyama, T., Bjorndal, K.A. & Bolten, A.B. (2007) Incorporating multiple mixed stocks in mixed stock analysis: 'many-to-many' analyses. *Molecular Ecology*. pp 685–695.

Bolker, B. M. (2012). Mixed stock analysis in R: Getting started with the mixstock package. Retrieved from <https://rforge.rproject.org/scm/viewvc.php/%2Acheckout%2A/pkg/inst/doc/mixstock.pdf> revision=31%26root=mixstock%26pathrev=31

Bolker, B., Okuyama, T., Bjorndal, K. & Bolten, A. (2003). Sea turtle stock estimation using genetic markers: accounting for sampling error of rare genotypes. *Ecol. Appl.* 13: 763–775.

Bolten, A.B. (2003). Variation in sea turtle life history patterns: neritic vs. oceanic developmental stages. In *The biology of sea turtles*, vol. II (eds PL Lutz, J Musick, JWyncken), pp. 243–257. Boca Raton, FL: CRC Press.

Boore, J.L. (1999). Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.* 27;1767–1780.

Botsford, L.W., Micheli, F. & Hastings, A. (2003). Principles for the design of marine reserves. *Ecol Appl* 13: 25–31.

Bowen, B.W. & Avise, J.C. (1995). Conservation genetics of sea turtles. In: Avise JC, Hamrick JL, eds. *Conservation Genetics: case histories from nature*. New York: Chapman and Hill. pp 190–237.

Bowen, B.W., Bass, A.L., Garcia-Rodriguez, A., Diez, C.E. and others. (1996). Origin of hawksbill turtles in a Caribbean feeding area as indicated by genetic markers. *Ecol Appl* 6: 566–572

Bowen, B.W., Bass, A.L., Soares, L.S. & Toonen, R.J. (2004). Natal homing in juvenile loggerhead turtles (*Caretta caretta*). *Mol. Ecol.* 13, 3797–3808. (doi:10.1111/j.1365-294X.2004.02356.x)

Bowen, B.W., Grant, W.S., Hillis-Starr, Z., Shaver, D.J., Bjorndal, K.A., et al. (2007). Mixed-stock analysis reveals the migrations of juvenile hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) in the Caribbean Sea. *Molecular Ecology* 16: 49–60. (doi:10.1111/j.1365-294X.2006.03096.x)

Bowen, B.W. & Karl, S.A. (2000). Meeting report: taxonomic status of the East Pacific green turtle (*Chelonia agassizii*). *Marine Turtle Newsletter*. pp 20–22.

Bowen, B. W., F. A. Abreu-Grobois, G. H. Kamezaki, C. J. Limpus, and Ferl, R.J. (1995). Trans-Pacific migrations of the loggerhead sea turtle demonstrated with mitochondrial DNA markers. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 92: 3731– 3734.

Bowen, B.W. & Karl, S.A. Population genetics and phylogeography of sea turtles. *Mol. Ecol.* 2007, 16, 4886–4907.

Cann, R.L., Stoneking, M. & Wilson, A.C. (1987). Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 325: 31-36

Carr, A. (1987). New perspectives on the pelagic stage of sea turtle development. *Conserv. Biol.*, 1: 103-121.

Ceballos-Fonseca, C.P. (2000). Tortugas (Testudinata) marinas y continentales de Colombia. *Biota Colombiana* 1 (2): 187-194.

Chaves, J.A., Peña, M., Valdés-Urbe, J.A., Muñoz-Pérez, J.P., Vallejo, F., Heidemeyer, M., & Torres-Carvajal, O. (2017). Connectivity, population structure, and conservation of Ecuadorian green sea turtles. *Endangered Species Research*, 32, 251-264.

Chung, F.C., Pilcher, N.J., Salmon, M. & Wyneken J. (2009). Offshore migratory activity of hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) hatchlings, II. Swimming gaits, swimming speed, and morphological comparisons. *Chelonian Conserv. Biol.* 8, 35–42. (doi:10.2744/CCB-0716.1)

Dethmers, K.M., Broderick, D., Moritz, C., FitzSimmons, N., Limpus, C., et al. (2006). The genetic structure of Australasian green turtles (*Chelonia mydas*): exploring the geographical scale of genetic exchange. *Molecular Ecology* 15: 3931–3946.

Drosopoulou, E., Tsiamis, G., Mavropoulou, M., Vittas, S., Katselidis, K.A., Schofield, G., Palaiologou, D., Sartsidis, T., Bourtzis, K., Pantis, J. (2012). The complete mitochondrial genome of the loggerhead turtle *Caretta caretta* (Testudines:Cheloniidae): genome description and phylogenetic considerations. *Mit. DNA* 23, 1–12.

Dutton, P. & Squires, D. (2008). Reconciling biodiversity with fishing: a holistic strategy for Pacific sea turtle recovery. *Ocean Development & International Law* 39: 200–222.

Dutton, P.H., Balazs, G.H., LeRoux, R.A., Murakawa, S.K.K., Zarate, P. & Martinez, L.S. (2008). Composition of Hawaiian green turtle foraging aggregations: mtDNA evidence for a distinct regional population. *Endang Species Res* 5: 37–44

Dutton, P.H. & Frey, A. (2008). Characterization of polymorphic microsatellite markers for the green turtle (*Chelonia mydas*). *Molecular Ecology Resources* 9: 354–356.

Dutton, P.H., Bowen, B.W., Owens, D.W., Barragan, A. & Davis, S.K. (2000). Global phylogeography of the leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*). *J. Zool.* 248: 397– 409.

Dutton, P.H., Jensen, M.P., Frey, A., LaCasella, E., Balazs, G.H., Zárata, P., Chassin-Noria, O., Sarti-Martinez, A.L. & Velez, E. (2014a) Population structure and phylogeography reveal pathways of colonization by a migratory marine reptile (*Chelonia mydas*) in the central and eastern Pacific. *Ecol. Evol.* 4, 4317–4331

Dutton, P.H., Jensen, M.P., Frutchey, K., Frey, A., LaCasella, E., Balazs, G.H., Cruce, J., Tagarino, A., Farman, R. & Tatarata, M. (2014B). Genetic stock structure of green turtle (*Chelonia mydas*) nesting populations across the Pacific islands. *Pac. Sci.* 68, 451–464.

Edwards, D.L., Benavides, E., Garrick, R.C., Gibbs, J.P. and others. (2013). The genetic legacy of Lonesome George survives: giant tortoises with Pinta Island ancestry identified in Galápagos. *Biol Conserv* 157: 225–228

Fonseca, L. G., Quirós, W. Villachica, W. N., Mora, J. G., Heidemeyer, M., & Valverde, R.A. (2013). Anidación de tortuga verde (*Chelonia mydas*) del Pacífico, en la Isla San José, Área de Conservación Guanacaste, Costa Rica (temporada 2012-2013). San José, Costa Rica: Biocenosis Marina.

Gaos Alexander R., Lewison Rebecca L., Yañez Ingrid L., Wallace Bryan P., Liles Michael J., Nichols Wallace J., Baquero Andres, Hasbún Carlos R., Vasquez Mauricio, Urteaga José & Seminoff Jeffrey A. (2012). Shifting the life-history paradigm: discovery of novel habitat use by hawksbill turtles. *Biol. Lett.* 854–56 <http://doi.org/10.1098/rsbl.2011.0603>

Gaos Alexander R., Lewison Rebecca L., Jensen Michael P., Liles Michael J., Henriquez Ana, Chavarria Sofia, Pacheco Carlos Mario, Valle Melissa, Melero David, Gadea Velkiss, Altamirano Eduardo, Torres Perla, Vallejo Felipe, Miranda Cristina, LeMarie Carolina, Lucero Jesus, Ocegüera Karen, Chácon Didiher, Fonseca Luis, Abrego Marino, Seminoff Jeffrey A., Flores Eric E., Llamas Israel, Donadi Rodrigo, Peña Bernardo, Muñoz Juan Pablo, Ruales Daniela Alarcón, Chaves Jaime A., Otterstrom Sarah, Zavala Alan, Hart Catherine E., Brittain Rachel, Alfaro-Shigueto Joanna, Mangel Jeffrey, Yañez Ingrid L. and Dutton Peter H. (2017). Natal foraging philopatry in eastern Pacific hawksbill turtles. *Soc. open sci.* 4170153170153 <http://doi.org/10.1098/rsos.170153>

Gaos, A. R., A. Abreu, J. A. Alfaro, D. Amorocho, R. Arauz, A. Baquero, et al. (2010). Signs of hope in the EP: international collaboration reveals encouraging status for a severely depleted population of hawksbill turtles *Eretmochelys imbricata*. *Oryx* 44: 595– 601.

Gaos, A.R., Lewison, R., Jensen, M., Liles, M., Henriquez, A., Chavarria, S., Pacheco, C., Valle, M., Melero, D., Gadea, V., Altamirano, E., Torres, P., Vallejo, F., Miranda, C., Lemarie, C., Lucero, J., Ocegüera, K., Chacon, D., Fonseca, L., Abrego, M., Seminoff, J., Flores, E., Llamas, I., Peña, B., Muñoz, J., Alarcón-Ruales, D., Chaves, J., Otterstrom, S., Zavala, A., Hart, C., Brittain, R., Alfaro-Shigueto, J., Mangel, J.C., Yañez, I., Dutton, P.H. (2018). Rookery contributions, movements and conservation needs of hawksbill turtles at foraging grounds in the eastern Pacific Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 586, 203–216.

Gaos, A. R., Lewison, R. L., Liles, M. J., Gadea, V., Altamirano, E., Henríquez, A. V., Torres, P., Urteaga, J., Vallejo, F., Baquero, A., LeMarie, C., Muñoz, J. P., Chaves, J. A., Hart, C. E., Peña de Niz, A., Chácon, D., Fonseca, L., Otterstrom, S., Yañez, I. L., LaCasella, E. L., ... Dutton, P. H. (2016). Hawksbill turtle terra incognita: conservation genetics of eastern Pacific rookeries. *Ecology and evolution*, 6(4), 1251–1264. <https://doi.org/10.1002/ece3.1897>

Gaspar, P., Benson, S.R., Dutton, P.H., Réveillére, A., Jacob, G., Meetoo, C., Dehecq, A., Fossette, S. (2012). Oceanic dispersal of juvenile leatherback turtles: going beyond passive drift modeling. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 457, 265–284. (doi:10.3354/meps09689)

Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.

Hansen, L., Zarate, P., Chassin, O., Balazs, G.H., Sarti, L., et al. (2007) Stock structure and gene flow among green turtle nesting populations in the eastern Pacific based on microsatellite analysis. In: Mast RB, Hutchinson BJ, Hutchinson AH, eds. Proceedings of the Twenty-Fourth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation: U.S. Dept. Commerce. NOAA Tech. Memo. NMFS-SEFSC-567. 128 p.

Hays, G.C., Fossette, S., Katselidis, K.A., Mariani, P., Schofield, G. (2010). Ontogenetic development of migration: Lagrangian drift trajectories suggest a new paradigm for sea turtles. *J.R. Soc. Interface* 7, 1319–1327. (doi:10.1098/rsif.2010.0009)

Heidemeyer Thieleman, Maïke. (2015). Orígenes natales y migratorios de la agregación de tortuga verde (*Chelonia mydas*) en el hábitat de alimentación de la isla del coco basado en análisis de ADN, bioquímicos y tecnología satelital. Tesis para optar por título de maestría. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

Heidemeyer, M., Arauz-Vargas, R. & Lopez-Agüero, E. (2014). New foraging grounds for hawksbill (*Eretmochelys imbricata*) and green turtles (*Chelonia mydas*) along the northern Pacific coast of Costa Rica, Central America. *Rev. Biol. Trop.*, 62: 109-118. <http://doi.org/10.1098/rspb.2021.0754>

Jensen, M.P., Bell, I., Limpus, C.J., Hamann, M. and others. (2016). Spatial and temporal genetic variation among size classes of green turtles (*Chelonia mydas*) provides information on oceanic dispersal and population dynamics. *Mar Ecol Prog Ser* 543: 241–256

Jensen, M.P., FitzSimmons, N.N. & Dutton, P.H. (2013). Molecular genetics of sea turtles. In: Wyneken J, Lohmann KJ, Musick JA (eds) *The biology of sea turtles*, Vol 3. CRC Press, Boca Raton, FL, p 135–161

Kamezaki, N. & Matsui, M. (1995). Geographic variation in skull morphology of the green turtle, *Chelonia mydas*, with a taxonomic discussion. *J. Herpetol.* 29: 51–60.

Karl, S. A., Bowen, B.W. & Avise J.C. (1992). Global Population Genetic Structure and Male-Mediated Gene Flow in the Green Turtle (*C. mydas*): RFLP Analyses of Anonymous Nuclear Loci. *Genetics.* (131): 163-173.

Lahanas, P.N., Bjorndal, K.A., Bolten, A.B., Encalada, S.E., Miyamoto, M.M., Valverde, R.A. & Bowen, B.W. (1998). Genetic composition of a green turtle (*Chelonia mydas*) feeding ground population: evidence for multiple origins. *Mar Biol* 130:345–352

LeRoux, R.A., Dutton, P.H., Abreu-Grobois, F.A., Lagueux, C.J., Campbell, C.L., Delcroix, E. et al. (2012). Re-examination of population structure and phylogeography of Hawksbill turtles in the wider Caribbean using longer mtDNA sequences. *J. Hered.* 103: 806– 820.

Michael J. Liles, Markus J. Peterson, Jeffrey A. Seminoff, Eduardo Altamirano, Ana V. Henríquez, Alexander R. Gaos, Velkiss Gadea, José Urteaga, Perla Torres, Bryan P. Wallace, Tarla Rai Peterson. (2015). One size does not fit all: Importance of adjusting conservation practices for endangered hawksbill turtles to address local nesting habitat needs in the eastern Pacific Ocean. *Biological Conservation*, (184)405-413 <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2015.02.017>.

Liles, M.J., M. Jandres, W. López, G. Mariona, C.R. Hasbún & J.A. Seminoff. (2011). Hawksbill turtles *Eretmochelys imbricata* in El Salvador: nesting distribution and mortality at the largest remaining nesting aggregation in the Eastern Pacific Ocean. *Endang. Species Res.*, 14(1): 23-30.

Luschi, P., Hays, G.C. & Papi, F. (2003). A review of long-distance movements by marine turtles, and the possible role of ocean currents. *OIKOS* 103, 293–302. (doi:10.1034/j.1600-0706.2003.12123.x)

Mansfield, K.L., Wyneken, J., Porter, W.P. & Luo, J. (2014). First satellite tracks of neonate sea turtles redefine the 'lost years' oceanic niche. *Proc. R. Soc. B* 281, 20133039. (doi:10.1098/rspb.2013.3039)

Martin, P.A & Palumbi, S.R. (1992). Body size, metabolic rate, regeneration time, and the molecular clock. *Proc Natl Acad Sci.* 90:4087-4091.

Meylan, A. (1982). Sea turtle migration - evidence from tag returns. In: Bjorndal KA, ed. *Biology and Conservation of Sea Turtles*. Washington, D.C.: Smithsonian Institution Press. pp 91–100.

Monzón-Argüello, C., López-Jurado, L.F., Rico, C., Marco, A., López, P., et al. (2010). Evidence from genetic and Langrarian drifter data for trasatlantic transport of small juvenile green turtles. *Journal of Biogeography* 37: 1752–1766.

Monzón-Argüello, C., N. Loureiro, C. Delgado, A. Marco, J. López, M. Gómez, et al. (2011). Príncipe island hawksbills: genetic isolation of an Eastern Atlantic stock. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 407: 345– 354.

Naro-Maciel, E., Becker, J.E., Lima, H.S.M., Marcovaldi, M.A. & DeSalle, R. (2007). Testing dispersal hypothesis in foraging green sea turtles (*Chelonia mydas*) of Brazil. *Journal of Heredity* 98: 29–39.

Naro-Maciel, E., Bondioli, A.C.V., Martin, M., Almeida, A.P., Baptistotte, C., Bellini, C., Marcovaldi, M.A., Santos, A.J.B. & Amato, G. (2012). The interplay of homing and dispersal in green turtles: a focus on the southwestern Atlantic. *J. Hered.* 103, 792–805. (doi:10.1093/jhered/ess068)

Naro-Maciel, E., M. Le, N. N. FitzSimmons, & G. Amato. (2008). Evolutionary relationships of marine turtles: a molecular phylogeny based on nuclear and mitochondrial genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 49: 659– 662.

Naro-Maciel, E., Reid, B.N., Alter, S.E., Amato, G., Bjorndal, K.A., Bolten, A.B., Martin, M., Nairn, C.J., Shamblyn, B., Pineda-Catalan, O. (2014). From refugia to rookeries: Phylogeography of Atlantic green turtles. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 461, 306–316.

Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York, 512 pp.

Pella, J. & Masuda, M. (2001). Bayesian methods for analysis of stock mixtures from genetic characters. *Fish Bull* 99:151–167

Prosdocimi, L., Carman, V.G., Albareda, D.A. & Remis, M.I. (2011). Genetic composition of green turtle feeding grounds of coastal waters of Argentina based on mitochondrial DNA. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 412, 37–45. (doi:10.1016/j.jembe.2011.10.015)

Putman, N.F. & Mansfield, K.L. (2015). Direct evidence of swimming demonstrates active dispersal in the sea turtle 'lost years'. *Curr. Biol.* (4)1221-1227. (doi:10.1016/j.cub.2015.03.014)

Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J.C., Messeguer X. & Rozas, R. (2003). DNASP, DNA polymorphism analyses by the coalecent and other methods. *Bioinformatics*, 19: 2496-2497.

Sanches, T.M. & Bellini, C. (1999). Juvenile *Eretmochelys imbricata* and *Chelonia mydas* in Archipelago of Fernando de Noronha, Brazil. *Chelonian Conservation and Biology* 2: 308-311.

Seminoff, J.A., Resendiz, A. & Nichols, W.J. (2002a). Home range of green turtles *Chelonia mydas* at a coastal foraging area in the Gulf of California, Mexico. *Mar Ecol Prog Ser* 242: 253–265.

Semlitsch, R.D. & Bodie, J.R. (2003). Biological criteria for buffer zones around wetlands and riparian habitats for amphibians and reptiles. *Conserv Biol* 17: 1219–1228

Smith, M.H., Hillstad, H.O., Manlove, M.N., Straney, D.O. & Dean, J.M. (1977). Management implications of genetic variability in loggerhead and green sea turtles. *Proceedings of the 13th International Congress of Game Biologists*, 13, 302–312.

Sutherland, W.J., Pullin, A.S., Dolman, P.M. & Knight, T.M. (2004). The need for evidence-based conservation. *Trends Ecol Evol* 19: 305–308

Trujillo-Arias, N., D. F. Amorocho, D. López-Álvarez, and L. M. Mejía-Ladino. (2014). Relaciones filogeográficas de algunas colonias de alimentación y anidación de la tortuga Carey (*Eretmochelys imbricata*) en el Pacífico y Caribe Colombianos. *Bol. Investig. Marinas Costeras* 43: 159– 182.

Vargas, S. M., Jensen, M.P., Ho, S.Y.W., Mobaraki, A., Broderick, D., Mortimer, J.A., et al. (2015). Phylogeography, genetic diversity, and management units of hawksbill turtles in the Indo-Pacific. *J. Hered.* 27: 1– 16. doi:10.1093/jhered/esv091.

Wallace, B.P., DiMatteo, A.D., Hurley, B.J., Finkbeiner, E.M., Bolten, A.B., Chaloupka, M.Y., Hutchinson, B.J., Abreu-Grobois, F.A., Amorocho, D., Bjorndal, K.A., et al. (2010). Regional management units for marine turtles: A novel framework for prioritizing conservation and research across multiple scales. *PLoS ONE*, 5, e15465.

Watanabe, K.K., Hatase, H., Kinoshita, M., Omuta, K. and others. (2011). Population structure of the loggerhead turtle *Caretta caretta*, a large marine carnivore that exhibits alternative foraging behaviors. *Mar Ecol Prog Ser* 424: 273–283

Wildermann Natalie, Critchell Kay, Fuentes Mariana M. P. B., Limpus Colin J., Wolanski Eric and Hamann Mark. (2017). Does behaviour affect the dispersal of flatback post-hatchlings in the Great Barrier Reef. *R. Soc. open sci.* <http://doi.org/10.1098/rsos.170164>

Zarate, P., Seminoff, J.A. & Dutton, P.H. (2007). Assessment of sea turtle foraging areas in the Galapagos Islands. In: Mast RB, Hutchinson BJ, Hutchinson AH, eds. *Proceedings of the Twenty-Fourth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*: U.S. Dept. Commer. NOAA Tech. Memo. NMFS-SEFSC- 567. 237 p.

Zuñiga-Marroquin, Tania, & Espinosa de los Monteros, Alejandro. (2017). Genetic characterization of the Critically Endangered hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) from the Mexican Pacific region. *Latin American journal of aquatic research*, 45(3), 555-562. <https://dx.doi.org/10.3856/vol45-issue3-fulltext-5>

## ANEXO I

### Tablas

**Tabla 1.** Promedio  $\pm$  desviación estándar y rangos de concentraciones (pg/ml) de muestras de plasma obtenidas de diferentes estados de madurez entre machos y hembras de la tortuga Carey que se encontraban forrajeando Bahía Matapalito en el Pacífico Norte de Costa Rica.

	JUVENILES <85 CM DE SCL		Adultos >85 cm de SCL	
	MEDIA $\pm$ SD	MEDIA $\pm$ SD	Hembras	Machos
<b>Testosterona (pg/mL)</b>	68.9 $\pm$ 78	7563.5 $\pm$ 6143.9	15.16	1106.7
<b>INTERVALO DE CONCENTRACIÓN (PG/ML)</b>	16 – 239	878.3 – 27236.1	-	-
<b>N plasma</b>	11	16	1	1

**Tabla 3.** Estudios previos sobre proporción sexual en juveniles de carey (*E. imbricata*) y los resultados obtenidos en este estudio.

LUGAR	N	PROPORCIÓN SEXUAL (F:M)	METODO	REFERENCIA
Great Barrier Reef, Australia	109	2,57:1	Laparoscopía/necropsia	Limpus (1992)
Dominican Republic	143	2,71:1	Testosterona RIA	Leon & Diez (1999)
Puerto Rico	120	0,8:1	Laparoscopía/Testosterona RIA	Diez & Van Dam (2003)
US Virgin Islands	72	4:1	Testosterona RIA	Geis et al. (2003)
Florida USA	65	2,37:1	Testosterona RIA	Blanvillain et al. (2007)
Bahía Matapalito, Costa Rica	27	0,45:1	Testosterona ELISA	Este estudio

**Tabla 4.** Concentración de testosterona, testosterona con transformación logarítmica y largo recto del caparazón (SCL) de juveniles y adultos de *C. mydas* del estudio de Allen et al. 2015.

<b>N</b>	<b>EDAD</b>	<b>Sexo</b>	<b>Concentración de T (pg/mL)</b>	<b>T log (pg/mL)</b>	<b>SCL (cm)</b>
1	Adulto	Hembra	132.74	2.123	94.8
2	Adulto	Macho	514.04	2.711	101
3	Adulto	Macho	1213.39	3.084	98.6
4	Adulto	Macho	22029.26	4.343	93.8
5	Adulto	Hembra	50.82	1.706	102.8
6	Adulto	Hembra	6.87	0.837	97.7
7	Adulto	Macho	1148.15	3.06	92.1
8	Adulto	Hembra	10.50	1.021	97.5
9	Adulto	Hembra	49.89	1.698	95.1
10	Adulto	Hembra	31.26	1.495	99.3
11	Adulto	Hembra	60.12	1.779	107.2
12	Adulto	Hembra	12.91	1.111	104.6
13	Adulto	Hembra	61.94	1.792	102.6
14	Adulto	Macho	112201.85	5.05	95
15	Adulto	Hembra	9.77	0.99	98.8
16	Adulto	Macho	48865.24	4.689	97.1
17	Adulto	Hembra	74.99	1.875	101.2
18	Adulto	Hembra	16.52	1.218	102.2
19	Adulto	Hembra	110.92	2.045	96.5
20	Adulto	Hembra	52.84	1.723	104
21	Adulto	Hembra	42.07	1.624	101.3
22	Adulto	Macho	351.56	2.546	102.1
23	Adulto	Hembra	17.58	1.245	90.8
24	Adulto	Hembra	7.71	0.887	104.6
25	Adulto	Hembra	1761.98	3.246	94.6
26	Juvenil	Hembra	50.12	1.7	43
27	Juvenil	Hembra	10.96	1.04	28.5
28	Juvenil	Hembra	22.70	1.356	31.2
29	Juvenil	Hembra	13.55	1.132	48.6
30	Juvenil	Hembra	8.22	0.915	55.1
31	Juvenil	Hembra	73.62	1.867	39.3
32	Juvenil	Hembra	5.48	0.739	46.1
33	Juvenil	Hembra	12.97	1.113	37
34	Juvenil	Hembra	21.28	1.328	66.3
35	Juvenil	Hembra	4.18	0.621	59
36	Juvenil	Hembra	12.08	1.082	61.2
37	Juvenil	Hembra	10.42	1.018	80.4
38	Juvenil	Hembra	9.31	0.969	82.3

39	Juvenil	Hembra	8.47	0.928	47.5
40	Juvenil	Hembra	24.95	1.397	59.5
41	Juvenil	Hembra	8.18	0.913	66.1
42	Juvenil	Hembra	41.98	1.623	71.2
43	Juvenil	Hembra	9.59	0.982	45.4
44	Juvenil	Hembra	9.89	0.995	76.1
45	Juvenil	Hembra	14.93	1.174	78.9
46	Juvenil	Hembra	6.55	0.816	54.4
47	Juvenil	Hembra	55.46	1.744	74.6
48	Juvenil	Hembra	27.86	1.445	81.7
49	Juvenil	Hembra	4.82	0.683	66.7
50	Juvenil	Hembra	12.88	1.11	81.3
51	Juvenil	Hembra	15.85	1.2	83.7
52	Juvenil	Hembra	12.82	1.108	73.2
53	Juvenil	Hembra	113.24	2.054	80.2
54	Juvenil	Hembra	18.16	1.259	55.6
55	Juvenil	Hembra	10.35	1.015	75.8
56	Juvenil	Hembra	8.09	0.908	53.9
57	Juvenil	Hembra	5.20	0.716	49.3
58	Juvenil	Hembra	15.03	1.177	67
59	Juvenil	Hembra	14.55	1.163	64.4
60	Juvenil	Hembra	7.21	0.858	59.5
61	Juvenil	Hembra	15.45	1.189	46.7
62	Juvenil	Hembra	32.89	1.517	86.7
63	Juvenil	Hembra	38.64	1.587	83.4
64	Juvenil	Hembra	53.33	1.727	75.7
65	Juvenil	Hembra	11.51	1.061	65.3
66	Juvenil	Hembra	22.39	1.35	75.4
67	Juvenil	Hembra	16.56	1.219	51.9
68	Juvenil	Hembra	12.42	1.094	61.1
69	Juvenil	Hembra	56.89	1.755	71.2
70	Juvenil	Hembra	65.31	1.815	82.3
71	Juvenil	Hembra	31.26	1.495	65.8
72	Juvenil	Hembra	40.27	1.605	63.6
73	Juvenil	Hembra	14.00	1.146	73.2
74	Juvenil	Macho	645.65	2.81	43.8
75	Juvenil	Macho	849.18	2.929	35.7
76	Juvenil	Macho	1836.54	3.264	42.6
77	Juvenil	Macho	5093.31	3.707	41.9
78	Juvenil	Macho	382.82	2.583	48.3
79	Juvenil	Macho	2137.96	3.33	45.4
80	Juvenil	Macho	1285.29	3.109	36.7
81	Juvenil	Macho	104954.24	5.021	79.8

82	Juvenil	Macho	11194.38	4.049	79.5
83	Juvenil	Macho	119674.05	5.078	85.4
84	Juvenil	Macho	1370.88	3.137	65.9
85	Juvenil	Macho	688.65	2.838	85.9
86	Juvenil	Macho	246.60	2.392	57.4
87	Juvenil	Macho	1659.59	3.22	72.4
88	Juvenil	Macho	574.12	2.759	84.4
89	Juvenil	Macho	891.25	2.95	65.2
90	Juvenil	Macho	221.31	2.345	50.5
91	Juvenil	Macho	758.58	2.88	56.7
92	Juvenil	Macho	198.15	2.297	54.4
93	Juvenil	Macho	1213.39	3.084	85.5
94	Juvenil	Macho	2612.16	3.417	59.3

**Tabla 6.** Promedio  $\pm$  desviación estándar e intervalos de concentraciones (pg/mL) de muestras de plasma obtenidas de diferentes estados de madurez entre machos y hembras de la tortuga verde que se encontraban forrajeando BM en el Pacífico Norte de Costa Rica. El estado de madurez ha sido clasificado de acuerdo al tamaño de largo curvo del caparazón (CCL).

	JUVENILES <85 CM DE CCL		Adultos >85 cm de CCL	
	MEDIA $\pm$ SD		MEDIA $\pm$ SD	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos
<b>Testosterona (pg/mL)</b>	39.7 $\pm$ 23.9	2056.70 $\pm$ 2461.8	72.20 $\pm$ 28.6	291.9 $\pm$ 268.13
<b>Intervalo de concentración (pg/ml)</b>	15.83– 104.7	237.19 – 7494.6	17.74 – 114.6	101.94 – 481.90
<b>N plasma</b>	22	7	9	2

**Tabla 9.** Frecuencias de los haplotipos ADNmit de *C. mydas* encontrados en los individuos que forrajeaban en Bahía Matapalito, así como de los reportados en colonias de anidación establecidas en el del Pacífico Oriental, Central y Sur usados como “stocks” en el análisis de poblaciones mixtas. Estos últimos han sido adaptados de Dutton et al. 2014 & Heidemeyer, 2015.

	CmP1.1	CmP2.1	CmP3.1	CmP3.2	CmP4.1	CmP4.2	CmP4.3	CmP4.4	CmP4.5	CmP4.6	CmP4.7	CmP4.8	CmP4.9	CmP4.11	CmP5.1	CmP6.1	CmP7.1	CmP8.1	CmP8.2	CmP8.3	CmP9.1	CmP11.1	CmP12.1	CmP13.1	CmP14.1	CmP15.1	CmP15.2	CmP17.1	CmP17.2	CmP24.1	CmP49.9	CmP65.1	CmP93.1	CmP97.1	CmP109.1	CmP132.1	CmP218.1	CmP220.1																				
<b>Noroeste de Hawaii</b>																																																										
French frigate Shoals	136	28	11	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																		
Laysan Island	9	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																		
<b>México</b>																																																										
Islas Revillagigedo- Isla Clarion	-	-	6	-	7	2	-	-	3	-	-	-	-	-	-	33	-	-	-	-	2	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																		
Islas Revillagigedo- Isla Socorro	1	-	2	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	-	1	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																		
Colala, Michoacan	-	-	-	-	58	-	2	-	-	7	-	5	-	-	43	-	3	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																			
<b>Costa Rica</b>																																																										
Nombre Jesus	-	-	-	-	2	-	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-	-	3	2	5	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																			
Isla San Jose	-	-	-	-	5	-	-	-	-	16	1	-	-	-	-	-	-	10	2	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2																		
Playa Coloradas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2																			
<b>Ecuador</b>																																																										
Galapagos-Las Bachas	-	-	-	-	14	-	-	3	-	16	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-																				
Galapagos- Las Salinas	-	-	-	-	12	-	-	3	-	35	23	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	2	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-																				
<b>Islas Marshall</b>																																																										
<b>American Samoa</b>																																																										
<b>Polinesia Francesa</b>																																																										
<b>Bahía Matapalito</b>																				1	-	-	-	3	-	-	-	-	5	1	-	-	-	1	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	3	-	4	1	2	-	-			

**Tabla 10.** Frecuencias de los haplotipos de ADNmit de *E. imbricata* encontrados en los individuos que forrajeaban en Bahía Matapalito, así como de los reportados en colonias de anidación establecidas en el del Pacífico Oriental usados como “stocks” en el análisis de poblaciones mixtas. Estos últimos han sido adaptados de Gaos et al. 2016.

	EIP23	EIP33	EIP74	EIP106	EIP107	EIP108	EIP115	EIP114	EIP132*	EIP133*
<b>México</b>	<b>1</b>	<b>14</b>								
Costa Careyes	1	14								
<b>El Salvador</b>	<b>5</b>	<b>23</b>		<b>59</b>						
Los Cobanos		4		1						
Bahía de Jiquilisco	5	15		58						
Punta Amapola		4						1		
<b>Nicaragua</b>	<b>2</b>	<b>97</b>	<b>5</b>		<b>1</b>	<b>6</b>		<b>1</b>		
Estero Padre Ramos	2	94	1	31		6				
Aserradores		3		2				1		
Southern Rivas			4		1					
<b>Costa Rica</b>		<b>1</b>	<b>7</b>				<b>2</b>			
Península de Osa		1	7				2			
<b>Panamá</b>			<b>3</b>							
Península Azuero			3							
<b>Ecuador</b>		<b>1</b>	<b>1</b>							
Machalilla		1	1							
Isla San Cristobal (Galapagos)										
<b>Bahía Matapalito</b>			<b>18</b>	<b>2</b>			<b>1</b>		<b>3</b>	<b>1</b>

**Tabla 11.** Estimación de la contribución de las colonias “stock” calculadas mediante el análisis de poblaciones mixtas (MSA) de la tortuga verde *C. mydas* para el sitio de alimentación de Bahía Matapalito.

	Contribución (%)	Intervalos de confianza	
		2.50%	97.50%
<b>Noroeste de Hawaii</b> <b>French Frigate Shoals</b>	1.743	1.103 <sup>e-19</sup>	12.516
<b>Noroeste de Hawaii</b> <b>Laysan Island</b>	2.161	5.683 <sup>e-18</sup>	13.827
<b>México-Revillagigedo Isla</b> <b>Clarión</b>	0.528	4.503 <sup>e-20</sup>	5.270
<b>México-Revillagigedo Isla</b> <b>Socorro</b>	1.047	5.223 <sup>e-20</sup>	13.214
<b>México-Colala</b>	11.169	4.169 <sup>e-08</sup>	35.898
<b>Costa Rica-Nombre de</b> <b>Jesús</b>	9.812	2.396 <sup>e-18</sup>	68.574
<b>Costa Rica-Isla San José</b>	20.205	5.747 <sup>e-17</sup>	72.594
<b>Costa Rica-Playa</b> <b>Coloradas</b>	18.569	1.608 <sup>e-15</sup>	57.861
<b>Galápagos-Las Bachas</b>	8.443	5.266 <sup>e-18</sup>	48.244
<b>Galápagos-Las Salinas</b>	7.668	1.744 <sup>e-18</sup>	43.471
<b>Islas Marshall</b>	7.189	7.165 <sup>e-19</sup>	35.665
<b>Samoa Americana</b>	6.173	1.482 <sup>e-17</sup>	31.390
<b>Polinesia Francesa</b>	5.293	6.810 <sup>e-20</sup>	28.835

**Tabla 12.** Estimación de la contribución de las colonias “stock” calculadas mediante el análisis de poblaciones mixtas (MSA) de la tortuga verde *E. imbricata* para el sitio de alimentación de Bahía Matapalito.

	Intervalos de confianza		
	Contribución (%)	2.50%	97.50%
México-Costa Careyes	0.407	8.723 <sup>e-18</sup>	4.257
El Salvador-Los Cobanos	0.980	1.451 <sup>e-16</sup>	10.008
El Salvador-Bahía de Jiquilisco	3.755	6.397 <sup>e-16</sup>	20.682
El Salvador-Punta Amapola	0.516	7.008 <sup>e-18</sup>	5.397
Nicaragua-Estero Padre Ramos	0.818	1.293 <sup>e-18</sup>	8.494
Nicaragua-Aserradores	1.258	6.339 <sup>e-18</sup>	12.058
Nicaragua-Southern Rivas	12.813	5.019 <sup>e-16</sup>	88.744
Costa Rica-Península de Osa	40.229	1.931 <sup>e-06</sup>	97.641
Panamá-Península Azuero	37.741	4.387 <sup>e-12</sup>	95.811
Ecuador-Machalilla	0.471	9.430 <sup>e-18</sup>	4.180
Ecuador-Isla San Cristóbal (Galapagos)	1.011	9.545 <sup>e-16</sup>	8.319

FIGURAS

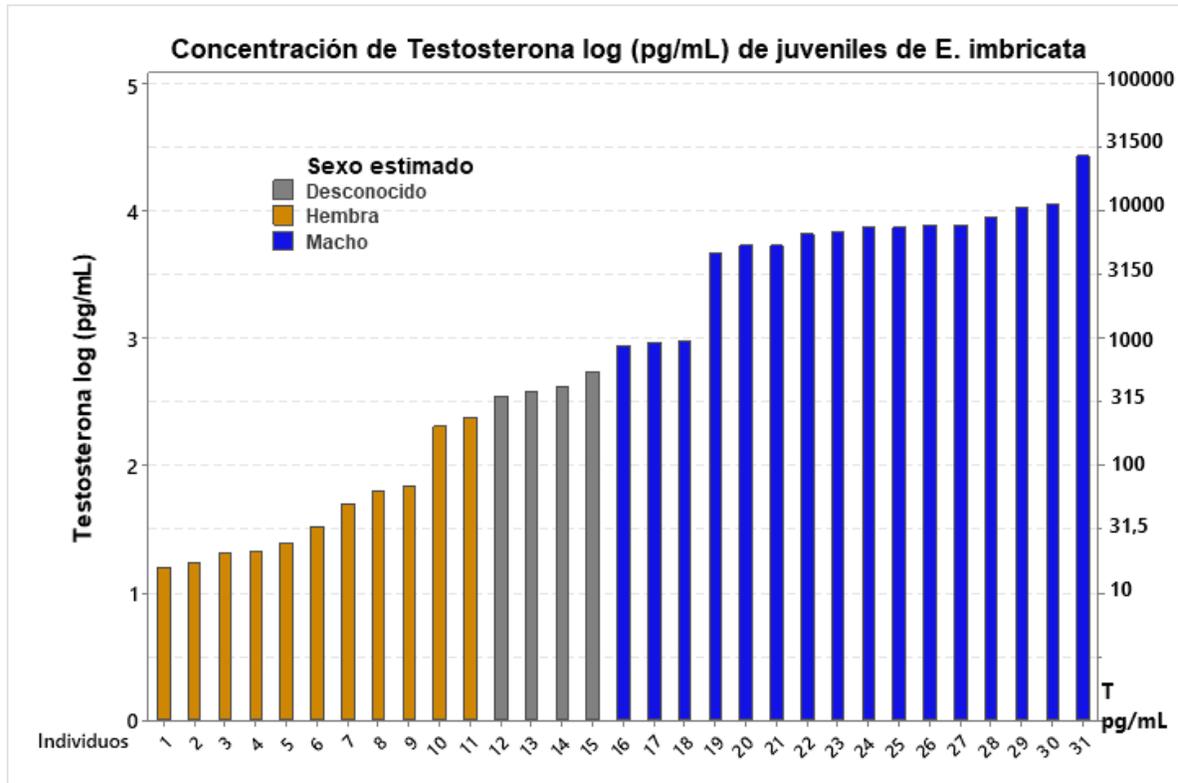


Figura 3. Concentración de testosterona (pg/mL) y testosterona log (pg/ml) del plasma de juveniles de tortugas de carey capturadas en Bahía Matapalito en el Pacífico Norte de Costa Rica.

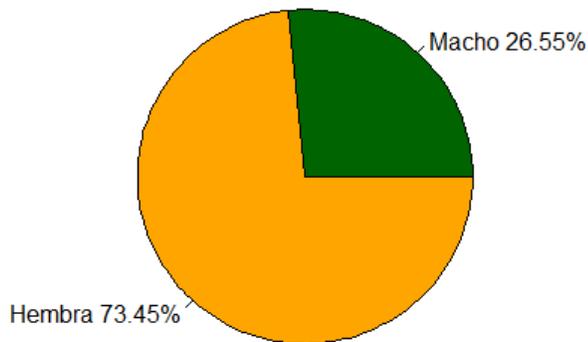


Figura 6. Distribución de los datos de entrenamiento para el modelo de regresión logística binaria para la predicción del sexo de tortugas verdes juveniles de BM. La población para entrenamiento está conformada únicamente por individuos de sexo conocido, en los cuales hay 69 juveniles y 44 adultos de *C. mydas*.

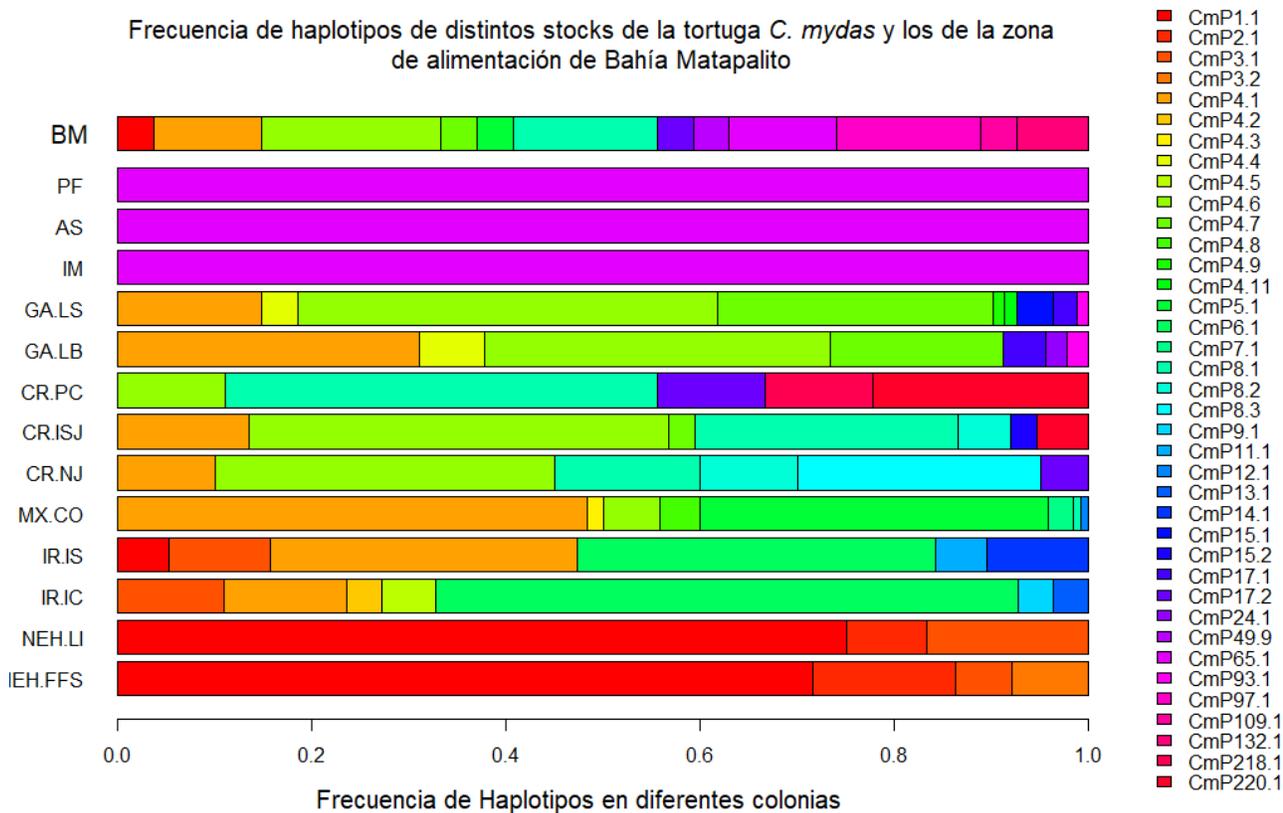


Figura 8. Frecuencia de los haplotipos de *C. mydas* presentes en las distintas colonias “stocks” (zona de anidación) de la región del Pacífico Oriental, Central y Sur y los que fueron identificados en los individuos que forrajeaban Bahía Matapalito. BM=Bahía Matapalito; PF=Polinesia Francesa; AS=American Samoa; IM=Islas Marshall; GA.LS= Galápagos, Las Salinas; GA.LB=Galápagos, Las Bacha; CR.PC=Costa Rica, Playa Colorada; CR.ISJ= Costa Rica, Isla San José; CR.NJ= Costa Rica, Nombre de Jesús; MX.CO: México, Colala; IR.IS= Islas Revillagigedo, Isla Socorro; IR.IC=Islas Revillagigedo, Isla Clarion; NEH.LI= Noroeste de Hawaii, Laysan Island; NEH.FFS=Noroeste de Hawaii, French Frigate Shoals.

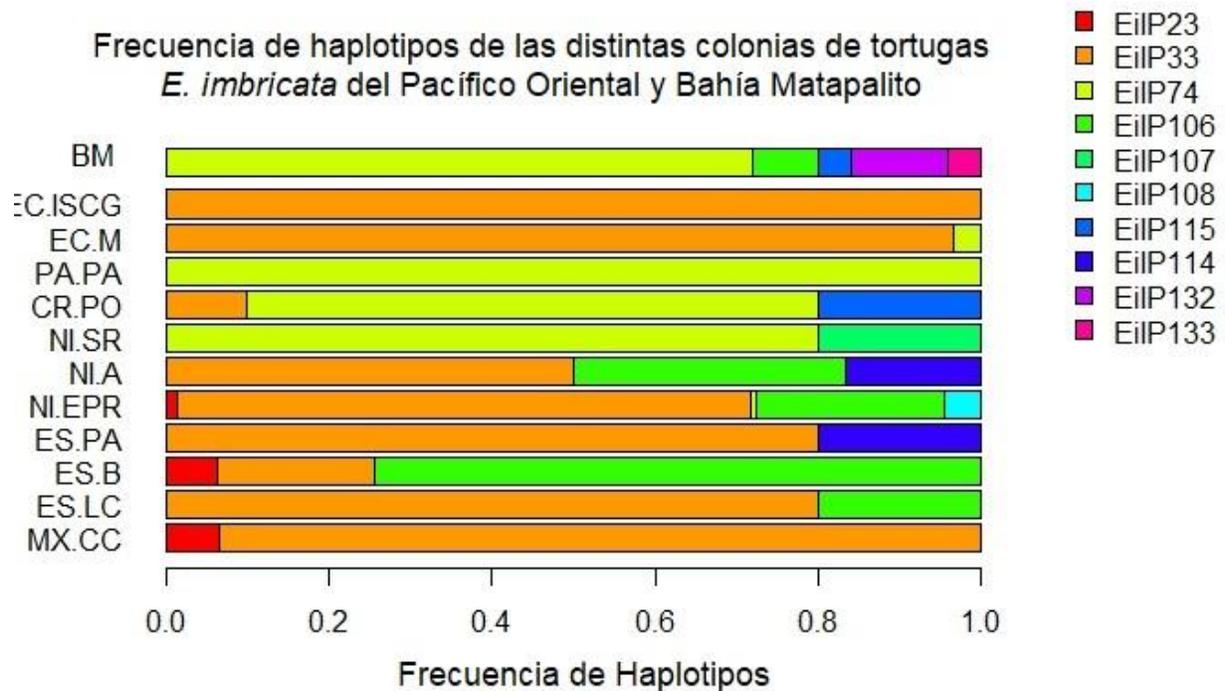


Figura 9. Frecuencia de los haplotipos de *E. imbricata* presentes en las distintas colonias "stocks" (zona de anidación) de la región del Pacífico Oriental y los que fueron identificados en los individuos que forrajeaban Bahía Matapalito. BM=Bahía Matapalito; EC.ISCG=Isla San Cristóbal (Galápagos); EC.M=Machalilla; PA.PA=Panamá, Península Azuero; CR.PO= Costa Rica, Península de Osa; NI.SR=Nicaragua, Southern Rivas; NI.A=Nicaragua, Aserradores; NI.EPR= Nicaragua, Estero Padre Ramos; ES.PA=El Salvador, Punta Amapola; ES.B=El Salvador, Bahía de Jiquilisco; ES.LC=El Salvador, Los Cobanos; MX.CC=México, Costa Careyes.

**ANEXO II****Protocolo de extracción de ADN utilizando cloruro de litio (LiCl)**  
(Modificado de Axayacatl Rocha por Julia Azanza)

1. Cortar ~50 mg de tejido con una navaja tan finamente como sea posible. Si se usa sangre en buffer de lisis, tomar 200  $\mu$ l de sangre. Si la sangre está congelada es más sencillo tomar este volumen raspando el material congelado y transferirlo a un tubo vacío para medir el volumen aproximado contra las marcas al lado del tubo.
2. Colocar el tejido en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y agregar 350  $\mu$ l de buffer de extracción (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 15 SDS, 50 mM EDTA, pH 8.0). Asegurarse de que no queda nada de tejido adherido alrededor de la boca del tubo. Si es sangre, aforar a 400  $\mu$ l con buffer de extracción (o sea, añadir 200  $\mu$ l del buffer)
3. Agregar 20  $\mu$ l de proteinasa K (20 mg/ ml) y agitar brevemente.
4. Colocar en baño maría o en rotador en incubadora a 55 °C toda la noche o hasta que el tejido esté suficientemente digerido.
5. Agregar 300  $\mu$ l de LiCl 5M y agitar a temperatura ambiental por un minuto.
6. Agregar 600  $\mu$ l de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y agitar brevemente.
7. Mezclar en el rotador a temperatura ambiente durante 30 minutos aproximadamente.
8. Centrifugar a 13,000 X g por 15 minutos.
9. Extraer con pipeta 500  $\mu$ l de la capa acuosa (parte superior) y transferir a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml. Tener cuidado de no extraer material de la interfase (capa media). En caso de extraer parte de esta, regresar la muestra al tubo y centrifugar por 5 minutos para después repetir este paso.
10. Agregar 50  $\mu$ l de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 1000  $\mu$ l de etanol al 100% frío.
11. Invertir el tubo varias veces y colocarlo en el congelador a -20 °C por lo menos una hora (o 30 minutos a -80°C). También puede dejarse toda la noche
12. Centrifugar a máxima velocidad por 20 minutos. Para obtener mayor cantidad de ADN puede ponerse una centrifuga pequeña en el refrigerador (4 °C).
13. Remover el líquido del tubo teniendo cuidado de no perder el pellet de ADN.
14. Agregar 750  $\mu$ l de etanol al 70% y mezclar por 15 minutos a temperatura ambiente.
15. Centrifugar a máxima velocidad por 5 minutos.
16. Remover el etanol con sumo cuidado.
17. Secar el pellet en centrifuga de vacío por 10 minutos o hasta que esté seco.
18. Agregar 50  $\mu$ l de TE 1x pH 8.0 para resuspender el pellet. Si se nota que hay mucho DNA se debe aumentar la cantidad de TE.
19. Permitir que el pellet se resuspenda a 4 °C durante la noche o 30 minutos a temperatura ambiente.
20. Mezclar la muestra para asegurar que el pellet está totalmente disuelto.
21. Calentar las muestras a 95°C por 4 minutos y al finalizar pasarlas inmediatamente a hielo o a su almacenamiento bajo refrigeración o congelación.
22. Para estimar la calidad y cantidad de ADN, correr un minigel de agarosa 1% (3  $\mu$ l de ADN y 2  $\mu$ l de loading buffer) de 20 a 40 minutos a 85 volts. No es necesario usar escalera.

<b>Parámetros morfométricos muestreados en juveniles y adultos de <i>C. Mydas</i></b>		
<b>ABREVIATURA</b>	<b>CARÁCTER MORFOMÉTRICO</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>
<b>LRC</b>	Largo Recto del Caparazón (cm)	Medida recta desde el escudo nucal (precentral) hasta el escudo supracaudal.
<b>LCC</b>	Largo Curvo del Caparazón (cm)	Medida curva desde el escudo nucal (precentral) hasta el escudo supracaudal.
<b>ARC</b>	Ancho Recto del Caparazón (cm)	Medida recta de los escudos marginales de izquierdo-derecho (zona de mayor curvatura).
<b>ACC</b>	Ancho Curvo del Caparazón (cm)	Medida recta de los escudos marginales de izquierdo-derecho (zona de mayor curvatura).
<b>LP</b>	Largo del Plastrón (cm)	Medida por la sección central desde la placa intergular hasta la placa interanal.
<b>PC</b>	Profundidad de Caparazón (cm)	Medida transversal recta desde la zona de mayor curvatura a la zona central del plastrón.
<b>LTC</b>	Largo Total de Cola (cm)	Medida desde el final de la placa interanal o base de la cola, hasta la punta de la cola.
<b>LPreC</b>	Largo Pre-Cloacal (cm)	Medida desde la base de la cola hasta la cloaca (cm).
<b>LPC</b>	Largo Post-Cloacal (cm)	Medida desde el orificio de la cloaca hasta la punta de la cola.
<b>Razón</b>	Razón	Medida obtenida matemáticamente dividiendo el largo post cloacal entre el largo pre cloacal.
<b>Peso (kg)</b>	Peso (kg)	