



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**VARIABILIDAD DEL  $\delta^{13}\text{C}$  Y  $\delta^{15}\text{N}$  EN PIEL DE LAS BALLENAS  
JOROBADAS (*Megaptera novaeangliae*) QUE SE CONGREGAN EN BAJA  
CALIFORNIA SUR, MÉXICO**

**T E S I S**  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA  
(BIOLOGÍA MARINA)

PRESENTA:  
**MARIANA HIDALGO REZA**

TUTOR:  
**DR. JORGE URBÁN RAMÍREZ**  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA SUR

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
**DR. XAVIER CHIAPPA CARRARA**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM  
**DR. SERGIO AGUÍÑIGA GARCÍA**  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS Y COSTERAS  
**DR. MARTÍN F. SOTO JIMÉNEZ**  
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA  
**DR. FELIPE GALVÁN MAGAÑA**  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS Y COSTERAS

ASESORES EXTERNOS:  
**DR. FERNANDO R. ELORRIAGA VERPLANCKEN**  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS Y COSTERAS

CIUDAD DE MÉXICO, (JUNIO) 2017



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

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

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

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



## DEDICATORIA

A mis padres Micaela y José Luis.

A mi hermano Gean.

A mi abuelita Dolores.

No existen las palabras precisas que expresen mi amor hacia ustedes. El mar, la luna, el sol y el cielo, todo lo merecen por estar a mi lado, aún en la distancia, aún en la ausencia.

“Live as if you were to die tomorrow, learn as if you were to live for ever”

- Mahatma Gandhi

"Si tus sueños no te asustan, no son lo suficientemente grandes”



## AGRADECIMIENTOS

Gracias infinitas al Dr. Jorge Urbán por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación y de ser su ayudante académico, por compartir una de sus pasiones en la vida, por contagiarme el disfrute inmenso del trabajo en campo con ballenas, por su apoyo incondicional, por su confianza y por tantas enseñanzas, muchísimas gracias Jorge!!!

A mi comité revisor: Dr. Sergio Aguñiga y Dr. Felipe Galván, gracias por preguntar en cada oportunidad ¿Para cuándo? Por sus comentarios y enseñanzas que me ayudaron a aterrizar ideas... Dr. Martín Soto y Dr. Xavier Chiappa gracias por su pronta respuesta y sus observaciones a este trabajo.

En especial a mi asesor externo Dr. Fernando Elorriaga, muchas gracias por todo el tiempo dedicado, por las n revisiones y comentarios, por no quitar el dedo del renglón e impulsarme a aprender el mundo de los isótopos, por siempre hacer tiempo y resolver mis dudas.

Al personal del Laboratorio de Espectrometría de Masas de Relaciones Isotópicas del CICIMAR, por brindar sus instalaciones y equipo para el procesamiento de las muestras. En particular al técnico Ángel Ruvalcaba.

A la Dra. Aida Martínez por facilitarme el uso del equipo del Departamento de Plancton y Ecología Marina del CICIMAR, IPN.

A la Dra. Maurilia Rojas de la UABCS por brindarme su apoyo y equipo para el secado de las muestras.

Al proyecto WWF-TELCEL, a Ecology Project International y a CONACyT por los recursos otorgados para llevar a cabo este trabajo.

Gracias a mis padres por siempre impulsarme a cumplir mis sueños. Son todo en mi vida, los amo.

Gracia a mi hermano Gean, gracias por existir, por estar, por ser.

Gracias a los Hidalgo. Irma, Rosi, Male, Martín, Chucho, Gaby, Pam, Raúl porque sé que en cualquier momento cuento con ustedes incondicionalmente, por apoyarme en el desarrollo de este trabajo y siempre brindarme amor al estilo Hidalgo.

Gracias a los Reza. Alba, Hugo, Rebe (ya sé que no eres Reza, pero estás en esta lista), Aby, tías y tíos, primos y primas (somos muchos).



A mi aquelarre paceño, Marcela Vélez y Aurora Paniagua, gracias amigas por esas noches de chicas, por su compañía y su cariño.

A mis brujitas Elizabeth Montes de Oca, Raquel Arroyo, Elisa Vega y Rebecca Winchester, gracias por estar a mi lado.

Con bombos y platillos, gracias a David Santisbon. Te quiero!

Al equipo PRIMMA con quienes compartí seis años de trabajo. Carlos gracias por tu amistad, por tus consejos en campo y orientación en el procesamiento de muestras para isótopos. Sergio gracias por compartir tus conocimientos sin límites, por siempre estar dispuesto a todo, por las enseñanzas en San Nacho, por tu orden y compromiso en todo lo que haces, por los varamientos y gran etcétera. Lorena, gracias por todos los EPI's, por guiarme en campo. Hiram, Pamela, Esther, Tabata gracias por las pláticas y trabajo compartido.

A todas las personas que en algún momento me ayudaron y orientaron para lograr culminar este trabajo, gracias, Pablo Hernández, Anidia Blanco, David Vega, Eduardo Méndez.



## CONTENIDO

DEDICATORIA .....	2
AGRADECIMIENTOS .....	3
ÍNDICE DE FIGURAS .....	6
ÍNDICE DE ECUACIONES .....	7
ÍNDICE DE TABLAS .....	7
RESUMEN .....	9
ABSTRACT .....	10
1. Introducción .....	11
2. Antecedentes .....	13
2.1 Distribución y migración de la ballena jorobada, <i>Megaptera novaeangliae</i> .....	13
2.2 Alimentación de la ballena jorobada.....	17
2.3 Isótopos estables en el Pacífico Norte de la ballena jorobada .....	19
2.4 Isótopos estables en el Pacífico Mexicano .....	20
3. Planteamiento de la investigación .....	22
4. Hipótesis.....	24
5. Objetivos .....	25
5.1 General.....	25
5.2 Específicos .....	25
6. Área de estudio.....	26
7. Material y Métodos .....	28
7.1 Trabajo de campo.....	28
7.1.1 Recolección de muestras .....	28
7.2 Trabajo de laboratorio. Preparación de muestras y análisis de isótopos estables ( $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ ).....	34
7.2.1 Liofilización.....	34
7.2.2 Extracción de lípidos .....	35
7.2.3 Homogeneización y encapsulado de las muestras .....	35
7.2.4 Lectura de isótopos estables ( $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ ).....	36



7.2.5	Análisis molecular (sexo).....	37
7.2.6	Foto-identificación .....	38
7.3	Trabajo de gabinete.....	38
7.3.1	Análisis estadístico .....	38
8.	Resultados .....	40
8.1	Efecto del método de preservación en los valores isotópicos en la piel de ballena jorobada .....	40
8.2	Valores promedio y variación inter-anual de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ en piel de la ballena jorobada .....	43
8.3	Valores promedio y variación intra-anual de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ en piel de la ballena jorobada .....	48
8.4	Variabilidad en el $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ en piel de la ballena jorobada dependiendo el sexo 49	
8.5	Variabilidad en el $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ en piel de ballena jorobada en la región de B.C.S. y relación con sus orígenes migratorios.....	51
9.	Discusión.....	53
9.1	Efecto del método de preservación en la piel de la ballena jorobada .....	53
9.2	Variabilidad del $\delta^{13}\text{C}$ en piel de la ballena jorobada en la región de reproducción de B.C.S., México.....	56
9.3	Variabilidad del $\delta^{15}\text{N}$ en piel de la ballena jorobada en la región de reproducción de B.C.S. México .....	59
9.4	Variabilidad en el $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ en piel de ballena jorobada dependiendo el sexo .	61
9.5	Variabilidad en el $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ en piel de ballena jorobada en la región de B.C.S. y relación con sus orígenes migratorios.....	62
10.	Conclusiones.....	67
11.	Referencias bibliográficas .....	68



## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. INTERVALO DE DISTRIBUCIÓN DE LA BALLENA JOROBADA EN EL MUNDO..	14
FIGURA 2. ÁREAS DE REPRODUCCIÓN DE LA BALLENA JOROBADA EN EL PACÍFICO NORTE..	14
FIGURA 3. ÁREAS DE ALIMENTACIÓN DE BALLENA JOROBADA EN EL PACÍFICO NORTE.....	15
FIGURA 4. DESTINOS MIGRATORIOS DE LA BALLENA JOROBADA EN EL PACÍFICO NORTE..	16
FIGURA 5. DESTINOS MIGRATORIOS DE LAS BALLENAS JOROBADAS DEL PACÍFICO MEXICANO..	17
FIGURA 6. ÁREA DE ESTUDIO.....	27
FIGURA 7. EMBARCACIONES PARA COLECTA DE MUESTRAS..	30
FIGURA 8. TOMA DE MUESTRA DE PIEL DE BALLENA JOROBADA.....	31
FIGURA 9. MANIPULACIÓN DE MUESTRA DE PIEL Y GRASA DE BALLENA JOROBADA.....	31
FIGURA 10. HOMOGENEIZADO Y ENCAPSULADO DE MUESTRAS.....	37
FIGURA 11. RELACIÓN DEL $\Delta^{13}\text{C}$ (‰) Y $\Delta^{15}\text{N}$ (‰) DE DOS MEDIOS DE PRESERVACIÓN .....	40
FIGURA 12. VALORES PROMEDIO ( $\pm\text{SE}$ ) DE $\Delta^{13}\text{C}$ (‰) Y $\Delta^{15}\text{N}$ (‰) POR TEMPORADA (2004-2011).....	44
FIGURA 13. DISTRIBUCIÓN NORMAL DE LOS DATOS.....	45
FIGURA 14. TRASLAPO DEL NICHOS TRÓFICO DE LA BALLENA JOROBADA..	47
FIGURA 15. VALORES PROMEDIO ( $\pm\text{SE}$ ) DE $\Delta^{13}\text{C}$ (‰) Y $\Delta^{15}\text{N}$ (‰) EN HEMBRAS Y MACHOS..	49
FIGURA 16. ANÁLISIS DE REGRESIÓN.....	52



## ÍNDICE DE ECUACIONES

(1) CONTENIDO DE LÍPIDOS.....	33
(2) $\Delta^{13}\text{C}$ NORMALIZADA $\Delta^{13}\text{C}'$ . .....	33
(3) MODELO PROPUESTO POR POST ET AL. (2007). .....	34
(4) $\Delta$ (DELTA) $^{13}\text{C}$ Y $^{15}\text{N}$ DIFERENCIAS RELATIVAS DE LAS RAZONES ISOTÓPICAS. ....	36

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. TAMAÑO DE MUESTRA POR MES Y TOTAL PARA CADA TEMPORADA. ....	28
TABLA 2. NÚMERO DE MUESTRAS POR MEDIO DE PRESERVACIÓN.....	32
TABLA 3. MUESTRAS PAREADAS PRESERVADAS EN CONGELACIÓN Y EN ETANOL AL 90%.....	32
TABLA 4. VALORES PROMEDIO ( $\pm\text{DE}$ ) DE $\Delta^{13}\text{C}$ (‰) DE MUESTRAS PRESERVADAS EN ETANOL 90% Y CONGELADAS.. .....	42
TABLA 5. VALORES PROMEDIO ( $\pm\text{SE}$ ) Y DE DEL $\Delta^{13}\text{C}$ Y $\Delta^{15}\text{N}$ POR TEMPORADA. ....	44
TABLA 6. VALORES PROMEDIO ( $\pm\text{SE}$ ) DEL $^{13}\text{C}$ (‰) Y $^{15}\text{N}$ (‰) EN HEMBRAS Y MACHOS.....	50



## RESUMEN

La ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*) realiza extensas migraciones estacionales. En Baja California Sur se encuentra durante el invierno. El presente estudio tiene como objetivo principal aportar conocimiento acerca del grupo de crianza de Baja California Sur utilizando el análisis de las relaciones isotópicas estables de carbono y nitrógeno. Se analizaron 554 muestras de piel de ballenas jorobadas obtenidas en las temporadas invernales de 2004 a 2011. Los valores isotópicos promedio obtenidos fueron  $\delta^{13}\text{C}$   $-18.42 \pm 0.05\text{‰}$  y  $\delta^{15}\text{N}$   $13.85 \pm 0.07\text{‰}$ . Se encontraron diferencias significativas entre hembras y machos para ambos isótopos ( $\delta^{13}\text{C}$   $0.3\text{‰}$  y  $\delta^{15}\text{N}$   $0.39\text{‰}$ ) las cuales se atribuyen a diferencias a nivel metabólico entre sexos. Se obtuvo un amplio panorama de los hábitos alimentarios de la ballena jorobada. Para el  $\delta^{13}\text{C}$  durante 2004, 2010 y 2011 se obtuvieron valores más enriquecidos y fueron diferentes significativamente al resto de las temporadas, y para el  $\delta^{15}\text{N}$  durante 2011 se obtuvo el valor promedio más alto de todas las temporadas invernales. Dichas diferencias en los valores isotópicos tuvieron una relación con eventos oceanográficos ocurridos en los mismos años en el Pacífico Norte. Con ayuda de la foto-recaptura de 17 ballenas, se pudo analizar la relación entre los valores isotópicos de dichos individuos y los valores promedios reportados para las regiones de alimentación. Con base en estos resultados y debido a que no se obtuvieron diferencias significativas entre los meses que componen la temporada invernal se puede concluir que la señal isotópica que se registra en el área de Baja California Sur es debida al nicho trófico que ocupan en sus áreas de alimentación.

**Palabras clave:** Ballena jorobada, isótopos estables, carbono y nitrógeno, Baja California Sur, México.



## ABSTRACT

Humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) carries out extensive seasonal migrations. During winter it locates in Baja California Sur. The main objective of the present study is to contribute to the knowledge of the breeding group of Baja California Sur using stable isotopic ratios of carbon and nitrogen. During winter seasons 2004-2011, 554 skin biopsies were taken from humpback whales. Mean isotopic values were  $\delta^{13}\text{C}$   $-18.42 \pm 0.05\text{‰}$  and  $\delta^{15}\text{N}$   $13.85 \pm 0.07\text{‰}$ . There was statistical significance between females and males for both isotopes, maybe due to metabolism differences among genders. A broad panorama of the dietary habits of humpback whale was obtained. The  $\delta^{13}\text{C}$  values for 2004, 2010 and 2011 were more enriched and significantly different than the other seasons; for  $\delta^{15}\text{N}$ , 2011 was the highest mean value for all winter seasons. The differences in the isotopic values were related to oceanographic events occurring in the same years in the North Pacific. The relationship between isotopic values of 17 whales and reported mean values for feeding grounds was analyzed with the help of resightings of these individuals. Base on these results and due to the fact that no significant differences were obtained between the months of the winter season it can be concluded that the recorded isotopic signal in the Baja California Sur area is due to the trophic niche that they occupy in its feeding grounds.

**Key words:** Humpback whale, stable isotopes, carbon and nitrogen, Baja California Sur, Mexico.



## Introducción

Un factor clave en la determinación de la supervivencia de los individuos es el hábitat que ocupan (Gunnarsson *et al.* 2005). La selección del hábitat influye en la cantidad y calidad de los recursos disponibles para los individuos, incluidas las oportunidades de apareamiento y el acceso al alimento. Es raro que un solo hábitat ofrezca la máxima disponibilidad de recursos necesarios, dando como resultado evolutivo una serie de comportamientos, entre ellos la migración estacional (Witteveen 2008).

La migración se describe como el movimiento estacional de los individuos de un lugar a otro, ocurriendo con mayor frecuencia entre los lugares de reproducción y crianza y los no reproductivos; este fenómeno incluye numerosas presiones ecológicas y tiene consecuencias sobre los individuos y las poblaciones (Studds y Marra 2005). Se presentan patrones complejos del uso del hábitat migratorio, lo cual resulta en el traslado de efectos, de tal manera que las consecuencias de la ocupación de un hábitat afectan el éxito individual en el otro hábitat (Marra *et al.* 1998). Por lo tanto explorar las conexiones migratorias es esencial para entender la ecología completa de un animal (Webster *et al.* 2002).

La ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*) representa una de las especies migratorias de ballenas barbadas. Esta especie realiza extensas migraciones estacionales y se somete a periodos largos de ayuno, pasa los meses de verano alimentándose en aguas productivas de altas latitudes y migra a latitudes más bajas para reproducirse y dar a luz, donde pueden perder de un tercio a la mitad de su masa corporal. Durante el periodo de ayuno, las ballenas jorobadas dependen de sus reservas de grasa que han acumulado mientras se alimentan en las zonas de alimentación (Baraff *et al.* 1991, Laerm *et al.* 1997).

Como resultado de su sobre-explotación comercial y a pesar de estar protegidas de la caza comercial por la Comisión Ballenera Internacional (CBI) desde 1966, las ballenas jorobadas fueron catalogadas como una especie en peligro de extinción en 1973 bajo la Ley de Especies en Peligro de Estados Unidos y como una especie amenazada en la Lista Roja de la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza). Aunque las



ballenas jorobadas están experimentando un crecimiento de la población en el Pacífico Norte y su estatus se ha modificado a “preocupación mínima” (UICN 2008), sus hábitos costeros la han hecho una de las especies más vulnerables, ya que están expuestas a amenazas antropogénicas, como colisiones con embarcaciones, exposición a contaminantes y enredos con artes de pesca (Angliss y Outlaw 2008).

La ballena jorobada tiene una historia de vida compleja lo cual la hace un sujeto idóneo para la investigación en varios aspectos de su ecología. Por ser una especie migratoria, es fundamental comprender los vínculos entre las diferentes áreas geográficas utilizadas por ellas, para que de ésta manera los esfuerzos de recuperación y conservación sean efectivos (Witteveen 2008).

Existen aún preguntas sin respuesta sobre destinos migratorios y el uso del hábitat de la ballena jorobada, lo cual implica los esfuerzos de manejo y conservación. Se requiere de investigación centrada en la vinculación entre hábitats estacionales con el fin de abordar adecuadamente su conservación (Urbán *et al.* 2000, Calambokidis *et al.* 2001).

El análisis de isótopos estables de carbono y nitrógeno, se han convertido en una herramienta útil para conocer la conectividad de hábitat de especies migratorias, incluyendo aves marinas, aves costeras, pinnípedos y cetáceos (Best y Schell 1996, Aurioles *et al.* 2006, Cerling *et al.* 2006, Furness *et al.* 2006). Este análisis permite el muestreo de animales en libertad, y se requiere de poco tejido, constituyendo una técnica de muestreo poco invasiva.

A partir del análisis isotópico se pueden realizar estudios migratorios debido a que las proporciones de isótopos estables de los tejidos de un animal reflejan la señal isotópica de su red alimentaria regional (Peterson y Fry 1987, Schell *et al.* 1989a b). Animales que se mueven en redes isotópicamente distintas deben conservar la información de su último lugar de alimentación (Hobson 1999). Por ejemplo las ballenas jorobadas que no se alimentan en sus lugares de reproducción y crianza, adquieren sus firmas isotópicas en las zonas de alimentación (Witteveen *et al.* 2009b).



## Antecedentes

### 1.1 Distribución y migración de la ballena jorobada, *Megaptera novaeangliae*

La migración estacional, es resultado de la evolución de una serie de conductas para mantener un equilibrio entre los recursos que necesitan los individuos para mantener la supervivencia global y las oportunidades de reproducción. La migración ha permitido a muchos grupos, como por ejemplo a mamíferos, explotar recursos en un lapso de tiempo (Webster *et al.* 2002).

Las ballenas jorobadas viven en todas las cuencas oceánicas importantes desde el ecuador hasta latitudes subpolares. La especie se divide en tres poblaciones geográficamente aisladas, Pacífico Norte, Atlántico y Océano Austral. Durante el invierno este cetáceo se limita principalmente a aguas poco profundas a lo largo de las costas y alrededor de islas oceánicas. Esta restricción divide a cada una de las tres poblaciones principales en varios grupos de crianza (Figura 1, <http://www.nmfs.noaa.gov>).

Durante los meses de verano se localizan en latitudes altas, en zonas frías de alta productividad donde se alimentan (entre los 60° y 70° de latitud); después en invierno migran a latitudes más bajas (entre los 10° y 23° de latitud) donde se reproducen, tiene lugar el parto y crían al ballenato. En estos meses se alimentan poco o no lo hacen (Baraff *et al.* 1991, Laerm *et al.* 1997, Angliss y Lodge 2003).

En el Pacífico Norte, las ballenas jorobadas se reproducen en tres zonas: (1) Asiática: Islas Ryukyu, Taiwan, Islas Marianas, Corea del Sur e Islas Bonin; (2) Pacífico Central: Archipiélago de Hawaii, incluyendo las islas de Kahuai, Oahu, Maui y Hawaii; (3) Americana: del Pacífico Mexicano hasta Centro América (Fig. 2) (Urbán *et al.* 2000, Calambokidis *et al.* 2001).

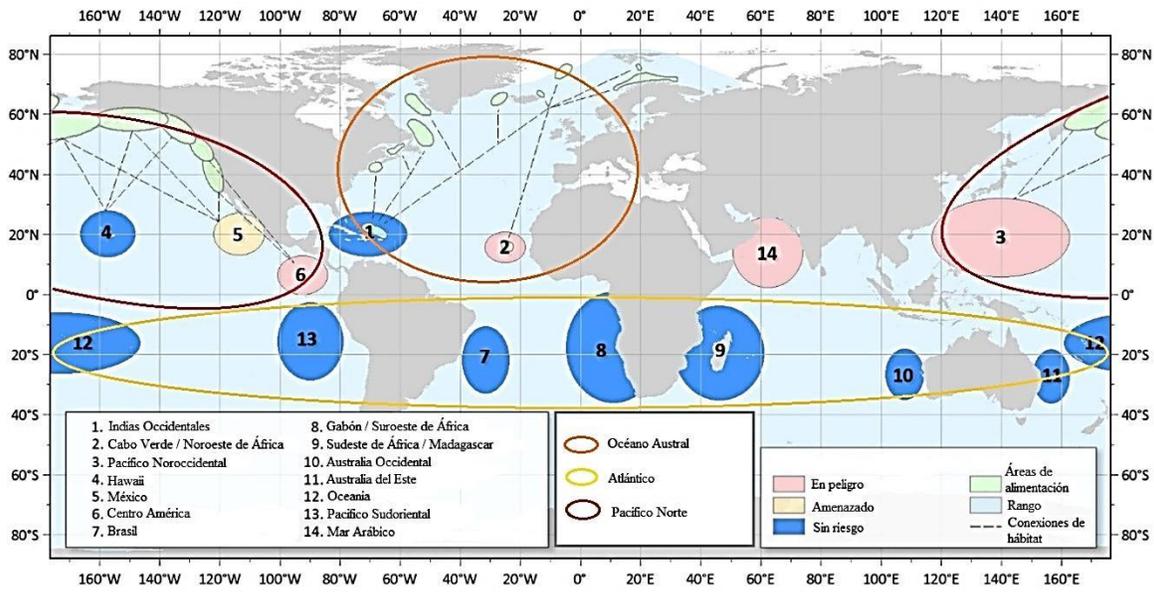


Figura 1. Intervalo de distribución de la ballena jorobada. Poblaciones (óvalos grandes), grupos de crianza (números del 1 al 14), áreas de alimentación (óvalos pequeños) y rutas migratorias (---). (Imagen modificada de <http://www.mnfs.noaa.gov>).

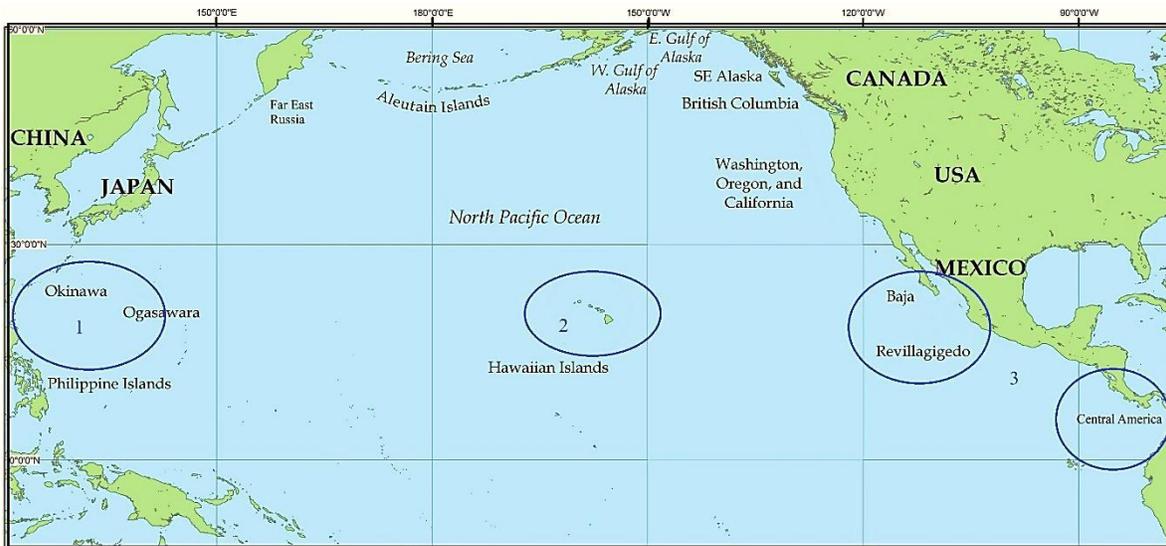
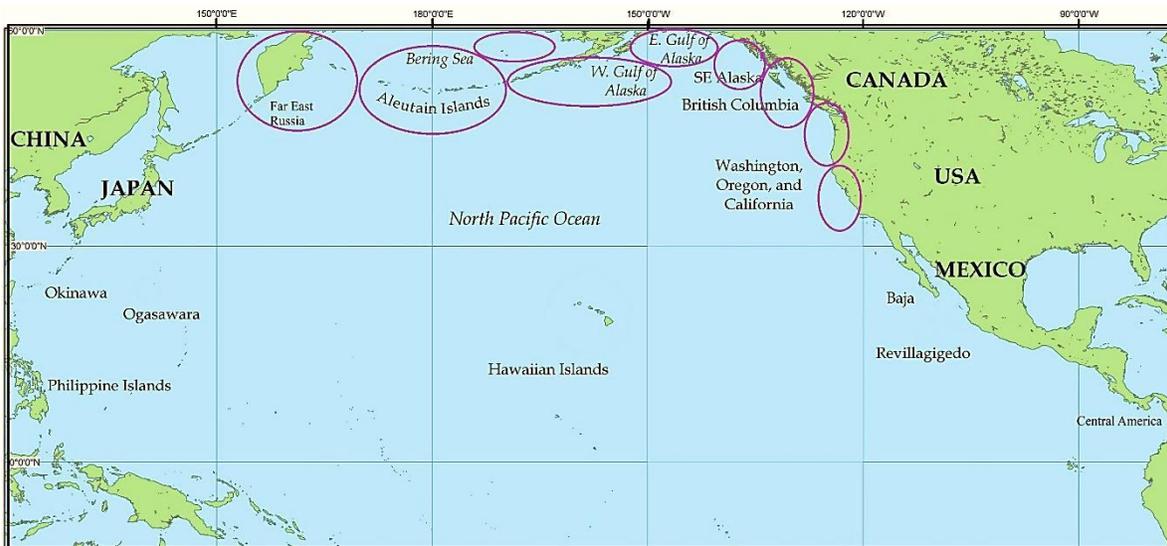


Figura 2. Áreas de reproducción de la ballena jorobada en el Pacífico Norte. 1. Asiática, 2. Pacífico Central, 3. Americana. (Imagen modificada de <http://www.noanews.noss.gov>).



Después de migrar de sus lugares de crianza, las ballenas jorobadas se separan geográficamente en varias agrupaciones de alimentación. Este patrón de movimiento crea una estructura poblacional compleja. En el Pacífico Norte las áreas de alimentación conocidas comprenden: Rusia, Islas Aleutianas, Mar de Bering, Islas Kodiak, Islas Shumagin, Golfo de Alaska, Sureste de Alaska, Columbia Británica y costas de Washington, Oregón y California (Fig. 3) (Calambokidis *et al.* 1996, Calambokidis *et al.* 2001, Calambokidis *et al.* 2008, Witteveen *et al.* 2009b).



**Figura 3.** Áreas de alimentación de ballena jorobada en el Pacífico Norte. (Imagen modificada de <http://www.noaanews.noaa.gov>).

Los esfuerzos para detallar la relación entre las zonas de alimentación y reproducción en las rutas migratorias de la ballena jorobada, se han basado en técnicas de marcado y recaptura, utilizando ya sea la foto-identificación o análisis genéticos para comparar los haplotipos obtenidos del ADN mitocondrial (Baker *et al.* 1986, Baker *et al.* 1994, Calambokidis *et al.* 2008, González-Peral 2011, Barlow *et al.* 2011). Ambas técnicas están limitadas por la exigencia de que se deben muestrear ambas áreas, tanto la de reproducción como la de alimentación.



Algunos patrones en la migración de la ballena jorobada han sido descritos, aunque no son exactos. Se ha podido diferenciar una estructura general donde se muestra que las regiones costeras invernales occidentales (Asia) y orientales (costa occidental de México y Centroamérica) son los destinos invernales principales para las ballenas que pasan el verano en regiones de alimentación costeras y de latitudes bajas, y las áreas invernales de las Islas de Hawaii y del Archipiélago de Revillagigedo son los destinos migratorios principales de ballenas jorobadas procedentes de áreas de alimentación de latitudes altas (Perry *et al.* 1999; Calambokidis *et al.* 2008).

Las recapturas encontradas por medio de la técnica de foto-identificación en el Pacífico Norte, sugieren que existen fuertes y débiles conexiones entre las zonas de reproducción y más de un área de alimentación, e incluso conexiones entre las zonas de reproducción a lo largo del Pacífico Norte (Calambokidis *et al.* 2001, Urbán *et al.* 2000, González-Peral 2011, Barlow *et al.* 2011) (Fig. 4).

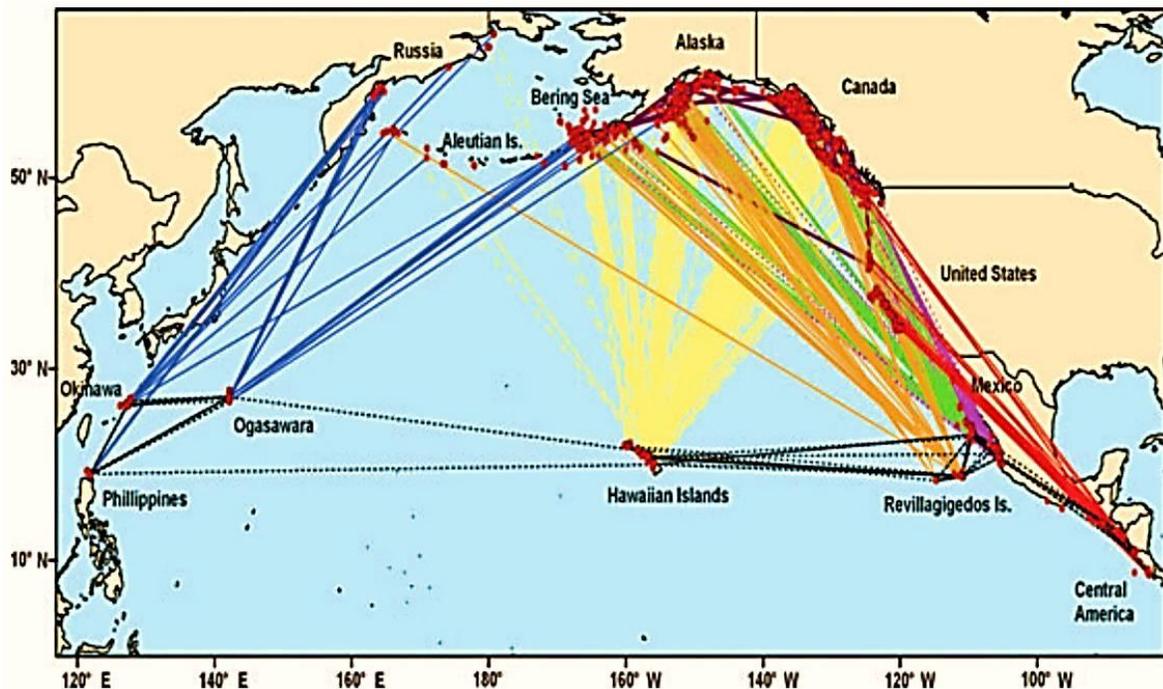


Figura 4. Destinos migratorios de la ballena jorobada en el Pacífico Norte. Conexiones encontradas por medio de foto identificación. Los colores corresponden a agrupaciones invernales diferentes, para México: Revillagigedo color naranja, Continente color morado y Baja California color verde. (Imagen tomada de Barlow *et al.* 2011).



En la congregación de ballenas jorobadas del Pacífico Mexicano, las recapturas por medio de foto identificación que los individuos del Archipiélago de Revillagigedo tienen como destino migratorio el Norte del Golfo de Alaska o el occidente del Golfo de Alaska incluida la Isla Kodiak y el Mar de Bering (Fig. 5a); los de la costa continental migran a las costas de California y Oregón, seguidas por las costas de Washington y British Columbia (Fig. 5b); y las ballenas de la Península de Baja California conformadas por una combinación de las dos congregaciones anteriores, tienen como principal destino migratorio las costas de California, Oregón, Washington, Oeste del Golfo de Alaska y Sur de Columbia Británica (Fig. 5c) (Urbán *et al.* 2000, Calambokidis *et al.* 2001, Calambokidis *et al.* 2008, González-Peral 2011).



**Figura 5. Destinos migratorios de las ballenas jorobadas del Pacífico Mexicano. (a) Archipiélago de Revillagigedo. (b) Costa Continental. (c) Baja California. (Imagen tomada de SPLASH 2004-2006).**

## 1.2 Alimentación de la ballena jorobada

La dieta de las ballenas jorobadas, es considerada generalista por la variedad en su alimentación, la cual consiste en peces pequeños que forman cardúmenes y de crustáceos pequeños conocidos como eufáusidos. En el Hemisferio Norte consume organismos bentónicos y pelágicos costeros (Perry *et al.* 1999, Witteveen 2011a).

Frente a las costas de Alaska, las jorobadas se alimentan de arenques (*Clupea harengus* y *C. pallasii*), capelanes (*Mallotus villosus*), así como las especies de eufáusido *Euphausia*



*pacifica*, *Thysanoessa spinifera*, *T. raschii* y tal vez *T. longipes*. y *T. inermis* (Witteveen 2011a, Filatova *et al.* 2013)

Otras presas en el Pacífico Norte son la macarela (*Pleurogrammus monopterygius*), las anguilillas de arena (*Ammodytes hexapterus*, *A. lanceolatus*, *A. americanus* y *A. dubis*), los bacalaos (*Gadus macrocephalus*, *Eleginus gracilis*, *Boreogadus saida*), los salmones (*Oncorhynchus spp.*), los peces piedra (*Sebastes spp.*); así como los peces *Theragra chalcogramma*, *Thaleichthys pacificus* y *Pollachius virens*. (Perry *et al.* 1999, Filatova *et al.* 2013).

También incluyen en la dieta, para la misma área, invertebrados como el eufáusido *Mysis oculata*, el anfípodo pelágico *Parathemisto libellula*, los camarones *Eualus gaimardii* y *Pandialus goniurus*, copépodos *Calanus spp.* e incluso algunos cefalópodos (Witteveen 2011a).

Aun cuando la ballena jorobada se considera una especie que no se alimenta mientras se encuentra en sus lugares de crianza y reproducción, en México, su alimentación invernal es ocasional y en pocas ocasiones se les ha visto comer lo que aparentemente son sardinas (*Sardinops spp*) en la Bahía de Banderas y el Golfo de California; así como el eufáusido *Nictiphanes simplex* al sur del Golfo de California (Gendron y Urbán 1993, Perry *et al.* 1999).

También es probable que ajusten su dieta dependiendo de la disponibilidad de sus presas. Un análisis de la dermis superficial en las ballenas jorobadas de Revillagigedo reveló que, posterior a un verano de El Niño, las ballenas cambiaron su composición de ácidos grasos, lo cual se interpretó como un cambio de presas con respecto a las usuales y/o que las presas cambiaron su dieta, modificando su composición de ácidos grasos (Nolasco-Soto 2003).

Los estudios dirigidos a determinar la ubicación de las zonas de alimentación pueden ser importantes en la determinación de la supervivencia y el éxito reproductivo de una especie migratoria, donde el ayuno es un factor importante en su historia de vida, debido a que son propensos a sufrir periodos de estrés nutricional y por ende posibles efectos en su condición corporal; por lo que la calidad del alimento y su ingesta deben ser optimizados a fin de



soportar la migración, la reproducción, y en el caso de hembras la lactancia y la preñez (Witteveen 2008).

### 1.3 Isótopos estables en el Pacífico Norte de la ballena jorobada

La técnica de isótopos estables ha sido utilizada para explorar la estructura de la población de las ballenas jorobadas en el Pacífico Norte, determinando diferencias geográficas a partir de las proporciones de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ , las cuales varían significativamente en función de la localidad donde fue tomada la muestra. Con base en este análisis se dividen en seis grupos de alimentación, los cuales se enlistan posteriormente. La similitud en las proporciones isotópicas mostraron fuertes vínculos migratorios entre las áreas de alimentación orientales y las áreas más occidentales de reproducción de ballena jorobada (Witteveen 2008).

A continuación se enlistan los grupos de alimentación de las ballenas jorobadas en el Pacífico Norte y sus valores isotópicos promedio ( $\pm$  error estándar) de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  correspondientes, iniciando con el grupo más norteño y finalizando con el grupo más sureño. Russia, Oeste de las Isla Aleutianas (WEST)  $-17.8 \pm 0.10\text{‰}$   $\delta^{13}\text{C}$ ,  $12.2 \pm 0.19\text{‰}$   $\delta^{15}\text{N}$ ; Este de las Islas Aleutianas, Mar de Bering y Oeste del Golfo de Alaska (CENT)  $-18.4 \pm 0.04\text{‰}$   $\delta^{13}\text{C}$ ,  $12.5 \pm 0.07\text{‰}$   $\delta^{15}\text{N}$ ; Norte del Golfo de Alaska (NGOA)  $-17.6 \pm 0.05\text{‰}$   $\delta^{13}\text{C}$ ,  $13.5 \pm 0.07\text{‰}$   $\delta^{15}\text{N}$ ; Sureste de Alaska (SEAK)  $-17.1 \pm 0.05\text{‰}$   $\delta^{13}\text{C}$ ,  $12.7 \pm 0.06\text{‰}$   $\delta^{15}\text{N}$ ; Norte de Columbia Británica (NBC)  $-17.6 \pm 0.06\text{‰}$   $\delta^{13}\text{C}$ ,  $12.9 \pm 0.08\text{‰}$   $\delta^{15}\text{N}$ ; y California, Oregón y Washington (COW)  $-16.4 \pm 0.04\text{‰}$   $\delta^{13}\text{C}$ ,  $14.6 \pm 0.07\text{‰}$   $\delta^{15}\text{N}$  (Witteveen *et al.* 2009a).

Al mismo tiempo y como complemento en el esfuerzo por conocer los movimientos migratorios de la ballena jorobada en el Pacífico Norte, Witteveen *et al.* (2009b) analizaron valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  de las regiones de reproducción, obteniendo los siguientes promedios isotópicos: Asia  $-18.3 \pm 0.06\text{‰}$   $\delta^{13}\text{C}$ ,  $12.1 \pm 0.13\text{‰}$   $\delta^{15}\text{N}$ ; Hawaii  $-18.0 \pm 0.05\text{‰}$   $\delta^{13}\text{C}$ ,  $13.0 \pm 0.08\text{‰}$   $\delta^{15}\text{N}$ ; Centro América  $-16.3 \pm 0.09\text{‰}$   $\delta^{13}\text{C}$ ,  $14.9 \pm 0.13\text{‰}$   $\delta^{15}\text{N}$ :



y México  $-17.2 \pm 0.09\text{‰}$   $\delta^{13}\text{C}$ ,  $13.3 \pm 0.13\text{‰}$   $\delta^{15}\text{N}$ . Estos promedios los obtuvieron analizando muestras de un periodo de tiempo de tres años (2004, 2005 y 2006).

Witteveen *et al.* (2009b), asignaron individuos de regiones de reproducción a alguna de las regiones de alimentación (las cuales se mencionan en párrafos anteriores), basándose en árboles de clasificación como herramienta para identificar los vínculos entre áreas, por medio de los isótopos estables de carbono y nitrógeno. En su investigación observan que las ballenas jorobadas del Pacífico Norte presentan cambios pequeños en los valores de isótopos estables entre hábitats.

La zona de reproducción de México tuvo la mayor asignación de individuos con California, Oregón y Washington (COW); en dicha zona se observaron conexiones significativas entre Baja California y COW (Witteveen *et al.*, 2009b). Las asignaciones de los individuos por medio de dicha técnica entre zonas de reproducción y de alimentación difieren 12% en promedio con respecto a las recapturas por foto-identificación (Calambokidis *et al.* 2008, Witteveen *et al.* 2009b).

#### 1.4 Isótopos estables en el Pacífico Mexicano

En el Golfo de California se han realizado diferentes estudios utilizando como principal herramienta el análisis de valores isotópicos de carbono y nitrógeno en cetáceos (Díaz-Gamboa 2004, Jaume-Schinkel 2004, Busquets 2008).

Se han diferenciado dos formas de tursión *Tursiops truncatus*, basados en la variación de los valores de  $\delta^{13}\text{C}$ , lo cual permitió identificar dos ecotipos, uno costero y otro oceánico (Díaz-Gamboa 2004).

Guerrero (2008), estudió el cachalote, *Physeter macrocephalus*, concluyendo que existe una diferenciación isotópica entre grupos sociales, lo cual sugiere que la estructura social puede influir en los hábitos alimentarios y a su vez regular la distribución de los cachalotes en el Golfo de California.



Jaume-Schinkel (2004), analizó los hábitos alimentarios del rorcual común *Balaenoptera physalus* y encontró un posible cambio de dieta entre temporadas, ya que durante la temporada fría se alimenta del eufáusido *Nectiphanes simplex* en zonas más costeras, y en temporada cálida presenta un mayor consumo de presas de nivel trófico mayor (por ejemplo sardinas) y en una zona alejada de la costa.

Otro estudio aplicado a ballena azul (*Balaenoptera musculus*) muestra que la principal fuente de variabilidad en el  $\delta^{13}\text{C}$  (-18.5‰ a -15‰), aparentemente está asociada con las diferencias metabólicas entre machos y hembras, o con el desplazamiento constante de las ballenas entre las zonas costera y oceánica; mientras que la variabilidad en el  $\delta^{15}\text{N}$  (11.05‰ a 16.9‰) entre la piel de diferentes individuos estuvo influida principalmente por los cambios temporales (entre los meses de muestreo) asociados a la migración. Lo anterior fue asociado con el registro de señales isotópicas distintas que provienen de dos ecosistemas con diferencias biogeoquímicas regionales (diferentes zonas del Océano Pacífico y el Golfo de California) (Busquets 2008).

Witteveen *et al.* (2009) calcularon los valores promedio ( $\pm$ SE) de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  en piel de ballena jorobada, en los años 2004, 2005 y 2006 para el Pacífico mexicano; obteniendo para 2004  $-16.8 \pm 0.14\text{‰}$   $\delta^{13}\text{C}$ ,  $13.2 \pm 0.18\text{‰}$   $\delta^{15}\text{N}$ ; 2005  $-17.5 \pm 0.12\text{‰}$   $\delta^{13}\text{C}$ ,  $13.0 \pm 0.27\text{‰}$   $\delta^{15}\text{N}$ ; y 2006  $-17.5 \pm 0.16\text{‰}$   $\delta^{13}\text{C}$ ,  $13.7 \pm 0.24\text{‰}$   $\delta^{15}\text{N}$ . Cabe mencionar que en el caso del Pacífico mexicano el número de muestras con el que trabajaron por región fue pequeño o inexistente, tal fue el caso del año 2005 para las agrupaciones de Baja California y Continente. También asignan individuos de las áreas de crianza y reproducción a las regiones de alimentación, por medio de árboles de clasificación, en los cuales se observaron conexiones fuertes entre Baja California y COW con un 34% de individuos asignados con éxito.



## Planteamiento de la investigación

La región de Baja California Sur es una de las tres regiones del Pacífico mexicano donde se congregan las ballenas jorobadas en temporada invernal. Esta representa un área importante porque expone características únicas a diferencia del Archipiélago de Revillagigedo y la costa continental de México. El tiempo de residencia es el más corto en comparación a las otras dos regiones de reproducción, con un promedio de 8 días; los machos permanecen en la zona 6 días, mientras que las hembras un promedio de 10 días.

Aun cuando la región es utilizada para la reproducción también es considerada una zona de tránsito en la ruta migratoria de las ballenas jorobadas, sobre todo cuando van de regreso a sus zonas de alimentación. Individuos que migran de Revillagigedo y de continente pasan por esta región. Baja California Sur registra el menor porcentaje de fidelidad en el Pacífico mexicano, ya que entre el 48 y 55% de ballenas foto-identificadas regresa a la región en un periodo de tiempo de tres años (Urbán 2000, Calambokidis *et al.* 2001, Calambokidis *et al.* 2008, González-Peral 2011). Estos aspectos hacen de la región de Baja California Sur un lugar clave, ya que proporciona un banco de información único en el Pacífico mexicano, para el conocimiento de la historia de vida de la ballena jorobada.

El presente estudio tiene como objetivo principal aportar conocimiento acerca del grupo de crianza de Baja California Sur utilizando la técnica de isótopos estables de carbono y nitrógeno, la cual puede proveer información relevante sobre la ecología trófica de los organismos y ha sido utilizada para realizar inferencias ecológicas en gran cantidad de organismos (Hobson, 1999, Unkovich *et al.* 2001).

En la actualidad existen estudios que aportan información de valores isotópicos presentes en piel de ballena jorobada para el Pacífico Norte y en particular para el Pacífico mexicano (Witteveen *et al.* 2009a, Witteveen *et al.* 2009b, Witteveen *et al.* 2011a, Witteveen *et al.* 2011b, Witteveen *et al.* 2012, Filatova *et al.* 2013, Wright *et al.* 2016), sin embargo en el presente trabajo se analizaron muestras a una mayor escala de tiempo, lo cual indica un panorama más amplio de los hábitos alimentarios de la ballena jorobada y cómo se podrían modificar o ajustar a cambios que pudieran ocurrir a nivel oceanográfico.



El análisis de isótopos estables de carbono y nitrógeno en conjunto con la técnica de foto identificación se complementan para obtener información acerca de las conexiones existentes entre la región de reproducción y crianza de Baja California Sur y las regiones de alimentación en el Pacífico Norte. Una vez obtenidas las recapturas fotográficas se pueden relacionar los valores isotópicos de cada individuo con los valores reportados para las regiones de alimentación.

El trabajar con muestras obtenidas en un intervalo de tiempo de ocho años brinda la oportunidad de analizar los efectos que pudieran presentarse, en los valores isotópicos de carbono y nitrógeno en la piel de la ballena jorobada, debidos a la preservación en etanol al 90%. Este punto es importante ya que sentará un precedente para futuros análisis en los que se cuenten con muestras en dicho medio de preservación.



## Hipótesis

Las ballenas jorobadas que arriban a aguas del Golfo de California para reproducirse, dar a luz y criar a sus ballenatos, no se alimentan en esta área, por lo que los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  no serán diferentes en el transcurso del periodo invernal y revelarán relaciones, con sus zonas de alimentación, útiles para explicar la heterogeneidad de su población. A lo largo del tiempo en el Pacífico Norte se presentan variaciones oceanográficas, las cuales se evidenciarán mostrando disparidades en los valores isotópicos en los individuos de las diferentes temporadas invernales. Por otro lado, se espera no encontrar diferencias entre los valores isotópicos de las hembras y los machos, ya que se alimentan en las mismas regiones y de los mismos niveles tróficos.



## Objetivos

### 1.5 General

- Determinar la variabilidad del  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  en piel de las ballenas jorobadas que se congregan en las aguas de Baja California Sur, México.

### 1.6 Específicos

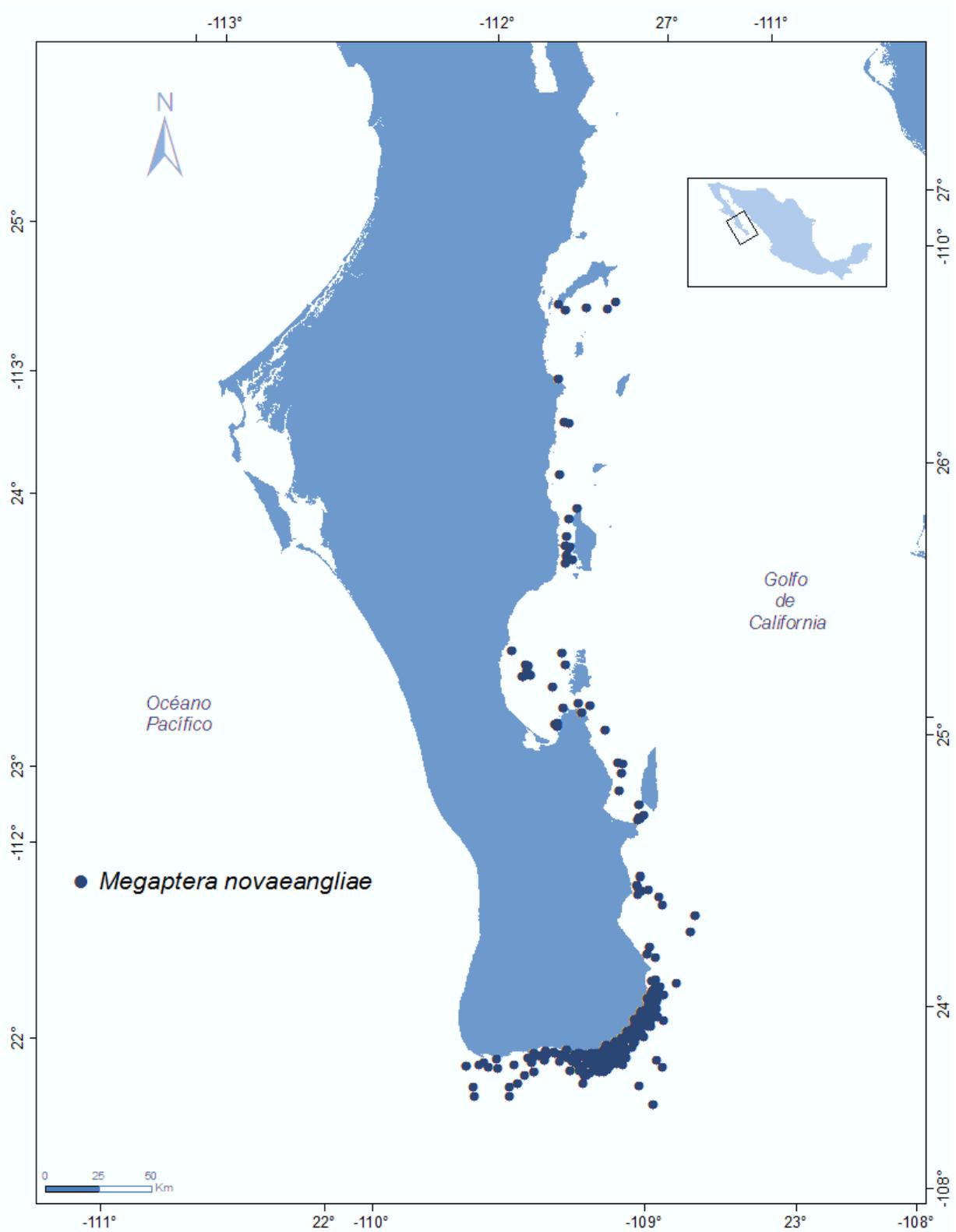
- Comparar métodos de preservación, en muestras de piel de ballena jorobada.
- Determinar la variación de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  entre las temporadas invernales de 2004 a 2011.
- Determinar la variación de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  a lo de la temporada invernal.
- Determinar las diferencias en las señales de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  entre hembras y machos.
- Relacionar las proporciones del  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  con sus orígenes migratorios en el Pacífico Norte.



## Área de estudio

La zona de estudio se ubicó en el sur de la Península de Baja California, región donde arriba la congregación de ballenas jorobadas de Baja California (BC), debido a la dificultad de navegar del lado del Océano Pacífico, el área de estudio se concentró en el Golfo de California, abarcando desde Cabo Pulmo hasta Loreto, Baja California Sur, México, entre los  $23^{\circ}03'$  y los  $25^{\circ}57'N$  y los  $-109^{\circ}21'$  y  $-111^{\circ}6'O$  (Fig. 6).

Esta zona está influenciada por la convergencia de la Corriente Norecuatorial y el Giro del Pacífico Norte. Los vientos son variables, durante el invierno provienen del norte, mientras que durante el resto del año provienen del sureste (Martínez, 2011). El extremo sur del Golfo de California se caracteriza por ser una zona de transición con una estructura dinámica y compleja, la cual involucra a la entrada del golfo, con profundidades de más de 2,500 m, lo que permite un intercambio de masas de agua entre el golfo y el Océano Pacífico (Álvarez-Borrego 1983).



**Figura 6.** Área de estudio. Parte sur de la Península de Baja California, México. Los puntos corresponden a individuos de ballena jorobada muestreados a lo largo de ocho temporadas (Imagen por M en C. Esther Jiménez PRIMMA/UABCS)



## Material y Métodos

### 1.7 Trabajo de campo

#### 1.7.1 Recolección de muestras

Debido a diferentes factores, el esfuerzo de muestreo fue variable para cada temporada. A continuación se detallan los números de muestras por mes para cada una de las temporadas.

En las temporadas invernales 2004, 2005 y 2006, durante los meses de enero, febrero marzo y abril, se obtuvieron 308 muestras de piel de ballena jorobada, como parte del proyecto SPLASH (Structure Population, Levels of Abundance and Status of Humpbacks; Calambokidis *et al.* 2008) cubriendo la zona comprendida entre Cabo Pulmo y Cabo San Lucas, Baja California Sur (BCS), (coordinado por la Dra. Úrsula A. González Peral de la Universidad Autónoma de Baja California Sur, UABCS).

Durante febrero y marzo en 2007, se obtuvieron 82 muestras. Para la siguiente temporada (2008) el esfuerzo de muestreo no incluyó al mes de enero, logrando recolectar 39 muestras a lo largo de febrero, marzo y abril; la menor cantidad de muestras se colectó la temporada de 2009 logrando un total de 25 muestras repartidas en los meses de enero, febrero, marzo y abril; en 2010 los meses enero, febrero, marzo y abril contaron con esfuerzo de muestreo, logrando recolectar 36 muestras; por último en la temporada 2011 no se realizó colecta en enero y se obtuvo un total de 64 muestras de piel a lo largo de febrero, marzo y abril (Tabla 1).

El método para la colecta de las muestras de piel para el análisis isotópico de las ballenas jorobadas a lo largo de BCS, se basó en navegaciones a bordo de embarcaciones tipo panga (de 22 pies de largo) con motor fuera de borda (de 100 HP), y en algunas ocasiones en embarcaciones mayores (Fig.7). Durante estos muestreos se dio la participación de miembros del Programa de Investigación en Mamíferos Marinos (PRIMMA) de la UABCS.

**Tabla 1. Tamaño de muestra por mes y total para cada temporada.**



TEMPORADA	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL	TOTAL POR TEMPORADA
2004	23	29	61	9	<b>122</b>
2005	27	22	32	8	<b>89</b>
2006	13	29	53	2	<b>97</b>
2007	--	56	26	--	<b>82</b>
2008	--	12	3	24	<b>39</b>
2009	2	3	18	2	<b>25</b>
2010	3	11	19	3	<b>36</b>
2011	--	13	37	14	<b>64</b>
<b>TOTAL POR MES</b>	<b>68</b>	<b>175</b>	<b>249</b>	<b>62</b>	<b>554</b>

Las muestras de piel se obtuvieron usando flechas modificadas con puntas para biopsias (longitud x diámetro 3 x 0.8 cm, 4 x 0.8 cm) las cuales se dispararon con una ballesta (*Horton, Forcesteel* de 67 Kg de potencia de disparo) a una distancia de 5 a 15m de la ballena (Fig.8). La punta penetra 2.5cm en la piel del animal y retiene un fragmento de ésta en su interior, al rebotar es recuperada en la superficie del mar gracias a que posee un flotador color brillante para facilitar su localización (González-Peral 2011).

Posteriormente a la toma de muestras, estas se manejaron bajo condiciones de mayor esterilidad posible y de acuerdo a los procedimientos habituales para la manipulación de tejidos (Mathews *et al.* 1988). En un campo estéril se dividió la piel en dos partes con ayuda de pinza y bisturí (Fig. 9).

La piel de ballena jorobada que se utilizó para el análisis de isótopos estables fue preservada de distinta manera. En los años 2004-2006 fueron preservadas en etanol al 90%, de 2007 a 2009 la preservación fue en etanol al 90% y por congelación, y en los años 2010 y 2011 se preservaron mediante congelación. El número de muestras para cada temporada y la forma en que fueron preservadas se indica en la Tabla 2.



Figura 7. Embarcaciones para colecta de muestras. Embarcación mayor (arriba) y tipo panga (abajo).

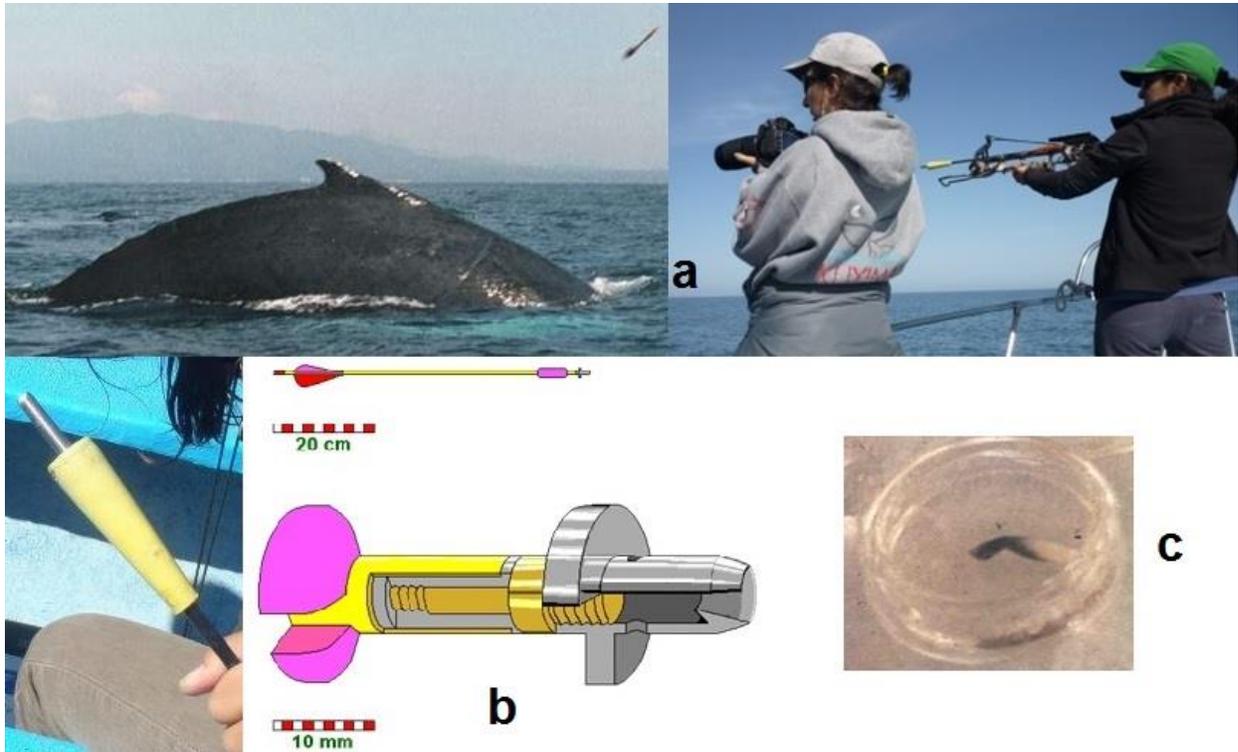


Figura 8. Toma de muestra de piel de ballena jorobada. Miembros del PRIMMA colectando muestras (a), flecha con punta modificada (b), muestra de piel y grasa (c).

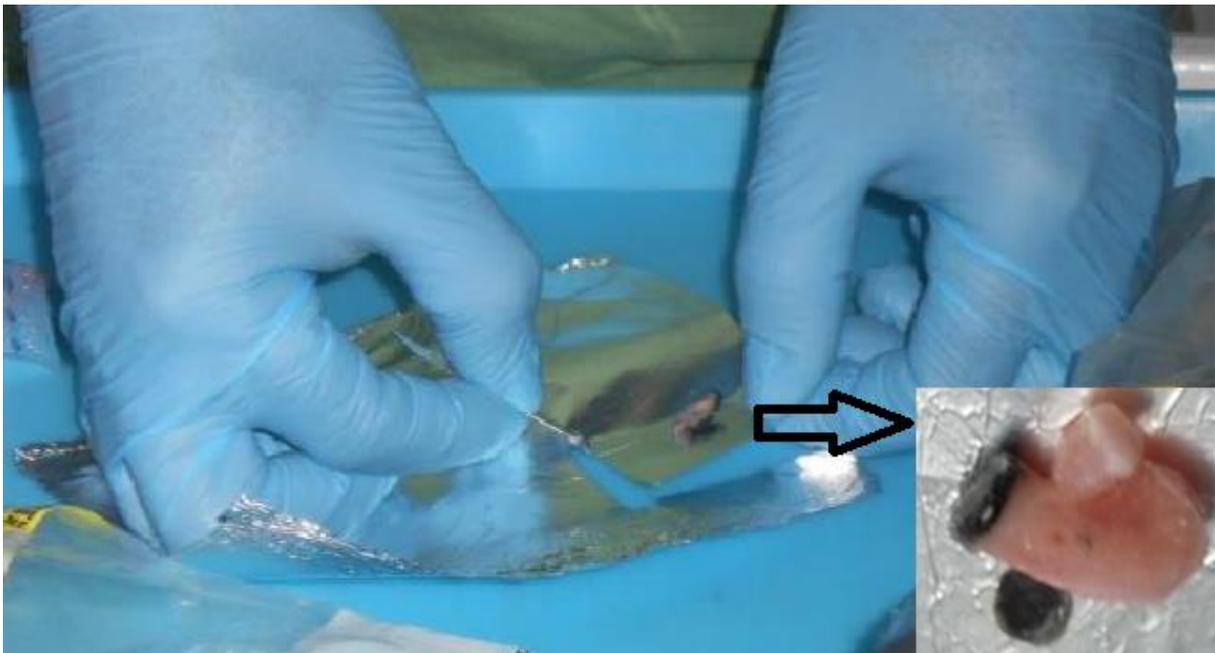


Figura 9. Manipulación de muestra de piel y grasa de ballena jorobada para su almacenamiento y posterior análisis.



**Tabla 2. Número de muestras por medio de preservación en cada temporada de muestreo. (-- ausencia de muestras).**

<b>TEMPORADA</b>	<b>ETANOL 90%</b>	<b>CONGELADA</b>	<b>TOTAL POR TEMPORADA</b>
<b>2004</b>	122	--	<b>122</b>
<b>2005</b>	89	--	<b>89</b>
<b>2006</b>	97	--	<b>97</b>
<b>2007</b>	53	29	<b>82</b>
<b>2008</b>	16	23	<b>39</b>
<b>2009</b>	15	10	<b>25</b>
<b>2010</b>	--	36	<b>36</b>
<b>2011</b>	--	64	<b>64</b>
<b>TOTAL POR MEDIO DE PRESERVACIÓN</b>	<b>392</b>	<b>162</b>	<b>554</b>

Se obtuvieron 54 muestras preservadas en ambos métodos (congelación y etanol al 90%), de las cuales 24 corresponden a la temporada del año 2007, 23 al 2008 y 7 al 2009 (Tabla 3). Estas muestras se utilizaron para realizar la prueba T-Student para comprobar si el método de preservación afecta la señal de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ .

**Tabla 3. Muestras pareadas preservadas en congelación y en etanol al 90% (pertenecientes al mismo individuo). Colectadas en las temporadas 2007, 2008 y 2009.**

<b>TEMPORADA</b>	<b>ETANOL 90%</b>	<b>CONGELADA</b>	<b>TOTAL</b>
<b>2007</b>	24	24	<b>48</b>
<b>2008</b>	23	23	<b>46</b>
<b>2009</b>	7	7	<b>14</b>
<b>TOTAL</b>	<b>54</b>	<b>54</b>	<b>108</b>



Ya que uno de los objetivos fue trabajar los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  de las ocho temporadas como un solo grupo de datos y determinar promedios y la variabilidad de la señal isotópica en el Golfo de California, después de comprobar la existencia de diferencias significativas entre medios de preservación en los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  se les realizaron correcciones.

Para el  $\delta^{13}\text{C}$  de las muestras congeladas (valores manejados como grupo de muestras sin tratar) se utilizaron dos modelos diferentes y uno propuesto específicamente para las muestras de piel de ballena jorobada que se analizan en este trabajo.

El primer modelo es el propuesto por McConnaughey & McRoy (M&M) (McConnaughey & McRoy, 1979) para todo el cuerpo de diferentes vertebrados e invertebrados marinos, incluyendo aves marinas y mamíferos, requiere información acerca de tres parámetros: contenido de lípidos L (1), proporciones de C y N en la muestra sin tratar (C:N) y la diferencia isotópica (en ‰) entre lípidos puros y proteína pura D. Este modelo se basa en las siguientes ecuaciones:

$$L = \frac{93}{1 + [0.246 \times (\text{C:N}) - 0.775]^{-1}}$$

**(1) Contenido de lípidos.**

$$\delta^{13}\text{C}' = \delta^{13}\text{C} + D \times \left( I + \frac{3.90}{1 + 287/L} \right)$$

**(2)  $\delta^{13}\text{C}$  normalizada  $\delta^{13}\text{C}'$ .**

Donde  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{13}\text{C}'$  son los valores medidos sin tratar y los valores ya normalizados de la muestra, respectivamente, D define la pendiente de la curva y es una constante. El modelo de M&M supone una D, de 6‰ y un I de -0.207 (McConnaughey, 1978). Utilizando muestras de diferentes cetáceos Lesage *et al.* (2010) re-estima a D= 4.825 e I= 0.120 (Lesage *et al.* 2010). La normalización de los datos se realiza utilizando ambos valores para D e I.



El segundo modelo fue el propuesto por Post *et al.* (2007). Desarrollan este modelo simplificado (3) para una amplia variedad de animales terrestres y acuáticos, donde se usa la relación C:N de muestras sin tratar (en este caso las congeladas).

$$\delta^{13}\text{C}' = \delta^{13}\text{C} - 3.32 + 0.99\text{CN}$$

**(3) Modelo propuesto por Post et al. (2007).**

Por último, también se propuso un modelo simple, desarrollado a partir de nuestros datos, utilizando los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  de la piel de ballena jorobada sin tratar (congeladas).

## **1.8 Trabajo de laboratorio. Preparación de muestras y análisis de isótopos estables ( $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ )**

### **1.8.1 Liofilización**

Las muestras de piel (entre 10 y 15mg de masa húmeda) se lavaron con agua destilada para eliminar exceso de sal y de etanol; dejando las muestras destapadas en sus viales, protegidas con papel aluminio. Se congelaron a  $-40^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se colocaron por 24 horas en un liofilizador (FreeZone 2.5 Liter Benchtop Freeze Dry System) del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marianas (CICIMAR), para extraer la humedad de la piel a una temperatura de entre  $-40^{\circ}\text{C}$  y  $-50^{\circ}\text{C}$ , a un vacío de  $50 \times 10^3$  mbares. Posteriormente las muestras se almacenaron en un desecador hasta su posterior manipulación para realizar la extracción de lípidos.



### 1.8.2 Extracción de lípidos

Las muestras de piel de ballena jorobada fueron sometidas a extracción de lípidos. Lo anterior es debido a que los lípidos están empobrecidos en  $^{13}\text{C}$ , lo que podría causar un sesgo de los resultados hacia valores más negativos de  $\delta^{13}\text{C}$  (DeNiro y Epstein 1977), que no sería resultado de la conducta alimentaria de los individuos sino de la bioquímica lipídica. Las muestras sin humedad, contenidas en viales se cubrieron con éter de petróleo (Witteven 2009a), se agitan de ese modo por 30 min y posteriormente se centrifugaron a 2000 rpm por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Estos pasos se hicieron tres veces por cada muestra (Hoekstra 2002). Como paso siguiente las muestras se sometieron a liofilización por 24h para eliminar el solvente y posteriormente se almacenaron en un desecador hasta su posterior manipulación.

### 1.8.3 Homogeneización y encapsulado de las muestras

Las muestras libres de lípidos se maceraron utilizando un mortero con pistilo de ágata. El mortero se limpió exhaustivamente con acetona al 50% después de la homogeneización de cada muestra. Posteriormente se pesaron submuestras de 1.5 a 2mg en una Sartorius Micro-microbalanza Premium ME5-F del Laboratorio de Química del CICIMAR-IPN, con una precisión de  $\pm 0.001\text{g}$ , las cuales fueron almacenadas en cápsulas de estaño (Fig. 10). Estas fueron manejadas con pinzas esterilizadas de y se colocaron en porta cápsulas especializados para su envío al Departamento de Ciencias Botánicas de la Universidad de California en Davis (UCD), EUA, donde se llevó a cabo el análisis de isótopos estables de carbono y nitrógeno.



#### 1.8.4 Lectura de isótopos estables ( $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ )

Los isótopos estables de C y N fueron medidos en un analizador elemental PDZ Europa ANCA-GSL interconectado a un espectrómetro de masas isotópicas PDZ Europa 20-20 (Sercon Ltd., Cheshire, UK) en la universidad de Davis California, con una precisión en máxima desviación estándar de 0.2‰ para  $^{13}\text{C}$  y de 0.3‰ para  $\delta^{15}\text{N}$ .

Las diferencias relativas de las razones isotópicas estables entre las muestras y los estándares se expresan como  $\delta$  (Delta)  $^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ , se obtuvieron a partir de las razones medidas en la muestra y de los elementos estándares usando la siguiente ecuación propuesta por DeNiro y Epstein (1981):

$$\delta^{13}\text{C} \text{ ó } \delta^{15}\text{N} = [(R_{\text{muestra}}/R_{\text{estándar}}) - 1] \times 1000$$

(4)  $\delta$  (Delta)  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$  Diferencias relativas de las razones isotópicas.

dónde:  $\delta^{13}\text{C}$  ó  $\delta^{15}\text{N}$  es la diferencia expresada en partes por mil (‰) entre el contenido de  $\delta^{13}\text{C}$  ó  $\delta^{15}\text{N}$  de la muestra y del estándar.

$R_{\text{muestra}}$  y  $R_{\text{estándar}}$  son las razones de  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  o  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  para la muestra y el estándar, respectivamente. El estándar para el  $\delta^{13}\text{C}$  fue el PDB (Pee Dee Belemnita), mientras que para el  $\delta^{15}\text{N}$  fue el  $\text{N}_2$  atmosférico.



**Figura 10. Homogeneizado y encapsulado de muestras.**

### **1.8.5 Análisis molecular (sexo)**

Las muestras colectadas en las temporadas invernales de 2004, 2005 y 2006 se analizaron en el Laboratorio de Genética y Conservación de Cetáceos en el Hatfield Marine Science Center (HMSC) de la Oregon State University (OSU) (González-Peral, 2011).

Las muestras colectadas en las temporadas invernales de 2007 a 2011 se analizaron en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por la Dra. Úrsula A. González Peral.

Debido a varios factores como pudieron ser, conservación, área del cuerpo muestreada o tipo de muestra (p.e. piel descamada), degradación del DNA, contaminación; algunas muestras no arrojaron resultados confiables en cuanto al sexo por lo que no se tomaron en cuenta.



### 1.8.6 Foto-identificación

Desde las diferentes plataformas utilizadas para el trabajo de campo, se tomaron fotografías de la cara ventral de la aleta caudal de las ballenas jorobadas utilizando cámaras réflex digitales.

La técnica de foto-identificación consiste en el reconocimiento de cada ballena jorobada por medio de la fotografía de la cara ventral de su aleta caudal. Las principales diferencias a observar son la coloración, la forma y el borde de la aleta, la presencia de cicatrices, marcas y muescas. Las fotografías se imprimieron y se crearon catálogos anuales por región (Baja California, Contiente y Archipiélago de Revillagigedo). Estas se clasificaron por su patrón de coloración, del tipo 1 (blancas) al 5 (negras) de acuerdo con la clasificación utilizada por Glockner y Venus (1983) y Rosebaum *et al.* (1995) (González-Peral 2011).

## 1.9 Trabajo de gabinete

### 1.9.1 Análisis estadístico

Para comparar los medios de preservación en los que estuvieron las muestras se utilizó la prueba T-Student para  $\delta^{13}\text{C}$  y Mann-Whitney para el  $\delta^{15}\text{N}$ ; así como la relación C:N para comprobar que la extracción de lípidos se llevó a cabo de manera adecuada.

La prueba de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov ( $P > .20$ ) se utilizó para determinar si los valores obtenidos de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  se ajustan a una distribución normal, la prueba de Levene ( $p > .05$ ) para constatar si las varianzas son homogéneas.

Se utilizó la prueba de análisis de varianza ANOVA para identificar diferencias significativas de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  entre temporadas y a lo largo de las temporadas. La prueba *pot hoc* de Tukey-Kramer Unequal N Honestly Significant Difference (HSD) se utilizó para la comparación múltiple e identificación de subconjuntos homogéneos cuyas medias no se diferencian entre sí.



Para determinar si existen diferencias significativas entre sexos se utilizó la prueba T-Student de dos colas.

Se utilizó el método de Elipses Bayesianas de Isótopos Estables en R SIBER en la rutina del paquete SIAR, en el entorno de programación R, para examinar la variación de los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  y así estimar el espacio de nicho isotópico (Jackson *et al.* 2011, R Development Core Team, 2011). Este método asigna medidas de incertidumbre basadas en la simulación Monte Carlo Markov-Chain (MCMC) y usando métodos Euclidianos como el convex hulls define el espacio del nicho isotópico a lo largo del tiempo (Layman *et al.* 2007, Ryan *et al.* 2013).

Este análisis se utilizó como complemento a la determinación de diferencias significativas; por medio del área de un polígono, utilizando medidas basadas en elipses que no son influenciadas por el tamaño de la muestra o de datos externos, observamos la sobreposición (sobreposición  $\leq 1$  es significativa) de los grupos de datos.

La elipse de dos variables y el convex hulls fue usada para trazar el espacio del nicho isotópico ( $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  elipses con un intervalo de confianza del 95%) y la extensión total del nicho isotópico respectivo en cada temporada (Jackson *et al.* 2011). Este enfoque es específicamente relevante para los animales que muestran movimientos migratorios predecibles y en los organismos de alto nivel trófico, donde los valores isotópicos regionales de referencia pueden ser difíciles de identificar e interpretar después de múltiples transferencias tróficas.

Para realizar los análisis estadísticos se utilizaron los programas STATISTICA 8.0 (StatSoft, Inc 1984-2007), SIAR de R para Windows.



## Resultados

### 1.10 Efecto del método de preservación en los valores isotópicos en la piel de ballena jorobada

En las temporadas 2007, 2008 y 2009, 54 muestras de piel de ballena jorobada fueron preservadas por duplicado en congelación y en etanol al 90% (Figura 11). Los valores promedio y error estándar (SE) obtenidos para las muestras en etanol al 90% fueron  $\delta^{13}\text{C}$  -17.86  $\pm$  0.13‰ y  $\delta^{15}\text{N}$  13.48  $\pm$  0.22‰ y para las muestras congeladas  $\delta^{13}\text{C}$  -18.78  $\pm$  0.13‰;  $\delta^{15}\text{N}$  13.67  $\pm$  0.20‰.

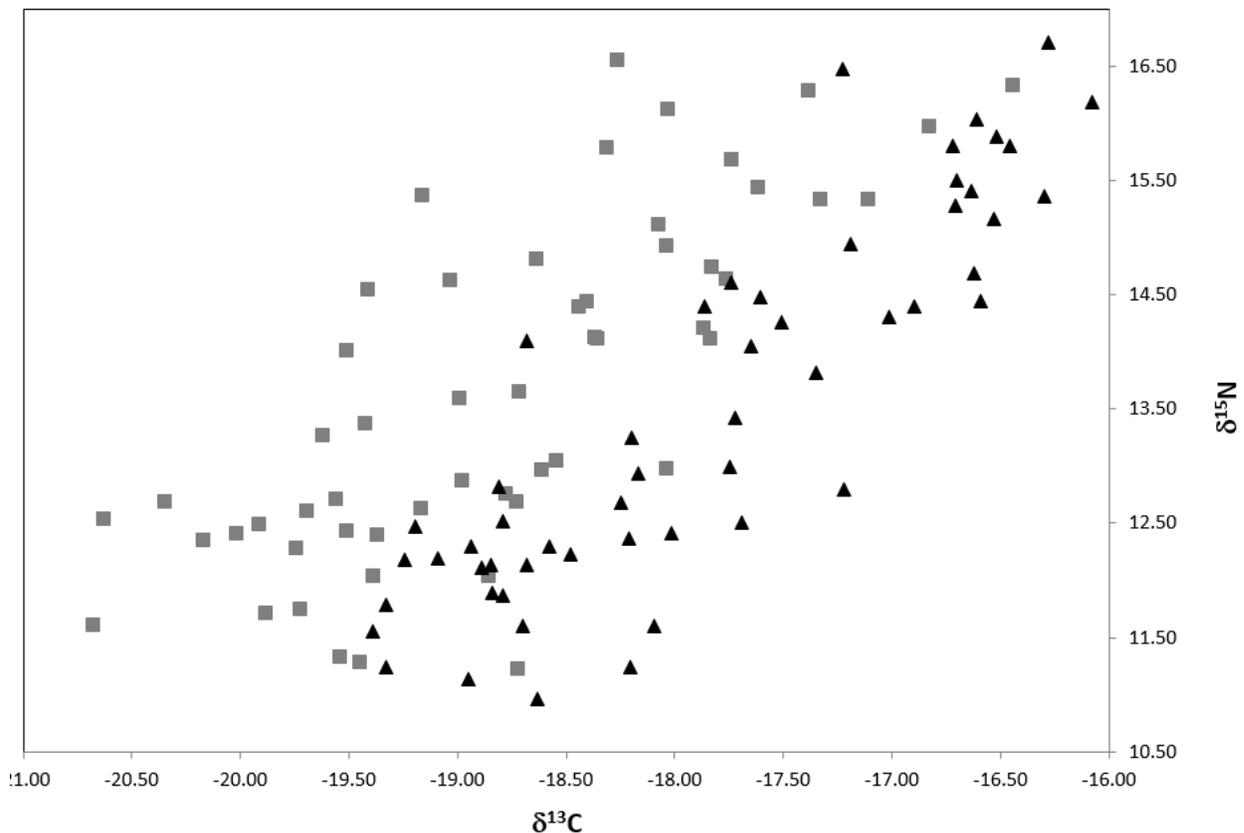


Figura 11. Relación del  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) y  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) de dos medios de preservación, congelación (cuadrados) y en etanol 90% (triángulos), en muestras de piel de ballena jorobada.



El análisis de normalidad se aplicó de manera separada para  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ , en el caso del isótopo estable de carbono, los valores mostraron un comportamiento normal, mientras que los valores de nitrógeno fueron no normales. Se utilizó la prueba T-Student ( $\alpha=0.05$ ) para comparar las medias de  $\delta^{13}\text{C}$  y Mann-Whitney para comparar las medianas del  $\delta^{15}\text{N}$  entre los 54 pares de muestras de los dos medios de preservación (etanol 90% y congelado). La hipótesis nula en este caso fue que la media y la mediana de los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ , respectivamente, son iguales en ambos métodos de preservación.

Se encontró que, para los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  no hubo evidencia de que los grupos sean diferentes ( $p = 0.514$ ) por lo que se infiere que el etanol no tiene efectos en los valores del isótopo estable de nitrógeno, mientras que para  $\delta^{13}\text{C}$  existieron diferencias significativas entre los valores promedio obtenidos de los dos medios de preservación congelado y etanol 90% ( $t = 4.93$ ;  $p = 0.00$ ,  $p\ 2\ colas = 0.00$ ).

Debido a estas diferencias significativas en el  $\delta^{13}\text{C}$  y para confirmar la extracción exhaustiva de lípidos, de las 108 muestras se calculó el promedio de su relación C:N que fue igual a  $3.22 \pm 0.07\%$ . Este promedio está por debajo del 5% de lípidos ( $\text{C:N} < 3.5$ ), el cual se considera un nivel bajo para animales acuáticos (Post *et al.*, 2007). Lesage *et al.* en 2010 reportan que, para piel de cetáceos con lípidos extraídos, el promedio de la relación C:N es  $3.19 \pm 0.02\%$ ; con base en esto se puede decir que la extracción de lípidos fue exhaustiva y las diferencias significativas se deben al medio en el que fueron preservadas.

La normalización matemática de los valores isotópicos de  $\delta^{13}\text{C}$  no se llevó a cabo, ya que no son recomendados para muestras preservadas en etanol (Post 2007; McConnaughey y McRoy 1978; Lesage *et al.*, 2010).

Como siguiente paso se compararon los valores isotópicos de carbono entre las muestras congeladas y en etanol para cada temporada por separado (2007, 2008 y 2009), se utilizó la prueba T-Student, la cual presentó diferencias significativas entre ambos métodos de preservación en los años 2007 y 2008, mientras que para el año 2009 no se encontraron diferencias significativas.



Analizando la diferencia de los valores promedio de  $\delta^{13}\text{C}$  entre los medios de preservación, se puede ver un probable comportamiento de cambio isotópico con relación al tiempo, mientras más tiempo permanecieron las muestras preservadas en etanol se observó una leve diferencia en partes por mil (Tabla 4) que fue en aumento, lo cual se debe tomar con reservas debido al número de muestras con las que se trabaja.

**Tabla 4. Valores promedio ( $\pm$ DE) de  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) de muestras preservadas en etanol 90% y congeladas. Número de muestras (n) para cada medio de preservación, valores P de prueba T-Student y diferencia en partes por mil entre los dos medios de preservación.**

TEMPO RADA	PROMEDIO $\pm$ DE $\delta^{13}\text{C}$ (‰)		n		VALOR DE P	DIFERENCIA (‰)
	CONGELADA	ETANOL 90%	CONGELADA	ETANOL 90%		
<b>2007</b>	-18.85 $\pm$ 1.01	-17.81 $\pm$ 1.86	24	24	0.001	<b>-1.04</b>
<b>2008</b>	-18.62 $\pm$ 0.96	-17.76 $\pm$ 0.90	23	23	0.003	<b>-0.86</b>
<b>2009</b>	-19.09 $\pm$ 0.77	-18.39 $\pm$ 0.82	7	7	0.122	<b>-0.7</b>
<b>2007-2009</b>	-18.78 $\pm$ 0.96	-17.86 $\pm$ 0.98	54	54	0.000	<b>-0.92</b>

La diferencia de los promedios del  $\delta^{13}\text{C}$  de las muestras congelado y en etanol 90%, tomando las tres temporadas juntas (2007-2009, n= 54), es de -0.92‰ (Tabla 4), observando este comportamiento se propuso un modelo simple, en el que esta diferencia se reste a los valores de las muestras sin tratar.

Una vez realizada la corrección de las muestras congeladas se realizó la prueba U de Mann-Whitney, comprobando que no existen diferencias significativas entre ambos métodos de preservación ( $p < 0.05$ ).

Tomando en cuenta este resultado, y debido a que los trabajos con los que se comparará el presente estudio analizan valores isotópicos de muestras congeladas, se decidió realizar el ajuste de los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  de las muestras preservadas en etanol 90% de las temporadas 2004-2008 (Tabla 2); para las temporadas 2004 y 2006 se les sumó lo promediado del ensayo anterior -0.92‰; en el caso de las muestras de la temporada 2007 se les sumó la diferencia que se obtuvo para dicho año -1.04‰ y por último a las muestras de la temporada 2008 se les sumaron -0.86‰.



En el caso de las muestras preservadas en etanol 90% de la temporada 2009 se decidió no aplicarles ningún ajuste, debido a que no mostraron diferencias significativas al compararlas con las muestras congeladas; lo cual nos indica que para este año el método de preservación etanol 90% no afectó a los valores del isótopo estable de carbono.

### **1.11 Valores promedio y variación inter-anual de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ en piel de la ballena jorobada**

Se analizaron valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  presentes en la piel de 554 ballenas jorobadas diferentes, congregadas en las aguas de Baja California Sur, las cuales fueron tomadas en el transcurso de ocho temporadas, del año 2004 al 2011, las diferencias en el tamaño de muestra entre años refleja variabilidad en el esfuerzo de muestreo.

Al observar los valores isotópicos de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  de ballenas jorobadas a lo largo de ocho temporadas (2004-2011) en el área de reproducción de Baja California Sur, se encontró que el  $\delta^{13}\text{C}$  varía del valor más negativo al más positivo en 5.24‰, siendo el valor más negativo de -21.31‰ (2005) y el más positivo de -16.07‰ (2004). El  $\delta^{15}\text{N}$  presentó valores desde 9.85‰ (2005) hasta 17.73‰ (2007) teniendo un intervalo de 7.88‰ (Fig. 12).

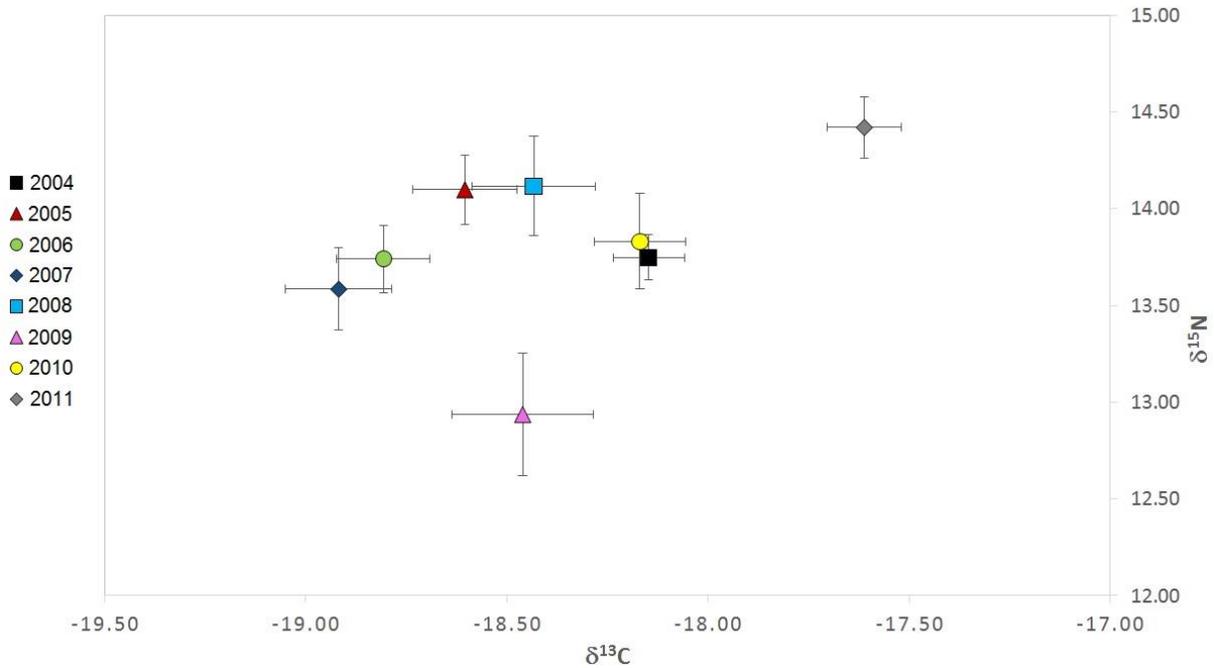


Figura 12. Valores promedio ( $\pm\text{SE}$ ) de  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) y  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) por temporada (2004-2011) de las ballenas jorobadas congregadas en aguas de Baja California Sur.

Tabla 5. Valores promedio ( $\pm\text{SE}$ ) y desviación estandar (DE) del  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  por temporada de ballenas jorobadas en Baja California Sur.

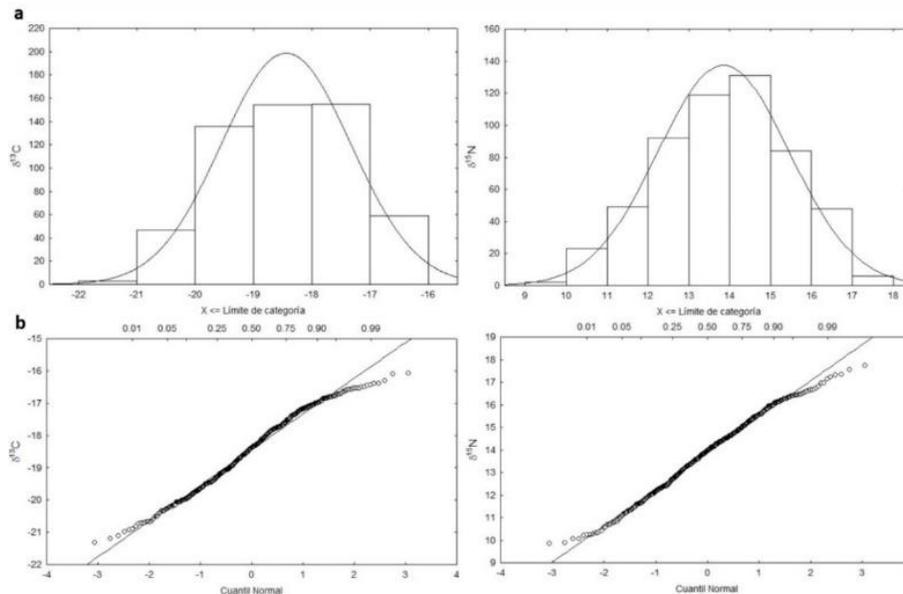
TEMPORADA	n	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	DE	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	DE
2004	122	$-18.15 \pm 0.09$	0.99	$13.75 \pm 0.12$	1.28
2005	89	$-18.60 \pm 0.13$	1.21	$14.10 \pm 0.18$	1.70
2006	97	$-18.81 \pm 0.12$	1.14	$13.74 \pm 0.17$	1.71
2007	82	$-18.92 \pm 0.13$	1.02	$13.58 \pm 0.21$	1.93
2008	39	$-18.43 \pm 0.15$	0.96	$14.12 \pm 0.26$	1.61
2009	25	$-18.46 \pm 0.18$	0.88	$12.94 \pm 0.32$	1.58
2010	36	$-18.17 \pm 0.11$	0.68	$13.83 \pm 0.25$	1.47
2011	64	$-17.61 \pm 0.09$	0.74	$14.42 \pm 0.16$	1.28
<b>PROMEDIO</b>	<b>554</b>	<b><math>-18.42 \pm 0.05</math></b>	<b>1.11</b>	<b><math>13.85 \pm 0.07</math></b>	<b>1.61</b>



Se obtuvo un promedio  $\pm$  error estándar (SE), para las ocho temporadas, de  $\delta^{13}\text{C}$   $-18.42 \pm 0.05\text{‰}$  y  $\delta^{15}\text{N}$   $13.85 \pm 0.07\text{‰}$ . Para la temporada 2011 se encontró el promedio  $\pm$  SE menos negativo de  $\delta^{13}\text{C}$   $-17.61 \pm 0.09\text{‰}$  ( $n = 64$ ); y más alto de  $\delta^{15}\text{N}$   $14.42 \pm 0.16\text{‰}$ ; mientras que en 2009 se obtuvo el promedio más bajo para  $\delta^{15}\text{N}$   $12.94 \pm 0.32\text{‰}$  ( $n = 25$ ) y 2007 mostró el valor más negativo de  $\delta^{13}\text{C}$   $-18.92 \pm 0.13\text{‰}$  ( $n = 82$ ). Los valores por temporada se pueden observar en la tabla 5.

La prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, indica que los valores isotópicos de las ocho temporadas siguen una distribución normal para el nitrógeno (K-S  $d = 0.034$ ,  $p > .20$ ) pero no para el carbono (K-S  $d = 0.057$ ,  $p < .10$ ).

Los datos fueron analizados como normales con base en el Teorema central del límite, ya que el tamaño de muestra es grande (una regla empírica establece que, en la mayoría de las situaciones prácticas, una muestra de tamaño 30 es suficiente para considerarse grande). Se trabajó con una muestra de gran tamaño, de naturaleza heterogénea, los gráficos a simple vista muestran una distribución normal y el Q-Q Plot para ambos casos no se alejan de la normalidad (Fig. 13). Estos mismos argumentos se utilizaron en estudios anteriores (Witteveen, 2008).



**Figura 13. Distribución normal de los datos. (a) Histograma para  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ . (b) Quantile-Quantile plot para  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ .**



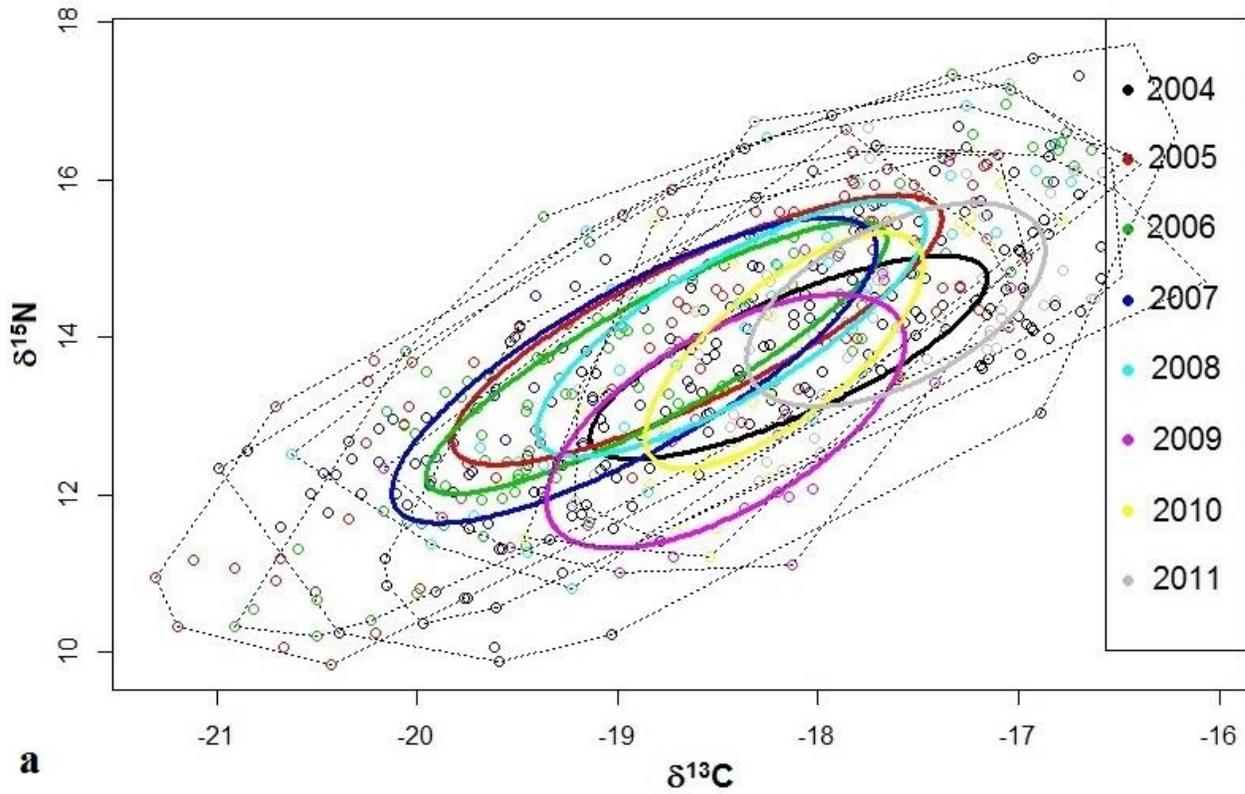
El análisis de varianza ANOVA mostró que existen diferencias significativas para los dos isótopos  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ , con una  $p = 0.00$  en ambos casos.

La prueba Post Hoc Tukey HSD (para  $n$  diferentes) para el  $\delta^{13}\text{C}$  muestra que la temporada 2004 es significativamente diferente a la de 2006 y 2007, mostrando la primera una media menos negativa; así como la media de la temporada 2010 se diferencia de 2007 significativamente en 0.75‰; por último la temporada 2011 es significativamente diferente a 2005, 2006, 2007 y 2008, teniendo valores medios más enriquecidos en el isótopo de carbono ( $p < 0.05$  en todos los casos).

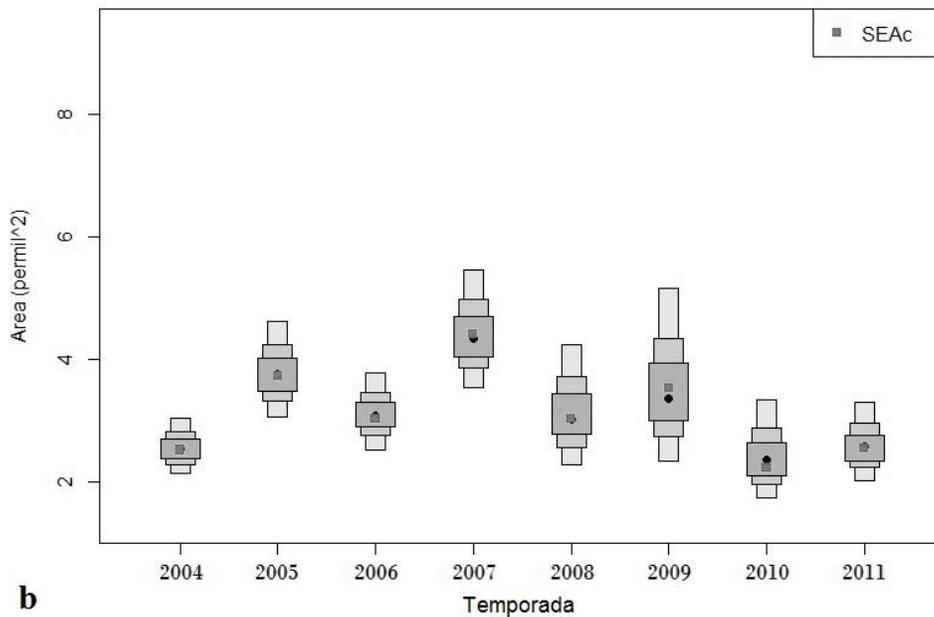
En el caso de los valores del  $\delta^{15}\text{N}$ , la temporada 2009 mostró un valor promedio más bajo y fue diferente significativamente a 2011 ( $p = 0.02$ ).

Por medio del análisis Bayesiano SIAR se puede observar como se agrupan los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  de cada temporada, en una elipse (no influenciada por el tamaño de la muestra) de diferente color y la alta sobreposición que presentan entre ellos (para considerar que la sobreposición de las elipses es alta, está debe ser mayor a 1). El área total del polígono más grande se presentó en la temporada 2007 con un  $TA = 19.31$ , representando la temporada en la que las ballenas jorobadas tuvieron el nicho más ancho en comparación con el resto. La temporada 2010 presentó el área total más pequeña  $TA = 7.24$ , o sea, el ancho de nicho más pequeño que se presentó a lo largo del estudio.

La probabilidad de que en alguna temporada la ballena jorobada haya ocupado espacios de nicho distintos se deduce a través del traslape de las elipses. Como se puede observar en los gráficos de la figura 14 existe un traslape evidente en el nicho trófico, sin embargo entre las temporadas 2005 y 2007 el traslape isotópico fue el más alto observado entre todas las temporadas con un valor de 3.27 y el valor más bajo de traslape se presentó entre las temporadas 2006 (elipse verde) y 2011 (elipse gris) con un valor de 0.46 (Fig. 14). Estos datos indican que en todas las temporadas se compartió el espacio de nicho isotópico por las ballenas jorobadas estudiadas en el presente trabajo.



a



b

Figura 14. Traslape del nicho trófico de la ballena jorobada. (a) Valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  en piel de ballenas jorobadas colectada en Baja California Sur de 2004 a 2011, las elipses solidas muestran el nicho isotópico para cada una de las temporadas. (b) Medidas de incertidumbre y tendencia central (cuadro gris –centro– = moda) de las áreas estándar de la elipse ( $\text{SEAc}$ , corrección para muestras pequeñas en distribución bi-variada por 2 grados de libertad) mostrando el 95, 75 y 50% de intervalos de credibilidad para cada temporada.



## 1.12 Valores promedio y variación intra-anual de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ en piel de la ballena jorobada

Las temporadas se componen de los meses de enero, febrero, marzo y abril. En algunos meses no fue posible la obtención de muestras, tal es el caso de las temporadas 2007 sin muestras para enero y abril, 2008 y 2011 sin muestras para enero; en otros casos el número de muestras por mes es muy bajo, por ejemplo, para el mes de abril en la temporada 2006 se lograron recolectar dos muestras, caso similar para la temporada 2009.

Para calcular los valores promedio intra-anales se agruparon las muestras por mes juntando las ocho temporadas. Así se tiene que en el mes de enero ( $n = 68$ ) se obtuvo un valor promedio  $\pm$  SE de  $\delta^{13}\text{C}$   $-18.59 \pm 0.15\%$  y  $\delta^{15}\text{N}$   $13.43 \pm 0.21\%$ ; febrero ( $n = 175$ )  $\delta^{13}\text{C}$   $-18.60 \pm 0.08\%$  y  $\delta^{15}\text{N}$  de  $13.80 \pm 0.12\%$ ; marzo ( $n = 249$ )  $\delta^{13}\text{C}$   $-18.34 \pm 0.07\%$  y  $\delta^{15}\text{N}$   $13.86 \pm 0.10\%$ ; y abril ( $n = 62$ )  $\delta^{13}\text{C}$   $-18.10 \pm 0.12\%$  y  $\delta^{15}\text{N}$   $14.42 \pm 0.19\%$ . El comportamiento de los valores promedio del isótopo estable de nitrógeno de enero a abril tiende ligeramente a incrementar y el isótopo estable de carbono en los primeros dos meses muestra promedios más negativos en comparación con marzo y abril.

Para la comparación isotópica intra-anual se realizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA). Se agruparon los valores isotópicos de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  de las temporadas sin diferencias significativas (las temporadas 2004, 2010 y 2011 quedaron fuera), teniendo así cuatro grupos de datos, uno por cada mes (enero, febrero, marzo y abril).

Al comparar los meses se obtuvieron los siguientes valores,  $\delta^{13}\text{C}$   $p = 0.4$  y  $\delta^{15}\text{N}$   $p = 0.2$ , por lo que no hay evidencia suficiente para probar que existen diferencias significativas en ninguno de los dos isótopos.



### 1.13 Variabilidad en el $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ en piel de la ballena jorobada dependiendo el sexo

Se identificó el sexo de 524 individuos a lo largo de las ocho temporadas; 164 fueron hembras presentando valores de  $\delta^{13}\text{C}$  entre -21.12 y -16.49‰ y de  $\delta^{15}\text{N}$  entre 9.85 y 17.34‰; mientras que fueron 360 machos con valores de  $\delta^{13}\text{C}$  entre -21.31 y -16.07‰ y  $\delta^{15}\text{N}$  de 10.06 a 17.73‰. Se obtuvo una proporción de 2.20 machos por hembra (2.20:1).

Los valores promedio  $\pm$  SE de isótopos estables a lo largo de las ocho temporadas de muestreo, fueron para hembras de  $\delta^{13}\text{C}$   $-18.62 \pm 0.09$  y  $\delta^{15}\text{N}$   $13.60 \pm 0.13$ , y de  $\delta^{13}\text{C}$   $-18.32 \pm 0.06$  y  $\delta^{15}\text{N}$   $13.99 \pm 0.08$  para machos (Fig. 15). Los valores promedio de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  para hembras y machos en cada una de las temporadas se muestran en la Tabla 5.

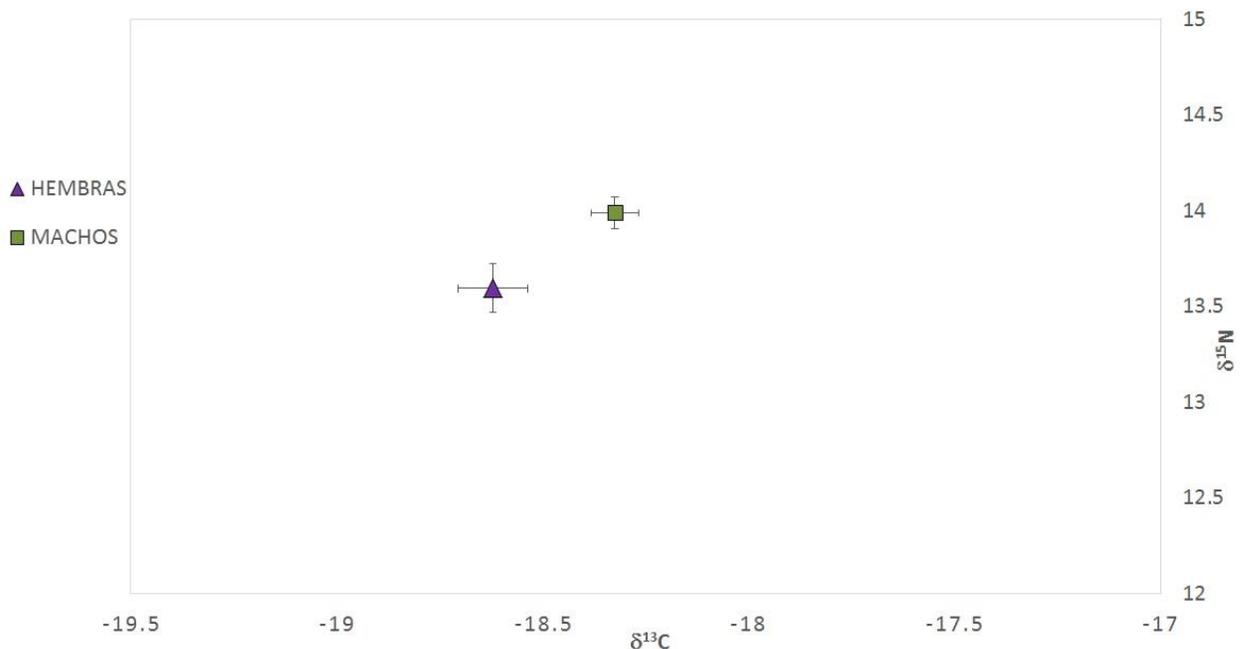


Figura 15. Valores promedio ( $\pm$ SE) de  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) y  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) en hembras y machos de ballena jorobada. Muestras colectadas en ocho temporadas (2004-2011) en Baja California Sur.



Se compararon las medias de hembras y machos para los isótopos estables de carbono y nitrógeno por medio de la prueba estadística T-Student de dos colas; para las temporadas el intervalo de tiempo trabajado 2004 a 2011. Los resultados indican que existen diferencias significativas para ambos isótopos ( $T^2_{(\text{casewise MD})} = 9.16$ ,  $F_{2,521} = 4.57$   $p < 0.01$ ), donde el  $\delta^{13}\text{C}$  tuvo una  $t = -2.97$  y una  $p = 0.003$  y el  $\delta^{15}\text{N}$   $t = -2.62$  y  $p = 0.01$ .

**Tabla 6. Valores promedio ( $\pm$ SE) del  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) y  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) en hembras y machos de ballenas jorobadas, por temporada, en el área de reproducción de Baja California Sur.**

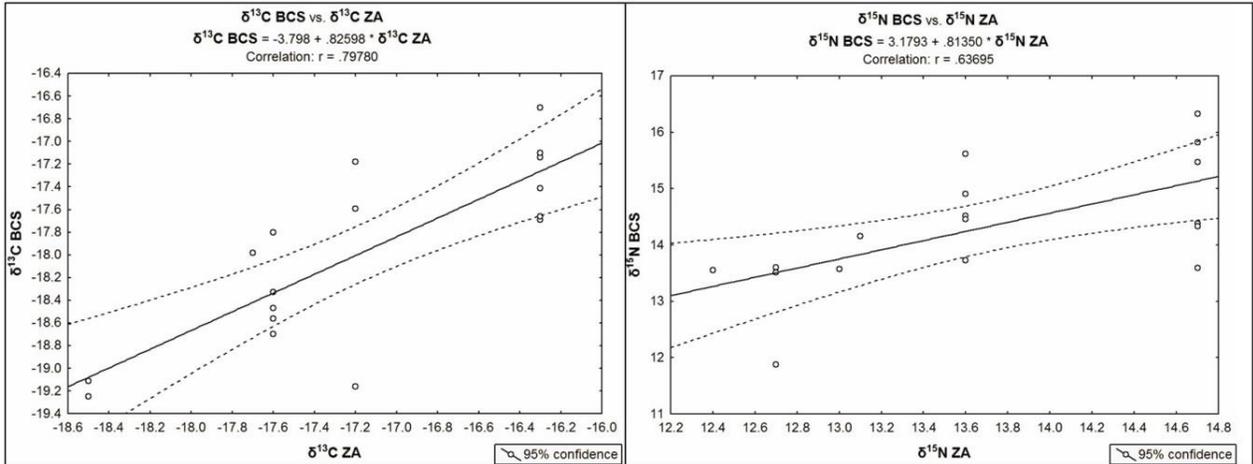
TEMPORADA	HEMBRAS	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	MACHOS	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)
2004	23	-18.37 $\pm$ 0.22	13.59 $\pm$ 0.33	83	-18.03 $\pm$ 0.10	13.87 $\pm$ 0.13
2005	38	-18.74 $\pm$ 0.20	13.96 $\pm$ 0.30	49	-18.42 $\pm$ 0.17	14.29 $\pm$ 0.22
2006	27	-19.01 $\pm$ 0.19	13.52 $\pm$ 0.31	69	-18.71 $\pm$ 0.15	13.83 $\pm$ 0.21
2007	11	-19.68 $\pm$ 0.19	12.31 $\pm$ 0.47	64	-18.80 $\pm$ 0.15	13.71 $\pm$ 0.23
2008	20	-18.69 $\pm$ 0.24	13.69 $\pm$ 0.39	19	-18.17 $\pm$ 0.18	14.57 $\pm$ 0.31
2009	12	-18.67 $\pm$ 0.27	12.70 $\pm$ 0.40	13	-18.26 $\pm$ 0.22	13.16 $\pm$ 0.49
2010	9	-18.48 $\pm$ 0.19	13.23 $\pm$ 0.47	25	-18.06 $\pm$ 0.14	14.13 $\pm$ 0.28
2011	24	-17.73 $\pm$ 0.16	14.21 $\pm$ 0.21	38	-17.52 $\pm$ 0.12	14.53 $\pm$ 0.23
<b>PROMEDIO</b>	<b>164</b>	<b>-18.62<math>\pm</math>0.09</b>	<b>13.60<math>\pm</math>0.13</b>	<b>360</b>	<b>-18.32<math>\pm</math>0.06</b>	<b>13.99<math>\pm</math>0.08</b>



### 1.14 Variabilidad en el $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ en piel de ballena jorobada en la región de B.C.S. y relación con sus orígenes migratorios

Se utilizó la base de datos resultado del proyecto Estructura de la Población, Niveles de Abundancia y Estatus de las Ballenas Jorobadas (SPLASH por sus siglas en inglés), se encontraron 17 ballenas jorobadas con foto-recaptura (ballenas con registro fotográfico en sus regiones de alimentación del Pacífico Norte y en la región de reproducción de Baja California Sur) en las temporadas 2004 y 2005, los valores isotópicos promedio de las regiones de alimentación se obtuvieron del trabajo de Witteveen (2008), quien indica que la recolección de las muestras para obtener dichos valores se llevó a cabo como parte del mismo proyecto SPLASH. Las seis regiones donde se alimentaron las ballenas jorobadas foto-recapturadas fueron California-Oregón (CA-OR) 6 ballenas, Norte de la Columbia Británica (NBC) una ballena, Sur Este del Golfo de Alaska (SEAK) 3 ballenas, Norte del Golfo de Alaska (NGOA) 5 ballenas, Oeste del Golfo de Alaska (WGOA) una ballena y Mar de Bering (BERING) una ballena (Calambokidis *et al.* 2001)

Se realizó el análisis de regresión lineal con los promedios isotópicos de las seis zonas de alimentación de procedencia de las 17 ballenas jorobadas vistas en B.C.S (Fig. 16). Analizando el coeficiente de determinación para ambos isótopos ( $\delta^{13}\text{C}$   $R^2= 0.64$  y  $\delta^{15}\text{N}$   $R^2= 0.41$ ), indica que la relación entre los valores promedio de las zonas de alimentación y los valores de los individuos foto-recapturados para  $\delta^{13}\text{C}$  es mayor en comparación con  $\delta^{15}\text{N}$ , ya que cuando  $R^2$  es más cercano a cero existe mayor independencia entre las variables y cuando el valor es 1 existe una relación perfecta entre las variables. Sin embargo, en ambos casos la relación es positiva y en ambos casos la regresión fue significativa con una  $p$  igual a 0.00.



**Figura 16. Análisis de regresión para relacionar los valores promedio del  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  de seis zonas de alimentación en el Pacífico Norte y los valores isotópicos obtenidos en individuos foto-recapturados en la región de reproducción de B.C.S. México.**

Las ballenas jorobadas muestreadas en B.C.S con foto-recaptura en la región de alimentación de California-Oregón fueron las que presentaron los valores menos negativos de  $\delta^{13}\text{C}$  (promedio de  $-17.28\%$ ) y las ballenas jorobadas con foto-recaptura en las regiones NBC, NGOA, SEAK, NGOA, WGOA y Bering fueron enriqueciendo su señal mientras más al norte fueron recapturadas, coincidiendo con los valores promedio mostrados en las regiones de alimentación. La diferencia entre el valor promedio menos enriquecido (CA-OR) y el más enriquecido, mostrado por las ballenas del WGOA y Bering fue de  $1.9\%$ .



## Discusión

Los resultados de los análisis de isótopos estables sugieren que el método de preservación en etanol al 90% causa que los niveles de  $\delta^{13}\text{C}$  sean 0.9‰ por debajo de lo obtenido en muestras control. Se registraron valores promedio en el  $\delta^{13}\text{C}$  y el  $\delta^{15}\text{N}$  que coinciden con valores promedio ya reportados. Las diferencias obtenidas entre las hembras y los machos se atribuyen a diferencias a nivel metabólico entre sexos. Coincidiendo con lo reportado por Ryan *et al.* (2013) se encontró que el nicho isotópico de la ballena jorobada es amplio. Las condiciones oceanográficas que ocurrieron durante el periodo de alimentación de los individuos analizados, nos ayuda a explicar la variabilidad inter-anual de las razones isotópicas del  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ . Asimismo las foto-recapturas ayudaron a afirmar que las firmas isotópicas, obtenidas en el presente estudio, son reflejo de los valores que adquieren en sus regiones de alimentación.

### 1.15 Efecto del método de preservación en la piel de la ballena jorobada

El análisis de isótopos estables es ampliamente utilizado por investigadores de campo para tratar de resolver diferentes preguntas (Best 1996, Bosley y Wainright 1999, Gendron *et al.* 2001, Born *et al.* 2003, Aurióles *et al.* 2006, Filatova *et al.* 2013, Felming *et al.* 2016). Las muestras recolectadas en campo deben ser preservadas por lapsos de tiempo que pueden variar desde horas, días, meses o años, antes de que sean analizadas en laboratorio. Algunos métodos de preservación de tejidos tienen efectos en los valores de isótopos estables de carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) y nitrógeno ( $\delta^{15}\text{N}$ ).

En el presente estudio se utilizaron las muestras congeladas como control, ya que no fue posible tener un grupo libre de preservación, debido a que se trabajó con muestras almacenadas. Hay trabajos en los que se evalúan los efectos de la preservación por congelación a  $-10^{\circ}\text{C}$ , en los que se encuentran diferencias significativas al grupo control,



para ambos isótopos  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  a partir del día 60 almacenados (Barrow *et al.* 2008), sin embargo estos autores atribuyen esas diferencias a la pérdida de los isótopos más ligeros de carbono y nitrógeno de la descomposición mecánica de las células a través de la lixiviación, cuando las muestras se descongelan durante el proceso de preparación. Para prevenir esto y poder utilizar las muestras congeladas como muestras control, se realizó la desecación de las muestras por liofilización, método por el cual se elimina el agua de la muestra congelada por sublimación del hielo en condiciones de vacío, evitando que pasen por el estado líquido, extrayendo la humedad de su estado sólido.

Varios trabajos que también evalúan los efectos de la preservación en congelación de diferentes tejidos, entre ellos piel, analizan los mismos isótopos estables, a las mismas temperaturas o más bajas, reportando que no muestran diferencias significativas por lo que se considera que la preservación por congelación no muestra cambios en los valores isotópicos, siendo un método seguro y el más común para almacenar muestras (Gloutney y Hobson 1998, Bosley y Wainright 1999, Kaehler y Pakhomov 2001, Barrow *et al.* 2008).

Por otro lado la señal del  $\delta^{13}\text{C}$  puede disminuir y enriquecerse el  $^{15}\text{N}$  para muestras almacenadas en etanol por periodos de tiempo largos (Barrow *et al.* 2008). Las muestras de piel de ballena jorobada preservadas en etanol no mostraron diferencias significativas en los valores de  $\delta^{15}\text{N}$ , coincidiendo con lo observado con anterioridad en otros estudios (Hobson *et al.* 1997). El etanol afectó las firmas isotópicas de los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  en la piel de ballena jorobada, la magnitud de los cambios indican una mayor diferencia con las muestras control mientras aumenta el tiempo de preservación.

Se obtuvo una diferencia promedio de  $-0.92\text{‰}$  entre los valores del  $\delta^{13}\text{C}$  de muestras preservadas en etanol al 90% y el grupo control. Al analizar por año la diferencia promedio de señal isotópica, se tiene que para el año 2007 es de  $-1.04\text{‰}$ , para 2008  $-0.86\text{‰}$  y para las muestras del año más reciente, 2009, no se encontraron diferencias significativas. En un estudio realizado por Kaehler y Pakhomov (2001), se encontraron diferencias significativas para los isótopos estables de carbono, en tres especies de invertebrados, preservados en etanol 70% a lo largo del tiempo. Por otro lado, en varios estudios se ha encontrado que el  $\delta^{13}\text{C}$  puede ser alterado significativamente por tratamiento con etanol, en concentraciones



por arriba del 70% (Hobson *et al.* 1997, Kaehler y Pakhomov 2001, Sarakinos *et al.* 2002, Feuchtmayr y Grey 2003, Barrow *et al.* 2008).

Es posible que la preservación en etanol 90% tenga efectos en la firma del isótopo de carbono del tejido debido a la pérdida de lípidos o proteínas, actuando como un disolvente de compuestos isotópicamente más ligeros presentes en las muestras (Kaehler y Pakhomov 2001, Arrington y Winemiller, 2002). Varios estudios han demostrado que la extracción de lípidos isotópicamente más ligeros del tejido analizado puede enriquecer el  $^{13}\text{C}$  presente en todo el cuerpo en un organismo (McCounnaughey y McRoy 1979, Doucett *et al.* 1999), resultando en valores menos negativos de  $\delta^{13}\text{C}$ , porque los lípidos contienen menos  $^{13}\text{C}$  que los tejidos del músculo (DeNiro y Epstein 1977, McConnaughey y McRoy 1979).

Se han sugerido diferentes mecanismos para explicar cómo es que la preservación altera los valores isotópicos de los tejidos, tales como el intercambio de isótopos ligeros por los pesados (Hobson *et al.* 1997, Edwards *et al.* 2002), la adición del carbono ligero desde el medio de preservación (Edwards *et al.* 2002), la extracción de lípidos (Syväranta *et al.* 2008) o la hidrólisis de proteínas durante la preservación (Arrington y Winemiller 2002; Sarakinos *et al.* 2002).

Las muestras probablemente incrementan su variación mientras más tiempo pasan preservadas, por lo que son necesarios más estudios para evaluar la influencia potencial de almacenar a largo plazo en los conservantes que se hayan utilizado o se pretenda utilizar, ya que por ejemplo el etanol 70% o en mayor concentración está asociado a cambios en la relación isotópica por lo que puede no ser apropiada para todos los tipos de tejidos. Como mencionan Kelly *et al.* (2006) el uso apropiado de muestras almacenadas en la reconstrucción de cadenas tróficas históricas requerirá la realización de experimentos específicos para cada especie y así determinar la naturaleza de los cambios inducidos por la preservación en las firmas isotópicas de los tejidos.

Los resultados presentados en este trabajo ilustran que analizar muestras de piel de ballena jorobada preservadas en diferentes medios (congeladas y etanol 90%) pueden resultar diferencias significativas, ya que el etanol induce el enriquecimiento de la señal isotópica de  $\delta^{13}\text{C}$ . Con base en este y los demás argumentos antes mencionados, y ya que el uso de



los factores de corrección que brinda la literatura (Post *et al.* 2007, McConnaughey y McRoy 1979, Lesage *et al.* 2010) no fueron posibles, se decidió aplicar un factor de corrección propuesto para muestras preservadas en etanol 90%. Por ello es necesario resaltar la importancia de realizar la evaluación de los efectos del método de preservación para cada estudio que así lo requiera, previo a la comparación de los valores isotópicos.

### **1.16 Variabilidad del $\delta^{13}\text{C}$ en piel de la ballena jorobada en la región de reproducción de B.C.S., México**

El  $\delta^{13}\text{C}$  es utilizado para indicar la contribución relativa de diferentes fuentes de producción primaria, diferenciando entre ambientes costeros o bentónicos (valores más positivos de  $\delta^{13}\text{C}$ ) de aquellos oceánicos o pelágicos (valores más negativos de  $\delta^{13}\text{C}$ ), así como un gradiente latitudinal, es mayor en latitudes medias que en latitudes altas (Rau *et al.* 1992, Hobson *et al.* 1994, Burton y Koch 1999, Post 2002, Newsome *et al.* 2010).

Los valores del  $\delta^{13}\text{C}$  estuvieron dentro del intervalo de -21.31‰ (temporada 2005) el más negativo a -16.07‰ (temporada 2004) el más enriquecido, estos valores se encuentran dentro de los intervalos reportados por Witteveen (2008), quien reporta un valor mínimo de -23.0‰ para la región de alimentación del Oeste del Golfo de Alaska y un valor máximo de -15.2‰ para la región de California-Oregón. Al no encontrar valores fuera de los intervalos mencionados para las regiones de alimentación, en los individuos muestreados en Baja California Sur, se considera que todos los valores isotópicos obtenidos corresponden a ballenas jorobadas que se alimentaron en regiones del Pacífico Norte.

Se descarta que los individuos analizados, en las temporadas que comprenden este estudio, se hayan alimentado en Baja California Sur. Esto con base en que los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  no fueron diferentes estadísticamente al comparar los meses que comprenden la temporada invernal. Considerando que la piel es un tejido con una tasa de recambio relativamente corta con respecto a otros tejidos como hueso o músculo, se considera que se habría hecho evidente una diferencia, en caso de haber existido eventos de alimentación, los cuales se



han reportado como esporádicos y oportunistas (Gendron *et al.* 1993, Walker *et al.* 1999). La tasa de recambio de piel es difícil calcular para animales en vida libre; sin embargo existen valores calculados para beluga (*Delphinapterus leucas*) en cautiverio es de 70 a 75 días, *Tusiops truncatus* en cautiverio cambia su señal de  $\delta^{13}\text{C}$  en piel de 11 a 23 días, para ballena azul (en vida libre) se calculó de tres meses, para ballena jorobada nunca ha sido medida o calculada, sin embargo para varios estudios se utiliza un aproximado de 7 a 14 días (Aubin *et al.* 1990, Todd 1997, Busquets 2008, Witteveen, 2008, Browning *et al.*, 2014).

La variación del isótopo de carbono puede verse influenciada por diversos factores. Los valores más enriquecidos de  $\delta^{13}\text{C}$  se encuentran cerca de la costa debido al aporte terrígeno, florecimientos de fitoplancton inducidos por la mezcla de la columna de agua y el consecuente aporte de nutrientes del fondo, que a su vez favorece la entrada de  $^{13}\text{C}$  enriquecido fijado por macrofitas bentónicas, las cuales están considerablemente más enriquecidas en  $^{13}\text{C}$  con respecto al fitoplancton (Michener y Schell 1994, France 1995). En contraste los valores menos enriquecidos de  $\delta^{13}\text{C}$  se dan en ecosistemas oceánicos donde el aporte de nutrientes es generalmente limitado, la tasa de crecimiento fitoplanctónico es baja y las macrofitas están ausentes, el  $\text{CO}_2$  acuoso incrementa (no es usado para la fotosíntesis) y el carbono orgánico de la base de la cadena trófica es más enriquecido en  $^{12}\text{C}$  (Rau *et al.* 1992, Hobson *et al.* 1994, Schell *et al.* 1998a, Burton y Koch 1999, Post 2002).

La variabilidad del isótopo de carbono en las ballenas jorobadas de Baja California Sur es de 5.24‰, se sabe que si los gradientes del isótopo de carbono costero-oceánico son generados principalmente por efecto de las tasas de crecimiento diferencial del fitoplancton, se presentan diferencias de 2-3‰; en caso de que los gradientes isotópicos estén soportados por la alta producción costera de macrofitas, podrían ser mucho más grandes, quizá 5-6‰ (France 1995). Por lo tanto este amplio intervalo de variabilidad en el  $\delta^{13}\text{C}$  pudiera indicar que algunas ballenas se están alimentando en zonas costeras y otras en zonas oceánicas, sin que sea posible en esta investigación diferenciar unas de otras, debido a que no se sabe con exactitud en qué región se alimentaron cada una de las ballenas muestreadas.

En las regiones de alimentación de las ballenas jorobadas del Pacífico Norte pueden ocurrir movimientos entre las zonas oceánicas y costeras. En este sentido se tienen registros en las



Islas Kodiak, Sureste del Golfo de Alaska y Prince William Sound. Prince William Sound es una región en la cual las ballenas jorobadas tienen hábitats costeros y oceánicos que se pueden diferenciar isotópicamente. También existen datos históricos del tiempo de la caza de ballenas que demuestran que las zonas oceánicas del Golfo de Alaska fueron ampliamente utilizadas por las ballenas jorobadas, así como por otras especies de grandes ballenas (Ivashchenko *et al.* 2007, Witteveen *et al.* 2011b).

Para el Pacífico Norte se tiene registrado un valor promedio de  $\delta^{13}\text{C}$  de  $-17.5 \pm 0.03\text{‰}$  para piel de ballena jorobada, mientras que en el Pacífico mexicano (Baja California Sur, Isla Revillagigedo y la zona continental) el valor promedio reportado es de  $-17.2 \pm 0.09\text{‰}$   $\delta^{13}\text{C}$ ; éste promedio incluye muestreos realizados en los años 2004 ( $-16.8 \pm 0.14\text{‰}$   $\delta^{13}\text{C}$ ), 2005 ( $-17.5 \pm 0.12\text{‰}$   $\delta^{13}\text{C}$ ) y 2006 ( $-17.5 \pm 0.16\text{‰}$   $\delta^{13}\text{C}$ ) (Witteveen *et al.* 2009b). En el presente estudio el valor promedio obtenido, para las ballenas jorobadas congregadas en las aguas de Baja California Sur, fue de  $-18.42 \pm 0.05\text{‰}$  para  $\delta^{13}\text{C}$ .

Los valores promedio de  $\delta^{13}\text{C}$  del Pacífico mexicano reportados en otros estudios difieren de los presentados en esta investigación, siendo los segundos más negativos o menos enriquecidos en 1.35‰ para 2004, 2005 en 1.1‰ y 2006 en 1.35‰. Esto puede deberse a la diferencia en número de muestras con el que se trabaja y/o a que el Pacífico mexicano incluye dos regiones más de reproducción aparte de Baja California Sur; sin embargo, con base en estudios anteriores en los que se menciona que la zona de Baja California Sur es un área de tránsito de las ballenas jorobadas en su camino de regreso a las áreas de alimentación, se considera poco probable que sea ésta última la razón de la diferencia.

En el presente estudio se trabajaron un total de 308 muestras en el periodo de 2004-2006 para la zona de reproducción de Baja California Sur, mientras que Witteveen *et al.* (2009b) lograron obtener 117 muestras para todo el Pacífico mexicano, de las cuales sólo 33 se obtuvieron en la región de Baja California Sur. Cabe mencionar que para la temporada 2005 no obtuvieron muestras para dicha zona. Es difícil hacer inferencias basadas en los valores de  $\delta^{13}\text{C}$ , debido a que el enriquecimiento trófico entre niveles es mucho menor que en el caso del nitrógeno (Witteveen *et al.* 2009b, González-Peral 2011).



### 1.17 Variabilidad del $\delta^{15}\text{N}$ en piel de la ballena jorobada en la región de reproducción de B.C.S. México

La señal de  $\delta^{15}\text{N}$  puede estar influenciada por diferentes factores como el factor de discriminación o enriquecimiento que puede verse afectado por diferencias fisiológicas y de la dieta (las cuales dependen de los procesos bioquímicos en el metabolismo e incorporación de nutrientes) y, por otra parte, los procesos oceanográficos que modifican el nitrógeno inorgánico disuelto en algunas regiones, el cual es utilizado por el fitoplancton, como por ejemplo los nitratos, nitritos y amonio (Gannes *et al.* 1997, Martínez del Río *et al.* 2009).

Los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  variaron desde las 9.85 a las 17.73‰, obteniendo un intervalo de 7.88‰, el cual pudiera ser indicativo de variación entre las dietas o entre regiones de alimentación de las ballenas muestreadas, sin embargo las verdaderas diferencias en el nivel trófico no pueden determinarse sin establecer el valor  $\delta^{15}\text{N}$  en las bases de las redes alimenticias regionales (Schell *et al.* 1998, Post 2002, Witteveen *et al.* 2009b). Por otro lado en estudios anteriores en piel de ballenas jorobadas muestreadas en regiones de alimentación del Pacífico Norte se tienen intervalos de valores isotópicos que van desde las 7.4‰ de un individuo muestreado en el Mar de Bering hasta el valor más alto se encontrado en California-Oregón con 16.6‰, el cual es similar al mencionado con anterioridad para las ballenas jorobadas de Baja California Sur (Calambokidis *et al.* 2001, Witteveen *et al.* 2009a).

Debido a que las ballenas jorobadas no se alimentan en sus regiones de reproducción, los valores de las proporciones del isótopo de nitrógeno obtenidos en el presente trabajo indican los valores isotópicos de sus regiones de alimentación. Esto queda comprobado al observar que los valores de  $\delta^{15}\text{N}$ , entre los meses que comprenden la temporada invernal, no evidenciaron diferencias significativas. Recordemos que, como se mencionó para el  $\delta^{13}\text{C}$ , aun cuando se han registrado eventos aislados de alimentación en las regiones de reproducción, se necesita un tiempo aproximado de entre 7 y 30 días para que se registren cambios la señal isotópica de la piel en cetáceos. Para el caso del  $\delta^{15}\text{N}$  en piel de tursión en



cautiverio se calculó de 14 a 23 días el cambio en la señal isotópica (Aubin *et al.* 1990, Gendron *et al.* 1993, Todd 1997, Busquets 2008, Witteveen, 2008, Browning *et al.*, 2014).

Al comparar el valor promedio de  $\delta^{15}\text{N}$  ( $13.85 \pm 0.07$  ‰) en la piel de la ballena jorobada, en ocho temporadas de reproducción en Baja California Sur, con el reportado en trabajos anteriores en el Pacífico mexicano ( $13.3 \pm 0.13$ ), durante tres temporadas de muestreo; es evidente que la diferencia de 0.5‰ es pequeña. Lo anterior a partir de que, para poder inferir un cambio de nivel trófico entre valores isotópicos, debe presentarse una diferencia alrededor de 3-5‰ (DeNiro y Epstein 1981, Post 2002, Bearhop *et al.* 2004). Aun cuando se desconoce el origen migratorio de las ballenas muestreadas en el presente trabajo, los individuos que llegan a las aguas de Baja California Sur, están consumiendo y asimilando proporciones similares de un amplio conjunto de presas, en donde las señales isotópicas son incorporadas a la piel de las ballenas jorobadas.

Las ballenas jorobadas pueden ser vistas alimentándose desde Rusia, Islas Aleutianas, Golfo de Alaska hasta California, sitios que representan a una gran variedad de ecosistemas con diferencias biogeoquímicas a nivel de material orgánico particulado, donde se encuentra la base alimenticia de las redes tróficas (Calambokidis *et al.* 2001, Altabet 2001, Witteveen 2008) y que en el Pacífico Norte los valores isotópicos del nitrógeno son mayores a latitudes medias, debido posiblemente a que las aguas intermedias en la Corriente de California acarrear nutrientes ( $\text{NO}_3^-$ ) del Pacífico Este tropical, donde se presenta un fuerte proceso de denitrificación a grandes profundidades (Altabet 2001, Voss *et al.* 2001).

También tomando en cuenta que los valores promedio de  $\delta^{15}\text{N}$  en la piel de ballena jorobada en las regiones de alimentación del Pacífico Norte, van desde un valor promedio de  $14.7 \pm 0.09$  ‰ en la región de California-Oregón (donde se alimentan en mayor proporción de peces, niveles trófico altos) hasta  $11.4 \pm 0.25$  ‰ que corresponden a la región del Oeste de las Islas Aleutianas (lugar en el que se alimentan en mayor proporción de zooplancton) (Witteveen 2008, Witteveen *et al.* 2011a), se observa que los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  han mostrado una variación coherente con los patrones geográficos. En el Pacífico Noreste las variaciones ocurren en decremento de 2-3‰ en el  $\delta^{15}\text{N}$  de zonas templadas ( $\sim 30\text{-}35^\circ\text{N}$ ) a altas latitudes ( $\sim 50^\circ\text{N}$ ) en ecosistemas pelágicos (Saino y Hattori 1987,



Aurioles *et al.* 2006). Aun cuando algunos autores explican los gradientes latitudinales en los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  del fitoplancton como una consecuencia de la baja concentración de amonio y nitrito en las áreas tropicales, otros autores creen que las razones de dicho enriquecimiento del  $^{15}\text{N}$  con el incremento de la latitud es aún incierto (Wada y Hattori 1991, Rubenstein y Hobson 2004).

Debido a que dichos patrones latitudinales se observan en varios estudios, el intervalo en los valores de isótopos estables en piel de los individuos de ballena jorobada presentada en este trabajo pudiera ser indicativo de una variación individual en la dieta y de una amplia gama de sitios de procedencia, que pudieran ir desde sitios norteños como las islas Aleutianas hasta regiones como California-Oregón-Washington.

### **1.18 Variabilidad en el $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ en piel de ballena jorobada dependiendo el sexo**

En estudios anteriores, donde se analizan el  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  en piel de ballena jorobada, no se encuentran diferencias significativas entre hembras y machos en zonas de alimentación (Witteveen 2008, Witteveen *et al.* 2009a, 2009b, 2012, Fleming *et al.* 2016). Las diferencias encontradas se atribuyen a diferencias a nivel metabólico entre sexos, no a una zonificación y/o a que se alimenten de algunas presas los machos y de otras las hembras.

La ballena jorobada que arriba a las aguas de Baja California Sur llega a aparearse y dar a luz a sus crías, por esta razón se relacionan las diferencias significativas entre machos y hembras a diferencias a nivel metabólico entre sexos.

La demanda de energía durante la reproducción de las hembras adultas es alta y generalmente las ballenas están expuestas a un intenso estrés nutricional, como resultado, es probable que las hembras adultas se ajusten a las demandas energéticas metabolizando sus propias proteínas, lo cual genera un enriquecimiento de  $^{15}\text{N}$  en los tejidos como resultado de la reutilización de las proteínas (Hobson y Clark, 1993; Hobson *et al.*, 1993).



La necesidad de ingesta y la calidad del alimento es optimizado en las regiones de alimentación para sostener la migración y el comportamiento de apareamiento y, para hembras, la lactancia y la preñez (Witteveen *et al.* 2012).

Las consecuencias isotópicas del crecimiento, preñez y lactancia han sido poco estudiadas, por lo que se muestran estudios realizados en los que se encontró evidencia en el isótopo de nitrógeno. Se esperaría que los animales en crecimiento, embarazados o lactantes pierdan relativamente menos nitrógeno corporal como desechos urinarios y por lo tanto tengan valores bajos de  $\delta^{15}\text{N}$ . Estudios con caballos reportan que las hembras lactantes mostraron valores bajos de  $\delta^{15}\text{N}$  en comparación con otros adultos machos y hembras no lactantes (Koch 1997). Kurle (2002) reporta valores de  $\delta^{15}\text{N}$  en sangre de un lobo fino de Alaska *Callorhinus ursinus* aproximadamente 1‰ más bajos al de las hembras nulíparas. En otro estudio donde se analizó el pelo de 10 hembras humanas Fuller *et al.* (2004) reportan variaciones del  $\delta^{15}\text{N}$  en hembras embarazadas, encontraron que los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  descendieron entre 0.3 a 1.1‰ desde la concepción hasta el nacimiento. Estos valores coinciden con la diferencia encontrada en el presente estudio para dicho isótopo, en el que los valores promedio de los machos fueron más altos que los de las hembras en 0.39‰.

### **1.19 Variabilidad en el $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ en piel de ballena jorobada en la región de B.C.S. y relación con sus orígenes migratorios**

La extensión total de la diversidad trófica dentro en la red alimentaria de la ballena jorobada, para cada temporada se observa en la Figura 14 (Layman *et al.* 2007). Las elipses reflejan áreas grandes del nicho isotópico, coincidiendo con lo encontrado con Ryan *et al.* (2013) quienes al comparar el nicho isotópico de tres rorcuales encuentran que la ballena jorobada, a diferencia de la ballena Minke (*Balaenoptera acutorostrata*) y la ballena de aleta (*Balaenoptera physalus*), ocupa el nicho isotópico más amplio. Esta amplitud de nicho aunado al amplio rango en los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  y  $\delta^{13}\text{C}$  puede ser resultado de la alimentación en más de un sitio geográfico o a un conjunto de composiciones isotópicas en la línea base a lo largo del Pacífico Norte, de posibles eventos de alimentación a lo largo de la migración



o incluso a diferencias en el fraccionamiento isotópico a nivel metabólico así como al asociado al catabolismo (Hobson *et al.* 1993, 2004, Gannes *et al.* 1997, Witteveen *et al.* 2009a, 2009b, Ryan *et al.* 2013).

Las condiciones oceanográficas que ocurrieron durante el periodo de alimentación de las ballenas jorobadas del presente estudio ayudan a explicar de la variabilidad interanual de las razones isotópicas de carbono y nitrógeno encontradas. En el Sistema de la Corriente de California existe una relación lineal positiva entre el  $\delta^{15}\text{N}$  y la temperatura superficial del mar, la cual indica que en años más cálidos resultan en niveles tróficos más altos para ballenas jorobadas y que el  $\delta^{15}\text{N}$  también decrece junto con la abundancia de krill. En cuanto al  $\delta^{13}\text{C}$  sus valores incrementan con la abundancia de anchoveta y declina con forme incrementan las surgencias, cuando la Oscilación Decadal del Pacífico (ODP) entra a una fase positiva, la dieta de las ballenas jorobadas es dominada por krill, dando como resultado una relación ligeramente negativa entre la fase positiva del ODP y los valores del  $\delta^{13}\text{C}$  (Fleming *et al.* 2016).

Como se puede ver en la tabla 4 los valores promedio para las temporadas con diferencias significativas son los más enriquecidos en  $^{13}\text{C}$ , lo cual coincide con los eventos oceanográficos que se observaron en esos años. En 2004 la temperatura superficial del mar fue más cálida en el verano ocasionando que las surgencias se retrasaran; la OPD estuvo en una fase positiva, lo cual estuvo asociado a corrientes polares fuertes, estas condiciones ocasionaron que el krill al inicio de la temporada de alimentación estuviera muy al norte y por lo tanto se perdiera el afloramiento óptimo en primavera para el forrajeo, registrándose abundancias de krill anómalamente bajas. Con base en estas condiciones y en específico por las temperaturas cálidas, la población de sardinas y anchovetas se incrementaron y en específico la sardina migró más al norte de su intervalo normal (Brodeur *et al.* 2006, Mackas *et al.* 2006, Schwing *et al.* 2006, Barth *et al.* 2007, Dorman *et al.* 2011, Zwolinski *et al.* 2012, Fleming *et al.* 2016).

En 2010 y 2011 el krill se presentó en altas densidades; mientras que la sardina y la anchoveta tuvieron una abundancia anómalamente baja a través del sistema de la Corriente de California, lo cual se contrapone con los resultados obtenidos en el presente trabajo en los que el  $\delta^{13}\text{C}$  sigue presentando valores menos negativos que el resto de las temporadas, y



se esperaría que debido a la alta disponibilidad de krill, la señal del isótopo de carbono en las ballenas jorobadas fuera más negativo. Sin embargo los valores promedio obtenidos para el  $\delta^{15}\text{N}$  en la temporada 2011 coinciden con una dieta alta en krill (Fig. 14, elipse gris), ya que fueron más enriquecidos que en el resto de las temporadas muestreadas; este mismo comportamiento se presentó con los valores de ballenas jorobadas muestreadas a lo largo de la Corriente de California en los mismos años por Fleming *et al.* (2016).

Gu *et al.* (1997) y Bearhop *et al.* (2004) señalan que una vez que se hayan identificado las fuentes de variación más significativas independientes de la dieta, la varianza del  $\delta^{15}\text{N}$  puede ser un buen indicador de la amplitud del nicho y del estatus trófico de los depredadores, debido a que esta integra la información de las presas asimiladas. Utilizando los datos isotópicos, la dieta en la temporada 2011 parece ser reducida en amplitud, cuando es evaluada mediante los valores del  $\delta^{15}\text{N}$ , en la figura 14 (elipse gris) se observa que es corta tanto en los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  como de  $\delta^{13}\text{C}$  lo cual sugiere que la ballena jorobada ocupa un nicho trófico menos amplio en esa temporada.

En la temporada 2010 pudieran estarse reflejando valores de  $\delta^{13}\text{C}$  más enriquecidos debido a que el krill en ese año pudiera haber presentado valores ligeramente elevados de  $\delta^{13}\text{C}$ . Esto lo explican Fleming *et al.* (2016) por medio de tres escenarios. En 2010 se presentó un incremento de surgencias en junio y julio como resultado de una transición entre un breve periodo de El Niño a un periodo de La Niña, lo cual pudo ocasionar que los eufáusidos estuvieran más próximos a la costa enriqueciendo las cadenas alimenticias en  $\delta^{13}\text{C}$  comparado con hábitats pelágicos (Checkey y Barth 2009, Bjorkstedt *et al.* 2011). En 2010 la composición de los copépodos fue dominada por especies menos ricas en lípidos, lo cual podría haber elevado la firma del  $\delta^{13}\text{C}$  observada en las ballenas jorobadas ese invierno. Por último, en 2010 se presentó un ODP positivo que como ya se había mencionado, está asociado a corrientes fuertes hacia el norte, lo cual pudiera haber dado lugar a que especies subtropicales de krill (*Nyctiphanes simplex*) estuvieran presentes en el Sistema de la Corriente de California (Di Lorenzo y Ohman 2013).

La técnica de isótopos estables de carbono y nitrógeno puede ser usada para distinguir las regiones de alimentación de las ballenas jorobadas en el Pacífico Norte, teniendo en cuenta que los valores isotópicos de las regiones de alimentación varían significativamente con



respecto a la latitud, debido a que en regiones frías, el  $\text{CO}_2$  acuoso es alto debido a las bajas tasas fotosintéticas estacionales, la mezcla vertical de la columna de agua no es fuertemente estratificada y la solubilidad del  $\text{CO}_2$  es alta; en estas condiciones el fraccionamiento asociado con la absorción de  $\text{CO}_2$  fotosintético se expresa conduciendo a valores bajos de  $\delta^{13}\text{C}$  (Schell *et al.* 1998, Witteveen *et al.* 2009b).

La diferencia entre el valor promedio menos enriquecido de  $^{13}\text{C}$  (CA-OR) y el más enriquecido, mostrado por las ballenas del WGOA y Bering fue de 1.9%. Diferencia que es muy cercana a la disminución de 2% que se presenta a través del inicio del talud continental en el sureste del Mar de Bering en los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  de zooplancton y eufáusidos del este al oeste del Pacífico Norte (Schell *et al.* 1998, Calambokidis *et al.* 2001, Witteveen 2008, Witteveen *et al.* 2009b, Newsome *et al.* 2010).

La proporción de recapturas que se obtuvieron fue mayor para las regiones de alimentación de CA-OR, NGOA y SEAK (6, 5 y 3 ballenas foto-recapturadas respectivamente), lo cual coincide con lo encontrado en otros estudios en los que mencionan que las ballenas jorobadas de las aguas de B.C.S, tienen como destino migratorio principal a California-Oregón y Washington. Sin embargo, en otros estudios, utilizando análisis genéticos, la región del Oeste del Golfo de Alaska la mencionan como principal destino migratorio seguido por California y Oregón. Por medio de foto-identificación Washington y el Sur de la Columbia Británica, seguidos por California y Oregón y después las Islas Aleutianas son los principales destinos migratorios (Urbán 2000, Calambokidis *et al.* 2001, González-Peral 2008, Witteveen 2008, Witteveen *et al.* 2009b).

Se reconocen varias limitaciones en el uso de la técnica de isótopos estables, generalmente asociadas con la aplicación de la valoración de toda una comunidad sin contar con la variación temporal y espacial en las firmas isotópicas de las presas, especialmente debido a la baja fidelidad de las ballenas jorobadas a las regiones donde llevan a cabo la reproducción y la crianza comparada con su fidelidad a las regiones de alimentación, por ejemplo, una ballena que se alimenta en el SEAK puede migrar a Hawái, Islas Revillagigedo o a Baja California Sur. Sin embargo se cree que la herramienta de foto-identificación pudiera ser un valioso complemento para vincular hábitats, en caso de no conocer la procedencia de las firmas isotópicas y sólo contar con muestras para el análisis



de isótopos estables de regiones donde no se alimenta el animal migratorio (Post 2002, Urbán *et al.* 2000, Calambokidis *et al.* 2001, Witteveen *et al.* 2004, González-Peral 2008, Lagerquist *et al.* 2008).

Tal es el caso en el presente estudio, en el que se observó una relación importante entre los valores isotópicos promedio de las regiones de alimentación y los valores isotópicos de los individuos recapturados en el área de Baja California Sur. Esta relación fue más evidente para el  $\delta^{13}\text{C}$  que para el  $\delta^{15}\text{N}$ . Sin embargo son una prueba de que la señal isotópica obtenida en la región de Baja California Sur es un reflejo de la señal obtenida por los individuos en sus regiones de alimentación.

Es muy importante conocer la variación temporal y espacial en las firmas isotópicas de posibles fuentes alimentarias y cómo contribuyen a la variación de las firmas isotópicas de las ballenas jorobadas ya que éstas influyen en su posición en el espacio del nicho. La variación de la señal isotópica no sólo depende de la dieta, también se deben tomar en cuenta los factores que afectan la asimilación de los alimentos en el tejido analizado (DeNiro y Epstein 1981, Vanderklift y Ponsard 2003).



## Conclusiones

- El método de preservación en etanol al 90% disminuyó la señal del  $\delta^{13}\text{C}$  en  $-0.92\%$ , por lo que se aplicó un factor corrección para las muestras preservadas en etanol al 90%.
- Los valores promedio de isótopos estables de carbono y nitrógeno en la piel de la ballena jorobada que arriba a las aguas de Baja California Sur fueron de  $\delta^{13}\text{C}$   $-18.42 \pm 0.05\%$  y  $\delta^{15}\text{N}$   $13.85 \pm 0.07\%$ , coincidiendo con lo reportado para esta región.
- Los valores del  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  en piel de las ballenas jorobadas fueron diferentes significativamente entre las temporadas de muestreo. El  $\delta^{13}\text{C}$  para las temporadas 2004, 2010 y 2011 presentó los valores menos negativos y el  $\delta^{15}\text{N}$  de la temporada 2011 mostró los valores más altos. Lo cual se atribuyó a cambios oceanográficos presentes en el Pacífico Norte a lo largo de los años 2004, 2010 y 2011.
- No se encontraron variaciones en las señales de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  a lo largo de su estancia en la región de Baja California Sur, siendo claro indicio de que no se alimentaron en la región de Baja California Sur. Por lo que la señal en la piel de las ballenas jorobadas, fue reflejo consistente de su origen migratorio.
- Las diferencias encontradas entre machos y hembras se atribuyen a disimilitudes a nivel metabólico, no a orígenes migratorios distintos o a dietas dispares por sexo. Debido a que en ninguno de los dos isótopos la diferencia es mayor a  $0.4\%$ .
- Las ballenas que arribaron a aguas de Baja California Sur en las temporadas 2004 y 2005 procedieron en su mayoría de California, Oregón y del Norte y Sureste del Golfo de Alaska. Los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  de las ballenas recapturadas indicaron una relación fuerte entre los valores promedio de sus orígenes migratorios y la señal isotópica que mostraban en la región de Baja California Sur.



## Referencias bibliográficas

- Altabet**, M.A. 2001. Nitrogen isotopic evidence for micronutrient control of fractional  $\text{NO}_3$  utilization in the equatorial Pacific. *Limnol. Oceanogr.* 46(2), 368-380.
- Angliss**, R.P. and Lodge, K.L., 2003. Humpback whale (*Megaptera novaeangliae*); Western North Pacific Stock. Alaska Marine Mammal Stock Assessments. NOAA-TM-AFSC-144.
- Angliss**, R.P. and Outlaw, R.B., 2008. Alaska marine mammal stock assessments, 2007. NOAA Tech Memo NMFS-AFSC-180, 263p.
- Arrington**, D.A., and Winemiller, K.O. 2002. Preservation effects on stable isotope analysis of fish muscle. *Trans Am Fish Soc* 131:337–342.
- Aubin**, D.J., Smith, T.G. and Geraci, J.R. 1990. Seasonal epidermal molt in beluga whales, *Delphinapterus leucas*. *Can. J. Zool.* 68(2):359-367.
- Aurioles**, D., Koch, P.L., Le Bueuf, B.J. 2006. Differences in foraging location of Mexican and California elephant seals, evidence from stable isotopes in pups. *Mas Mamm Sci* 22:326-338.
- Baker**, C. S., Perry, A., Bannister, J.L., Weinrich, M.T., Abernethy, R.B., Calambokidis, J., Lien, J., Lambersten, R.H., Urbán, J., Vasquez, O., Clapham, P.J., Alling, A., O'Brien, S.J. and Palumbi S.R. 1993. Abundant mitochondrial DNA variation and world-wide population structure in humpback whales. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America. Evolution.* Vol. 90: 8239-8243.
- Baker**, C. S., Slade, R., Bannister, J.L., Abernethy, R.B., Weinrich, M.T., Lien, J., Urbán, J., Corkeron, P., Calambokidis, J., Vazquez O., and Palumbi, S. R. 1994. Hierarchical structure of mitochondrial DNA gene flow among humpback whales *Megaptera novaeangliae*, world-wide. *Molecular Ecology.*, (3): 313-327.



- Baraff, C.S., Clapham, P.J., Mattila, D.K., and Bowman, R.S.** 1991. Feeding behavior of a humpback whales in low latitude waters. *Mas Mamm Sci* 7:197-202.
- Barlow, J., Calambokidis, J., Baker, S.C., Burdin, M.A., Clapham, J.P., Ford, B.J., Gabriele, M.S., LeDuc, R., Mattila, K.D., Quinn II, J.T., Rojas-Bracho, L., Straley, M.J., Taylor, L.B., Urbán, R.J., et al.** 2011. Humpback whale abundance in the North Pacific estimated by photographic capture-recapture with bias correction from simulation studies. *Marine Mammal Science*. 1-26.
- Barrow, L., Bjorndal, K.A. and Reich, K.J.** 2008. Effects of preservation method on stable carbon and nitrogen isotope values. *Physiological and Biochemical Zoology*. 81(5):688-693.
- Barth, J.A., Menge, B.A, Lubchenco, J., Chan, F., Bane, J., Kirincich, R., McManus, M., Nielsen, K., Pierce, S. y Washburn.** 2007. Delayed upwelling alters nearshore coastal ocean ecosystems in the northern California current. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 3719–3724.
- Bearhop, S., Adams, C., Waldron, S., Fuller, R., and Macleod, H.** 2004. Determining trophic niche width: a novel approach using stable isotope analysis. *Journal of Animal Ecology*. 73: 1007-1012.
- Best, P.B., and Schell, D.M.** 1996. Stable isotopes in south right whale (*Eubalaena australis*) baleen as indicators of seasonal movements, feeding and growth. *Mar Biol* 124:483-494.
- Bjorkstedt, E.P., Goericke, R., McClatchie, S., Webe, E., Watson, W., Lo, N., Peterson, B., Emmet, B., Brodeur, R., Peterson, J., Litz, M., et al.** 2011. State of the California Current 2010–2011: regionally variable responses to a strong (but fleeting?) La Niña. *California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports*, 52, 36–68.
- Bosley, K.L., and Wainright, S.C.** 1999. Effects of preservation and acidification on the stable isotope ratios ( $^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$ ) of two species of marine animals. *Can J Fish Aquat Sci* 56: 2181–2185.



- Born, E.W.,** Outrige, P., Riget, F.F., Hobson, K.A., Dietz, R., Oien, N., and Haug, T. 2003. Population substructure of north Atlantic minke whales (*Balaenoptera acutorostrata*) inferred from regional variation of elemental and stable isotopic signatures in tissues. *J. Mar Syst* 43:1-17.
- Brodeur, R.D.,** Ralston, S., Emmett, R.L., Trudel, M., Auth, T.D., and Phillips, A.J. 2006. Anomalous pelagic nekton abundance, distribution, and apparent recruitment in the northern California Current in 2004 and 2005. *Geophysical Research Letters*, 33, L22S08.
- Brodeur, R.D.,** Suchman, C.L., Reese, D.C., Miller, T.W., and Daly, E.A. 2008. Spatial overlap and trophic interactions between pelagic fish and large jellyfish in the northern California Current. *Marine Biology*, 154, 649–659.
- Burton, R.K.,** and Koch, P.L. 1999. Isotopic tracking of foraging and long-distance migration in northeastern Pacific pinnipeds. *Oecologia* 119:578-585.
- Busquets, V. G.** 2008. Variabilidad de Isotopos estables de Nitrógeno y Carbono en piel de ballena azul (*Balaenoptera musculus*). Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICMAR). Instituto Politécnico Nacional. 79 pp.
- Browning, N.E.,** Dold, C., I-Fan, J. y Worthy, G.A.J. 2014. Isotope turnover rates and diet-tissue discrimination in skin of *ex situ* bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Journal of Experimental Biology* 217,214-221.
- Calambokidis, J.,** Steiger, G.H., Evenson, J.R., Flynn, K.R., Balcomb, K., Claridge, D., Bloedel, P., Straley, J., Baker, J., Ziegesar, O., Dahlheim, M., Waite, J., Darling, J., Ellis, G. and Elli, G. 1996. Interchange and isolation of humpback whales off California and other North Pacific feeding grounds. *Mar Mamm Sci* 12:215–226.
- Calambokidis, J.,** Steiger, G. H., Straley, J. M., Herman, L. M., Cerchio, S., Salden, D. R., Urban J., Jacobsen, J. K., *et al.* 2001. Movements and population structure of humpback whales in the North Pacific. *Mar. Mammal Sci.* 17(4): 769-794.



- Calambokidis, J.,** Falcone, E., Quinn, T. J., Burdin, A. M., Clapham, P. J., Ford, J., Gabriele, C. M., LeDuc, R., Mattila, D., Rojas-Bracho, L., Straley, J. M., Taylor, B. L., Urban J., *et al.* 2008. SPLASH: Structure of Populations, Levels of Abundance and Status of Humpback Whales in the North Pacific. Final report for Contract AB133F-03-RP-00078 for U.S. Dept of Commerce, Western Administrative Center, Seattle, Washington. 57 pp.
- Checkley, D.M.,** and Barth, J.A. 2009. Patterns and processes in the California Current system. *Progress in Oceanography*, 83, 49–64.
- Cerling, T.E.,** Wittemyer, G., Rasmussen, H.B., Vollrath, F., Cerling, C.E., Robinson, T.J., and Douglas-Hamilton, I. 2006. Stable isotope in elephant hair document migration patterns and diet changes. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:371-373.
- Das, K.,** Lepoint, G., Loizeau, V., Debacker, V., Dauby, P., and Bouquegneau, J. 2000. Tuna and dolphin associations in the northeast Atlantic: evidence of different ecological niches from stable isotope and heavy metal measurements. *Mar. Poll. Bull.* 40(2):102-109.
- DeNiro, M.J.** and Epstein, S. 1977. Mechanisms of carbon isotope fractionation associated with lipid synthesis. *Science*. 197: 261-263.
- DeNiro, M.J.** and Epstein S. 1981. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 45:341-351.
- Di Lorenzo, E.,** and Ohman, M.D. 2013. A double-integration hypothesis to explain ocean ecosystem response to climate forcing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 2496–2499.
- Díaz-Gamboa, R. E.** 2003. Diferenciación entre tursiones *Tursiops truncatus* costeros y oceánicos en el Golfo de California por medio de isótopos estables de carbono y nitrógeno. Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICMAR). Instituto Politécnico Nacional. 62 pp.



- Dorman**, J.G., Powell, T.M., Sydeman, W.J., and Bograd, S.J. 2011 Advection and starvation cause krill (*Euphausia pacifica*) decreases in 2005 Northern California coastal populations: implications from a model study. *Geophysical Research Letters*, 38, L04605.
- Doucett**, R.R., Booth, R.K., Power, G. and McKinley, R.S. 1999. Effects of the spawning migration on the nutritional status of anadrimus Atlantic salmon (*Salmo salar*): insights from stable isotope analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 56: 2172-2180.
- Edwards**, M. S., Turner, T. F. and Sharp, Z. D. 2002. Short- and long-term effects of fixation and preservation on stable isotope values ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{34}\text{S}$ ) of fluid-preserved museum specimens. *Copeia* 4: 1106–1112.
- Fleming**, A.H., Clark, C.T., Calambokidis, J., and Barlow, J. 2016. Humpback whale diets respond to variance in ocean climate and ecosystem conditions in the California Current. *Global Change Biology* 22, 1214-1224.
- Filatova**, O.A., Witteveen, B.H., Goncharov, A.A., Tiunov A.V., Servertsov, A.N., Goncharova, A.I., Burdin, A.M., and Hoyt, E. 2013. The diets of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) on the shelf and oceanic feeding grounds in the western North Pacific inferred from stable isotope analysis. *Marine Mammal Science*. 29(3):E253-E265.
- France**, R. L. 1995. Carbon-13 enrichment in benthic compared to planktonic algae foodweb implications. *Marine Ecology Progress Series*. 124: 307-312.
- Fuller**, B. T., Fuller, J.L., Sage, N.E., Harris, D.A., O’Connell T.C., and Hedges, R.E.M. 2004. Nitrogen balance and  $\delta^{15}\text{N}$ : Why you’re not what you eat during pregnancy. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 18:2889–2896.
- Furness**, R.W., Crane, J.E., Bearhop, S., Garthe, S., Käelä, A., Käelä, R., Kelly, A., Kubetzki, U., Votier, A. and Waldron, S. 2006. Techniques to link individual migration patterns of seabirds with diet specialization, condition and breeding performance. *Ardea* 94:631–638.



- Gannes, L.Z., O'Brien D.M., and Del Rio C.M.** 1997. Stable isotopes in animal ecology: assumptions, caveats, and a call for more laboratory experiments. *Ecology* 78: 1271–1276.
- Gendron, D. and Urbán, R.J.**, 1993. Evidence of feeding by humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) in the Baja California breeding ground, México. *Marine Mammal Science* 9: 76-81.
- Gendron, D., Aguiñiga, S., and Carriquiry, J.D.** 2001.  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  in skin biopsy samples: a note on their applicability for examining the relative trophic level in three orqual species. *J Cetacean Res Manag* 3:41-44.
- Goericke, R. and Fry B.** 1994. Variations of marine plankton  $\delta^{13}\text{C}$  with latitude, temperature, and dissolved  $\text{CO}_2$  in the world ocean.
- González-Peral, U.A.** 2011. Definición y características de las unidades poblacionales de las ballenas jorobadas que se congregan en el Pacífico Mexicano. Tesis para obtener el grado de doctor en ciencias. Universidad Autónoma de Baja California Sur. 92pp.
- Gu, B., Schelske, C. L. and Hoyer, M. V.** 1997. Intrapopulation feeding diversity in blue tilapia: evidence from stable-isotope analyses. *Ecology*. 78:2263–2266.
- Guerrero, J.F.** 2008. Variación en la dieta de los cachalotes del Golfo de California con base en isótopos estables de carbono y nitrógeno. Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICMAR). Instituto Politécnico Nacional. 67pp.
- Gunnarsson, T.G., Gill, J.A., Newton, J., Potts, P.M., and Sutherland, W.J.** 2005. Seasonal matching of habitat quality and fitness in a migratory bird. *Proc R Soc Biol Sci Ser B* 272:2319-2323.
- Hobson, K.A.** 1999. Tracing origins and migration of wild- life using stable isotopes: a review. *Oecologia* 120: 314–326.
- Hobson, K.A.** 2006. Establishing migratory connectivity and seasonal interactions using stable isotopes. *J Ornithol* 147:52-53.



- Hobson, K.A., and Clark, R.W.** 1992. Assessing avian diets using stable isotopes. I. Turnover of carbon-13. *Condor* 94:181±188.
- Hobson, K.A., Alisauskas, R.T., and Clark, R.G.** 1993. Stable-nitrogen isotope enrichment in avian tissues due to fasting and nutritional stress: implications for isotopic analyses of diet. *Condor* 95: 388–394.
- Hobson, K.A., Piatt, J.F., and Pitocchelli, J.** 1994. Using stable isotopes to determine seabird trophic relationships. *J Anim Ecol* 63:786-798.
- Hobson, K.A., Gibbs, H.L. and Gloutney, M.L.** 1997. Preservation of blood and tissue samples for stable-carbon and stable-nitrogen isotope analysis. *Can J Zool* 75:1720–1723.
- Hobson, K.A., Riget, F., Outridge, P., Dietz, R., and Born, E.** 2004. Baleen as a biomonitor of mercury content and dietary history of North Atlantic minke whales (*Balaenoptera acutorostrata*): combining elemental and stable isotope approaches. *Sci Total Environ* 331: 69–82.
- Hoekstra, P.F., Dehn, L.A., George, J.C., Solomon K.R., Muir D.C., and O’Hara, T.M.** 2002. Trophic ecology of bowhead whales (*Balaena mysticetus*) compared with that of other arctic marine biota as interpreted from carbon-, nitrogen-, and sulfur-isotope signatures. *Canadian Journal of Zoology*. 80:223-231.
- Ivashchenko, Y.V., Clapham, P.J., and Brownell, R.L.** 2007. Scientific reports of Soviet whaling expeditions, 1955–1978. NOAA Tech Memo NMFS-AFSC-175, US Dept Commerce, Seattle, WA
- Jaume, S.** 2004. Hábitos alimentarios del rorcual común *Balaenoptera physalus* en el Golfo de California mediante el uso de isotopos estables de nitrógeno y carbono. Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICMAR). Instituto Politécnico Nacional. 63 pp.



- Jackson**, A.L., Inger, R., Parnell, A.C., and Bearhop, S. 2011. Comparing isotopic niche widths among and within communities: SIBER – Stable Isotope Bayesian Ellipses in R. *Journal of Animal Ecology*. 80,595-602.
- Kaehler**, S. and Pakhomov, E.A. 2001. Effects of storage and preservation on the  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  signatures of selected marine organisms. *Marine Ecology Progress Series*. 219: 299-304.
- Kelly**, B., Dempson, J.B. and Power, M. 2006. The effects of preservation on fish tissue stable isotope signatures. *Journal of Fish Biology*. 69, 1595-1611.
- Kurle**, C. M. 2002. Stable-isotope ratios of blood components from captive northern fur seals (*Callorhinus ursinus*) and their diet: Applications for studying the foraging ecology of wild otariids. *Canadian Journal of Zoology* 80:902–909.
- Laerm**, J., Wenzel, F., Craddock, J.E., Weinand, D., McGurk, J., Harris, M.J., Early, G.A., Mead, J.G., Potter, C.W., and Barros, N.B. 1997. New prey species for northwestern Atlantic humpback whales. *Marine Mammal Science*. 13:705-711.
- Lagerquist**, B.A., Mate, B.R., Ortega-Ortiz, J.G., and Winsor, M. 2008. Migratory movements and surfacing rates of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) satellite tagged at Socorro Island, Mexico. *Mar Mamm Sci* 24:815–830.
- Layman**, C.A., Arrington, D.D., Montaña, C.G., and Post, D.D. 2007. Can stable isotope ratios provide for community-wide measures of trophic structure? *Ecology*. 88(1) 44-48.
- Lesage**, V., Morin, Y., Rioux, E., Pomerleau, C., Ferguson, S.H., and Pelletier, E. 2010. Stable isotopes and trace elements as indicators of diet and habitat use in cetaceans: predicting errors related to preservation, lipid extraction, and lipid normalization. *Marine Ecology Progress Series*. 419: 249-265.
- Mackas**, D.L., Peterson, W.T., Ohman, M.D., and Lavaniegos, B.E. 2006. Zooplankton anomalies in the California Current system before and during the warm ocean conditions of 2005. *Geophysical Research Letters*, 33, L22S07.



- Marra, P.P., Hobson, K.A., and Holmes, R.T.** 1998. Linking winter and summer events in a migratory bird by using stable-carbon isotopes. *Science* 282:1884-1886.
- Martínez, A.S.** 2011. Abundancia y tasa de incremento de la ballena jorobada *Megaptera novaeangliae* en el pacífico mexicano. Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias. Universidad Autónoma de Baja California Sur. 92pp.
- Martínez Del Río, C., Wolf, N., Carleton, S.A. and Gannes, L.Z.,** 2009. Isotopic ecology ten years after a call for more laboratory experiments. *Biological Reviews*, 84(1): 91-111.
- Mathews, E.A., Keller, S., and Weiner, D. B.** 1988. A method to collect and process skin biopsies for cell culture from free-ranging gray whales (*Eschrichtius robustus*). *Marine Mammal Science* 4: 1- 12.
- McConnaughey, T.** 1978 Ecosystems naturally labeled with carbon-13: applications to the study of consumer food webs. MSc thesis, University of Alaska, Fairbanks, AK.
- McConnaughey, T., and McRoy C.P.** 1979. Food-web structure and the fractionation of carbon isotopes in the Bering Sea. *Mar Biol* 53:257–262.
- Michener, R. H. and Schell, D. M.** 1994. Stable isotope ratios as tracers in marine aquatic food webs. pp. 138–157. *En: Lajtha, K., Michener, R.H. (Eds.), Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science.* Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Miller, T.W., Brodeur, R.D., and Rau, G.H.** 2008. Carbon stable isotopes reveal relative contribution of shelf-slope production to the northern California Current pelagic community. *Limnology and Oceanography*, 53, 1493–1503.
- Newsome, S.D., Clementz, M.T., and Koch, P.L.** 2010a. Using stable isotope biogeochemistry to study marine mammal ecology. *Marine Mammal Science*. 26(3): 509-572.
- Newsome, S., Bentall, G., Tinker, M., Oftedal, O., Ralls, K., Estes, J., and Fogel, M.** 2010b. Variation in  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  diet-vibrissae trophic discrimination factors in a wild population of California sea otters. *Ecological Applications*. 20(6):1744-1752.



- Nolaszo-Soto, J.**, 2003. Contenido calórico y composición de ácidos grasos de la dermis de la ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*) en aguas adyacentes a la Isla Socorro, Revillagigedo, México. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Perry, S.L., DeMaster, D.P., and Silber, G.K.** 1999. The great whales: History and status of six species listed as endangered under the U.S. Endangered Species Act of 1973. *Marine Fisheries Review* 61(1): 1-74.
- Peterson, B.J., and Fry, B.** 1987. Stable isotopes in ecosystem studies. *Annu Rev Ecol Syst* 18:293-320.
- Peterson, B., Emmet, R., Goericke, R., Venrick, E., Mantyla, A., Bograd, S., Schwing, F., Hewitt, R., Lo, N., Watson, W., Barlow, J., Lowty, M., Ralston, S., et al.** 2006 The state of the California Current, 2005–2006: warm in the north, cool in the south. *California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports*, 47, 30–74.
- Post, D.M.** 2002. Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology* 83: 703–720.
- Post, D.M., Layman, C.A., Arrington, D.A., Takimoto, G., Quattrochi, J., and Montaña, C.G.** 2007. Getting to the fat of the matter: models, methods and assumptions for dealing with lipids in stable isotope analyses. *Oecologia*.
- Rau, G.H., Sweeney, R.E. and Kaplan, R.I.** 1982. Plankton  $^{13}\text{C}:^{12}\text{C}$  ratio changes with latitude: differences between northern and southern oceans. *Deep Sea Research*. 29: 1035-1039.
- Rau, G.H., Ainley, D.G., Bengtson, J.L., Torres, J.J., and Hopkins, T.L.** 1992.  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  in Weddell Sea birds, seals, and fish: implications for diet and trophic structure. *Mar Ecol Prog Ser* 84:1–8.
- Rubenstein, D.R., and Hobson, K.A.** 2004. From birds to butterflies: animal movement patterns and stable isotopes. *Trends Ecol Evol* 19:256-263.



- Ryan, C.,** McHugh, B., Trueman, N., Sabin, S., Deaville, R., Harrod, C., Berrow, S.D., and O'Connor, I. 2013. Stable isotope analysis of baleen reveals resource partitioning among sympatric rorquals and population structure in fin whales. *Marine Ecology Progress Series*. 479:251-261.
- Saino, T.,** and Hattori A. 1987. Geographical variation of the water column distribution of suspended particulate organic nitrogen and its  $^{15}\text{N}$  natural abundance in the Pacific and its marginal seas. *Deep Sea Research*. Vol. 34. pp. 807-827.
- Sarakinos, H.C.,** Johnson, M.L., and Vander-Zanden, M.J. 2002. A synthesis of tissue-preservation effects on carbon and nitrogen stable isotope signatures. *Can J Zool* 80:381–387.
- Schell, D.M.,** Saupe, S.M., and Haubstock, N. 1989a. Bowhead whale (*Balaena mysticetus*) growth and feeding as estimated by  $\delta^{13}\text{C}$  techniques. *Mar Biol* 103:433–443.
- Schell, D.M.,** Saupe, S.M., and Haubstock, N. 1989b. Natural isotope abundances in bowhead whale (*Baleana mysticetus*) baleen: markers of aging and habitat usage. En: Rundel PW, Ehleringer JR, Nagy KA (eds) *Stable isotopes in ecological research*. Springer-Verlag, New York, p 260–269.
- Schell, D.M.,** Barnett, B.A. and Vinette, K.A. 1998. Carbon and nitrogen isotope ratios in zooplankton of the Bering, Chukchi and Beaufort seas. *Marine Ecology Progress Series*. 162:11-23.
- Schwing, F.B.,** Bond, N.A., Bograd, S.J., Mitchell, T., Alexander, M.A., and Mantua, N. 2006. Delayed coastal upwelling along the U.S. West Coast in 2005: a historical perspective. *Geophysical Research Letters*, 33, L22S01.
- Studds, C.E.** and Marra, P.P. 2005. Nonbreeding habitat occupancy and population processes: An upgrade experiment with a migratory bird. *Ecology* 86:2380-2385.



- Syväranta, J., Vesala, S., Rask, M., Ruuhijärvi J., and Jones, R.I.** 2008. Evaluating the utility of stable isotope analyses of archived freshwater sample materials. *Hydrobiologia* 600: 121-130.
- Tieszen, L.L., Boutton, T.W., Tesdahl, K.G. and Slade, N.A.** 1983. Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: Implications for  $\delta^{13}\text{C}$  analysis of diet. *Oecologia*. 57:32-37.
- Todd, S.K.** 1997. Dietary patterns of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) in the Northwest Atlantic: evidence from  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  stable isotopes. Doctoral (PhD) thesis, Memorial University of Newfoundland.
- Todd, S., Ostrom, P., Lien J. and Abrajano, J.** 1997. Use of biopsy samples of humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) skin for stable isotope ( $\delta^{13}\text{C}$ ) determination. *Journal of Northwest Atlantic Fisheries Science* 22:71–76.
- Urbán, J., Jaramillo, L., Aguayo, L., Ladrón de Guevara, P., Salina, Z., Alvarez, F., Medrano, L., Jacobsen, J., Balcomb, K., Claridge, D., Calambokidis, J., Steiger, G., Straley, J., von Ziegesar, O., Waite, J., Mizroch, S., Dahlheim, M., Darling, J. and Baker, D.** 2000. Migratory destinations of humpback whales wintering in the Mexican Pacific. *J. Cetacean Res Mang* 2:101-110.
- Vanderklift, M.A. and Ponsard, S.** 2003. Sources of variation in consumer-diet  $\delta^{15}\text{N}$  enrichment: a meta-analysis. *Stable Isotope Ecology*. 136:169-182.
- Voss, M., Dippner, J.W. and Montoya, J.P.** 2001. Nitrogen isotope patterns in the oxygen-deficient waters of the Eastern Tropical Pacific Ocean. *Deep-Sea Research I* 48, 1905-1921.
- Wada, E., and Hattori, A.** 1991. Nitrogen from the sea: forms, abundances and rate processes. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Walker, J., Potter, C. and Macko, S.** 1999. The diets of modern and historic bottlenose dolphin population reflected through stable isotopes. *Marine Mammal Science* 15(2):335-350.



- Webster, M.S., Marra, P.P., Haig, S.M., Bensch S., and Holmes R.T.** 2002. Links between worlds: unraveling migratory connectivity. *Trends Ecol Evol* 17:76-83.
- Witteveen, B.H., Straley, J.M., von Ziegesar, O., Steel, D., and Baker, C. S.** 2004. Abundance and mtDNA differentiation of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) in the Shumagin Islands, Alaska. *Canadian Journal of Zoology* 82: 1352–1359.
- Witteveen, B.H.** 2008. Using stable isotopes to assess population structure and feeding ecology of North Pacific humpback whales (*Megaptera novaeangliae*). Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy. University of Central Florida, Orlando, Florida. 144pp.
- Witteveen, B.H., Worthy, A.J., Wynne, K.M., and Roth, J.D.** 2009a. Population structure of North Pacific humpback whales in their feeding grounds revealed by stable carbon and nitrogen isotope ratios. *Marine Ecology Progress Series*. 379:299-310.
- Witteveen, B.H., Worthy, A.J., and Roth, J.D.** 2009b. Tracing migratory movements of breeding North Pacific humpback whales using stable isotope analysis. *Marine Ecology Progress Series*. 393:173-183.
- Witteveen, B.H., Worthy, A.J., Wynne, K.M., Hirons, A.C., Andrews III A.G., and Markel, R.W.** 2011a. Trophic levels of North Pacific humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) through analysis of stable isotopes: Implications on prey and resource quality. *Aquatic Mam*
- Witteveen, B.H., Straley, J.M., Chenoweth, E., Backer, S.C., Barlow, J., Matkin, C., Gabriele, C.M., Neilson, J., Steel, D., Ziegesar, O., Andrews, G.A., and Hirons, A.** 2011b. Using movements, genetics and trophic ecology to differentiate inshore from offshore aggregations of humpback whales in the Gulf of Alaska. *Endangered Species Reseach*. 14:217-225.
- Witteveen, G.H., Worthy, G.A., Froy, R.J. and Wynne, K.M.** 2012. Modeling the diet of humpback whales: An approach using stable carbon and nitrogen isotopes in a Bayesian mixing model. *Marine Mammal Science*. 28(3): E233-E250.



- Wright, D.L., Witteveen, B. and Wynne. 2016.** Fine-scale spatial differences in humpback whale diet composition near Kodiak, Alaska. *Marine Mammal Science*. 32(3): 1099-1114.
- Zwolinski, J.P., and Demer, D.A. 2012.** A cold oceanographic regime with high exploitation rates in the Northeast Pacific forecasts a collapse of the sardine stock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 4175–4180.