

Evaluation of 2 methods of *ex situ* incubation for sea turtle eggs in terms of nest temperature, hatching success, and hatchling quality

Evaluación de 2 métodos de incubación *ex situ* para huevos de tortugas marinas considerando temperatura del nido, éxito de eclosión, y calidad de los neonatos

Diana Rubí Ríos-Huerta^{1*}, Milagros González-Hernández², Catherine E Hart^{3,4},
Antonio Ramírez-Guillen⁴, Katherine EC Santos¹

¹ The Science Exchange Sea Turtle Internship Program, The Ocean Foundation, 1320 19th St, NW, 5th Floor, Washington DC 20036, USA.

² Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, km 14.5 Carretera San Luis Potosí-Matehuala, Ejido Palma de la Cruz, Soledad de Graciano Sánchez, 78321, San Luis Potosí, Mexico.

³ Investigación, Capacitación y Soluciones Ambientales y Sociales, Calle Acaponeta, no. 358, Colonia Morelos, Tepic, 63160, Nayarit, Mexico.

⁴ Grupo Tortuguero de las Californias, Calle Seis, no. 141, Colonia Azaleas, 23098, La Paz, Baja California Sur, Mexico.

* Corresponding author. E-mail: dianucass@gmail.com

ABSTRACT. At the marine turtle conservation program in Boca de Tomates, Jalisco, Mexico, all nests are relocated to fenced-off beach hatchery or polystyrene boxes due to illegal egg collection, predation, erosion, and high sand temperatures. For both methods we evaluated the following nest viability and hatchling quality parameters: hatching success, nest temperatures, incubation duration, and hatchling quality (locomotor performance, morphometrics, weight, and congenital malformations). Hatching success was significantly higher in the beach hatchery (mean 77.4%, $n = 1,368$) than in boxes (average 59.91%, $n = 1,160$) ($P < 0.001$). The beach hatchery nests hatched in less time (hatchery = 46 d, boxes = 51 d) ($P < 0.001$) due to the significantly higher mean temperature (hatchery = 32.62 °C, boxes 30.58 °C) ($P < 0.001$). The hatchery was exposed to less temperature variability per day (hatchery = 1.46 °C, boxes = 2.69 °C) ($P < 0.001$). To test hatchling quality, 10 hatchlings were randomly selected from each nest ($n = 254$). The weight, size, and locomotor performance (righting response and time to crawl 3 m) of these organisms were recorded. Live and dead neonates were carefully inspected for malformations ($n = 2,000$). No significant difference was found between incubation methods in any hatchling quality parameter ($P > 0.050$). The malformations at this site have low prevalence (hatchery = 1.35%, boxes = 1.89%) and low intensity index per organism (hatchery = 1.52, boxes = 1.89) compared to other studies and species. This is the first study, to our knowledge, that compares hatchling quality from 2 *ex situ* incubation methods in a single species (*Lepidochelys olivacea*), at the same location, and during the same period of time. Carrying out studies such as this one is important, since the quality of hatchlings can contribute to their ability to survive and reproduce in the future.

Key words: *ex situ* conservation, hatching success, malformations, morphometry, locomotor performance.

RESUMEN. Dentro del programa de conservación de tortugas marinas en Boca de Tomates, Jalisco (México), todos los nidos de *Lepidochelys olivacea* son reubicados a corral de playa o a cajas de poliestireno debido a la recolección ilegal de huevos, la depredación, la erosión y las altas temperaturas de la arena. Con ambos métodos de incubación evaluamos los siguientes términos de viabilidad del nido y calidad de los neonatos: éxito de eclosión, temperatura del nido, duración de incubación y calidad de neonatos (desempeño locomotor, morfometría, peso y malformaciones congénitas). El éxito de eclosión fue significativamente mayor en corral (promedio = 77.4%, $n = 1368$) que en cajas (promedio = 59.91%, $n = 1,160$) ($P < 0.001$). Los nidos incubados en corral eclosionaron en menor tiempo que aquellos incubados en cajas (corral = 46 d, cajas = 51 d) ($P < 0.001$) debido a una temperatura promedio significativamente más elevada (corral = 32.62 °C, cajas = 30.58 °C) ($P < 0.001$). El corral fue expuesto a menor variabilidad de la fluctuación térmica diaria (corral = 1.46 °C, cajas = 2.69 °C) ($P < 0.001$). No encontramos diferencia significativa en ningún parámetro de calidad de los neonatos entre los métodos de incubación ($P > 0.050$). Determinamos que las malformaciones en *L. olivacea* tienen baja prevalencia (corral = 1.35%, caja = 1.89%) y bajo índice de intensidad por organismo (corral = 1.52, cajas = 1.89) en este sitio. Este es el primer estudio que conocemos que compara la calidad de neonatos de una misma especie (*L. olivacea*) entre estos 2 métodos de incubación *ex situ* en la misma ubicación y durante el mismo periodo de tiempo. Realizar estudios similares a este es importante, puesto que la calidad de los neonatos puede contribuir a su capacidad de supervivencia y reproducción.

Palabras clave: conservación *ex situ*, éxito de eclosión, malformaciones, morfometría, desempeño locomotor.

INTRODUCTION

There are 7 species of sea turtles globally, 6 of which nest in Mexico (Márquez 1990, Mazaris et al. 2017). Currently, 6 species are listed within an extinction risk category and 1 species is listed as data deficient in the International Union for Conservation of Nature Red list of Threatened Species (IUCN 2020). The main threats are anthropogenic factors such as illegal fishing, pollution, habitat loss, climate change, poaching, illegal egg consumption (Koch et al. 2006, Mancini and Koch 2009, Mazaris et al. 2009). Therefore, implementing sea turtle conservation programs that include nest relocation and management are needed (Hamann et al. 2010, Brost et al. 2015). However, to fulfill this objective, it is necessary to produce viable, high-quality hatchlings, which have greater possibility of survival during incubation and in the open sea and higher chances for successful reproduction.

In situ, or natural incubation, is considered the best technique for the conservation of sea turtles (Mrosofsky 2006). In this method, the female chooses the nesting site on the beach where it will leave the nest to incubate (for ~45 d in the case of the olive ridley), which minimizes the risk of damage to the eggs from handling, movement, and transfer to another location (Kutzari 2006). However, since there are nest losses due to erosion, animal predation, high temperatures, and in certain regions, including Mexico, turtle egg consumption by humans (Mancini and Koch 2009, Hart et al. 2014), *ex situ* techniques such as beach fenced-off hatcheries and the incubation in polystyrene boxes are implemented.

A characteristic of the beach hatchery is that the eggs are buried by people in the sand, in holes that are similar in size and shape to natural nests. Some advantages of the hatchery are that they have physical protection (a fence or surveillance) and temperatures can be moderated with shade cloth or other material (e.g., palms, irrigation, etc.) (Esteban et al. 2018). The polystyrene boxes are used as containers to protect the eggs from natural threats, and after covering them with sand they are transferred to a room or tent, which depending on local conditions may or may not have controlled temperature and humidity to increase incubation success (Wood and Wood 2009). Polystyrene boxes are generally used on the Pacific coasts of Mexico where there is no space on the beach for a hatchery (e.g., there is no government concession permit, there is rural or touristic development, there is extreme erosion), and in turn they have the advantages of occupying less space and being able to be moved to another site during hurricanes and high tides, which would destroy a beach hatchery (Fuentes et al. 2011).

If management of both *ex situ* techniques is inadequate or conditions in the nest environment are unfavorable, there may be undesirable results such as higher mortality rates, reduced sizes in neonates, and more malformations compared to *in situ* incubation (Mortimer and Bresson 1999). Inadequate conditions can affect the sex ratio of a clutch

INTRODUCCIÓN

En el mundo existen 7 especies de tortugas marinas, de las cuales 6 anidan en México (Márquez 1990, Mazaris et al. 2017). Actualmente, 6 especies de tortugas marinas se encuentran dentro de alguna categoría de riesgo de extinción y una sin datos suficientes según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN 2020). Sus principales amenazas son los factores antropogénicos, como la pesca no controlada, la contaminación, la pérdida de hábitat, el cambio climático, la caza furtiva y el consumo ilegal de huevos (Koch et al. 2006, Mancini y Koch 2009, Mazaris et al. 2009). Por lo tanto, es necesario implementar programas de protección y conservación de tortugas marinas que incluyan el manejo de incubación de los nidos (Hamann et al. 2010, Brost et al. 2015). Sin embargo, para tal objetivo se requiere producir crías viables y de calidad que tengan alta posibilidad de supervivencia durante la incubación y el trayecto de sus vidas en mar abierto y alta capacidad de reproducción.

La incubación *in situ*, o manera natural de incubación, se considera la mejor técnica para la conservación de tortugas marinas (Mrosofsky 2006). En este procedimiento, la hembra escoge el sitio de anidación en la playa y deja el nido incubando ahí mismo (durante ~45 d en el caso de la tortuga golfina), lo cual minimiza el riesgo de daño a los huevos depositados por la manipulación, el movimiento y el traslado a otro sitio (Kutzari 2006). Sin embargo, al existir pérdidas de nidadas por erosión, uso recreativo, depredación animal, temperaturas altas y, en regiones particulares, incluido México, el consumo de huevos por humanos (Mancini y Koch 2009, Hart et al. 2014), se han implementado técnicas de incubación *ex situ* como el uso corral de playa y el uso de cajas de poliestireno.

Una característica del corral de playa es que los huevos son sembrados por humanos en la arena, donde las cavidades son de forma y tamaño similar al nido natural. Algunas ventajas del corral son que cuenta con protección física (una cerca o vigilancia) y las temperaturas pueden ser moderadas con malla sombra u otro material (palmas, riego, etc.) (Esteban et al. 2018). Las cajas de poliestireno se utilizan como contenedores para resguardar los huevos de amenazas naturales, y, después de ser cubiertos con arena, enseguida son trasladados a una habitación o carpa, la cual dependiendo de las condiciones locales, puede o no tener temperatura y humedad controlada para incrementar el éxito de incubación (Wood y Wood 2009). Las cajas de poliestireno generalmente son utilizadas en las costas mexicanas del Pacífico donde no hay espacio en la playa para un corral (e.g., no hay concesión gubernamental, existe mucho desarrollo, la erosión es extrema), y tienen las ventajas de ocupar menos espacio y de poder ser trasladadas a otro sitio durante eventos como huracanes y mareas altas, los cuales pueden destruir un corral de playa (Fuentes et al. 2011).

Si en ambas técnicas *ex situ* el manejo es inadecuado o las condiciones en el ambiente del nido son desfavorables,

(Morreale et al. 1982, Mrosovsky 1982, Dutton et al. 1985), have detrimental effects on embryonic development (Blanck and Sawyer 1981, Patino-Martínez et al. 2012), and reduce the locomotor performance of hatchlings (Booth et al. 2004, Booth and Evans 2011, Rusli et al. 2015). Environmental variables such as temperature are extremely important for nest incubation, as they have a direct influence on embryonic development in poikilothermic species (Du and Ji 2003, Booth 2006, Les et al. 2007). Sea turtle embryos are very sensitive to temperature fluctuations, with a thermal tolerance limit of 25.00 to 35.00 °C (Ackerman 1997). Outside of this temperature range, the embryo mortality rate increases (Ackerman 1997, Broderick et al. 2000) or damage can occur in the physiological processes during embryonic development (Maulany et al. 2012).

Locomotive performance (i.e., ability to move with the support of the flippers) plays an important role in the first hours of life for sea turtles (Ischer et al. 2009) because as soon as they hatch, they have to leave their nests, crawl to the sea, avoid predators, and continue their life cycle (Wyneken and Salmon 1992). In this regard, the morphometry of sea turtle hatchlings at birth may be a factor that directly influences locomotion. This has been reported for *Dermochelys coriacea* hatchlings with narrow shells, which showed an advantage in terrestrial locomotion (Mickelson and Downie 2010). However, if turtles are born with unfavorable phenotypic characteristics that influence their locomotion such as congenital deformities (e.g., shell hypoplasia, fin hypoplasia, or amelia), they will have little or no chance of surviving and breeding (Kaska and Downie 1999, Bárcenas and Maldonado 2009).

Considering all the above, it is extremely important to determine the effectiveness of nest conservation programs through technique assessments and success indicators. The objective of this study was to compare 2 *ex situ* incubation methods by analyzing biological variables such as nesting temperatures, hatching success, and physical state (morphometry, weight, locomotor performance, and congenital malformations) for olive ridley hatchlings at a conservation project located at Boca de Tomates Beach, Jalisco, Mexico. The present study analyzes the aforementioned factors in both *ex situ* techniques for the same species, beach, and nesting season with the goal of controlling differences in species, climate, and sand characteristics (e.g., grain size, moisture, organic content). To this date, the authors are unaware of another hatchling quality study with these characteristics.

MATERIALS AND METHODS

Study site

The Boca de Tomates Turtle Project is located in Puerto Vallarta, Jalisco, Mexico (20°40'06.9" N, 105°16'17.1" W), with a beach length of 2 km. It has a tropical climate and is

pueden haber resultados indeseables como mayor tasa de mortalidad, tamaños reducidos en neonatos y más malformaciones con respecto a la incubación *in situ* (Mortimer y Bresson 1999). Las condiciones inadecuadas pueden afectar la proporción sexual en un nido (Morreale et al. 1982, Mrosovsky 1982, Dutton et al. 1985), perjudicar el desarrollo embrionario (Blanck y Sawyer 1981, Patino-Martínez et al. 2012) y disminuir el desempeño locomotor de las crías (Booth et al. 2004, Booth y Evans 2011, Rusli et al. 2015). Las variables ambientales como la temperatura son sumamente importantes para el proceso de incubación de nidos, pues influyen directamente en el desarrollo embrionario de especies poiquilothermas (Du y Ji 2003, Booth 2006, Les et al. 2007). Los embriones de las tortugas marinas son muy sensibles a las fluctuaciones de temperatura, ya que su nivel de tolerancia térmica es de 25.00 a 35.00 °C (Ackerman 1997). Fuera de este intervalo de temperatura, se incrementa la tasa de mortalidad embrionaria (Ackerman 1997, Broderick et al. 2000) o existe daño en los procesos fisiológicos durante el desarrollo embrionario (Maulany et al. 2012).

El desempeño de locomoción (i.e., capacidad para desplazarse con el apoyo de las aletas) juega un papel importante en las primeras horas de vida de las tortugas marinas (Ischer et al. 2009), pues al eclosionar tienen que salir de sus nidos, arrastrarse hasta llegar al mar, evitar depredadores y continuar con su ciclo de vida (Wyneken y Salmon 1992). Relacionado a esto, la morfometría de las crías de tortugas marinas al nacer puede ser un factor que influye directamente en la locomoción. Esto ha sido reportado para crías de *Dermochelys coriacea* con caparazones angostos, las cuales mostraron una ventaja en la locomoción terrestre (Mickelson y Downie 2010). No obstante, si las crías nacen con alguna característica fenotípica desfavorable para su locomoción, como deformidades congénitas (e.g., hipoplasia de caparazón, hipoplasia de aletas o amelia), tendrán menor o ninguna posibilidad de sobrevivir y reproducirse (Kaska y Downie 1999, Bárcenas-Ibarra y Maldonado 2009).

Considerando lo anterior, es sumamente importante determinar la efectividad de los programas de conservación de nidos monitoreando las técnicas utilizadas y los indicadores de éxito. El objetivo de este estudio fue comparar 2 métodos de incubación *ex situ* analizando variables biológicas como temperaturas de anidación, éxito de eclosión y estado físico (morfometría, peso, desempeño locomotor y malformaciones congénitas) de crías de tortuga golfina en un proyecto de conservación ubicado en la playa de Boca de Tomates en la costa de Jalisco, México. El presente trabajo analiza los factores antes mencionados en ambas técnicas *ex situ* tomando en cuenta la misma especie, playa y temporada de estudio con la meta de controlar diferencias interespecíficas, climáticas y de las condiciones de la arena (e.g., tamaño de grano, humedad, contenido orgánico). Hasta el momento, los autores desconocemos otro reporte de calidad de neonatos con estas características.

one of the most important nesting beaches for olive ridleys (*Lepidochelys olivacea*) in the region.

Data collection

Night patrols were carried out during July and August 2019, until a total number of 26 olive ridley nests were collected. All nests were immediately excavated upon being found or collected at the end of the oviposition. The eggs were carefully removed and counted. They were then deposited in a clean plastic bag and transported to the conservation center on the beach for artificial incubation.

Of the collected nests, 13 were buried in the beach hatchery and 13 in polystyrene boxes. Both techniques followed the instructions of the sea turtle protection technique manual used on the Pacific coast of Mexico (Kutzari 2006). For the hatchery, a hole approximately 40–50 cm deep was dug in a shape that mimicked an *in situ* nest (flask shape), and the eggs were then carefully placed in the hole and covered with sand. The nests were placed approximately 1 m from other nests, in alternating rows. The hatchery had a shade cloth to help control sand temperatures. For the polystyrene boxes (43 × 32 × 25 cm), the base of each box was perforated to make multiple holes of approximately 0.5 cm in diameter in order to release excess moisture. Approximately 7 cm of moist sand (the same sand used in the hatchery) was placed in the bottom of the box, and layers of 9 × 6 eggs from the same nest were placed until the box was full, taking care to avoid contact with box wall. The boxes were located adjacent to the hatchery on shelves inside a nylon tent with no other ambient controls.

Temperature

To record the incubation temperature, a thermal sensor (HOBO UA001-08, Onset; Bourne, MA, USA), previously intercalibrated with the other 26 sensors, was placed in the middle of each nest, and it recorded temperature every hour until the nest hatched. Mean daily temperature, daily minimum temperature, daily maximum temperature, variability every 24 h, and the number of hours in which the temperature exceeded 35.00 °C (upper thermal tolerance limit, Ackerman 1997) were determined. For each nest, the mean and standard deviation of these temperature categories was calculated for the incubation period.

Neonate quality

After day 40 of incubation, the nests were checked daily until hatching. We waited for the most hatchlings to emerge from a single nest on the same day to carry out the physical tests. Approximately 15 min before the quality tests, all of the hatchlings were sprayed lightly with sea water so that they entered a state of frenzy (i.e., rapid flipper movement).

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio

El Proyecto Tortuguero Boca de Tomates está ubicado en Puerto Vallarta, Jalisco, México (20°40'06.9" N, 105°16'17.1" W), con una longitud de playa de 2 km. El clima es tropical y la playa es una de las más importantes para la anidación de la golfina (*Lepidochelys olivacea*) en la región.

Recolección de datos

Se realizaron patrullajes nocturnos durante julio y agosto de 2019 hasta recolectar un número total de 26 nidos de golfinas. Todos los nidos fueron inmediatamente excavados al ser encontrados o al término de la ovoposición de la hembra. Los huevos fueron removidos cuidadosamente y contabilizados. Posteriormente, se depositaron en una bolsa de plástico limpia para ser transportados al centro de conservación en la playa para su incubación artificial.

De los nidos recolectados, 13 fueron sembrados en corral de playa y 13 en cajas de poliestireno. Para las 2 técnicas, se siguieron las instrucciones del manual de técnicas de protección de tortugas marinas utilizado en las costas mexicanas del Pacífico (Kutzari 2006). Para la siembra en corral, se cavó un hoyo de 40–50 cm de profundidad para cada nido. Manualmente, se dio un acabado similar al nido *in situ*, en forma de matraz, y los huevos fueron colocados con precaución y cubiertos con arena. Los nidos se establecieron a aproximadamente 1 m de distancia entre cada uno en filas alternadas. El corral contaba con malla sombra como apoyo para control de temperatura en la arena. Para la siembra en cajas de poliestireno (43 × 32 × 25 cm), la base de cada caja fue perforada para obtener diversos agujeros de aproximadamente 0.5 cm de diámetro, a fin de liberar el exceso de humedad. Se colocó un grosor de aproximadamente 7 cm de arena húmeda (la misma arena usada en el corral de playa) al fondo de la caja, y se formaron hileras de 9 × 6 huevos de un solo nido hasta llenar la caja evitando el contacto con las paredes de las cajas. Las cajas fueron ubicadas en estantes dentro de una carpa de nylon, adyacente al corral, sin otro control del ambiente.

Temperatura

Para el registro de la temperatura de incubación, en medio de cada nidada se colocó un termosensor (HOBO UA001-08, Onset; Bourne, MA, EUA), previamente intercalibrado con los otros 26 sensores, el cual capturó la temperatura cada hora hasta la eclosión del nido. Se determinó la temperatura promedio diaria, la temperatura mínima diaria, la temperatura máxima diaria, la variabilidad cada 24 h y el número de horas en que la temperatura sobrepasó los 35.00 °C (límite superior de tolerancia térmica, Ackerman 1997). Para cada

Malformations

All live hatchlings and dead embryos were examined for the presence of malformations. Visual inspections were carried out systematically following cranial–caudal and dorsal–ventral orientations. If an embryo or hatchling showed multiple malformations, each type of malformation was recorded and photographed separately (e.g., Figs. 1–3). The malformations were classified by anatomical region, type of malformation, and intensity.

The incidence of malformations was estimated using the prevalence and intensity indices described by Margolis et al. (1982). In our study, prevalence is defined as the number of organisms that registered at least 1 malformation divided by the number of organisms studied. Intensity is the number of malformations found per organism; it is obtained by dividing the number of malformations found in the study by the number of organisms with malformations (Bárceñas and Maldonado 2009).

Morphometry and weight

Ten hatchlings were selected randomly from each nest. The carapace length and width (cm) of the hatchlings was measured using a conventional metallic vernier, obtaining means of 3 measurements of the straight carapace length and 3 measurements of the straight carapace width. A pre-calibrated scale was used to obtain the weight (g) of the hatchlings; each was weighed 3 times and a final mean was obtained.

nido se calculó el promedio y la desviación estándar de esas categorías de temperatura para el periodo de incubación.

Calidad de neonatos

A partir del día 40 de incubación, los nidos fueron revisados diariamente hasta su eclosión. Esperamos a que la mayoría de los neonatos de un solo nido emergieran en el mismo día para realizar las pruebas físicas y, aproximadamente 15 min antes de las pruebas de calidad, a todas las crías se les roció agua de mar ligeramente para que entraran en estado de frenesí (i.e., movimiento rápido de las aletas).

Malformaciones

Se examinaron todas las crías vivas y los embriones muertos para detectar malformaciones. La inspección visual se realizó de manera sistemática siguiendo una orientación craneal-caudal y dorsal-ventral. Si un embrión o una cría mostraba malformaciones múltiples, se separaban y se registraba cada tipo de malformación, y se procedió a la toma de fotografías de cada caso (e.g., Figs. 1–3). Las malformaciones fueron clasificadas por región anatómica, tipo de malformación e intensidad.

La incidencia de malformaciones se estimó mediante los índices de prevalencia e intensidad según Margolis et al. (1982). En nuestro estudio, la prevalencia es el número de organismos que presentaron al menos una malformación dividido por el número de organismos estudiados. La intensidad indica el número de malformaciones por organismo;

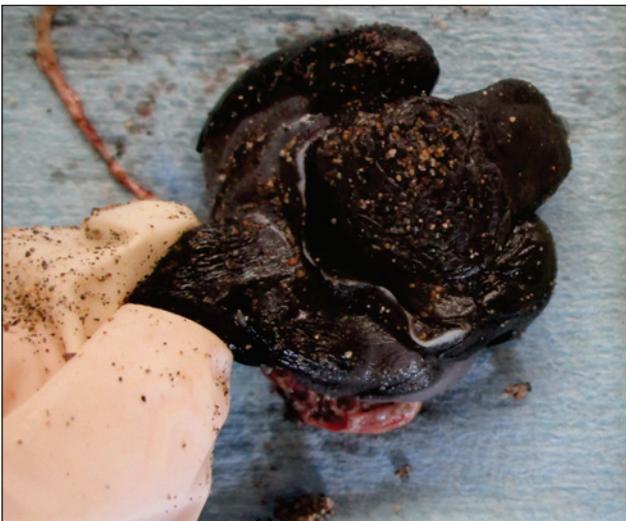


Figure 1. Olive ridley embryo (*Lepidochelys olivacea*) with shell hypoplasia.

Figura 1. Embrión de Tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) con hipoplasia de caparazón.



Figure 2. Olive ridley embryo (*Lepidochelys olivacea*) with irregular shell.

Figura 2. Embrión de Tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) con caparazón irregular.



Figure 3. Albino olive ridley embryo (*Lepidochelys olivacea*) with lower prognatia and anophthalmia.

Figura 3. Embrión de Tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) albino con prognatismo y anoftalmía.

Locomotor performance

With the 10 hatchlings that were measured and weighed, 2 measurements were made for hatchling locomotor performance (righting response and crawling speed) following the methods of Maulany et al. (2012) and Hart et al. (2016). For righting response, the time it took for the hatchlings to flip over was taken; hatchlings were placed upside down on their carapace and the mean of 5 trials (s) was taken. If any hatchling took more than 60 s to turn, a 5-s rest period was established before the next attempt (Hart et al. 2016).

For crawling speed, the time it took for a hatchling to crawl 3 m on the beach was recorded. To do this, a track was built in the sand by placing two 3-m-long wooden boards 10 cm apart. For the nocturnal tests, a LED lamp was placed at the end of the tables to guide the hatchlings towards the end. A time limit of 10 min was established for each hatchling to finish crawling the 3 m, and if the hatchlings did not finish covering that distance within the time limit, the centimeters advanced were recorded ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$). However, if the hatchlings did not move within the first 5 min of being placed at the top of the tables, they were assigned to the failure category ($0\text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$).

Hatching success

All hatchlings were released within 24 h of hatching. Cleaning of each nest was carried out on the third day after releasing the hatchlings. The total number of dead hatchlings was recorded and grouped into 3 categories: (1) eggs without visible embryonic development, (2) dead hatchlings outside the egg, (3) dead embryo inside the egg. Hatching success

se obtiene dividiendo el número de malformaciones encontradas en el estudio entre el número de organismos con malformaciones (Bárcenas-Ibarra y Maldonado 2009).

Morfometría y peso

Se tomaron 10 crías de forma aleatoria de cada nido. La longitud y el ancho del caparazón (cm) de las crías se midieron con un vernier convencional metálico; se registró un promedio final de 3 medidas del largo recto de caparazón y 3 medidas del ancho recto de caparazón. Se utilizó una báscula precalibrada para la obtención del peso (g) de las crías; se pesaron 3 veces y se obtuvo un promedio final.

Desempeño locomotor

Con las 10 crías que se midieron y pesaron, se realizaron 2 mediciones del desempeño locomotor (el enderezamiento y la velocidad de arrastre) siguiendo métodos de Maulany et al. (2012) y Hart et al. (2016). Para el enderezamiento, se tomó el tiempo que tardaron las crías en enderezarse; para esto, se colocaron a las crías boca arriba sobre su caparazón y se tomó el promedio de los 5 giros (s). Si alguna cría tardaba más de 60 s en girar, se estableció un periodo de descanso de 5 s antes del siguiente intento (Hart et al. 2016).

Para la velocidad de arrastre, se registró el tiempo que tomó cada cría para arrastrarse a lo largo de 3 m en la playa. Para ello, se construyó una pista en la arena colocando 2 tablas de madera de 3 m de largo separadas una de la otra por 10 cm. Para las pruebas nocturnas, se colocó una lámpara LED al final de las tablas para orientar las crías hacia el término. Se estableció un tiempo límite de 10 min para que cada cría terminara de recorrer los 3 m, y si las crías no terminaban de recorrer esa distancia en el tiempo límite, se registraron los centímetros avanzados ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$). Sin embargo, si las crías no se movían dentro de los primeros 5 min de haber sido colocadas al principio de las tablas, se asignaban a la categoría de falla ($0\text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$).

Éxito de eclosión

Todas las crías fueron liberadas antes de que cumplieran 24 h de eclosión. La limpieza de cada nido se realizó al tercer día de haber liberado a las crías. Se registró el número total de muertes, las cuales a su vez fueron agrupadas en 3 categorías: (1) huevos sin desarrollo embrionario visible, (2) cría muerta fuera del huevo y (3) embrión muerto dentro del huevo. El éxito de eclosión se calculó dividiendo el número de crías vivas entre el número total de huevos en el nido.

Análisis estadísticos

La prueba de chi (χ^2) cuadrada se utilizó para comprobar la hipótesis de que no había diferencias entre los tratamientos —caja y corral— respecto al éxito de eclosión y a

was calculated using the number of live hatchlings over the total eggs in the nest.

Statistical analysis

Chi-square (χ^2) tests were used to test the hypothesis that there were no differences between the treatments—boxes and hatchery—for hatching success and malformation parameters (prevalence, anatomical region, intensity). The data were normalized by the mean number of inspected organisms, and for counts below 10 we used the Yates correction. For the discrete data (temperatures, days of incubation, locomotor performance, weight, and morphometry [straight carapace length and straight carapace width]), the Ryan–Joiner normality test was used first, and if the distributions were normal, the Student-*t* test was used (*t*). For non-normal distributions, we used the Wilcoxon signed rank (*W*) test to check for differences between the means of the 2 groups (boxes and hatchery). Data were analyzed in Excel or Minitab 17.1.0 (Minitab; State College, Pennsylvania, USA), and all tests used an $\alpha = 0.05$ significance level.

RESULTS

Hatching success

A significant difference was found between the 2 methods (boxes and hatchery) for the mean hatching success. The eggs incubated in the hatchery obtained a higher hatching percentage (mean = 77.40%, $n = 1,368$) than those incubated in boxes (mean = 59.91%, $n = 1,160$) ($\chi^2 = 70.97$, $P < 0.001$, $n = 1,160$) (Table 1). Rain entered one box and the majority of embryos died, skewing the overall mean hatching success for the boxes. Removing that box's data from the analysis increased the mean hatching success to 64.60% ($n = 1,050$) but did not change the significant difference between the incubation methods ($\chi^2 = 33.9$, $P < 0.001$) (Table 1).

Nest temperatures

Results were obtained from 25 out of the 26 thermal sensors placed in the 26 nests because 1 sensor failed (hatchery, $n = 13$; boxes, $n = 12$). A significant difference in mean temperature over the incubation period was observed, with mean temperature being higher in the hatchery (32.62 °C) than in boxes (30.58 °C) ($t = -7.88$, $P < 0.001$). The mean daily minimum temperature during the incubation period was higher in the hatchery (27.61 °C) than in the boxes (26.11 °C), presenting a significant difference ($t = 5.18$, $P < 0.001$). No significant difference was found in the mean daily maximum temperature ($t = 0.94$, $P = 0.360$). The boxes were exposed to significantly fewer hours above the thermal tolerance limit (>35.00 °C) (box mean = 47.7 h, hatchery mean = 114.3 h; $W = 127$, $P = 0.020$) and a shorter duration (i.e., continuous hours) above 35.00 °C

los datos de malformación (prevalencia, región anatómica, intensidad). Los datos fueron normalizados por el promedio de organismos inspeccionados, y para los conteos inferiores a 10 usamos la corrección Yates. Para los datos discretos (temperaturas, días de incubación, desempeño locomotor, peso y morfometría [largo recto de caparazón y ancho recto de caparazón]), se utilizó primero la prueba de normalidad de Ryan-Joiner, y si las distribuciones eran normales, se utilizó la prueba *t* de Student (*t*). En el caso de las distribuciones no normales, usamos la prueba de rangos con signo de Wilcoxon (*W*) para comprobar diferencias entre los resultados promedio de los 2 grupos (cajas y corral). Los datos fueron analizados en Excel o Minitab 17.1.0 (Minitab; State College, PA, EUA), y todas las pruebas utilizaron nivel de significación de $\alpha = 0.05$.

RESULTADOS

Éxito de eclosión

Se encontró una diferencia significativa en el promedio del éxito de eclosión entre los 2 métodos de incubación (cajas y corral). Los huevos incubados en corral obtuvieron un mayor porcentaje de eclosión (promedio = 77.40%, $n = 1,368$) que aquellos incubados en cajas (promedio = 59.91%, $n = 1,160$) ($\chi^2 = 70.97$, $P < 0.001$, $n = 1,160$) (Tabla 1). La lluvia se infiltró en una caja y casi la totalidad de embriones murieron, lo cual sesgó el promedio del éxito de eclosión para las cajas. Eliminando los datos de esa caja de los análisis, mejoró el promedio de eclosión a 64.60% ($n = 1,050$), pero no cambió la diferencia significativa entre los métodos de incubación ($\chi^2 = 33.9$, $P < 0.001$) (Tabla 1).

Temperatura de nidos

Se obtuvieron resultados de 25 de los 26 termosensores colocados en los 26 nidos, puesto que uno falló (corral, $n = 13$; cajas, $n = 12$). Se observó una diferencia significativa en la temperatura promedio durante toda la incubación, y fue mayor en corral (32.62 °C) que en cajas (30.58 °C) ($t = -7.88$, $P < 0.001$). La temperatura mínima diaria promedio durante toda la incubación fue mayor en corral (27.61 °C) que en cajas (26.11 °C), y la diferencia fue significativa ($t = 5.18$, $P < 0.001$). No se encontró diferencia significativa en la temperatura máxima diaria promedio ($t = 0.94$, $P = 0.360$). Las cajas estuvieron expuestas a significativamente menor número de horas por encima de la tolerancia térmica (>35.00 °C) (promedio cajas = 47.7 h, promedio corral = 114.3 h; $W = 127$, $P = 0.020$) y a una menor duración (i.e., horas continuas) arriba de 35.00 °C (promedio cajas = 5.1 h [rango = 0 a 42], promedio corral = 14.6 h [rango = 0 a 141]; $W = 119$, $P < 0.010$). En cuanto a la variabilidad de la temperatura promedio cada 24 h, las fluctuaciones fueron mayores en cajas (promedio = 2.69 °C) que en corral

Table 1. Average and range of biological parameters in 2 incubation methods.
Tabla 1. Promedio y rango de los parámetros biológicos en 2 métodos de incubación.

Parameter	Incubation method			Statistical test	
	Hatchery		Box		
	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range	
Hatching success (%)	77.44 (±16.86)	33.90–91.07	59.91 (±30.24)	3.60–92.31	$\chi^2 = 70.97$ $P < 0.001$
Incubation days	46 (±0.99)	45–48	51 (±1.71)	48–54	$t = -9.42$ $P < 0.001$
Mean daily nest temperature (°C)	32.62 (±0.36)	32.08–33.30	30.58 (±0.83)	28.97–31.62	$t = -7.88$ $P < 0.001$
Mean daily min temperature (°C)	27.61 (±0.92)	26.02–28.79	26.11 (±0.48)	24.90–26.70	$t = 5.18$ $P < 0.001$
Mean daily max temperature (°C)	36.29 (±1.20)	34.38–38.99	35.70 (±1.85)	32.23–39.14	$t = 0.94$ $P = 0.360$
Daily temperature variance (°C)	1.46 (±0.33)	1.06–2.14	2.69 (±0.27)	2.19–3.07	$t = -10.26$ $P < 0.001$
Straight carapace length (cm)	4.02 (±0.12)	3.85–4.24	4.04 (±0.15)	3.85–4.32	$t = -0.28$ $P = 0.784$
Straight carapace width (cm)	3.28 (±0.13)	3.01–3.45	3.35 (±0.13)	3.14–3.61	$t = -1.26$ $P = 0.219$
Weight (g)	14.88 (±1.09)	13.25–16.29	15.56 (±1.23)	14.00–18.83	$W = 155.00$ $P = 0.305$
Crawl speed (cm s ⁻¹)	1.48 (±1.10)	0.67–4.41	1.22 (±0.88)	0.36–3.67	$W = 186.00$ $P = 0.640$
Righting response (Sg)	1.82 (±0.57)	1.10–3.38	3.05 (±2.84)	1.33–11.69	$W = 144.00$ $P = 0.119$

Average incubation days: $n = 13$, hatchery; $n = 13$, boxes. Average temperatures: $n = 13$, hatchery; $n = 12$, boxes. Average morphometric measurements, weight, and locomotor performance: $n = 130$, hatchery; $n = 124$, boxes.

(box mean = 5.1 h [range = 0 to 42], hatchery mean = 14.6 h [range = 0 to 141]; $W = 119$, $P < 0.010$). Regarding the variability in mean temperature over 24 h, there was a significant difference ($t = -10.26$, $P < 0.001$), with greater daily fluctuations in boxes (mean = 2.69 °C) than in the hatchery (mean = 1.46 °C) (Table 1).

Incubation duration

Nests incubated in boxes (mean = 51 d) took 5 d longer to hatch than those in the beach hatchery (mean = 46 d), and a significant difference was observed between the techniques ($W = 92$, $P < 0.001$, $n = 26$) (Table 1).

Neonate quality

Regarding locomotor performance (crawling and righting speed), morphometry (straight carapace length and straight carapace width), and weight, no significant differences were found between the incubation techniques (t and W tests, $P > 0.050$, $n = 254$) (Table 1). Of the hatchery nests, a total of 1,171 organisms were examined for malformations. Seventeen hatchlings presented at least 1 malformation, resulting in a prevalence rate of 1.45%. Overall, 26 malformations were found, for an intensity index of 1.52 malformations per organism. Of the eggs incubated in boxes, out of a total of 829 studied organisms, 9 malformed hatchlings were observed with a total of 17 malformations, representing a prevalence rate of 1.09% and an intensity index of 1.88 malformations per organism. No significant differences were found in the prevalence between the box and hatchery methods ($\chi^2 = 3.88$, $P = 0.140$, $n = 2,000$) (Table 2).

An irregular carapace was the most frequent malformation type observed in both incubation methods, with at least 1 occurrence in 23.5% of the boxes ($n = 13$) and in 50% of hatchery nests ($n = 13$) (Table 3, Fig. 3). The incubation technique was not found to influence the anatomical region of malformations ($\chi^2 = 4.42$, d.f. = 4, $P = 0.112$, $n = 43$ malformations) (Table 3).

DISCUSSION

In our study, a greater hatching success was found in the beach hatchery compared to polystyrene boxes. In other studies of *ex situ* incubation methods of sea turtles (box and beach) and their effect on hatching success, discrepancies have been reported, where some did not find significant differences between methods (Wyneken et al. 1988, Chan 1989, Abd-Mutalib and Fadzly 2015, Hart et al. 2016) and others have obtained similar results to the present study (Revuelta et al. 2014, Santos et al. 2019). Differences in findings may be attributed to the studied species, environmental conditions, nesting season, type of transport from the beach to the *ex situ* site, and even the economic resources of the project. For example, at our study site with limited financial resources,

(promedio = 1.46 °C), y la diferencia fue significativa ($t = -10.26$, $P < 0.001$) (Tabla 1).

Duración de incubación

Los nidos incubados tardaron 5 d más en eclosionar en cajas (promedio = 51 d) que en corral (promedio = 46 d), y se observó una diferencia significativa entre ambas técnicas ($W = 92$, $P < 0.001$, $n = 26$) (Tabla 1).

Calidad de neonatos

En cuanto al desempeño locomotor (enderezamiento y velocidad de arrastre), la morfometría (largo recto de caparazón y ancho recto de caparazón) y el peso, no se encontraron diferencias significativas entre las técnicas de incubación (pruebas t y W , $P > 0.050$, $n = 254$) (Tabla 1). De los nidos incubados en corral, un total de 1,171 organismos fueron inspeccionados en búsqueda de malformaciones. Diecisiete crías presentaron alguna malformación, y la prevalencia total fue de 1.45%. Se encontraron 26 malformaciones, con un índice de intensidad de 1.52 malformaciones por organismo. De los huevos incubados en cajas, 9 de las 829 crías inspeccionadas presentaron malformaciones, con un total de 17 malformaciones, una prevalencia total de 1.09% y una intensidad de 1.88 malformaciones por organismo. No se encontraron diferencias significativas en la prevalencia entre cajas y corral ($\chi^2 = 3.88$, $P = 0.140$, $n = 2,000$) (Tabla 2).

El caparazón irregular fue el tipo de malformación con mayor porcentaje manifestado en ambos métodos de incubación, con al menos una ocurrencia en 23.5% de las cajas ($n = 13$) y en 50% de los nidos de corral ($n = 13$) (Tabla 3, Fig. 3). Se observó que la técnica de incubación no influyó en la región anatómica de las malformaciones ($\chi^2 = 4.42$, g.l. = 4, $P = 0.112$, $n = 43$ malformaciones) (Tabla 3).

DISCUSIÓN

En nuestro estudio, el éxito de eclosión fue mayor en el corral de playa que en las cajas de poliestireno. Otros estudios de métodos de incubación *ex situ* de tortugas marinas (caja y playa) y su efecto sobre el éxito de eclosión han reportado discrepancias en los resultados, donde algunos no encontraron diferencias significativas entre métodos (Wyneken et al. 1988, Chan 1989, Abd-Mutalib y Fadzly 2015, Hart et al. 2016) y otros han obtenido resultados similares al presente estudio (Revuelta et al. 2014, Santos et al. 2019). Esta divergencia puede ser debida a la diferencia en especies, condiciones ambientales, temporada de anidación, tipo transporte de la playa al sitio *ex situ* e incluso recursos económicos del proyecto. Por ejemplo, en nuestro estudio, con recursos económicos limitados, la lluvia infiltró la carpa deteriorada y ocasionó ahogamiento de embriones en una de las cajas.

Con relación a las temperaturas de incubación, en nuestro estudio se registraron temperaturas diarias mínimas y medias

rain infiltrated the deteriorated tent, causing the drowning of the majority of embryos in one of the boxes.

Regarding incubation temperatures, in our study significantly higher minimum and mean daily temperatures were recorded in the hatchery compared to the boxes, which is consistent with previous studies (Mrosofsky and Yntema 1980, Mrosofsky 1982, Dutton, Whitmore and Mrosofsky 1985, Arzola-González 2007, Hart et al. 2016). This probably influenced the significantly longer incubation duration in the boxes (mean 5 d), as temperature has been shown to negatively correlate with incubation duration (Ackerman 1997).

The mean temperatures remained within the thermal tolerance range of 25.00–35.00 °C for survival. No thermometer registered temperatures <25.00 °C; however, temperatures higher than 35.00 °C were registered in both methods with different patterns. In the hatchery temperatures >35.00 °C presented longer durations (continuous hours), while the boxes had more spiked diurnal fluctuations above 35.00 °C. Sustained temperatures outside the recommended range could cause an increase in embryonic mortality (Ackerman 1997), as reported by studies of *in situ* olive ridley turtle nests on the Pacific coast of Costa Rica (Valverde et al. 2010). Considering that multiple studies predict that the temperature of many beaches will increase with global warming (Raustiala 1997, Fuentes et al. 2011, Pike 2014), it is essential to carefully monitor artificial incubation techniques.

Regarding neonate quality, our study did not find differences in crawling speed between the treatments. However, another study on *L. olivacea* in the Boca de Tomates region by Hart et al. (2016) reported that individuals incubated in a hatchery were faster than those incubated in boxes. We observed that the hatchlings in the boxes were in a state of lethargy for several hours, and therefore we waited until the hatchlings entered a state of “frenzy” for the locomotor performance tests. The lethargy is probably due to the lower temperatures recorded in the boxes, as ectothermic species take longer to activate their metabolism (Les et al. 2007).

significativamente más altas en el corral que en las cajas, lo cual concuerda con estudios previos (Mrosofsky y Yntema 1980, Mrosofsky 1982, Dutton et al. 1985, Arzola-González 2007, Hart et al. 2016). Esto probablemente influyó en la duración de incubación, que fue significativamente mayor en las cajas (5 d en promedio), ya que se ha demostrado que la temperatura está negativamente relacionada con el tiempo de incubación (Ackerman 1997).

El promedio de las temperaturas permaneció dentro del intervalo térmico de supervivencia de 25.00–35.00 °C. Ningún termómetro registró temperaturas <25.00 °C; sin embargo, se registraron temperaturas superiores a 35.00 °C en ambos métodos con patrones distintos. En el corral se registraron temperaturas >35.00 °C con mayor duración (horas continuas), mientras que en las cajas se presentaron fluctuaciones diurnas arriba de 35.00 °C más marcadas. Las temperaturas fuera del intervalo térmico recomendado podrían provocar un aumento en la mortalidad embrionaria (Ackerman 1997), como lo reportan estudios de nidos *in situ* de tortugas golfinas en la costa del pacífico de Costa Rica (Valverde et al. 2010). Considerando que diversos estudios han predicho que las temperaturas de muchas playas aumentarán con el calentamiento global (Raustiala 1997, Fuentes et al. 2011, Pike 2014), es necesario monitorear cuidadosamente las técnicas de incubación artificial.

Con respecto a la calidad de los neonatos, en nuestro estudio no encontramos diferencias en la velocidad de arrastre entre los tratamientos. Sin embargo, en otro estudio con *L. olivacea* en la región de Boca de Tomates, Hart et al. (2016) reportaron que las crías de corral mostraron ser más rápidas que las crías de huevos incubados en cajas. Observamos que en las cajas, las crías al eclosionar permanecían en estado de letargia por varias horas y, por eso, esperamos hasta que las crías entraran en estado de “frenesí” para realizar las pruebas de desempeño locomotor. Es probable que la letargia se debió a las temperaturas más bajas registradas en las cajas, ya que al ser ectotermos, tardan un poco más en activar su metabolismo (Les et al. 2007).

Table 2. Prevalence (%) and intensity of malformations in *Lepidochelys olivacea* hatchlings.

Tabla 2. Prevalencia (%) e intensidad de malformaciones en crías de *Lepidochelys olivacea*.

Incubation method	Total nests (N)	Nests with malformations (N)	Total eggs (N)	Inspected eggs (N)	Malformed hatchlings (N)	Malformations (N)	Total prevalence of inspected eggs (%)	Intensity: malformations/organism (N)
Hatchery	13	11	1,368	1,171	17	26	1.45%	1.52
Boxes	13	5	1,160	829	9	17	1.08%	1.88
Statistical test							$\chi^2 = 3.88$ $P = 0.140$ d.f. = 2 $n = 2,000$	

Table 3. Number (*N*) and proportion (%) of type of malformation by anatomical region and incubation method (beach hatcheries and polystyrene boxes).**Tabla 3.** Número (*N*) y proporción (%) del tipo de malformación por región anatómica y método de incubación (cajas de poliestireno y corral de playa).

Anatomical region	Type of malformation	Boxes (<i>N</i>)	Boxes (%)	Hatchery nests (<i>N</i>)	Hatchery nests (%)
General	Albinism			2	7.7%
	Identical twins				
	Unequal twins	1	5.90%		
	Complete aplasia	2	11.80%	1	3.85%
Head	Exencephaly				
Eyes	Cyclopia				
	Sinophtalmia				
	Monophtalmia	1	5.90%	1	3.85%
	Anophtalmia	1	5.90%	2	7.70%
Nose	Arhinia				
	Rhinodimo				
Jaw	Lower Prognatia			3	11.50%
	Agnathia				
Flippers	Monoamelia				
	Biamelia	1	5.90%		
	Tetramelia				
	Hypoplasia	3	17.50%		
	Bifurcation	2	11.80%	2	7.70%
Shell	Irregular	4	23.50%	13	50.00%
	Kyphosis	1	5.90%	1	3.85%
	Hypoplasia	1	5.90%	1	3.85%
Total		17	100%	26	100%

Regarding neonate malformations, both incubation methods produced hatchlings with malformations, but no significant differences were found. Our results of malformation prevalence and intensity are similar to studies by Bárcenas and Maldonado (2009) and Camacho-Muñoz (2018), in which they concluded that malformations in *L. olivacea* have low prevalence and low intensity of malformations per organism compared to other studies of different sea turtle species (Kaska and Downie 1999, Gularte 2000, Kaska and Furness 2001). Our results coincide with

Referente a las malformaciones, se observaron crías que manifestaron malformaciones con ambos métodos de incubación, pero sin diferencias significativas. Nuestros resultados de prevalencia e intensidad de malformaciones coincidieron con los estudios de Bárcenas-Ibarra y Maldonado (2009) y Camacho-Muñoz (2018), quienes concluyeron que las malformaciones en *L. olivacea* tienen baja prevalencia y baja intensidad por organismo en comparación con otras especies de tortugas marinas estudiadas (Kaska y Downie 1999, Gularte 2000, Kaska y Furness

findings from similar studies in that the most affected anatomical region was the carapace and the most frequent malformation type was an irregular carapace (Gularte 2000, Kaska and Furness 2001, Bárcenas-Ibarra and Maldonado 2009, Bárcenas-Ibarra et al. 2015).

Although the “normal” rates of prevalence and intensity of malformations in *in situ* olive ridley turtle nests in the region or the possible causes are unknown, in mammals the etiology of malformations has been classified into genetic, environmental (e.g., chemical, infectious, physical agents), and unknown factors (Deltsidou et al. 2000, Rojas and Walker 2012). Therefore, it has been suggested that these causes may be similar in sea turtles, but more research is needed to corroborate the possible causes (Kaska and Furness 2001, Bárcenas-Ibarra and Maldonado 2009).

This is the first study to compare the quality of hatchlings using 2 *ex situ* incubation methods in the same turtle species, location, and time period. Although our results do not demonstrate that there are serious consequences to neonate quality with these methods, differences in temperatures and hatching success were found. The possible relationship with temperatures, sand humidity (Arzola-González 2007, Lolavar and Wyneken 2019), and the neonate quality deserves further investigation in future studies that cover more of the nesting season. As the world moves towards *ex situ* incubation of many species due to lack of suitable natural habitat and global climate change, it is crucial to maximize the success of artificial management techniques, especially for endangered species such as the sea turtles.

ACKNOWLEDGMENTS

The federal government permit used during this study was SEMARNAT SGPA/DVGS/06260/19. We thank the volunteers of the Boca de Tomates sea turtle conservation camp for their assistance in collecting nests. Special thanks to Annelisse Bárcenas Ibarra for her support in the identification of malformations and to Mr. Vicente Peña Aldrete at Red Tortuguera for allowing this research to be carried out at the camp. Finally, we thank Matt Ware from Florida State University, for his help in the statistical analysis, and the 2 anonymous reviewers, whose comments helped us to significantly improve the manuscript.

REFERENCES

- Abd-Mutalib AH, Fadzly N. 2015. Assessing hatchery management as a conservation tool for sea turtles: A case study in Setiu, Terengganu. *Ocean Coast Manage.* 113:47–53. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2015.05.010>
- Ackerman RA. 1997. The nest environment and the embryonic development of sea turtles. In: Lutz PL, Musick JA (eds.), *The Biology of Sea Turtles*. Boca Raton (FL): CRC Press. p. 83–106.
- Arzola-González JF. 2007. Humedad y temperatura en nidos naturales y artificiales de tortuga golfina *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz 1829). *Rev Biol Mar Oceanogr.* 42(3):377–383. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572007000300017>

2001). Nuestros resultados coinciden con hallazgos de estudios similares que reportaron que la región anatómica más afectada era el caparazón y que el tipo de malformación más frecuente era la de caparazón irregular (Gularte 2000, Kaska y Furness 2001, Bárcenas-Ibarra y Maldonado 2009, Bárcenas-Ibarra et al. 2015).

Aunque se desconocen los índices “normales” de prevalencia e intensidad de malformaciones en tortuga golfina de nidos *in situ* en la región o las posibles causas que promuevan las apariciones de las mismas, en mamíferos la etiología de malformaciones se ha clasificado en factores genéticos, medio ambientales (e.g., agentes químicos, infecciosos, físicos) y desconocidos (Deltsidou et al. 2000, Rojas y Walker 2012). Por ende, para las tortugas, se ha sugerido que las causas de malformaciones pueden ser similares a las encontradas para mamíferos, pero falta más investigación para corroborar este supuesto (Kaska y Furness 2001, Bárcenas-Ibarra y Maldonado 2009).

Este es el primer estudio que compara la calidad de neonatos utilizando 2 métodos de incubación *ex situ* en la misma especie de tortuga, localización y periodo de tiempo. Aunque nuestros resultados no demuestran si hay consecuencias graves en la calidad de neonatos con los 2 métodos, se encontraron diferencias en temperaturas y éxito de eclosión. La posible relación con temperaturas, humedad de arena (Arzola-González 2007, Lolavar y Wyneken 2019) y la calidad de neonatos merece más investigación en futuros estudios que abarquen más de la temporada de anidación. A medida que el mundo avanza hacia la incubación *ex situ* de muchas especies debido a la falta de hábitats naturales adecuados y el cambio climático global, es crucial maximizar el éxito de las técnicas de manejo artificial, especialmente para especies en peligro de extinción como las tortugas marinas.

AGRADECIMIENTOS

El permiso gubernamental utilizado para este estudio fue SEMARNAT SGPA/DVGS/06260/19. Se agradece a los voluntarios del Campamento Tortuguero Boca de Tomates su asistencia en la recolección de nidos. Agradecimiento especial a Annelisse Bárcenas Ibarra por su apoyo en la identificación de malformaciones y al Sr. Vicente Peña, encargado del operativo Red Tortuguera, por permitir realizar esta investigación en el campamento. Finalmente, agradecemos a Matt Ware de la Universidad estatal de Florida su ayuda en el análisis estadístico y a los 2 revisores anónimos, cuyas anotaciones nos permitieron mejorar significativamente el manuscrito.

- Bárceñas-Ibarra A, de la Cueva H, Rojas-Lleonart I, Abreu-Grobois FA, Lozano-Guzmán RI, Cuevas E, García-Gasca A. 2015. First approximation to congenital malformation rates in embryos and hatchlings of sea turtles. *Birth Defects Res A*. 103(3):203–224.
<https://doi.org/10.1002/bdra.23342>
- Bárceñas-Ibarra A, Maldonado-Gasca A. 2009. Malformaciones en embriones y neonatos de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) en Nuevo Vallarta, Nayarit, México = Malformations in embryos and neonates of olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*) in Nuevo Vallarta, Nayarit, Mexico. *Vet Méx*. 40(4):371–380.
- Blanck CE, Sawyer RH. 1981. Hatchery practices in relation to early embryology of the loggerhead sea turtle, *Caretta caretta* (Linné). *J Exp Mar Biol Ecol*. 49(2–3):163–177.
[https://doi.org/10.1016/0022-0981\(81\)90068-X](https://doi.org/10.1016/0022-0981(81)90068-X)
- Booth DT. 2006. Influence of incubation temperature on hatchling phenotype in reptiles. *Physiol Biochem Zool*. 79(2):274–281.
<https://doi.org/10.1086/499988>
- Booth DT, Burgess E, McCosker J, Lanyon JM. 2004. The influence of incubation temperature on post-hatching fitness characteristics of turtles. *Int Congr Ser*. 1275:226–233.
<https://doi.org/10.1016/j.ics.2004.08.057>
- Booth DT, Evans A. 2011. Warm water and cool nests are best. How global warming might influence hatchling green turtle swimming performance. *PLOS ONE*. 6(8):e23162.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023162>
- Broderick AC, Godley BJ, Reece S, Downie JR. 2000. Incubation periods and sex ratios of green turtles: highly female biased hatchling production in the eastern Mediterranean. *Mar Ecol Prog Ser*. 202:273–281.
<https://doi.org/10.3354/meps202273>
- Brost B, Witherington B, Meylan A, Leone E, Ehrhart L, Bagley D. 2015. Sea turtle hatchling production from Florida (USA) beaches, 2002-2012, with recommendations for analyzing hatching success. *Endanger Species Res*. 27(1):53–68.
<https://doi.org/10.3354/esr00653>
- Camacho-Muñoz P. 2018. Malformaciones congénitas en embriones y neonatos de Tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*), en playa boca de tomates, Puerto Vallarta Jalisco [BSc thesis]. [Nayarit (Mexico)]: Universidad Autónoma de Nayarit.
- Chan EH. 1989. White spot development, incubation and hatching success of leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*) eggs from Rantau Abang, Malaysia. *Copeia*. 1989(1):42–47.
<https://doi.org/10.2307/1445603>
- Deltsidou Anna, Lykeridou K, Plessas ST. 2000. Congenital anomalies and aetiology. *Rev Clin Pharmacol Pharmacokin*. 14(3):111–115.
- Du WG, Ji X. 2003. The effects of incubation thermal environments on size, locomotor performance and early growth of hatchling soft-shelled turtles, *Pelodiscus sinensis*. *J Therm Biol*. 28(4):279–286.
[https://doi.org/10.1016/S0306-4565\(03\)00003-2](https://doi.org/10.1016/S0306-4565(03)00003-2)
- Dutton PH, Whitmore CP, Mrosovsky N. 1985. Masculinisation of leatherback turtle *Dermochelys coriacea* hatchlings from eggs incubated in styrofoam boxes. *Biol Cons*. 31(3):249–264.
[https://doi.org/10.1016/0006-3207\(85\)90070-9](https://doi.org/10.1016/0006-3207(85)90070-9)
- Esteban N, Laloë JO, Kiggen FSPL, Ubels SM, Becking LE, Meesters EH, Berkel J, Hays GC, Christianen MJA. 2018. Optimism for mitigation of climate warming impacts for sea turtles through nest shading and relocation. *Sci Rep*. 8(1):17625.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-35821-6>
- Fuentes MMPB, Fish MR, Maynard JA. 2011. Management strategies to mitigate the impacts of climate change on sea turtle's terrestrial reproductive phase. *Mitig Adapt Strateg Glob Chang*. 17(1):51–63.
<https://doi.org/10.1007/s11027-011-9308-8>
- Gularte W. 2000. Deformities in hatchling olive ridleys. In: Mosier A, Foley AM, Brost B (eds.), *Proceedings of the Twentieth Annual Symposium on Sea Turtle Biology and Conservation*, 2000 Feb 29 to Mar 4; Orlando (FL). Miami (FL): NOAA-National Oceanic and Atmospheric Administration (US), National Marine Fisheries Service. 156 p. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFCS-477.
- Hamann M, Godfrey MH, Seminoff JA, Arthur K, Barata PCR, Bjørndal KA, Bolten AB, Broderick AC, Campbell LM, Carreras C, et al. 2010. Global research priorities for sea turtles: informing management and conservation in the 21st century. *Endanger Species Res*. 11(3):245–269.
<https://doi.org/10.3354/esr00279>
- Hart CE, Ley-Quinonez C, Maldonado-Gasca A, Zavala-Norzagaray A, Abreu-Grobois FA. 2014. Nesting characteristics of olive ridley turtles (*Lepidochelys olivacea*) on El Naranjo Beach, Nayarit, Mexico. *Herpetol Conserv Biol*. 9(2):524–534.
- Hart CE, Zavala-Norzagaray AA, Benitez-Luna O, Plata-Rosas LJ, Abreu-Grobois FA, Ley-Quinonez CP. 2016. Effects of incubation technique on proxies for olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*) neonate fitness. *Amphibia-Reptilia*. 37(4):417–426.
<https://doi.org/10.1163/15685381-00003072>
- Ischer T, Ireland K, Booth DT. 2009. Locomotion performance of green turtle hatchlings from the Heron Island Rookery, Great Barrier Reef. *Mar Biol*. 156(7):1399–1409.
<https://doi.org/10.1007/s00227-009-1180-7>
- [IUCN] International Union for Conservation of Nature. 2020. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2020-3. UK: IUCN; [accessed 2021 March 4]. <https://www.iucnredlist.org>.
- Kaska Y, Downie R. 1999. Embryological development of sea turtles (*Chelonia mydas*, *Caretta caretta*) in the Mediterranean. *Zool Middle East*. 19(1):55–69.
<https://doi.org/10.1080/09397140.1999.10637796>
- Kaska Y, Furness RW. 2001. Heavy metals in marine turtle eggs and hatchlings in the Mediterranean. *Zool Middle East*. 24(1):127–132.
<https://doi.org/10.1080/09397140.2001.10637891>
- Koch V, Nichols WJ, Peckham H, de la Toba V. 2006. Estimates of sea turtle mortality from poaching and bycatch in Bahía Magdalena, Baja California Sur, Mexico. *Biol Conserv*. 128(3):327–334.
<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.09.038>
- Kutzari AC. 2006. *Manual de Técnicas de Protección de Tortugas Marinas*. Mexico: Kutzari, Asociación para el Estudio y Conservación de las Tortugas Marinas, AC. 16 p.
- Les HL, Paitz RT, Bowden RM. 2007. Experimental test of the effects of fluctuating incubation temperatures on hatchling phenotype. *J Exp Zool*. 307-A(5):274–280.
<https://doi.org/10.1002/jez.374>
- Lolavar A, Wyneken J. 2019. The impact of sand moisture on the temperature-sex ratio responses of developing loggerhead (*Caretta caretta*) sea turtles. *Zoology*. 138:125739.
<https://doi.org/10.1016/j.zool.2019.125739>
- Mancini A, Koch V. 2009. Sea turtle consumption and black market trade in Baja California Sur, Mexico. *Endanger Species Res*. 7(1):1–10.
<https://doi.org/10.3354/esr00165>
- Margolis L, Esch GW, Holmes JC, Kuris AM, Schad GA. 1982. The use of ecological terms in parasitology (report of an ad hoc committee of the American Society of Parasitologists). *J Parasitol*. 68(1):131–133.
<https://doi.org/10.2307/3281335>
- Márquez MR. 1990. *FAO species catalogue*. Vol. 11: Sea turtles of the world. An annotated and illustrated catalogue of sea turtle

- species known to date. FAO Fisheries Synopsis No. 125. Rome (Italy): FAO. 81 p.
- Maulany RI, Booth DT, Baxter GS. 2012. The effects of incubation temperature on hatchling quality in the olive ridley turtle, *Lepidochelys olivacea*, from Alas Purwo National Park, East Java, Indonesia: implications for hatchery management. *Mar Biol.* 159(12):2651–2661.
<https://doi.org/10.1007/s00227-012-2022-6>
- Mazaris AD, Matsinos G, Pantis JD. 2009. Evaluating the impacts of coastal squeeze on sea turtle nesting. *Ocean Coastal Manage.* 52(2):139–145.
<https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2008.10.005>
- Mazaris AD, Schofield G, Gkazinou C, Almpantidou V, Hays GC. 2017. Global sea turtle conservation successes. *Sci Adv.* 3(9):e1600730.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.1600730>
- Mickelson LE, Downie JR. 2010. Influence of incubation temperature on morphology and locomotion performance of Leatherback (*Dermochelys coriacea*) hatchlings. *Can J Zool.* 88(4):359–368.
<https://doi.org/10.1139/z10-007>
- Morreale SJ, Ruiz GJ, Spotila JR, Standora EA. 1982. Temperature-dependent sex determination: current practices threaten conservation of sea turtles. *Science.* 216(4551):1245–1247.
<https://doi.org/10.1126/science.7079758>
- Mortimer JA, Bresson R. 1999. Temporal distribution and periodicity in hawksbill turtles (*Eretmochelys imbricata*) nesting at Cousin Island, Republic of Seychelles, 1971–1997. *Chelonian Conserv Biol.* 3(2):318–325.
- Mrosovsky N. 1982. Sex ratio bias in hatchling sea turtles from artificially incubated eggs. *Biol Cons.* 23(4):309–314.
[https://doi.org/10.1016/0006-3207\(82\)90087-8](https://doi.org/10.1016/0006-3207(82)90087-8)
- Mrosovsky N. 2006. Distorting gene pools by conservation: assessing the case of doomed turtle eggs. *Environ Manage.* 38(4):523–531.
<https://doi.org/10.1007/s00267-006-8348-4>
- Mrosovsky N, Yntema CL. 1980. Temperature dependence of sexual differentiation in sea turtles: implications for conservation practices. *Biol Cons.* 18(4):271–280.
[https://doi.org/10.1016/0006-3207\(80\)90003-8](https://doi.org/10.1016/0006-3207(80)90003-8)
- Patino-Martinez J, Marco A, Quiñones L, Abella E, Muriel-Abad R, Diéguez-Uribeondo J. 2012. How do hatcheries influence embryonic development of sea turtle eggs? Experimental analysis and isolation of microorganisms in leatherback turtle eggs. *J Exp Zool Part A.* 317A(1):47–54.
<https://doi.org/10.1002/jez.719>
- Pike DA. 2014. Forecasting the viability of sea turtle eggs in a warming world. *Glob Change Biol.* 20(1):7–15.
<https://doi.org/10.1111/gcb.12397>
- Raustiala K. 1997. States, NGOs, and International Environment Institutions. *Int Stud Q.* 41(4):719–740.
<https://doi.org/10.1111/1468-2478.00064>
- Revueña O, León YM, Broderick AC, Feliz P, Godley BJ, Balbuena JA, Mason A, Poulton K, Savoré S, Raga JA, et al. 2014. Assessing the efficacy of direct conservation interventions: clutch protection of the leatherback marine turtle in the Dominican Republic. *Oryx.* 49(4):677–686.
<https://doi.org/10.1017/s0030605313001488>
- Rojas M, Walker L. 2012. Malformaciones congénitas: aspectos generales y genéticos. *Int J Morphol.* 30(4):1256–1265.
<https://doi.org/10.4067/s0717-95022012000400003>
- Rusli MU, Joseph J, Liew HC, Bachok Z. 2015. Effects of egg incubation methods on locomotor performances of green turtle (*Chelonia mydas*) hatchlings. *Sains Malays.* 44(1):49–55.
<https://doi.org/10.17576/jsm-2015-4401-07>
- Santos KC, Blattman K, Ramirez Guillen A, Hart CE. 2019. Comparison of *in situ*, beach hatchery and box nursery incubation methods at Boca de Tomates beach, Jalisco, Mexico. Oral presentation at the 39th International Sea Turtle Symposium, 2019 Feb 2–8; Charleston (SC).
- Valverde RA, Wingard S, Gómez F, Tordoir MT, Orrego CM. 2010. Field lethal incubation temperature of olive ridley sea turtle *Lepidochelys olivacea* at a mass nesting rookery. *Endanger Species Res.* 12(1):77–86.
<https://doi.org/10.3354/esr00296>
- Wood JR, Wood FE. 2009. Artificial incubation of Green sea turtle eggs (*Chelonia mydas*). *Proc World Maric Soc.* 10(1–4):215–221.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1979.tb00020.x>

Received 23 September 2020,
 accepted 23 March 2021.