



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

Programa de Estudios de Posgrado

ESTUDIO DE LA FISIOLOGÍA Y ECOLOGÍA REPRODUCTIVA DE  
LA BALLENA GRIS (*Eschrichtius robustus*) EN BAJA  
CALIFORNIA SUR, MÉXICO, A TRÁVES DEL ANÁLISIS DE LOS  
ISÓTOPOS ESTABLES INTEGRADOS EN SU PIEL.

T E S I S

Que para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en Biología Marina )

P r e s e n t a

**Michelle Gelippi**

La Paz, Baja California Sur, agosto de 2021.



La Paz, Baja California Sur, 30 de Julio 2021.

Los miembros del comité de tesis del estudiante Michelle Gelippi del Programa de Doctorado en Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el VoBo dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:  
iThenticate
- Filtros utilizados:  
Citas excluidas  
Bibliografía excluida
- Porcentajes de similitud: 10 %  
(Máximo permitido 20%)

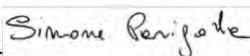
TIVA DE LA		Citas excluidas	10%
		Bibliografía excluida	SIMILAR
<b>Resumen de Coincidencias</b>			
8 coincidencias			
1	Internet 593 palabras hdl.handle.net		2%
2	Internet 88 palabras Copiado el 21-Jul-2020 cibnor.repositorioinstitucional.mx		<1%
3	Internet 87 palabras Copiado el 04-Jun-2021 1library.co		<1%
4	Internet 85 palabras Copiado el 30-Jun-2020 www.biblioteca.cicimar.ipn.mx		<1%
5	Internet 62 palabras Copiado el 20-May-2015 lsiecosystem.org		<1%
6	Internet 58 palabras Copiado el 13-Abr-2020 www.une.edu		<1%

**Firmas del comité**



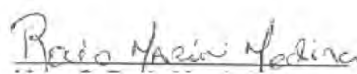
**Dr. Javier Caraveo Patiño**

Co-Director de tesis



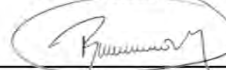
**Dr. Simone Panigada**

Co-Tutor de tesis



**Dra. Rocío Marcín Medina**

Co-Directora de tesis



**Dr. Raúl Octavio Martínez Rincón**

Co-Tutor de tesis



**Dr. Alan Zavala Norzagaray**

Co-Tutor de tesis



## **Conformación de Comités**

### **Comité Tutorial**

Dr. Javier Caraveo Patiño  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
Co-Director de Tesis

Dra. Rocío Marcín Medina  
Asociación de Investigación y Conservación de Mamíferos Marinos y su Hábitat A.C.  
Co- Directora de Tesis

Dr. Raúl Octavio Martínez Rincón  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
Co-Tutor de Tesis

Dr. Simone Panigada  
TETHYS Research Institute  
Co-Tutor de Tesis

Dr. Alan Zavala Norzagaray  
CIIDIR-IPN  
Co-Tutor de Tesis

### **Comité Revisor de Tesis**

Dr. Javier Caraveo Patiño  
Dra. Rocío Marcín Medina  
Dr. Raúl Octavio Martínez Rincón  
Dr. Simone Panigada  
Dr. Alan Zavala Norzagaray

### **Jurado de Examen**

Dr. Javier Caraveo Patiño  
Dra. Rocío Marcín Medina  
Dr. Raúl Octavio Martínez Rincón  
Dr. Simone Panigada  
Dr. Alan Zavala Norzagaray

### **Suplentes**

Dr. Eduardo Francisco Balart Páez  
Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez

## Resumen

Los avances actuales relacionados con la ecología alimenticia de la ballena gris la catalogan como una especie que sigue una estrategia energética denominada “capital breeding” (por sus siglas en inglés). La evaluación de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  en la piel de mysticetos es potencialmente útil para evaluar su ecología trófica, condición fisiológica y nutricional; sin embargo, existen aproximaciones que son contrastantes respecto a dividir la epidermis en sus tres componentes estructurales (es decir, estrato externo, medio e interno; corneo, espinoso y basal respectivamente) para su interpretación isotópica. Se exploraron a nivel individual, las estrategias energéticas que siguen distintas hembras durante la reproducción, si es considerado el consumo de presas a lo largo del corredor migratorio, y mediante el análisis de los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  registrados en la epidermis de hembras y crías lactantes a partir de biopsias colectadas en Laguna Ojo de Liebre (la laguna de crianza principal), durante 3 temporadas reproductivas (2011, 2018 y 2019). La interpretación isotópica consideró la composición estructural del tejido y se asumió que cada hembra sigue una estrategia alimenticia diferente. Los patrones isotópicos entre estratos se observaron previa estandarización de los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ . Se usaron modelos lineales de efectos mixtos para modelar la composición isotópica de la epidermis y detectar diferencias significativas entre factores; posteriormente se usaron pruebas *post-hoc* para identificar en que factores había diferencias significativas. Se usaron pruebas de Wilcoxon para corroborar el mismo uso de las fuentes de carbono y nitrógeno entre cada madre y cría. Se asumió la variación isotópica entre los tres estratos como un efecto asociado al cambio de condiciones fisiológicas (es decir, gestación y lactancia) en hembras y crías; en crías se generó un modelo de reloj isotópico para inferir cuándo ocurrió el cambio. Finalmente, las estrategias de alimentación más antiguas y recientes fueron caracterizadas a partir de los estratos córneos y basales respectivamente, con el uso de modelos de mezcla isotópica de tipo bayesiano. Se modelaron las probables contribuciones de las diferentes presas mediante los modelos generalizados de efecto mixto para identificar las posibles diferencias significativas entre factores. Los resultados demostraron diferencias significativas en los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  entre estratos, grupos de individuos, temporadas e incluso entre meses de colecta dentro de una misma temporada. Las pruebas de Wilcoxon demostraron que no hay diferencias significativas entre los valores isotópicos de madres y crías, por lo que se puede asumir que el patrón de las fuentes de carbono y nitrógeno detectadas en las crías es un reflejo de las fuentes consumidas por las madres. Se estimó un fraccionamiento isotópico de  $\sim 1.4\text{‰}$  para el carbono y  $1\text{-}1.5\text{‰}$  para el nitrógeno. En crías, la mayoría de los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  disminuyeron constantemente desde el estrato externo al interno, y permitió inferir los días entre la colecta y el cambio de la vida fetal y extrauterina. La modelación de los resultados de los modelos de mezcla evidenció una diferencia significativa en las estrategias de alimentación implementadas por las hembras de una misma temporada reproductiva, o bien entre temporadas. El consumo de alimento en laguna Ojo de Liebre identificó distintas dinámicas en la búsqueda de presas dentro del corredor migratorio. Evidencia que es congruente con estudios previos que sugieren una necesidad por parte de las hembras de satisfacer ciertos requerimientos fisiológicos específicos asociados a la gestación y lactancia, la cual se alcanza mediante una continua búsqueda de alimento que los contenga a lo largo de todo el corredor migratorio, y en particular en las áreas de reproducción.

**Palabras claves:** epidermis, isótopos estables, modelos isotópicos, reproducción y alimentación

**ORCID:** 0000-0003-1379-9440

**Vo.Bo.**



---

Dr. Javier Caraveo Patiño  
Co-Director de tesis



---

Dra. Rocío Marcín Medina  
Co-Directora de tesis

## Summary

In this study, the three epidermal layers of gray whales (*Eschrichtius robustus*) were analyzed for their carbon and nitrogen isotopes to investigate individual strategies during reproduction.

The stable isotope analysis of baleen whales' epidermis has the potential to provide insights on species feeding ecology and physiology, however, up to date, it is not clear if epidermal structural layers (i.e., stratum corneum, stratum spinosum, stratum basale) should be assessed independently for their  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  values. Here, we tested for isotopic variability among epidermal layers of lactating females and calves while investigating for their feeding ecology. Particularly, to corroborate the general assumption that gray whales feed on Arctic prey only, we investigated the possibility of contribution of benthic amphipods collected in the Bering Sea, compared to other sources from areas along the species migratory route. Skin biopsies were obtained from 59 free-ranging lactating females and calves in the breeding lagoon Ojo de Liebre, in Baja California Sur, Mexico, during three calving seasons (2011, 2018 and 2019). Models result indicated that  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  values differ significantly on an inter and intra-individual level based on epidermal layers, age class, year, and month of sampling. On the other hand, no isotopic difference was found between the epidermis of mother-calf pairs, which allows to consider calves'  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  values the reflection of mothers' ones. The mother-to-fetus carbon isotope fractionation was calculated to be  $\sim 1.4\%$ , the one of nitrogen 1-1.5%. In calves,  $\delta^{15}\text{N}$  values were detected to decrease constantly from the most external epidermal layer to the most internal one, which we suggest may indicate the diet change from placental blood to maternal milk. This pattern of change, together with the availability of previous information about cetaceans' epidermis isotopic turnover rates, allowed to apply an isotopic clock model to estimate the age of calves' epidermal layer and the timing of the transition from the gestation to lactation, thus calves' birthdates. Finally, Bayesian mixing models' results indicated that the main assumption of a high contribution of arctic amphipods to the isotopic composition of females' epidermis should be refused. Particularly, each mother resulted to perform a different feeding strategy, and prey from Vancouver Island emerged as important as the ones of the Bering Sea. Furthermore, models result highlighted a constant use of Ojo de Liebre lagoon as a feeding ground, as well. The prey selected by each mother in the calving ground corresponded to specific prey items assimilated in the feeding areas. When females assimilated amphipods in the Bering Sea, they integrated amphipods as well in Ojo de Liebre. On the other hand, when mysids were assimilated in Vancouver Island, polychaetas were preferred in the breeding lagoon. All these results agree with previous studies that report females' necessity to satisfy certain physiological requirements (e.g., assimilation of fatty acids *omega-6*) associated to gestation and lactation. These needs appear here to be fulfilled by a continuous feeding during migration and, particularly, inside the calving lagoons during breeding time. The evidence reported in this thesis highlight as critical the future investigation of the isotopic composition of all those prey items that could be fed by the eastern gray whale along its migratory route. The trophic connectivity that links all habitats used by the gray whale must indeed be better understood. Both historical and recent information, that would provide insights in the species feeding ecology under past and present environmental conditions, should be considered as equally important to establish conservation and management plans.

**Key words:** epidermis, stable isotopes, isotopic models, feeding and reproduction.

ORCID: 0000-0003-1379-9440

**Vo.Bo.**



---

Dr. Javier Caraveo Patiño  
Co-Director de tesis



---

Dra. Rocío Marcín Medina  
Co-Directora de tesis



## Dedicatoria

Dedico esta tesis a los primeros amores de mi vida, las ballenas, que me indican la vía e impulsan mis pasos desde siempre. Ellas me definen.

Gioele e Kai, esta tesis es para ustedes también. Siempre recuerden: su existencia nunca fue un límite a mis sueños, al contrario, ustedes les dieron un brillo totalmente nuevo. Los amo desde la parte más profunda de mi corazón.

Marco, esta tesis es tanto mía cuanto tuya. Eres mi copiloto, mi compañero de vida, lograste integrarte en mi esencial sin comprometer mi individual. Te amo Mr. MG.

*“From birth, man carries the weight of gravity on his shoulders.*

*He is bolted to earth.*

*But man has only to sink beneath the surface, and he is free.”*

Jacques Yves Cousteau

## **Agradecimientos**

Este estudio fue realizado gracias a la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT; número: # 779462/ 616369) y con el apoyo de Posgrado mediante la beca de extensión del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Agradezco a estas dos instituciones y en especial a la Dra. Gracia Alicia Gomez Anduro y al personal de Posgrado por el apoyo durante este Doctorado.

Este estudio se cumplió también gracias al premio NSF otorgado por la Universidad de Utah, EUA, lo cual me permitió participar a “IsoCamp 2017”; además, la Universidad de Utah me otorgó la beca “research in residence” (premio NSF número: # 1137336) para el entrenamiento inter-universitario en ecología continental, lo cual se realizó en la Universidad de Hawai’i at Mānoa, EUA, bajo la supervisión del Dr. Brian Popp. Agradezco al Dr. Jim Ehleringer, Dr. Thure Cerling y el Dr. Dave Bowling (Biology) para haberme seleccionada como estudiante de “IsoCamp 2017” y para haberme otorgado el premio “research in residence”, sin los cuales la realización de muchos de los análisis isotópicos realizados en este estudio no hubiera sido posible. Finalmente, mis agradecimientos más grandes van al Dr. Brian Popp, a su paciencia, dedicación y sabiduría; muchísimas gracias, Brian.

A mis Co-Directores de Tesis, el Dr. Javier Caraveo Patiño y Dra. Rocío Marcín Medina, por orientarme y apoyarme durante este proyecto. A mis Co-Tutores de Tesis, el Dr. Raúl Octavio Martínez Rincón, Dr. Alan Zavala Norzagaray y el Dr. Simone Panigada por el apoyo técnico, teórico, y en especial su tiempo, muchas gracias.

A mis amigos paceños y a todos los que siento a mi lado a pesar de encontrarse en casi todos los extremos del mundo, muchas gracias por ser parte de mi vida.

A Javier, por ser mucho más que un Director de Tesis. Por tu amor hacía el conocimiento, tu visión anti-convencional, las especulaciones filosóficas, la calma y paciencia que me diste cuando yo, al contrario, no las tenía, por tu cariño y afecto hacía mí, mis hijos y mi esposo; te agradezco muchísimo.

A mi segunda familia en Alemania, por su ayuda en finalizar este proyecto, muchas gracias.

A mi familia en Italia, que me dió raíces t n profundas que me impiden perder la brujula, y alas t n fuertes que me permiten volar y explorar desde siempre las maravillas de esta Tierra, te amo con todo mi ser.

## Contenido

<b>Resumen</b> .....	i
<b>Summary</b> .....	iii
<b>Dedicatoria</b> .....	iii
<b>Agradecimientos</b> .....	iv
<b>Contenido</b> .....	vi
<b>Lista de figuras</b> .....	viii
<b>Lista de tablas</b> .....	x
<b>Abreviaturas</b> .....	xi
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	7
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	13
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	15
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	16
5.1 Objetivo general .....	16
5.2 Objetivos particulares .....	16
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	17
6.1 Área de estudio .....	17
6.2 Trabajo de campo.....	18
6.2.1 Colecta de biopsias de piel .....	19
6.2.2 Colecta de las presas .....	20
6.3 Determinación de valores isotópicos.....	21
6.3.1 Preparación de submuestras por estrato epidérmico y presas.....	21
6.3.2 Valores isotópicos de carbono y nitrógeno.....	22
6.3.3 El análisis estadístico .....	23
6.3.3.1 Evaluación de los cambios isotópicos entre estratos epidérmicos.....	24
6.3.3.2 Estimación del inicio del consumo de leche materna mediante la modelación de los valores isotópicos.....	26
6.3.3.3 Evaluación de la contribución de las presas del Ártico en la epidermis de hembras y crías.....	29
6.3.3.3.1 Transformación de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de las epidermis en probabilidades de contribución de presas.....	29
6.3.3.3.2 Estimación de los valores isotópicos de la sangre placentaria y leche a partir de la epidermis de hembras y crías.....	32
6.3.3.3.3 Análisis estadístico de las probables contribuciones isotópicas .....	33
<b>7. RESULTADOS</b> .....	35
7.1 Colecta de biopsias .....	35
7.2 Los cambios isotópicos entre estratos epidérmicos .....	35
7.3 Estimación del inicio del consumo de leche mediante la modelación de los valores isotópicos .....	40
7.4 Evaluación de la contribución de las presas del Ártico en la epidermis de hembras y crías .....	44

7.4.1 Transformación de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ en probabilidades de contribución de presas ...	44
7.4.2 Análisis de las probables contribuciones isotópicas .....	45
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	<b>53</b>
8.1 Cambios isotópicos entre estratos epidérmicos .....	53
8.1.1 Patrones de $\delta^{13}\text{C}$ en hembras y crías.....	54
8.1.2 Patrones de $\delta^{15}\text{N}$ en hembras .....	55
8.1.3 Patrones de $\delta^{15}\text{N}$ en crías .....	56
8.2 Estimación del inicio del consumo de leche mediante la modelación de los valores isotópicos .....	57
8.3 Evaluación de la contribución de las presas del Ártico .....	61
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	<b>68</b>
<b>10. LITERATURA CITADA</b> .....	<b>69</b>
<b>11. ANEXOS</b> .....	<b>76</b>
Anexo A: Selección en avance del modelo lineal de efectos mixtos mas parsimonioso para los isótopos del carbono.....	76
Anexo B: Selección en avance del modelo lineal de efectos mixtos mas parsimonioso para los isótopos del nitrógeno. ....	76
Anexo C: Pruebas de desviación de la normalidad del modelo mas parsimoniosos del $\delta^{13}\text{C}$ (i) y del $\delta^{15}\text{N}$ (ii). ....	77
Anexo D: Ponderación de los residuos del modelo lineal de efectos mixtos mas parsimonioso para $\delta^{13}\text{C}$ (i) y $\delta^{15}\text{N}$ (ii) utilizando la estadística robusta para los factores ID (“id”), parejas madre-cría (“mcp” y año y mes de muestreo (“YM”))......	78
Anexo E: Coeficientes del modelo lineal de efectos mixtos mas parsimonioso para $\delta^{13}\text{C}$ (i) y $\delta^{15}\text{N}$ (ii) calculados utilizando la estadística robusta. ....	78
Anexo F: Resultados de los SIMMB-I, relativos a las estimaciones de las probabilidades de contribución de cuatro fuentes al EC de todas las hembras muestreadas. ....	79
Anexo G: Selección en avance del modelo generalizado de efectos mixtos de la composición de Mar de Bering. ....	81
Anexo H: Selección en avance del modelo generalizado de efectos mixtos de la composición de Isla Vancouver.....	82
Anexo I: Selección en avance del modelo generalizado de efectos mixtos de la composición de laguna Ojo de Liebre. ....	82
Anexo J: Artículo publicado: “Tracing gestation and lactation in free ranging gray whales using the stable isotopic composition of epidermal layers” .....	83
Anexo K: Artículo sometido: “Only Arctic food? Isotopic composition of epidermis reveals new insights on eastern gray whale feeding ecology” .....	136

## Lista de figuras

<b>Figura 1:</b> Rango de distribución geográfica de la ballena gris oriental y la ubicación de los hábitats en los cuales se colectaron las posibles presas de la especie <b>(A)</b> , y el área de estudio principal, laguna Ojo de Liebre, sitio de crianza y reproducción principal de la ballena gris <b>(B)</b> . Fuente: NOAA mediante la librería “marmap” del software R; Datum: WGS 1984, proyección: latlong.....	18
<b>Figura 2:</b> Colecta de las biopsias de piel y capa de grasa: <b>A)</b> hawaiana con punta modificada, <b>B)</b> flecha utilizando una ballesta.....	20
<b>Figura 3:</b> Cortes efectuados en los tejidos de una biopsia de ballena gris, para obtener submuestras de los tres estratos estructurales de la epidermis, estrato corneo (EC), estrato espinoso (ES) y estrato basal (EB). .....	22
<b>Figura 4:</b> Valores promedio de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ (cuartiles 25% y 50%) de la epidermis de las hembras y crías colectadas durante las temporadas reproductivas del 2011, 2018 y 2019. ....	36
<b>Figura 5:</b> Valores de $\delta^{13}\text{C}$ <b>(A)</b> y $\delta^{15}\text{N}$ <b>(B)</b> estandarizados para cada hembra y cría, para cada una de las temporadas de muestreo. ....	37
<b>Figura 6:</b> Diferencias isotópicas entre los valores de $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ registrados en los diferentes estratos epidérmicos (EC, ES, EB) de una hembra y cría colectadas en enero y marzo 2019. ....	38
<b>Figura 7:</b> Resultados post-hoc para los LME más parsimoniosos de los $\delta^{13}\text{C}$ <b>(A)</b> y $\delta^{15}\text{N}$ <b>(B)</b> en base al factor “estrato” (EC, ES, EB), y su interacción con el factor “edad” (h = hembra; c = cría). Las diferencias significativas entre grupos se indican con líneas horizontales ( $p < 0.05$ ). ....	39
<b>Figura 8:</b> Valores isotópicos del carbono <b>(A)</b> y del nitrógeno <b>(B)</b> estandarizados entre los estratos epidérmicos de las parejas madre-cría. La línea gris representa el error estándar de todas las mediciones. ....	40
<b>Figura 9:</b> Representación gráfica de las fechas de nacimiento estimadas para las crías muestreadas con sus respectivas madres durante febrero 2018 y enero 2019 y. Las curvas muestran los patrones de las estimaciones mediante un factor de fraccionamiento trófico de 1‰ o de 1.5‰. Las líneas negras punteadas representan los valores promedios. ....	42
<b>Figura 10:</b> Gráfica circular representante la distribución de las fechas de nacimiento estimadas para las crías, utilizando el fraccionamiento isotópico madre-cría de 1‰, y los periodos de tiempo conocidos para la reproducción, gestación y lactancia en ballena gris (Jones y Swartz, 2009).....	43
<b>Figura 11:</b> Curva de decaimiento exponencial (“Trayectoria”) esperada para el $\delta^{15}\text{N}$ del EB de la cría colectada y recolectada en enero y marzo 2019. El punto “1. muestreo” representa la fecha de nacimiento calculada del reloj isotópico a partir de los valores del EB de enero; el punto “2. muestreo” el valor de $\delta^{15}\text{N}$ registrado en el EB después de 46 días, y el punto “Estimado” el valor de $\delta^{15}\text{N}$ estimado por el modelo del reloj isotópico a la recolecta del EB en marzo 2019. .	44
<b>Figura 12:</b> Diagramas ternarios representantes la probabilidad de contribución isotópica de tres fuentes (“Mar de Bering”, “Vancouver”, “Ojo de Liebre”) al EC <b>(A)</b> y EB <b>(B)</b> de las hembras, sangre placentaria <b>(C)</b> y leche <b>(D)</b> estimadas mediante la ecn. 6. La coloración de los puntos indica si los resultados de los SIMMB-I estimaron que en el EC de cada hembra contribuían mayormente a los anfípodos (puntos rojos) o a los poliquetos (puntos azules) de LOL; las líneas de colores representan las probabilidades de contribución promedio de dichas variables categóricas. ....	47
<b>Figura 13:</b> Probabilidades de contribución isotópicas de tres fuentes (MB, IV, LOL) a los estratos	

epidérmicos (EC, EB) de una madre (m), y la sangre placentaria y leche materna estimados a partir de los estratos epidérmicos (EC, EB) de su cría (c), colectados y recolectados en enero y marzo 2019.....48

**Figura 14:** Resultados de los modelos GLME más parsimoniosos. Se reporta el patrón de cambio en las probabilidades de contribución isotópica de tres fuentes (“Mar de Bering”, “Isla Vancouver”, “Ojo de Liebre”) según el efecto de las variables “estrato” (EC, EB), “edad” (madre y cría), “año y mes” (febrero 2011 y 2018, enero y marzo 2019). .....50

**Figura 15:** Resultados post-hoc para el GLME más parsimonioso relativo a las probabilidades de contribución de los anfípodos de MB según el efecto de las variables “estrato” (EC, EB), “edad” (madre y cría), “año y mes” (febrero 2011 y 2018, enero y marzo 2019). Las diferencias significativas entre grupos se indican con líneas horizontales ( $p < 0.05$ ).....51

**Figura 16:** Resultados post-hoc para el GLME más parsimonioso relativo a las probabilidades de contribución de los misidáceos de IV según el efecto de las variables “estrato” (EC, EB), “edad” (madre y cría), “año y mes” (febrero 2011 y 2018, enero y marzo 2019). Las diferencias significativas entre grupos se indican con líneas horizontales ( $p < 0.05$ ).....52

**Figura 17:** Evidencia fotográfica de actividad alimenticia en laguna Ojo de Liebre. En particular, se puede observar como la ballena salió del agua con la boca abierta (**A** y **B**), para luego cerrarla (**C**) y expulsar agua (**D**, **E**, **F**, flechas verdes). La ballena se inclinó también hacia atrás (**E**, **F**), muy probablemente para tragar más fácilmente la comida. Se observan partículas de sedimento alrededor del cuerpo de la ballena después de su emersión (**A**, **B**, flechas amarillas) (©M. Gelippi, 2019). .....63

**Lista de tablas**

**Tabla 1:** Biopsias colectadas durante las tres temporadas reproductiva 2011, 2018 y 2019, reportadas en sus números totales, de parejas madre-cría y cuantas de organismos solos (hembras o crías). También se reporta el número total de muestras analizadas pos sus contenidos isotópicos; cada epidermis fue dividida en submuestras de sus estratos epidérmicos (EC, ES, EB).....35



**Abreviaturas**

AIC	Akaike Information Criteria (es: Criterio de información de Akaike)
AICc	AIC para pocos datos
AIC <sub>wt</sub>	AIC weight (es: ponderaciones del AIC)
EMM	Estimated marginal mean (es: media marginal estimada)
GLME	Generalized linear mixed effect model (es: modelos lineales generalizados mixtos)
LME	Linear Mixed Effect model (es: modelos de efectos lineales mixtos)
IV	Isla Vancouver
LOL	Laguna Ojo de Liebre
MB	Mar de Bering
NOAA	National Oceanographic and Atmospheric Administration
SIMMB	Stable Isotopes Mixing Models Bayesian (es: modelos de mezcla isotópica de tipo bayesianos)

## 1. INTRODUCCIÓN

La ballena gris (*Eschrichtius robustus*) es considerada la especie más costera, realiza una de las migraciones más largas para satisfacer todas sus necesidades de su historia de vida. Su ecología alimenticia la define como oportunista (Nerini, 1984; Calambokidis *et al.*, 1991; Dunham y Duffus, 2001; Moore y Huntington, 2008). Sus hábitos de alimentación pueden implicar diferentes comportamientos de depredación, desde la comúnmente reportada para la especie, succión del fondo marino para alimentarse del bentos, hasta la embestida vertical o la filtración superficial de plancton y necton (Dunham y Duffus, 2001; Jones y Swartz, 2009). Hábitos que pueden ser alternados en una o diferentes temporadas (Dunham y Duffus, 2001). A pesar de su predilección para los anfípodos bentónicos en el Ártico polar, diferentes estudios han reportado evidencias de actividades de forrajeo a lo largo de todo el corredor migratorio (Nerini, 1984; Moore y Huntington, 2008; Scheinin *et al.*, 2011).

En la actualidad la ballena gris es el misticeto más estudiado y la más vulnerable por las actividades antropogénicas. Durante el siglo XIX fue la especie más impactada por la caza; actividad que casi causó su extinción (Pyenson y Lindberg, 2011).

Existieron tres poblaciones en el hemisferio norte (Jones y Swartz, 2009): la atlántica que está extinta; la del pacífico occidental, clasificada en peligro de extinción por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN por sus siglas en inglés); y la del pacífico oriental, actualmente con el estatus de recuperada, gracias a esfuerzos internacionales llevados a cabo desde el principio del siglo XX (Pyenson y Lindberg, 2011). Hoy en día el tamaño de la población oriental de ballenas grises se estima como el de aquella población que existía antes de la cacería industrial (Moore y Huntington, 2008; Pyenson y Lindberg, 2011), se ha sugerido que ésta población quizás está cerca de la capacidad de carga en relación a sus áreas principales de alimentación en el Ártico (Schell *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2003; Moore y Huntington, 2008).

La ballena gris oriental migra entre las áreas de alimentación en Alaska y la península de Baja California, donde se encuentran sus áreas de reproducción (tres lagunas costeras en la costa occidental de Baja California Sur, México). Debido a su sensibilidad a los cambios ambientales la han considerado como una especie ideal para ser considerada “centinela” de los efectos del cambio climático (Moore y Huntington, 2008). Se piensa que la variabilidad de las condiciones ambientales en los hábitats utilizados por la especie pueda influir en la temporada migratoria, éxito reproductivo y ecología alimenticia (por ejemplo, Perryman y Lynn, 2002; Moore y Huntington, 2008; Scheinin *et al.*, 2011).

Los avances actuales relacionados con la ecología alimenticia de la ballena gris la catalogan como una especie que sigue una estrategia energética denominada “capital breeding” (por su sigla en inglés); es decir, se reproduce y alimenta en espacios y tiempos diferentes, involucra movimientos entre condiciones de grandes biomasa de sus recursos alimenticios a condiciones limitadas pero más propicias para la reproducción (Houston *et al.*, 2007; Newsome *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011). Los movimientos efectuados por las ballenas de la población oriental, y en particular las hembras gestantes, pueden alcanzar los 20,000 Km, desde la Península de Baja California hasta el Ártico y de regreso a Baja California Sur, donde las hembras dan a la luz después de 11 a 13 meses de gestación (Jones y Swartz, 2009).

Cuando las hembras se encuentran en el estado de gestación y lactancia sus necesidades cambian drásticamente; requieren grandes cantidades de energía y nutrientes para que el feto se desarrolle correctamente, y luego para producir la leche necesaria que alimentará a las crías hasta el destete. Ambas condiciones fisiológicas requieren metabolizar lípidos acumulados en el tejido adiposo (es decir, blubber o capa de grasa subcutánea), generados durante la temporada de alimentación previa, lo que permite finalizar la gestación y lactancia en condición de ayuno (Villegas-Amtmann *et al.*, 2015).

Bajo el contexto de la teoría del forrajeo óptimo, una ballena debería consumir presas que le proporcionen más energía que la que debería gastar para obtenerla; teoría que es comúnmente aceptada y aplicada en el estudio de la ecología trófica de todos los cetáceos (Spitz *et al.*, 2012). Debido al gran tamaño corporal de un misticeto (por ejemplo, la ballena azul), los

abastecimientos energéticos se deberían maximizar en espacios donde su consumo implique el menor gasto energético, distribuyéndose por periodos específicos en áreas caracterizadas por altas biomasa de sus presas; áreas de alta disponibilidad de alimento que para la población oriental de ballena gris se encuentran en los mares de Bering y Chukchi en Alaska, donde consume preferentemente anfípodos bentónicos (Perryman y Lynn, 2002; Moore y Huntington, 2008; Jones y Swartz, 2009).

Tanto la teoría del forrajeo óptimo como la estrategia energética “capital breeding” conceptualizan la ecología trófica en el contexto de la biomasa de presas consumida, demanda y acumulación de energía; ello como el principal indicador del éxito reproductivo de los individuos de una población (New *et al.*, 2014; Stephens *et al.*, 2014; Pirota *et al.*, 2018); pero la repercusión de la calidad nutricional es omitida (Spitz *et al.*, 2012); a pesar de existir evidencias que los depredadores pueden seleccionar activamente ciertos tipos de presas, o partes de ellas, por la composición de macronutrientes de las mismas (Kohl *et al.*, 2015; Machovsky-Capuska *et al.*, 2016). La existencia de una necesidad por parte de cualquier mamífero marino de satisfacer ciertos requerimientos fisiológicos específicos (ácidos grasos omega 3 y 6) asociados a la gestación y lactancia; nutrientes que posiblemente implica una continua búsqueda de alimento que los contenga durante sus movimientos a las áreas de reproducción, y particularmente en ellas (Caraveo-Patiño, 2004; Caraveo-Patiño y Soto, 2005; Caraveo-Patiño *et al.*, 2007, 2009) sugiere que quizás la ballena gris e incluso cualquier mysticeto no sigue una estrategia energética estricta “capital breeding”, más bien una combinación de dos estrategias “capital y income breeding” (el ayuno no caracterizaría toda la reproducción, sino solo partes de ella).

Por otro lado, la complejidad en el tiempo y espacio en el cual ocurre la historia de vida de la ballena gris y cualquier mysticeto, implica dificultades asociadas a la observación directa de los fenómenos que pueden influenciar aspectos tan importantes como la gestación y la lactancia (Pirota *et al.*, 2018); lo cual limita enormemente la posibilidad de falsear las hipótesis tradicionales relacionadas a las estrategias energéticas y de forrajeo, en particular durante estas condiciones fisiológicas de reproducción; quizás como se ha sugerido en general para cualquier

animal, existe una selección activa de presas debido a su calidad nutricional que a su calidad energética (Machovsky-Capuska *et al.*, 2016).

Actualmente son aún pocos los estudios que han usado el análisis del contenido isotópico del carbono y del nitrógeno en diferentes tejidos corporales de ballenas. Se han usado en estudios sobre ecología de poblaciones (Newsome *et al.*, 2010), dinámicas migratorias (Lesage *et al.*, 2010; Newsome *et al.*, 2010; Busquets-Vass *et al.*, 2017), ecología trófica (Caraveo-Patiño y Soto, 2005; Caraveo-Patiño *et al.*, 2007; Newsome *et al.*, 2010; Ko *et al.*, 2016; Wild *et al.*, 2018) y el efecto de diferentes condiciones fisiológicas (Newsome *et al.*, 2010; Clark *et al.*, 2016). En general, la mayoría de los estudios de ballena gris se habían basado en datos derivados de censos visuales desde tierra y/o desde barcos (por ejemplo, Perryman *et al.*, 2002; Perryman y Lynn, 2002; Pyenson y Lindberg, 2011); o bien, enfocados a evaluaciones genéticas de la especie (por ejemplo, Frasier *et al.*, 2011; Pyenson y Lindberg, 2011; Alter, Newsome y Palumbi, 2012). Hasta la fecha, las investigaciones que reportan valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y de  $\delta^{15}\text{N}$  en ballena gris se han enfocado a evaluar la ecología trófica en las áreas de alimentación (Schell *et al.*, 2000; Alter *et al.*, 2012); algunos sobre el efecto del catabolismo de las proteínas y del estrés oxidativo en los patrones isotópicos (Horstmann-Dehn *et al.*, 2012); o bien, si los valores isotópicos varían a lo largo de las componentes estructurales de un mismo tejido (Lian *et al.*, 2020); algunos han inferido el posible uso de las redes tróficas durante la reproducción (Caraveo-Patiño y Soto, 2005; Caraveo-Patiño *et al.*, 2007). Aún no se han realizado estudios que usen el análisis de isótopos estables para estudiar de forma simultánea la fisiología y ecología alimenticia de ningún mysticeto durante la gestación y la lactancia.

Se puede asumir que, en la ballena gris, como en cualquier animal, el éxito reproductivo está influenciado por un balance energético existente entre la acumulación de los nutrientes y el uso de estos para satisfacer las necesidades fisiológicas de la reproducción. La evaluación de las dinámicas alimenticias en hembras gestantes y lactantes emerge como un tema crítico; en especial para entender los movimientos migratorios y su relación biótica con las características peculiares de los hábitats en los cuales se mueven. La variabilidad interanual de las condiciones ambientales puede causar una fluctuación de la calidad y cantidad de las presas consumidas (Clark *et al.*, 2016; Piatt *et al.*, 2020), lo cual afecta la composición isotópica de los tejidos de la

madre y cría a lo largo de la gestación y lactancia, debido a la metabolización de las reservas nutricionales acumuladas por la hembra.

Recientemente, se ha demostrado que los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y de  $\delta^{15}\text{N}$  varían entre las componentes estructurales de la piel de ballenas azules (Busquets-Vass *et al.*, 2017), jorobadas, rorcuales comunes y cachalotes (Wild *et al.*, 2018); tales diferencias se han relacionado a cambios intraespecíficos en la dieta y en los movimientos migratorios estacionales y anuales. Sin embargo, el periodo de tiempo que representan los diferentes estratos de la piel de dichas ballenas no es claro; algunos autores mencionan que podrían variar según la especie, y/o las condiciones ambientales en las cuales se formaron. En el caso de la ballena gris, la única información disponible en este contexto, reporta que isotópicamente existe una homogeneidad entre los estratos de la piel, al no encontrar diferencias estadísticas isotópicas entre individuos varados a lo largo de las costas de California, Estados Unidos, llevó a los autores a sugerir que la piel de cualquier estrato puede representar de manera general los valores  $\delta^{13}\text{C}$  y de  $\delta^{15}\text{N}$  promedios de la piel de cualquier individuo, por lo que no hay necesidad de determinar los valores de cada uno de los estratos estructuralmente diferenciados mediante histología (Lian *et al.*, 2020). Es posible que la homogeneidad isotópica solo pueda ser considerada en organismos muertos, con diferencias en el grado de descomposición, pero queda aún la duda si los diferentes estratos de la piel de cualquier individuo vivo realmente son homogéneos isotópicamente, y si el valor, por ejemplo, del estrato más externo puede representar la señal isotópica del estrato más interno.

Por lo anterior, en este estudio se evaluó la composición isotópica de los diferentes estratos de la piel de organismos vivos. Se focalizó a evaluar la epidermis de hembras lactantes y crías de ballena gris durante su permanencia en la laguna Ojo de Liebre, área ubicada en la costa occidental de Baja California Sur, México; reconocida como la principal área de reproducción de esta población (Urbán R. *et al.*, 2003). Se hipotetizó una posible variación en la composición isotópica en los diferentes estratos de la piel tanto de las madres como de las crías; de existir estos cambios isotópicos entre estratos se asumió que tal variación isotópica podría relacionarse a tiempos diferentes de formación. La determinación y análisis de los estratos epidérmicos tanto de madres como de crías permitiría inferir a partir de las señales isotópicas

de la piel su relación con los procesos fisiológicos de gestación y lactancia. En particular, los valores de la piel de las madres permitirían relacionar la estrategia energética tradicional (es decir, dependiente totalmente de las redes tróficas del Ártico), o bien, lo posible diferenciación en las estrategias de alimentación que pudieran existir entre ellas. Finalmente, al detectar variaciones isotópicas en los estratos epidérmicos de cada par (madre-cria), permitiría realizar inferencias sobre la temporalidad de las fuentes principales de carbono y nitrógeno que les dieron origen, el traslado de los mismos a la leche materna, y su efecto en la formación de los estratos epidérmicos de madre-cría en diferentes años.

## 2. ANTECEDENTES

Hoy en día se considera que los individuos de ballena gris pertenecientes a la población oriental utilizan tres áreas de alimentación, denominadas como primaria, secundaria y terciaria (Kim y Oliver, 1989); en específico, la primaria y la secundaria están situadas en el Ártico, la principal en el Mar de Chukchi y norte del Mar de Bering, y la secundaria al sur del Mar de Bering (Kim y Oliver, 1989; Perryman y Lynn, 2002; Urbán R. *et al.*, 2003; Jones y Swartz, 2009), mientras que la terciaria se extiende desde Alaska hasta la península de Baja California (Nerini, 1984; Calambokidis *et al.*, 1991; Dunham y Duffus, 2001). Su presa principal se identifica en el anfípodo bentónico filtrador *Ampelisca macrocephala*, la cual se acumula en biomasas enormes en el Mar de Bering (Kim y Oliver, 1989; Caraveo-Patiño y Soto, 2005). Sin embargo, otras especies (por ejemplo, camarones, misidáceos, poliquetos, eufásidos, isópodos) (Nerini, 1984; Kim y Oliver, 1989) forman parte de la ecología alimenticia de este misticeto, debido a que la ballena gris posee la habilidad de alternar diferentes técnicas predatorias; la más común es la succión de bentos, pero puede realizar embestidas verticales y filtrar superficialmente el plancton y necton (Jones y Swartz, 2009).

En el año 1999, después de haber sido removida del listado de las especies en peligro de extinción en el 1994 (Moore *et al.*, 2003), la población oriental de la ballena gris fue confirmada sana y sin necesidad de ser protegida legislativamente (Rugh *et al.*, 1999). Desde entonces, en dos ocasiones se registró el aumento del número de ballenas encontradas muertas en condiciones de estrés nutricional y la disminución importante del número de crías reclutadas, particularmente entre 1999 al 2001 (Boeuf *et al.*, 1999; Perryman y Lynn, 2002; Moore *et al.*, 2003) y entre el 2019 y el 2020 (Martínez-Aguilar *et al.*, 2019). Todas las teorías que se formaron para encontrar las causas de esas anomalías consideran cambios en el área de alimentación principal de la especie: la distribución del hielo durante los meses de verano (Perryman *et al.*, 2002), al hecho que posiblemente la ballena gris llegó cerca de su capacidad de carga máxima y por lo tanto está agotando sus presas principales (Wade y Perryman, 2002), o el cambio climático, lo cual estaría afectando las condiciones físicas (Moore *et al.*, 2003) y determinando una transformación de todo el ecosistema del Mar de Bering (Grebmeier *et al.*, 2006).



En este contexto, la plasticidad alimenticia de la ballena gris y el rango tan extenso de sus posibles áreas de alimentación dificultan comprender las causas reales asociadas a grandes mortalidades y éxitos reproductivos negativos (Moore *et al.*, 2003). Durante el pleistoceno, por ejemplo, todas las áreas de alimentación consideradas hoy en día como principales (por ejemplo, Mares de Bering, Chukchi y Beaufort) fueron eliminadas más de 40 veces por la glaciación máxima y el incremento del nivel del mar (Pyenson y Lindberg, 2011); no obstante la ballena gris sobrevivió, quizás debido a su versatilidad en utilizar diferentes hábitos de alimentación, los cuales permitieron aprovechar diferentes presas y/o hábitats.

Hay evidencias asociadas a que la ballena gris sigue alimentándose fuera del Ártico; por ejemplo lo largo de las costas de la Columbia Británica (Dunham y Duffus, 2001; Lang *et al.*, 2014; Burnham y Duffus, 2018; Lagerquist *et al.*, 2019). Dunham and Duffus (2001), en específico, evidencian un cambio de presas, por temporalidad y por tamaño de las presas consumidas, las cuales varían y están formadas por: anfípodos, misidáceos, larvas de cangrejo, y una especie particular de camarón bentónico, *Callinassa californiensis*; además de hipotetizar que los cambios registrados hacia ciertos organismos se puedan relacionar a diferentes condiciones estacionales de la abundancia de éstos. Más recientemente Burnham y Duffus (2018) reportaron que a lo largo de 17 años la comunidad de misidáceos presentes en Clayoquot Sound, en Canadá, sigue abundante a pesar de su aprovechamiento por parte de la ballena gris, en cuanto parece existir una modulación del forrajeo según el comportamiento reproductivo de los invertebrados; además, los autores especulan sobre la posibilidad que la ballena gris pueda distinguir entre presas de alta o baja calidad, lo cual les podría permitir moverse con elección entre hábitats diferentes.

La complejidad de la ecología alimenticia de este misticeto sobresale aún más cuando se analizan todas aquellas evidencias que indican una necesidad por parte de la especie de satisfacer ciertos requerimientos nutricionales asociados a condiciones fisiológicas específicas, como la gestación y la lactancia (Caraveo-Patiño, 2004; Caraveo-Patiño y Soto, 2005; Caraveo-Patiño *et al.*, 2007, 2009). Necesidades que se especula no son satisfechas en su totalidad por las presas de las áreas polares, dominadas por organismos con altos niveles de ácidos grasos

omega 3; y son cubiertas en las áreas de reproducción, donde sus hábitats son caracterizados por una fauna que integra contenidos mayores de ácidos grasos omega 6, considerados importantes para la formación y el desarrollo de cualquier especie de mamífero (Marcel *et al.*, 1968; Williams *et al.*, 1987; Caraveo-Patiño *et al.*, 2009); en particular durante la parte final de la gestación y el inicio de la lactancia, cuando posiblemente aumenta la tasa de crecimiento del sistema nervioso central (Caraveo-Patiño *et al.*, 2009).

Ante todo lo anterior, resulta crítico para el manejo y la conservación de la población oriental ballena gris, y en general para cualquiera de sus poblaciones, entender de manera correcta la interacción que existe entre ecología alimenticia y fisiología de la reproducción, en particular para aquellos individuos que determinan principalmente el reclutamiento de las poblaciones, es decir, las hembras lactantes y sus crías al inicio de la lactancia. Desde diciembre miles de individuos de ballena gris oriental se aglomeran hasta abril en las aguas calmas y protegidas de las lagunas de reproducción, en particular en Ojo de Liebre, San Ignacio y el complejo lagunar de Bahía Magdalena, las cuales están ubicadas en la costa occidental de Baja California Sur, México (Urbán R. *et al.*, 2003). Las madres con sus crías recién nacidas son los organismos que ocupan esas áreas por más tiempo y en números mayores que juveniles, machos o hembras solteras, debido a que las lagunas constituyen el lugar óptimo para que las crías puedan ganar peso y fuerzas antes de empezar la migración al norte hacia las áreas polares de alimentación en el Ártico. La presencia de un número tan alto de parejas madre-cría en áreas costeras y, por lo tanto, fácilmente accesibles, representa una oportunidad para coleccionar la epidermis de ambos grupos de organismos silvestres.

La colecta de la piel de ballenas vivas ofrece la posibilidad de seleccionar *a priori* organismos con condiciones nutricionales y fisiológicas específicas, como hembras lactantes y crías al principio de su periodo de lactancia; que permitiría comprobar cómo dichas condiciones fisiológicas influyen sus valores isotopicos de carbono y nitrógeno. Como ya se ha reportado que ocurre en algunas condiciones nutricionales y fisiológicas de otras especies de ballenas (Newsome *et al.*, 2010; Horstmann-Dehn *et al.*, 2012). La epidermis, el estrato más externo de la piel, difiere entre ballenas y mamíferos terrestres en cuanto en los primero se compone de tres estratos estructurales (Sokolov, 1982; Reeb *et al.*, 2007); esta estructura ha permitido a las

ballenas adaptarse al ambiente acuático, que es más denso que el aire atmosférico, sujeto a cambios repentinos de la temperatura y presión (Reeb *et al.*, 2007). La epidermis almacena la información isotópica para un cierto periodo de tiempo (Vander Zanden *et al.*, 2015), debido a que crece continuamente, desde el más interno estrato basal (EB), donde las nuevas células epiteliales se forman, pasando por un estrato intermedio y extenso, estrato espinoso (ES), hasta el más externo, estrato corneo (EC), donde las células epiteliales sufren la descamación (Hicks *et al.*, 1985; Aubin *et al.*, 1990; Reeb *et al.*, 2007). Actualmente las dinámicas isotópicas asociadas al movimiento de nutrientes en la epidermis de hembras de ballena gris durante la lactancia y la gestación, así como en las crías durante el inicio del consumo de leche y de fetos a término de la gestación no se conocen.

En general, en los mamíferos marinos (por ejemplo, oso polar, ballena jorobada y elefantes marinos), ocurre un fraccionamiento isotópico entre madre-feto y madre-cría, lo cual es especie-específico, tejido-específico y puede ser influenciado por diferentes factores, como la estrategia energética utilizada por las hembras durante la reproducción y su estado nutricional (Polischuk *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2016; Habran *et al.*, 2019). En especies consideradas “capital breeders” se ha demostrado que la gestación determina un decremento de los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y de  $\delta^{15}\text{N}$  en tejidos, debido a la movilización de los lípidos, también al incremento de la tasa de síntesis de las proteínas y al decremento de la excreción del nitrógeno, las cuales son reacciones metabólicas típicamente asociadas a los periodos de ayuno (Martínez Del Rio *et al.*, 2009; Clark *et al.*, 2016). Con respecto al feto, ello se nutre de la sangre placentaria de la madre, rica en proteínas, causa un enriquecimiento en  $^{15}\text{N}$  en los tejidos del feto en comparación con la sangre placentaria, por lo que existe un balance entre los valores isotópicos del feto y de la madre (Borrell *et al.*, 2016). Hasta la fecha, los valores del fraccionamiento isotópico entre hembras gestantes y fetos para ballenas se reportó únicamente por los tejidos musculares de organismos de ballena de aleta, los fetos resultaron ser 1.13‰ y 1.5‰ más enriquecidos que las madres en sus valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y de  $\delta^{15}\text{N}$ , respectivamente (Borrell *et al.*, 2016). El fraccionamiento isotópico entre madre y feto se evalúan raramente en los mamíferos marinos. La información existente para algunas especies de pinnípedos “capital breeders” señala una fuerte variabilidad entre especies y entre tejidos. Por ejemplo, los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  de las células rojas y del suero de la sangre de fetos de foca gris resultan ser más bajos que los de sus madres (de ~0.1‰ y de

0.8‰, respectivamente) mientras que los de  $\delta^{15}\text{N}$  son más altos en los fetos que en sus madres, 2.4‰ y de 1.3‰, respectivamente (Habran *et al.*, 2019). En elefantes marinos los mismos tejidos no difieren en los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  entre fetos y madres, mientras que los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  son 0.7‰ más altos en los fetos que en sus respectivas madres (Habran *et al.*, 2010); finalmente, los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y de  $\delta^{15}\text{N}$  registrados en los bigotes de los elefantes marinos del hemisferio del sur parecen aumentar en los fetos y decrecer en las madres durante toda la gestación, sin llegar al balance esperado (Newsome *et al.*, 2006).

Cuando la lactancia empieza, los perfiles isotópicos se modifican en comparación con la gestación (Newsome *et al.*, 2010). Borrell y colaboradores (2016) reportan que los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  de los tejidos musculares de las ballenas de aleta son más bajos durante la gestación que en la lactancia, mientras que los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  no cambian significativamente durante los dos periodos fisiológicos. Con respecto a las crías de ballena franca (dos individuos), los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y de  $\delta^{15}\text{N}$  son más bajos en la piel que representa la vida afuera del útero materno que en la piel que representante la vida fetal (Horstmann-Dehn *et al.*, 2012).

Por el contrario en otras especies de mamíferos marinos, el suero de algunas hembras lactantes de elefantes marinos muestreadas 5 días después del parto (se consideró como tejido en estado de gestación) y luego 22 días después del parto (tejido en lactancia) resulta más enriquecido en  $^{13}\text{C}$  a los 5 que a los 22 días, mientras que los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  no difieren (Habran *et al.*, 2010). En el suero de las focas grises también los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  son más altos al principio que al final de la lactancia, mientras que el tejido muestreado en la tapa final de la lactancia resulta más enriquecido en  $^{15}\text{N}$  que al principio de la misma (Habran *et al.*, 2019). En algunas especies de pinnípedos, los datos disponibles para las crías no siguen un patrón estándar, a veces resultan ser más altos durante la gestación en comparación con la lactancia, como en el caso de los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  registrados en los bigotes de los elefantes marinos del sur (Lübcker *et al.*, 2020) y los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  registrados en el suero de los elefantes marinos del norte (Habran *et al.*, 2010); en otros casos, aumentan durante la lactancia, como los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  registrados en las células rojas de los elefantes marinos del norte (Habran *et al.*, 2010) y en los bigotes de los elefantes marinos del sur (Lübcker *et al.*, 2020); y otras especies no se modifican, como en las células rojas y en el suero de las crías de foca gris (Habran *et al.*, 2019).

Finalmente, los valores del fraccionamiento isotópico entre hembras y crías lactantes se han evaluado únicamente en algunas especies de pinnípedos (Newsome *et al.*, 2006; Ducatez *et al.*, 2008; Habran *et al.*, 2010, 2019; Cherel *et al.*, 2015). En las especies que se comportan como “capital breeders” durante la lactancia, como los elefantes marinos (Ducatez *et al.*, 2008; Habran *et al.*, 2010) y las focas grises (Habran *et al.*, 2019), los valores de fraccionamiento isotópico para carbono y nitrógeno de hembras y crías difirieron según los tejidos analizados y las especies. En general, la sangre, las células rojas y el suero de las crías lactantes de elefantes marino y focas gris (Habran *et al.*, 2010, 2019) y en los elefantes marinos muestreados después del destete (Ducatez *et al.*, 2008) resultaron almacenar valores más altos de  $\delta^{13}\text{C}$  y de  $\delta^{15}\text{N}$  en comparación con los mismos tejidos de las hembras lactantes. Sin embargo, los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  registrados en el suero y ambos los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y de  $\delta^{15}\text{N}$  del pelo de las crías de la foca gris fueron más bajos que los de los mismos tejidos de las madres respectivas (Habran *et al.*, 2019).

### 3. JUSTIFICACIÓN

En los últimos 20 años ocurrió una fluctuación importante del número de crías de ballena gris nacidas en las áreas de reproducción (Boeuf *et al.*, 1999; Perryman *et al.*, 2002; Jorge Urbán *et al.*, 2003; Martínez-Aguilar *et al.*, 2019), los ejemplares muertos (adultos y juveniles) incrementaron dramáticamente entre el 1999 al 2001 (Gulland *et al.*, 2005; Moore y Huntington, 2008; Thomas *et al.*, 2016) y del 2018 al 2019 (Martínez-Aguilar *et al.*, 2019); se desconoce la causa de esos eventos. Sin embargo, se ha hipotetizado al respecto del efecto de la distribución del hielo en el Ártico durante los meses de verano (Perryman *et al.*, 2002), al hecho que posiblemente la ballena gris llegó cerca de su capacidad de carga máxima y por lo tanto está agotando sus presas principales (Wade y Perryman, 2002), o a variaciones de las condiciones físicas (Moore *et al.*, 2003) y ecosistémicas en el Mar de Bering (Grebmeier *et al.*, 2006).

En este contexto, emerge como crítico entender si posibles alteraciones en la ecología trófica de la especie, a nivel individual y poblacional, pueden afectar las dinámicas fisiológicas de gestación y lactancia, en cuanto se refiere a la adquisición, acumulación y utilización de nutrientes específicos, los cuales tendrían que estar en balance energético para lograr el éxito reproductivo.

El presente trabajo se enfocó a investigar la reproducción de la ballena gris, con particular atención en los cambios isotópicos que ocurren en la epidermis durante los procesos de gestación y lactancia bajo una perspectiva de interacción entre ambas condiciones fisiológicas y la ecología alimenticia de la especie. Como área de estudio se seleccionó la laguna Ojo de Liebre, en Baja California Sur, México, por que es donde se registra la mayor proporción de nacimientos anuales, entre las diferentes áreas de reproducción (Urbán R. *et al.*, 2003); la facilidad de acceso al área, la posibilidad de coleccionar de manera remota muestras de epidermis y el aprovechamiento de tecnología sofisticada (por ejemplo, la espectrometría de masa), permiten estudiar a hembras y crías, el flujo de nutrientes entre hembras y crías lactantes, e inferir el intercambio de nutrientes entre parejas madre-cría previo al nacimiento. Finalmente, explorar si los cambios isotópicos de carbono y nitrógeno en la piel de madres y crías permite

aplicar modelos isotópicos para estimar las fechas de nacimientos de crías, una información raramente disponible para cualquier especie de ballena, y que permitiría detectar variaciones en los patrones de nacimiento y reproducción entre años y, consecuentemente poder evaluar cambios en la producción anual de crías y las posibles causas relacionadas a esos eventos.

La comprensión de los mecanismos que regulan la ecología y la fisiología de la gestación y de la lactancia en la ballena gris permite especular sobre las necesidades específicas de otras ballenas, como por ejemplo de la ballena gris occidental, la cual está listada por la UICN como “condición crítica de peligro de extinción”. Esto permitirá el desarrollo de planes de conservación más completos y eficientes, tanto en las áreas de alimentación como en las áreas de reproducción de las ballenas.

#### **4. HIPÓTESIS**

La caracterización estructural e isotópica de la piel de hembras y crías lactantes de ballena gris permite evaluar eventuales cambios en las condiciones fisiológicas y tróficas a corto (días), mediano (meses) y largo (años) plazo. El hecho de ser una especie “oportunista” le permite adaptarse de manera inmediata a diferentes condiciones tróficas. Sin embargo, cuando las condiciones ambientales cambian y afectan las principales fuentes de alimentación, es posible evaluar esas variaciones mediante el estudio del perfil isotópico de madres con crías.



## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Estudiar la fisiología y ecología trófica de la ballena gris (*Eschrichtius robustus*) durante tres temporadas reproductivas (2011, 2018 y 2019) mediante el análisis de la composición isotópica de piel de hembras y crías lactantes en la Laguna Ojo de Liebre en Baja California Sur, México.

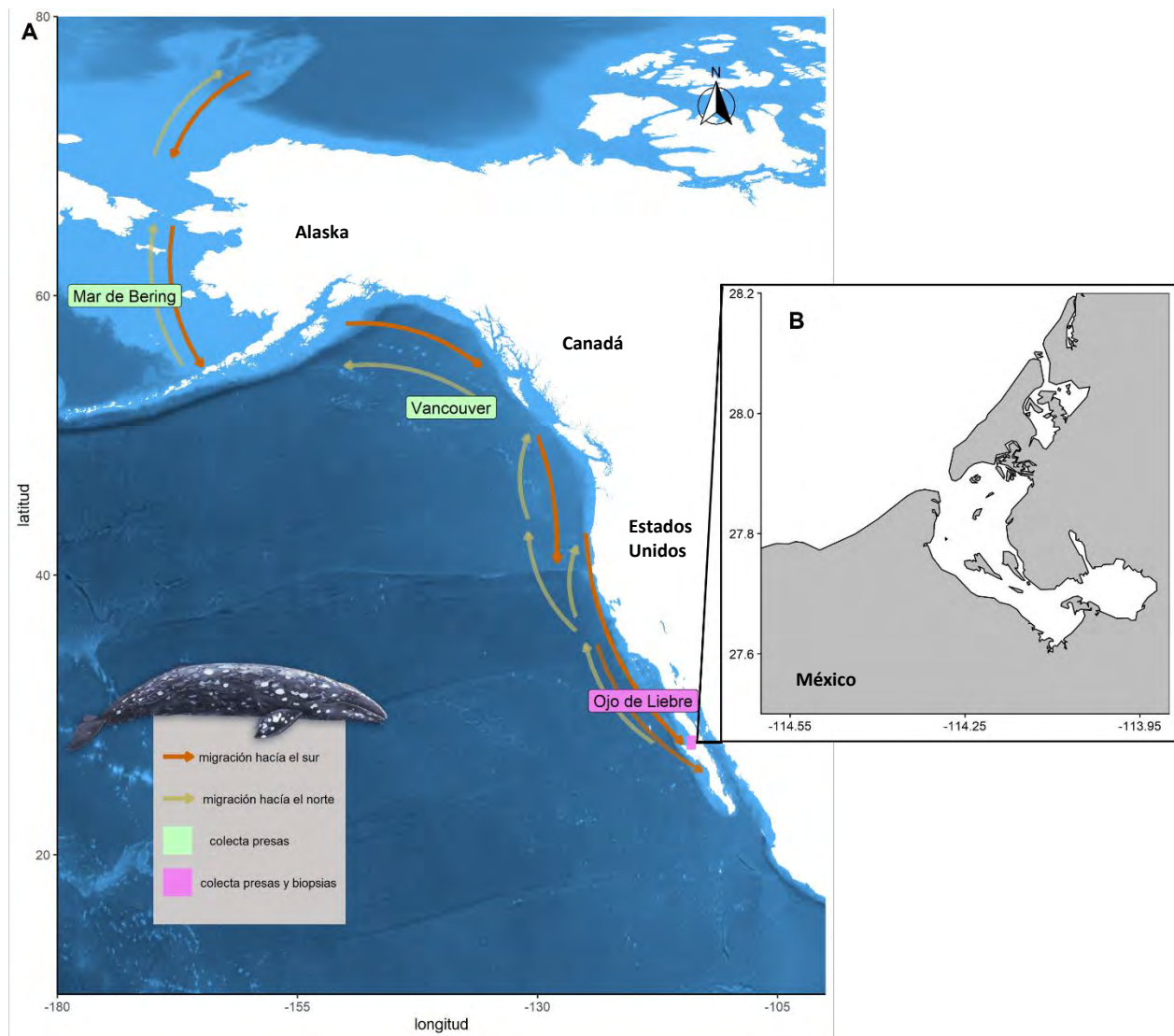
### 5.2 Objetivos particulares

1. Determinar cómo los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  cambian en los diferentes estratos de la epidermis de hembras y crías de ballena gris durante la gestación y lactancia.
2. Estimar el inicio del consumo de leche materna mediante la modelación de los valores isotópicos de los estratos epidérmicos de las crías.
3. Evaluar la contribución de las presas principales del Ártico a la dieta de hembras de ballena gris pertenecientes a la población oriental durante la gestación y lactancia.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Área de estudio

La Laguna Ojo de Liebre (LOL) representa históricamente la más importante para la reproducción y crianza de la ballena gris, en términos de abundancia (Urbán R. *et al.*, 2003). Se ubica en la Reserva del Vizcaíno, en la costa del Pacífico de Baja California Sur, municipio de Mulegé, entre los 27°23' y 27°59' N de latitud y los 114°30' y 114°55' O de longitud y con un área aproximada de ~228,000 hectáreas (Fig. 1) (Macías-Zamora *et al.*, 2008). Es una laguna somera constituida por numerosos canales, los cuales pueden tener profundidades mayores de 20 m. Tiene un cuerpo de agua hipersalino y está rodeada por estanques de evaporación, utilizados por la compañía Exportadora de Sal, S.A. (ESSA) para extraer y comercializar sal marina. Se caracteriza por poseer ecosistemas de tipo lagunar costero marino, en cuanto su batimetría es muy irregular, con muchos bajos e islas planas que se hacen evidentes durante las mareas bajas (Hernández-Aguierre, 2012).



**Figura 1:** Rango de distribución geográfica de la ballena gris oriental y la ubicación de los hábitats en los cuales se colectaron las posibles presas de la especie **(A)**, y el área de estudio principal, laguna Ojo de Liebre, sitio de crianza y reproducción principal de la ballena gris **(B)**. Fuente: NOAA mediante la librería “marmap” del software R; Datum: WGS 1984, proyección: latlong.

## 6.2 Trabajo de campo

Gran parte de las actividades implicadas en esta investigación se relacionaron al método de colecta de biopsias. Debido a que LOL únicamente representa las condiciones abióticas idóneas para el alumbramiento y el inicio de la lactancia (Urbán R. *et al.*, 2003), además de ser área libre de depredadores (Jones y Swartz, 2009). Por lo tanto, en febrero 2018 las actividades en el campo se centraron en delinear el protocolo de muestreo que permitiera obtener biopsias de la epidermis de parejas madre-cría. Garantizar el protocolo en términos de seguridad para

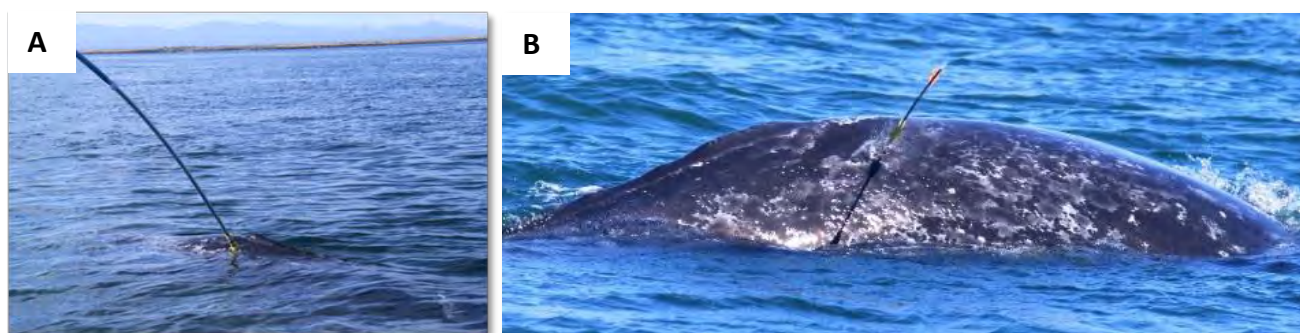
animales e investigadores. Durante el 2019 la actividad en campo se dirigió a coleccionar biopsias de parejas madre-cría al principio y al final de la temporada. Ambos grupos de biopsias se compararon con un conjunto de biopsias de hembras y crías coleccionadas durante febrero 2011, temporada en la cual no se coleccionaron a las parejas, únicamente grupos de hembras y crías al azar, excepto en una ocasión en la cual se logró muestrear una pareja madre-cría.

### **6.2.1 Colecta de biopsias de piel**

En febrero 2011, febrero 2018, enero 2019 y marzo 2019 se realizó el muestreo de piel y capa de grasa de hembras lactantes y crías silvestres de ballena gris, durante la temporada reproductiva en LOL. Todos los muestreos se realizaron mediante embarcaciones menores tipo “panga”, proporcionadas por la compañía de sal “Exportadora de Sal” de Guerrero Negro, Baja California Sur. Las condiciones climáticas consideradas como óptimas contaron con un estado del mar entre 0 y 2 en la escala de Beaufort. El proveedor de previsiones climáticas que se utilizó de referencia fue “windfinder”, disponible en internet.

Los animales considerados como idóneos para la colecta de las biopsias no expresaban señales de estrés por la presencia de la embarcación de muestreo y se movían lentamente. Durante las estaciones de muestreo del 2018 y 2019 se aplicó la metodología del muestreo focal (Mann, 1999), cada evento de muestreo involucró una pareja madre-cría lejos de grandes manadas, los individuos fueron marcados e identificados mediante la foto identificación, y seguidos en un determinado periodo de tiempo (~3 horas). La técnica de la foto identificación consiste en la toma de fotos de partes corporales de la especie objeto que permitan su identificación (Urian *et al.*, 2015). Con respecto a la ballena gris, el enfoque es la parte dorsal, debido a que el patrón de coloración de la piel de dicha área resulta ser de un individuo específico desde el nacimiento. Las tomas fotográficas permitieron reconocer los animales durante y después el muestreo, para identificarlos en caso de presencia de otros organismos y para evitar la recolecta involuntaria de los mismos. Finalmente, antes y después de la toma de biopsias se registraron diferentes actividades conductuales.

Las biopsias de piel y capa de grasa que se tomaron fueron de tipo “profundo” y “superficial”. En cuanto a las “profundas”, la metodología consistió en una hawaiana de 6 metros de largo, como sugieren por (Reeb y Best, 2006). A en el extremo de la hawaiana se colocaron puntas de acero inoxidable huecas: de 20 cm de largo y 0.6 cm de grosor en hembras adultas, y de 10 cm de largo y 0.4 cm de grosor en crías (Fig. 3A). Cuando el muestreo involucró la colecta de individuos recién nacidos, con piel de espesor pequeño, el tamaño de la punta fue de 5 cm, mediante la aplicación de un tapón de seguridad, para evitar la colecta de tejido muscular. Con respecto a las biopsias “superficiales”, los tejidos se colectaron con una a una ballesta a 15-20 metros de distancia con un dardo de acero inoxidable, de 3 cm de largo y 0.6 cm de grosor (Fig. 3B).



**Figura 2:** Colecta de las biopsias de piel y capa de grasa: **A)** hawaiana con punta modificada, **B)** flecha utilizando una ballesta.

Antes y después de cada evento de muestreo todas las puntas fueron esterilizadas con alcohol. Las biopsias fueron envueltas en papel aluminio y transportadas en hielo hasta el laboratorio del CIBNOR, unidad de Guerrero Negro, donde se guardaron primero en nitrógeno líquido y después en ultracongelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  (CIBNOR, Unidad de La Paz).

### 6.2.2 Colecta de las presas

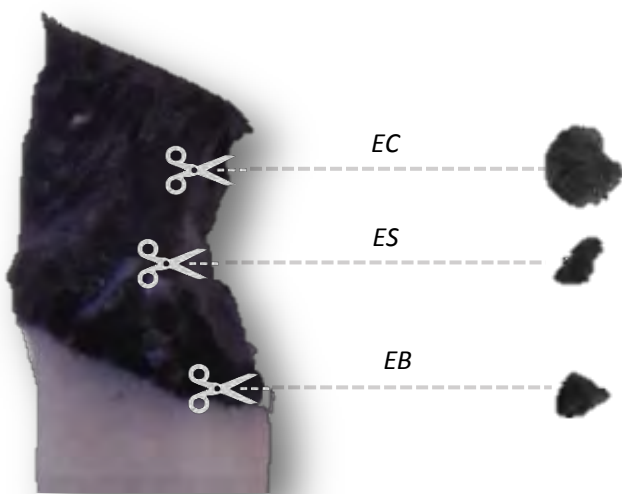
Para investigar los hábitos alimenticios de las hembras lactantes muestreadas en la LOL, se analizaron muestras de anfípodos y misidáceos, guardadas en ultracongelación ( $-80^{\circ}\text{C}$ ), colectadas en el Mar de Bering y Chukchi (Alaska) y en las aguas de la Isla Vancouver (Canadá) colectadas durante el año 2002 (Caraveo-Patiño, 2004; Caraveo-Patiño y Soto, 2005). Además,

se colectaron muestras de bentos en el año 2018 en las áreas de la LOL donde se registraron eventos alimenticios de ballena gris, para investigar el posible aporte nutricional de los organismos bentónicos de la LOL en la dieta de las ballenas durante su temporada reproductiva. La fauna bentónica se colectó con el uso de una draga tipo Ekman (0.2 m<sup>2</sup>), cada muestra de presas fue separada del substrato mediante un tamiz con luz de malla de 0.5mm con uso de agua de mar y colocadas en bolsas de plástico estériles en hielo para ser transportadas del campo a las instalaciones de CIBNOR en Guerrero Negro. Previa separación por clase de organismos bentónicos (es decir, anfípodos y poliquetos), las presas se almacenaron en nitrógeno líquido para transportarlas a las instalaciones del CIBNOR en La Paz, donde se mantuvieron en ultracongelación (-80°C) hasta su procesamiento.

### **6.3 Determinación de valores isotópicos.**

#### **6.3.1 Preparación de submuestras por estrato epidérmico y presas.**

De cada biopsia de piel de hembras y crías se obtuvieron una submuestra mediante cortes realizados con un bisturí estéril en las tres componentes estructurales de la epidermis (Fig. 3): estrato corneo (EC), estrato spinoso (ES) y estrato basal (EB). De cada submuestra los componentes lipídicos y proteicos fueron separados mediante el método de Folch *et al.* (1957). Dicha técnica contempla la inmersión de los tejidos descongelados en una mezcla de cloroformo y metanol (en proporción 2:1), con cantidades 20 veces mayores que el peso de cada submuestra. Las submuestras del tejido y reactivo se guardaron en viales de vidrio, tapados con papel aluminio, en congelación por 24 horas. En seguida, los solventes se evaporaron bajo una campana de ventilación con uso de nitrógeno. Finalmente, los tejidos sin lípidos se separaron en viales diferentes y fueron almacenados junto con los viales extractos de lípidos en ultracongelación (-80°C).



**Figura 3:** Cortes efectuados en los tejidos de una biopsia de ballena gris, para obtener submuestras de los tres estratos estructurales de la epidermis, estrato corneo (EC), estrato espinoso (ES) y estrato basal (EB).

Con respecto a las muestras de las presas una parte fue analizada sin proceder con la extracción de los lípidos, mientras que otra fue tratada utilizando el mismo protocolo de las biopsias para separar lípidos totales y componentes estructurales.

Finalmente, todas las muestras (tejidos de ballena gris y organismos planctónicos y bentónicos) fueron liofilizadas, pulverizadas y pesadas en capsulas de estaño ( $0.5 \text{ mg} \pm 0.05$  o  $1 \text{ mg} \pm 0.02$ , según si el laboratorio donde se efectuaron los análisis fue el de Hawai'i at Mānoa o de US. Davis).

### 6.3.2 Valores isotópicos de carbono y nitrógeno.

La composición isotópica del carbono (C) y del nitrógeno (N) de las componentes proteicas de los estratos colectados en los años 2011 y 2018 y las presas colectados en el 2002 y 2018 fueron determinadas en la Universidad de Hawai'i at Mānoa, Estados Unidos, en donde se utilizó un sistema a combustión Costech elemental 180 (Modelo 4010), acoplado a un espectrómetro de masa Thermo-Finnigan Delta plus XP de razones isotópicas 181, con una interfaz Conflo IV. Los materiales de referencia utilizados para calibrar las muestras y corregirlas debido al instrumento fueron glicina y tejido de músculo de atún. Los perfiles de isotopos del C y del N de las componentes proteicas de los estratos y presas colectadas en el año 2019 fueron determinadas

en el laboratorio de análisis de isótopos estables de la Universidad de California, Davis, Estados Unidos; se utilizó un espectrómetro de masa “Elementar Vario Micro Cube” (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Germany) acoplado con una interfaz Isoprime VISION. Los materiales de referencia utilizados para calibrar las muestras y corregirlas debido al instrumento fueron flores de alfalfa, hígado de bovino, alanina enriquecida, ácido glutámico y nylon 6. En ambos Laboratorios los estándares utilizados para el carbono y el nitrógeno fueron V-PDB (PeeDee Belemnite) y el N<sub>2</sub> atmosférico respectivamente, conocido por su sigla en inglés “AIR”. El acrónimo V-PDB corresponde a la PeeDee Belemnite (PDB) distribuida por la sede central de la agencia de energía nuclear internacional que distribuye los estándares y se localiza en Viena (V), Austria. La PDB es una calcita que se formó durante el cretáceo superior en el río Pee Dee en la Carolina del Sur. Hoy en día se utilizan PDB más recientes, calibradas con las PDB originales.

Todos los valores isotópicos se expresaron en valores con la notación  $\delta$ , valor introducido por McKinney *et al.* (1950) para reportar los valores isotópicos en relación a estándares universales de la siguiente manera:

$$\delta = \left( \frac{R_x - R_{std}}{R_{std}} \right) \times 1000 \quad (\text{ecn. 1})$$

donde  $R$  es la proporción de la abundancia del isótopo más pesado contra del más ligero,  $x$  indica la muestra y  $std$  el material de referencia (por su sigla en inglés “standard”). En ambos laboratorios la exactitud y la precisión de los equipos al determinar los valores  $\delta$  fue <0.2 ‰, valor calibrado de manera continua al introducir cada 10 muestras diferentes materiales de referencia.

### 6.3.3 El análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el uso del programa “R” en su versión 3.6.0 para Windows (R core Team 2017). Los valores de probabilidad <0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.



### 6.3.3.1 Evaluación de los cambios isotópicos entre estratos epidérmicos

Los valores isotópicos de cada estrato de la epidermis de las hembras y de las crías lactantes fueron considerados como representativos de diferentes periodos temporales. Se asumió para la epidermis de la ballena gris que las células epidérmicas se mueven a lo largo del EB entre 0 y 10 días después de su formación, en 50 días alcanzan la parte más externa del ES y su ciclo de vida se completa después de 75 días en el EC. Tal como se ha corroborado en células de la piel de otros mamíferos; mediante el marcaje de las células epidérmicas de algunos individuos en cautiverio, en específico tursiones (Hicks *et al.*, 1985) y belugas (Aubin *et al.*, 1990). La composición isotópica de las células epidérmicas recién nacidas representa la composición isotópica de los constituyentes del flujo de sangre en ese momento específico (Ayliffe *et al.*, 2004). Giménez y colaboradores (2016) estimaron que la vida isotópica media del carbono y del nitrógeno en el EC de la epidermis de los tursiones es de  $24 \pm 8$  días y de  $41 \pm 16$  días, respectivamente, mientras que son necesarios  $104 \pm 35$  días y  $180 \pm 71$  días para que los isótopos del carbono y del nitrógeno, respectivamente, se recambien completamente en el mismo estrato. Busquets-Vass y colaboradores (2017) reportan valores parecidos a los de Giménez y colaboradores (2016) para las tasas de recambio totales de los isótopos del nitrógeno en el EC de la epidermis de la ballena azul ( $163 \pm 91$  días), la cual es un animal de tamaño mucho mayor que el tursión. Finalmente, asumiendo una tasa de producción y descamación constante para los tres estratos de la epidermis, se espera que en cada estrato la tasa de recambio total para el nitrógeno sea entre los  $54 \pm 53$  y los  $69 \pm 49$  días (Wild *et al.*, 2018).

Para analizar la variación de los valores  $\delta^{13}\text{C}$  y de  $\delta^{15}\text{N}$  registrados en los estratos epidérmicos de cada individuo y evaluar patrones de cambio entre ellos, se procedió con la transformación a partir de las diferencias isotópicas registradas entre cada estrato epidérmico en relación con el EC. En caso de que una pareja madre-cría fuera colectada y recolectada durante la misma temporada reproductiva (diferente mes, mismo año), se calcularon las diferencias entre los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y de  $\delta^{15}\text{N}$  registrados en los mismos estratos epidérmicos durante meses diferentes, en la hembra y en la cría por separado, para evaluar los patrones de cambio.

Para evaluar las posibles diferencias significativas entre los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y de  $\delta^{15}\text{N}$  registrados en los distintos estratos de las epidermis de los organismos colectados se utilizaron los modelos de efecto lineal mixto (“lme” por su sigla en inglés, librería “lme4”). Los modelos fueron parametrizados con variables aleatorias y fijas; la parametrización se obtuvo mediante una selección del modelo en avance, ósea los efectos aleatorios fueron incluidos antes que los efectos fijos. Las variables aleatorias fueron 3: 1) “ID”, los valores isotópicos de los estratos de un mismo individuo como medidas repetidas; 2) “ID madre-cría”, los valores isotópicos de una madre y de su respectiva cría relacionados entre sí, debido a los procesos de gestación y de lactancia; 3) “año y mes”, los años y meses de muestreo (febrero 2011/febrero 2018/enero 2019/marzo 2019). Los modelos se parametrizaron para autorizar los valores isotópicos a variar entre las condiciones del contorno de cada “ID” y entre las condiciones del contorno de cada “ID madre-cría” (1 | ID madre-cría/ID estratos) (Bates *et al.*, 2015). Los efectos fijos fueron también 3: 1) “estratos” (EC/ES/EB), 2), “edad” (madre/cría), 3) la interacción entre “estratos” y “edad”. El modelo más parsimonioso fue seleccionado según el valor AICc más bajo y según las ponderaciones del AICc más alto (“AICc wt”). Las variables fueron probadas por colinealidad y las gráficas de los residuos fueron examinadas visualmente para determinar si había una desviación de la homocedasticidad y de la normalidad (librería “performance”). Si los residuos no siguieron una distribución normal, los valores atípicos fueron excluidos o, al contrario, si el número de valores atípicos era demasiado alto (>6), el modelo más parsimonioso fue parametrizado mediante estadística robusta (librería “robustlmm”). Para evaluar el efecto de la magnitud de los coeficientes se calculó el  $\eta^2$  parcial y sus intervalos de confianza (librería “effect-size”). Finalmente, se estimaron las medias marginales (librería “emmeans”) y los valores  $p$  se ajustaron para efectuar el análisis *post-hoc* de Holm para calcular las diferencias significativas entre los valores isotópicos de los estratos de las epidermis de las madres y de las crías.

Se utilizaron las pruebas  $t$  pareadas para analizar conjuntamente los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y de  $\delta^{15}\text{N}$  en las parejas madre-cría; en particular se compararon antes los valores medios de  $\delta^{13}\text{C}$  y de  $\delta^{15}\text{N}$  y luego los valores isotópicos específicos de cada estrato. Se utilizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para evaluar la distribución de los datos; para datos no normalmente distribuidos se utilizaron las pruebas Wilcoxon para dos muestras, en específico la

prueba Wilcoxon Rank Sum y la prueba Signed Rank (librería “exactRankTests” para R).

### 6.3.3.2 Estimación del inicio del consumo de leche materna mediante la modelación de los valores isotópicos.

En general, cuando ocurre un cambio en la dieta de un animal, la composición isotópica de sus tejidos cambia con el tiempo. Ese cambio se describe matemáticamente con una curva de decaimiento exponencial (Klaassen *et al.*, 2010):

$$\delta t = (\delta(0) - \delta(\infty))e^{-\lambda t} + \delta(\infty) \quad (\text{ecn. 2})$$

En la ecuación  $\delta(0)$  representa el valor isotópico de un tejido que se encuentra en estado estacionario con la dieta vieja, y  $\delta(\infty)$  es el valor isotópico del mismo tejido cuando se encuentra en estado estacionario con la dieta nueva. El parámetro  $t$  representa cuanto tiempo hace que el animal cambió su dieta (en días), y  $\lambda$  es una constante de primer grado que se obtiene de los datos. Si se conoce la vida media ( $t^{1/2}$ ) de un determinado isótopo, definida como el tiempo necesario para el isótopo en cuestión en llegar al valor medio entre los estados estacionarios de la vieja y nueva dieta (Boecklen *et al.*, 2011), entonces es posible calcular  $\lambda$  a partir de la ecuación (Tieszen *et al.*, 1983; Madigan *et al.*, 2012):

$$t^{1/2} = \ln(2) / \lambda \quad (\text{ecn. 3})$$

En este estudio se hipotetizó que, en la piel de las crías de ballena gris, los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  durante plena gestación es equivalente a  $\delta(0)$ , la dieta vieja, que difieren de los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  se registran en estado estacionario con la leche materna,  $\delta(\infty)$ , es decir la dieta nueva. En consecuencia, cuándo ocurre dicho cambio en la dieta de una cría, puede ser una estimación temporal de cuando nació, previo a la fecha de cuando se colectó la biopsia de su epidermis. Según la fecha de nacimiento de la cría, el efecto del cambio de la dieta influenciará a los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  de los diferentes estratos de manera diferente; por ejemplo, si la cría nació poco antes de ser muestreada, se espera que solamente los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  del EB, ósea del estrato más nuevo, sea influenciado por el cambio de gestación a lactancia. Al contrario, si la cría había

nacido semanas antes de la colecta de su epidermis, el cambio de dieta podía haber influido también en los valores isotópicos registrados en el ES o el EC, o solo en los del ES.

En este estudio la ecuación 2 (ecn. 2) fue utilizada para calcular cuando la cría cambió su dieta de la asimilación de la sangre placentaria a la toma de la leche materna, lo cual corresponde al cálculo de la fecha de su nacimiento. Esta aproximación se usó para cada uno de los estratos estructurales de todas las crías muestreadas en pareja con sus madres:

$$t = \frac{\ln \frac{\delta(0) - \delta(\infty)}{\delta(t) - \delta(\infty)}}{\lambda} \quad (\text{ecn. 4})$$

Se asumió que  $\lambda$  puede ser calculada utilizando la ecuación 3 (ecn. 3), al suponer que  $t^{1/2}$  tenga un valor de  $42 \pm 16$  días para los isotopos estables de nitrógeno (Giménez *et al.*, 2016).

El fraccionamiento isotópico del nitrógeno entre madre y feto/cría es especie-especifico (Jenkins *et al.*, 2001) pero algunos patrones permanecen constantes, por ejemplo se espera que los valores del  $\delta^{15}\text{N}$  disminuyan en los tejidos de las hembras gestantes desde la concepción hasta el parto; pero la velocidad con la cual los valores isotópicos del nitrógeno disminuyen es directamente proporcional al incremento de peso por parte del feto (Fuller *et al.*, 2004; Clark *et al.*, 2016). Si eso es cierto, se espera observar el fraccionamiento isotópico máximo entre madre y feto justamente antes del parto.

En este estudio, el cálculo del fraccionamiento isotópico entre hembra y feto, se efectuó siguiendo dos metodologías diferentes; ambas están basadas en la historia de vida de la ballena gris, en donde el nacimiento de las crías ocurre a finales de diciembre y mitad de febrero (Jones y Swartz, 2009):

1. Se consideraron las tasas de recambio de las células epidérmicas (Hicks *et al.*, 1985; Aubin *et al.*, 1990) y las de recambio total del  $\delta^{15}\text{N}$  (Giménez *et al.*, 2016; Busquets-Vass *et al.*, 2017); los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  del EC de parejas de hembras y crías se asociaron siempre a la gestación, independientemente de la fecha de nacimiento de las crías. En consecuencia, el fraccionamiento madre-feto se calculó restando el valor del  $\delta^{15}\text{N}$  registrado en el EC de la madre del valor del  $\delta^{15}\text{N}$  registrado en el EC de la cría.

2. Se evaluaron los patrones de los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  en los diferentes estratos estructurales de cada organismo, y se teorizó que según la fecha de nacimiento de la cría los efectos de la gestación se podían reflejar en cualquier estrato epidérmico. Consecuentemente, el fraccionamiento madre-feto se calculó restando el valor máximo de  $\delta^{15}\text{N}$  registrado en los estratos epidérmicos de la madre del valor máximo de  $\delta^{15}\text{N}$  registrado en los estratos epidérmicos de la cría.

Para las dos metodologías se teorizó que el fraccionamiento isotópico madre-cría máximo pudiera ser utilizado para calcular el valor  $\delta(0)_{\text{cria}}$  de la siguiente manera:

$$\delta(0)_{\text{cria}} = \delta(0)_{\text{madre}} + \text{fraccionamiento } (\text{‰}) \quad (\text{ecn. 5})$$

Consecuentemente,  $\delta(\infty)$  se calculó reorganizando la ecn. 1:

$$\delta(\infty) = \frac{(\delta(t) - \delta(0)e^{-\lambda t})}{1 - e^{-\lambda t}} \quad (\text{ecn. 6})$$

Ninguno de los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  registrados en las epidermis de las crías podía representar  $\delta(t)$ , en cuanto  $t$  representa la variable desconocida principal de nuestro modelo. Jenkins y colaboradores (2001) han presentado evidencia de la existencia de una correlación de los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  de las madres con los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  de las crías en un momento específico después del nacimiento, tal correlación se demostró que existe en 11 especies de mamíferos terrestres que difieren en tamaño y dieta. En específico, dichos autores demostraron que aproximadamente 15 días después del nacimiento los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  de las componentes de la sangre (células rojas y plasma) de las madres continuaban reflejando  $\delta(0)$ , mientras que los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  de las componentes de la sangre de las crías eran parecidos a los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  registrados en la sangre de las respectivas madres. En este estudio se consideró plausible que los mismos patrones puedan ocurrir en los mamíferos marinos también, dado que las células rojas y el plasma tienen tasas de recambio de  $\delta^{15}\text{N}$  que son comparables a las de los estratos epidérmicos (Jenkins *et al.*, 2001; Ayliffe *et al.*, 2004; Lesage *et al.*, 2010). Si esto es cierto, al encontrar valores de  $\delta^{15}\text{N}$  parecidos en los estratos epidérmicos de una madre y de

una cría, dichos valores representan los 15 días después del nacimiento y, consecuentemente, es posible resolver las ecuaciones 3 y 6 utilizando un valor de  $\delta(t)$  por las crías de 15 días.

Los valores de  $\delta(0)$  y de  $\delta(\infty)$  calculados por cada cría se utilizaron para crear una curva de decadencia exponencial que representara el cambio en los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  debido a los efectos de la gestación completa y de la lactancia. Adicionalmente, se calculó la edad de cada estrato epidérmico utilizando la ecn 4, también se calculó el valor esperado de  $\delta^{15}\text{N}$  en la epidermis al tiempo  $t^{1/2}$  utilizando la ecuación 2 (ecn. 2). La edad final de cada cría se calculó restando los resultados de la ecuación 4 de la fecha en la cual se obtuvieron las biopsias de piel.

En caso de que una pareja madre-cría fue colectada y recolectada durante la misma temporada reproductiva (es decir, diferente mes, mismo año), la precisión de estimación del reloj isotópico fue probada calculando dos veces la fecha de nacimiento de la cría, los valores isotópicos registrados en su epidermis y en la de la respectiva madre durante la colecta y recolecta.

### **6.3.3.3 Evaluación de la contribución de las presas del Ártico en la epidermis de hembras y crías.**

En general, la composición isotópica de los tejidos de los depredadores es determinada por la composición isotópica de la mezcla de las proteínas asimiladas mediante la alimentación (Phillips, 2012; Parnell *et al.*, 2013). Cuando los valores isotópicos de los tejidos de los depredadores y de las posibles presas son conocidos, es posible determinar en cual proporción cada presa influyó en la dieta de un cierto individuo o de un grupo de organismos mediante el uso de modelos de mezcla de los isotopos estables (SIMM, por sus siglas en inglés) (Hopkins y Ferguson, 2012), que usán una aproximación estadística de tipo bayesiano.

#### **6.3.3.3.1 Transformación de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de las epidermis en probabilidades de contribución de presas.**

En particular, los SIMM de tipo bayesiano (SIMMB) (Moore y Semmens, 2008), son una herramienta para evaluar las probabilidades de contribución de diferentes fuentes de información isotópica (por ejemplo, las presas consumidas por un depredador). Por tanto, la composición isotópica del tejido del depredador representa una “mezcla isotópica” originada por lo que fue asimilado en términos de ciertos elementos (por ejemplo, C y N) de las presas

consumidas en un tiempo determinado; el valor de la probabilidad de contribución de una presa dada puede inferirse con mayor ó menor precisión dependiendo de la información disponible de las variaciones de sus valores isotópicos (es decir, desviación estándar), y la fracción del total de isótopos que fueron asimilados en las estructuras de los tejidos de los depredadores (es decir, racionamiento isotópico).

Por lo anterior las variables necesarias para la parametrización de los SIMMB pueden ser obligatorias u opcionales: los valores isotópicos promedios y las respectivas desviaciones estándares del tejido del depredador y de las posibles presas son informaciones obligatorias; mientras que los factores de discriminación isotópica depredador-presa y las concentraciones isotópicas en las presas son opcionales (Hopkins y Ferguson, 2012; Phillips, 2012).

En este estudio, los SIMMB fueron utilizados para determinar cual fue el porcentaje de contribución de los anfípodos del MB en la composición isotópica del EC y EB de las hembras, la leche (inferida a partir del EB de la cría), y la sangre placentaria (inferida a partir del EC de la cría). Se usó la librería “simmr” para transformar cada uno de los valores isotópicos a los porcentajes de contribución isotópica probables de diferentes grupos de presas (es decir, fuentes isotópicas).

Puesto que las presas del MB son las principales fuentes de carbono y nitrógeno para la ballena gris, y dado que las actividades de forrajeo de las hembras gestantes dependen principalmente del Ártico (Villegas-Amtmann *et al.*, 2015), y en particular el número de los nacimientos anuales (Boeuf *et al.*, 1999; Perryman *et al.*, 2002; Gulland *et al.*, 2005; Martínez-Aguilar *et al.*, 2019); los SIMMB se implementaron bajo la suposición general que el carbono y nitrógeno de la epidermis de todas las hembras en gestación que migran cada año a las lagunas de reproducción, previamente consumieron las presas del MB (es decir, anfípodos bentónicos), las presas que definen su éxito reproductivo en términos de biomasa y energía. Por tanto, en cualquier nivel de profundidad de la epidermis, independientemente de la fecha de colecta, en particular durante su estancia en las lagunas de reproducción, la fuente MB se reflejaría como la más probable. Patrón que se debería reflejar previamente en la sangre placentaria y luego en la leche; en particular debido al ayuno que experimentan todas las hembras durante la parte final

de la gestación y el inicio de la lactancia en las lagunas de reproducción (Perryman *et al.*, 2002; Perryman y Lynn, 2002; Jones y Swartz, 2009; Villegas-Amtmann *et al.*, 2015).

Las fuentes isotópicas adicionales a las del MB consideradas como efectos en los SIMMB fueron de presas de dos latitudes: las que ocurren en el extremo sur de su migración reproductora (es decir, LOL), y de un área intermedia en el corredor migratorio (es decir, Isla Vancouver). Se ha reportado que la población oriental de ballena gris realiza eventos de actividad de alimentación cada año en las costas de la Isla Vancouver (IV) (Dunham y Duffus, 2001; Burnham y Duffus, 2018), y en las áreas de reproducción (Caraveo-Patiño y Soto, 2005; Caraveo-Patiño *et al.*, 2007). Por tanto, se implementaron SIMMB en todas las hembras y crías, con el fin de evaluar la probabilidad de contribución isotópica de las presas principales del MB. Se usó como primera aproximación la mezcla isotópica de la epidermis con la mayor probabilidad *a priori* de haber sido asimiladas como fuentes de carbono y nitrógeno en dicho tejido. Por tal razón se usó el estrato más antiguo de la epidermis (es decir, EC) para corroborar tal asunción trófica. De acuerdo en la literatura, este estrato puede registrar presas asimiladas hasta 70 días antes de la colecta (Hicks *et al.*, 1985; Busquets-Vass *et al.*, 2017; Gelippi *et al.*, 2020). Para cada uno de los SIMMB se consideraron como fuentes isotópicas de información además de los anfípodos del MB, los valores isotópicos de misidáceos de IV, y dos tipos de presas (es decir, anfípodos y poliquetos) posiblemente consumidas en la principal laguna de reproducción (es decir, LOL). Dado que los factores de discriminación trófica ballena gris-presas para carbono y nitrógeno son aún desconocidos, se usaron los factores de discriminación trófica depredador-presa reportados por Giménez y colaboradores (2016) para delfines, en específico  $0.93 \pm 0.56$  ‰ para los isótopos del carbono y  $1.74 \pm 0.55$  ‰ para los isótopos del nitrógeno.

Debido a que no se conoce la probabilidad de contribución de las presas de LOL, se implementó un primer modelo (SIMMB-I) con ambas fuentes de información isotópica (es decir, anfípodos y poliquetos). Los resultados de este primer SIMMB-I fueron usados principalmente para descartar las presas con menor probabilidad de contribución al EC de cada hembra. Posteriormente, a partir de las fuentes de mayor probabilidad de contribución se reajustó un nuevo modelo (SIMMB-II) con solo tres fuentes de información isotópica (es decir, MB, IV y la que resultó con mayor probabilidad de LOL); las cuales también se usaron para implementar los



modelos que evaluaron su efecto en la composición isotópica de sus estratos más recientemente formados (es decir, EB); estrato que puede registrar fuentes isotópicas de presas de 10 días aproximadamente (Gelippi *et al.*, 2020).

### 6.3.3.3.2 Estimación de los valores isotópicos de la sangre placentaria y leche a partir de la epidermis de hembras y crías

Las proteínas que forman la epidermis de las crías derivan de la sangre placentaria y/o de la leche materna, los cuales son tejidos imposibles de colectar de animales vivos y silvestres. Sin embargo, la composición isotópica de los tejidos de los animales ( $\delta_{\text{tejido}}$ ) está directamente asociada a la composición isotópica de su alimento ( $\delta_{\text{alimento}}$ ) y dicha relación se describe matemáticamente mediante la fórmula (DeNiro y Epstein, 1981):

$$\delta_{\text{tejido}} = \delta_{\text{alimento}} + \Delta_{dt} \quad (\text{ecn. 7})$$

Donde  $\Delta_{dt}$  representa el factor de enriquecimiento trófico que existe entre tejido y alimento. Si es cierto que las hembras catabolizan sus tejidos para producir la sangre placentaria y leche, la composición nutricional de dichos tejidos debería estar íntimamente ligada a la composición nutricional de la dieta de las hembras (Iverson *et al.*, 1997). Por ello, se estimaron los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y de  $\delta^{15}\text{N}$  de la sangre placentaria y/o leche materna a partir de la composición isotópica del EC y EB de cada cría mediante la ecuación 7, utilizando también los valores  $\Delta_{dt}$  para delfines reportados por Giménez y colaboradores (2016). Finalmente, se implementaron los SIMMB para inferir las probabilidades de contribución de las presas; con las mismas tres fuentes isotópicas usadas en cada hembra, se implementaron nuevos modelos para evaluar el efecto en la composición isotópica de la sangre placentaria (SIMMB-III), y leche (SIMMB-IV), las cuales deberían de coincidir con las inferencias derivadas de los modelos de la epidermis de sus respectivas madres. Para las crías muestreadas sin madres se utilizó la combinación de presas que prevaleció como espectro trófico (es decir, MB, iV y LOL) en las hembras muestreadas para los mismos meses y años.

### 6.3.3.3 Análisis estadístico de las probables contribuciones isotópicas

A cada estrato epidérmico, sangre placentaria y leche, transformados en sus presas (es decir, MB, IV, LOL), se le agregó una variable categórica correspondiente a la presa que los SMMIB infirieron como más probable en LOL (es decir, anfípodos o poliquetos).

Para identificar los efectos de los porcentajes de contribución isotópica probables de diferentes grupos de presas, se usaron diagramas ternarios (librería “ggtern”) (Baker, 1992), con el fin de visualizar la composición isotópica para todos los estratos epidérmicos de las hembras (es decir, EC, EB), de la sangre placentaria y la leche que fueron asimiladas en la epidermis de sus crías, para cada una de las temporadas anuales (es decir, febrero 2011 y febrero 2018), y los dos meses del 2019 (es decir, enero y marzo, principio y fin de la temporada). Cada diagrama representa un triángulo equilátero, cuyos vértices corresponden al porcentaje de contribución máxima de cada una de las tres fuentes isotópicas (es decir, presas) (100%); en cada lado, se grafica una flecha para indicar la dirección del incremento de las probabilidades de contribución de cada fuente isotópica. De esta manera, en el interior del diagrama, están posicionados los  $n$  puntos, representantes de las  $n$  intersecciones, que los ubican en las coordenadas de las probabilidades de contribución de las tres presas relativas a cada individuo (estratos epidémicos, sangre placentaria y leche). Se graficaron al interior del triángulo las probabilidades de contribución promedio de las variables categóricas (con dos colores diferentes), con el fin de identificar patrones de dispersión entre los puntos.

De igual forma, si una pareja madre-cría fuera colectada y recolectada durante la misma temporada reproductiva (es decir, diferente mes, mismo año), para detectar patrones de cambio en los porcentajes de contribución isotópica de las tres fuentes seleccionadas (es decir, anfípodos del MB, misidáceos de IV, anfípodos o poliquetos de LOL) en la composición isotópica de los dos estratos epidérmicos de la hembra (es decir, EC, EB), de la sangre placentaria y la leche asimiladas en la epidermis de la crías, las estimaciones de los SIMMB se visualizaron por separado para cada mes de muestreo.

Para evaluar las posibles diferencias significativas en las contribuciones probables de las presas, se realizaron modelos generalizados de efectos mixtos (GLME, por sus siglas en inglés, con el uso de la librería “glmmTMB”). La variable respuesta nombrada “contribución de las presas” fue de tipo proporcional (es decir, valor de 0 a 1), por lo tanto, se consideró una distribución beta de los errores. Se consideraron dos variables aleatorias: 1) “ID”, los porcentajes de contribución de cada presa en los valores isotópicos de los estratos de epidermis de un mismo individuo como medidas repetidas; 2) “ID madre-cría”, los porcentajes de contribución de cada presa en los valores isotópicos de una madre y de su respectiva cría relacionados entre sí, debido a los procesos de gestación y lactancia. Los modelos se parametrizaron para autorizar las proporciones de la contribución de cada presa a variar entre las condiciones de contorno de cada “ID” y entre cada “ID madre-cría” (1 | ID madre-cría/ID estratos) (Bates *et al.*, 2015). Los efectos fijos fueron cuatro: 1) “estratos” (EC/EB); 2) “edad” (madre/cría); 3) la interacción entre “estratos” y “edad” y 4) “año y mes” (febrero 2011/febrero 2018/enero 2019/marzo 2019). Se aplicó una selección en avances de las variables, en particular se incluyeron primero las aleatorias y luego las fijas (librería “glmmTMB”). El modelo más parsimonioso fue seleccionado según el valor AICc más bajo y según las ponderaciones del AICc más alto (“AICc wt”). Las gráficas de los residuos fueron examinadas visualmente para determinar si había una desviación de la homocedasticidad y la normalidad (librería “performance”). Finalmente, se estimaron las medias marginales (librería “emmeans”) y los valores  $p$  se ajustaron para efectuar el análisis *post-hoc* de Holm para calcular las diferencias significativas entre la contribución de las distintas fuentes isotópicas en los valores  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  de los estratos de las epidermis entre meses y años de muestreo.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Colecta de biopsias

En el análisis del número total de biopsias colectadas se puede observar un incremento entre temporadas, también que el número de crías colectadas solas fue mayor al número de hembras solas (Tabla 1). Esto se debe al muestreo focal desde que desde el 2018 aseguró la colecta de parejas madre-cría; sin embargo, la decisión de tomar siempre primero las biopsias de las crías causó que en 15 casos las madres se alejaran.

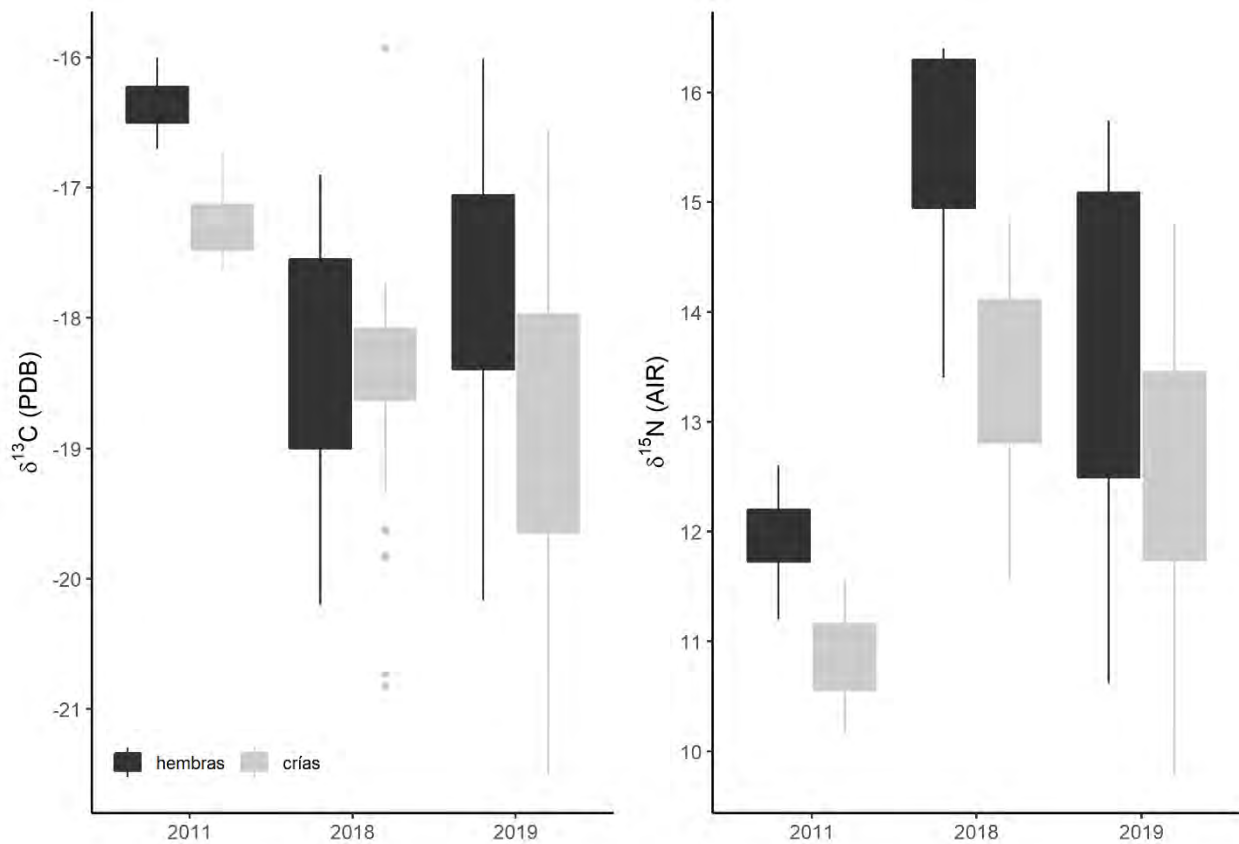
**Tabla 1:** Biopsias colectadas durante las tres temporadas reproductiva 2011, 2018 y 2019, reportadas en sus números totales, de parejas madre-cría y cuantas de organismos solos (hembras o crías). También se reporta el número total de muestras analizadas por sus contenidos isotópicos; cada epidermis fue dividida en submuestras de sus estratos epidérmicos (EC, ES, EB).

Años	Muestras totales	Parejas madre + cría	Hembras lactando solas	Crías lactantes solas	Análisis $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$
2011	11	2	5	4	11*3 = <b>33</b>
2018	14	10	-	4	14*3 = <b>42</b>
2019	34	28	-	6	34*3 = <b>102</b>
	<b>59</b>	<b>40</b>	<b>5</b>	<b>14</b>	<b>177</b>

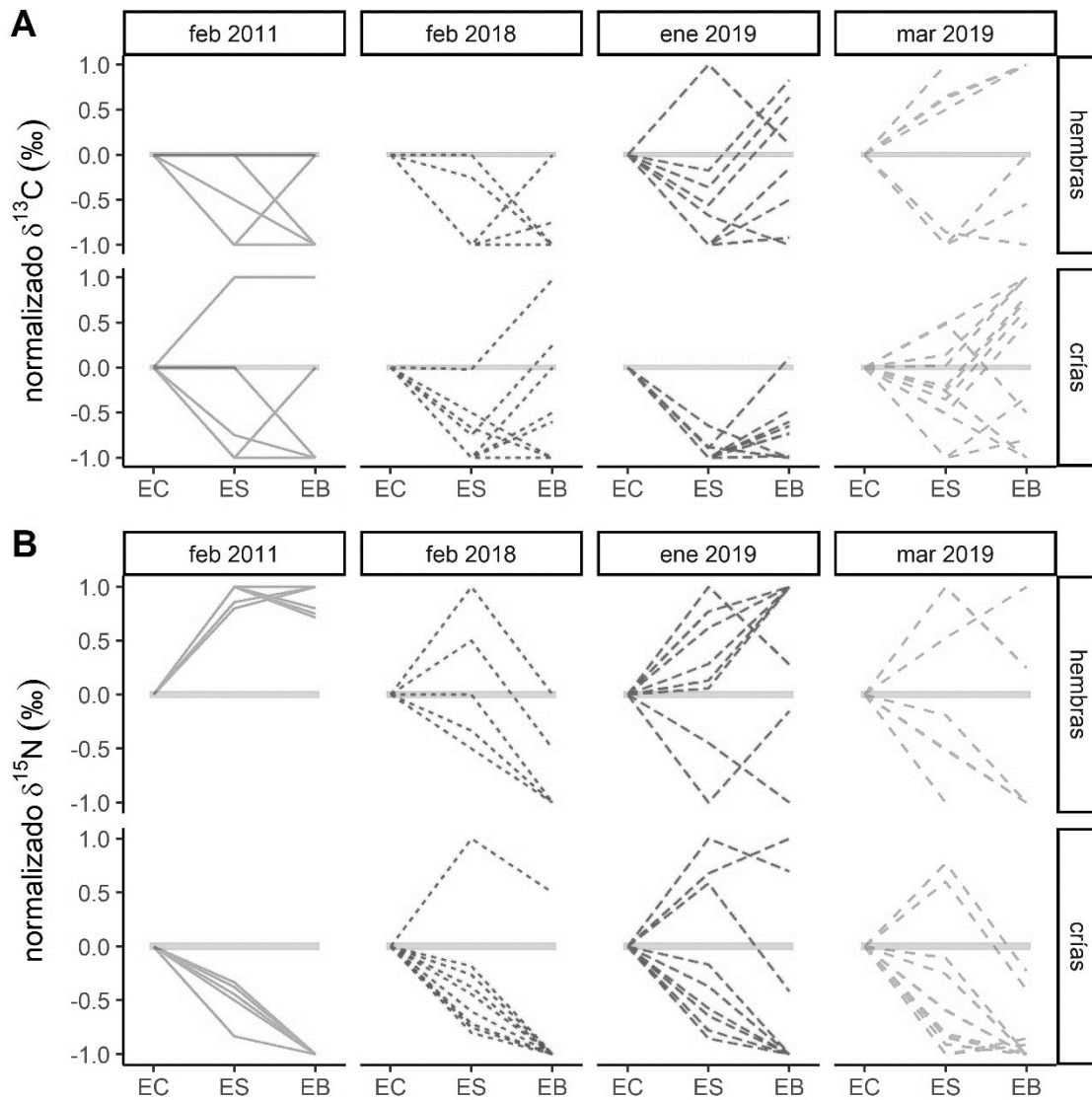
### 7.2 Los cambios isotópicos entre estratos epidérmicos

Los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  registrados en la epidermis de hembras y crías lactantes se encontraron en rangos de -20.20 a -16‰ y de 10.32 a 16.40‰ respectivamente, mientras que los valores medios fueron de -17.55 y 13.67‰ para las epidermis de las hembras y de -18.51 y 12.64‰ para las crías (Fig. 4). La magnitud de la diferencia isotópica entre los tres estratos epidérmicos de cada individuo se representó mediante la normalización de las diferencias

registradas entre estratos epidérmicos en relación con el EC (Fig. 5), con el fin de visualizar los patrones de cambio en los valores isotópicos. Los patrones en los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  variaron en las hembras colectadas en el 2011 y 2018, y también en las crías colectadas en el 2011; mientras que en todas las hembras muestreadas en el 2019 (menos una) y en las crías del 2018 y 2019 los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  decrecieron del EC al ES para después aumentar nuevamente en el EB. Con respecto a los patrones de  $\delta^{15}\text{N}$ , los valores cambiaron de manera variable en las hembras, mientras que en la mayoría de las crías decrecieron del EC al EB; sin embargo, en algunas crías los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  aumentaron del EC al ES para después decrecer en el EB, y en una cría muestreada en enero del 2019 aumentaron del EC al EB.

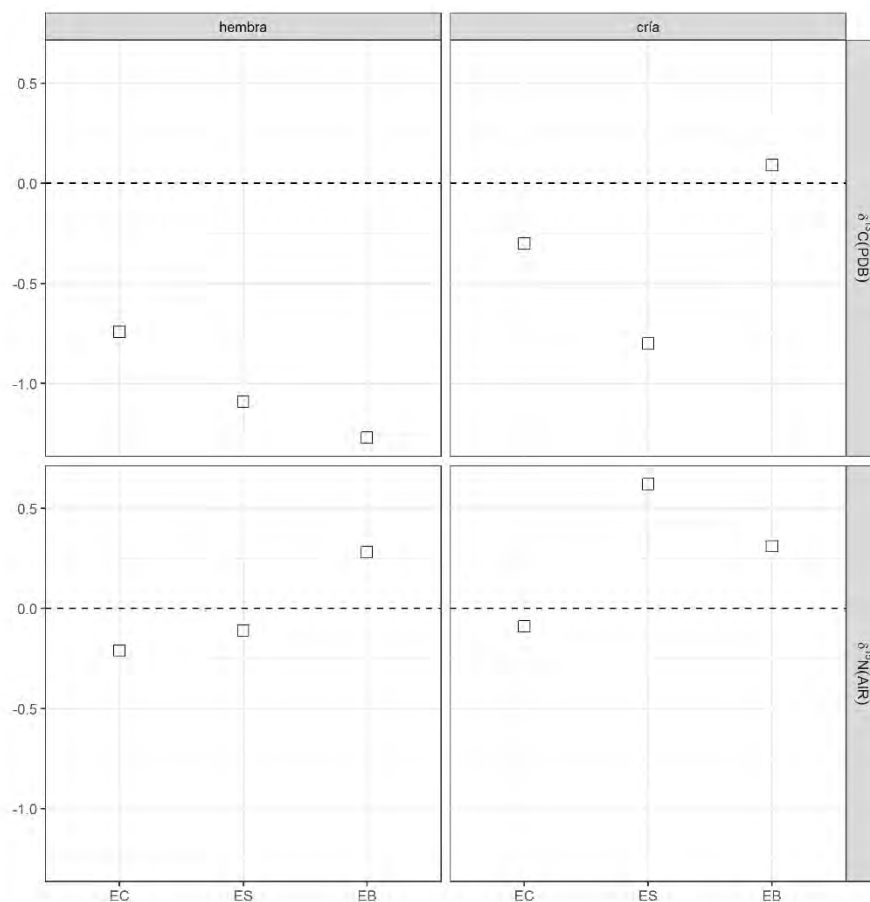


**Figura 4:** Valores promedio de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  (cuartiles 25% y 50%) de la epidermis de las hembras y crías colectadas durante las temporadas reproductivas del 2011, 2018 y 2019.



**Figura 5:** Valores de  $\delta^{13}\text{C}$  (A) y  $\delta^{15}\text{N}$  (B) estandarizados para cada hembra y cría, para cada una de las temporadas de muestreo.

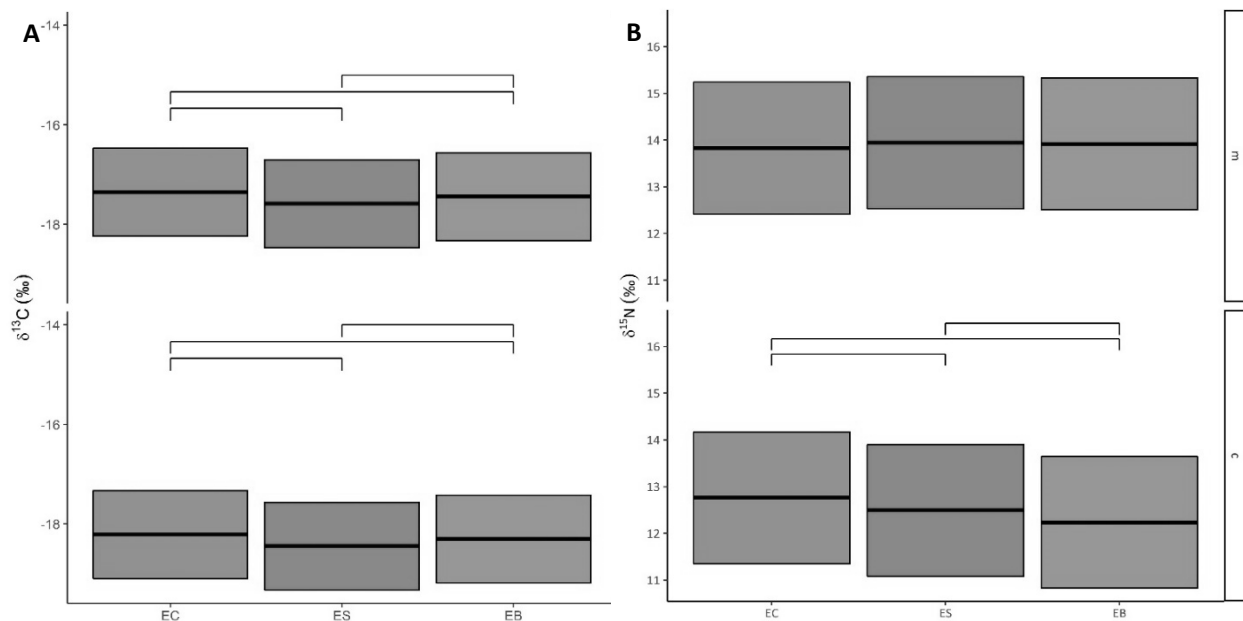
El 28 de enero del 2019 y 15 de marzo del 2019 una pareja madre-cría fue colectada y recolectada. La visualización de la magnitud de la diferencia en los valores  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  en los tres estratos epidérmicos muestreados con 46 días de diferencia indica que los patrones de cambio variaron entre hembra y cría (Fig. 6). En específico, los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  aumentaron y disminuyeron, respectivamente, en todos los estratos epidérmicos de la hembra; en la cría, hubo más variación, con los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  que aumentaron en su EC, aumentaron y disminuyeron, respectivamente, en su ES y disminuyeron en su EB.



**Figura 6:** Diferencias isotópicas entre los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  registrados en los diferentes estratos epidérmicos (EC, ES, EB) de una hembra y cría colectadas en enero y marzo 2019.

Los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  de la epidermis de hembras y crías variaron significativamente debido al efecto de los factores “estrato epidérmico” y “edad” (modelos más parsimoniosos: AIC = 384.61, AICcwt = 0.71, Anexo A); mientras que los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  de la epidermis de hembras y crías variaron significativamente debido al efecto de los factores “estrato epidérmico”, “edad” y por la interacción “estrato epidérmico\*edad” (modelo más parsimonioso: AICc = 275.01, AICcwt = 1.0, Anexo B). Una desviación de la normalidad se detectó para ambos el modelo más parsimonioso del  $\delta^{13}\text{C}$  (Anexo C.i.) y para lo del  $\delta^{15}\text{N}$  (Anexo C.ii.), determinada por un número de valores atípicos mayor a 6. Los residuos detectados fueron consecuentemente ponderados mediante la estadística robusta para el modelo más parsimonioso del  $\delta^{13}\text{C}$  (Anexo D.i.) y del del  $\delta^{15}\text{N}$  (Anexo D.ii.); de esta forma, se confirmaron las asunciones (es decir, ausencia de colinealidad, intercepto significativa) necesarias a la aceptación del modelo más parsimonioso para el  $\delta^{13}\text{C}$  (Anexo E.i.) y el  $\delta^{15}\text{N}$  (Anexo E.ii).

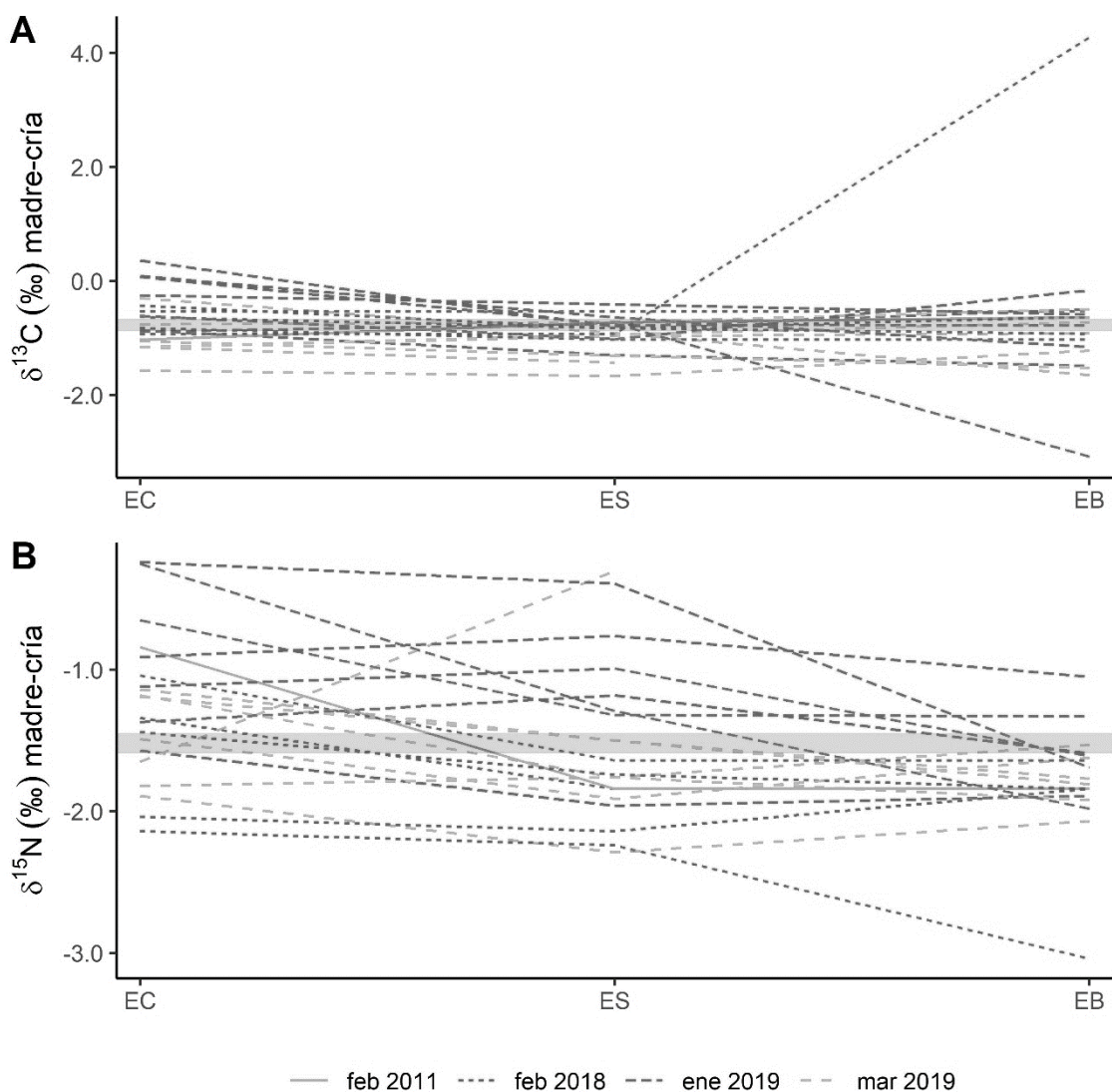
El 95% de los intervalos de confianza calculados por los patrones de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  resultaron ser altos para hembras y crías (Fig. 7A y B). Con respecto a los valores de  $\delta^{13}\text{C}$ , se detectó una variación de ellos entre los estratos epidérmicos de las hembras y crías; el análisis post-hoc (Fig. 7 A) indicó que esas variaciones eran significativas. Los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  resultaron ser significativas solamente en las crías, y el análisis post-hoc (Fig. 7B) indicó diferencias significativas entre los valores epidérmicos.



**Figura 7:** Resultados post-hoc para los LME más parsimoniosos de los  $\delta^{13}\text{C}$  (A) y  $\delta^{15}\text{N}$  (B) en base al factor “estrato” (EC, ES, EB), y su interacción con el factor “edad” (h = hembra; c = cría). Las diferencias significativas entre grupos se indican con líneas horizontales ( $p < 0.05$ ).

La prueba Shapiro-Wilk indicó que los valores isotópicos medios registrados en las epidermis de pares hembra-cría eran normalmente distribuidos, mientras que la normalidad no fue confirmada cuando se consideró la interacción “estrato epidérmico-año”. Las pruebas pareadas indicaron que no había diferencia significativa entre los valores medios de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  en pares hembra-cría, y que la relación isotópica hembra-cría no era influenciada por el año de muestreo (Fig. 8).





**Figura 8:** Valores isotópicos del carbono (A) y del nitrógeno (B) estandarizados entre los estratos epidérmicos de las parejas madre-cría. La línea gris representa el error estándar de todas las mediciones.

### 7.3 Estimación del inicio del consumo de leche mediante la modelación de los valores isotópicos

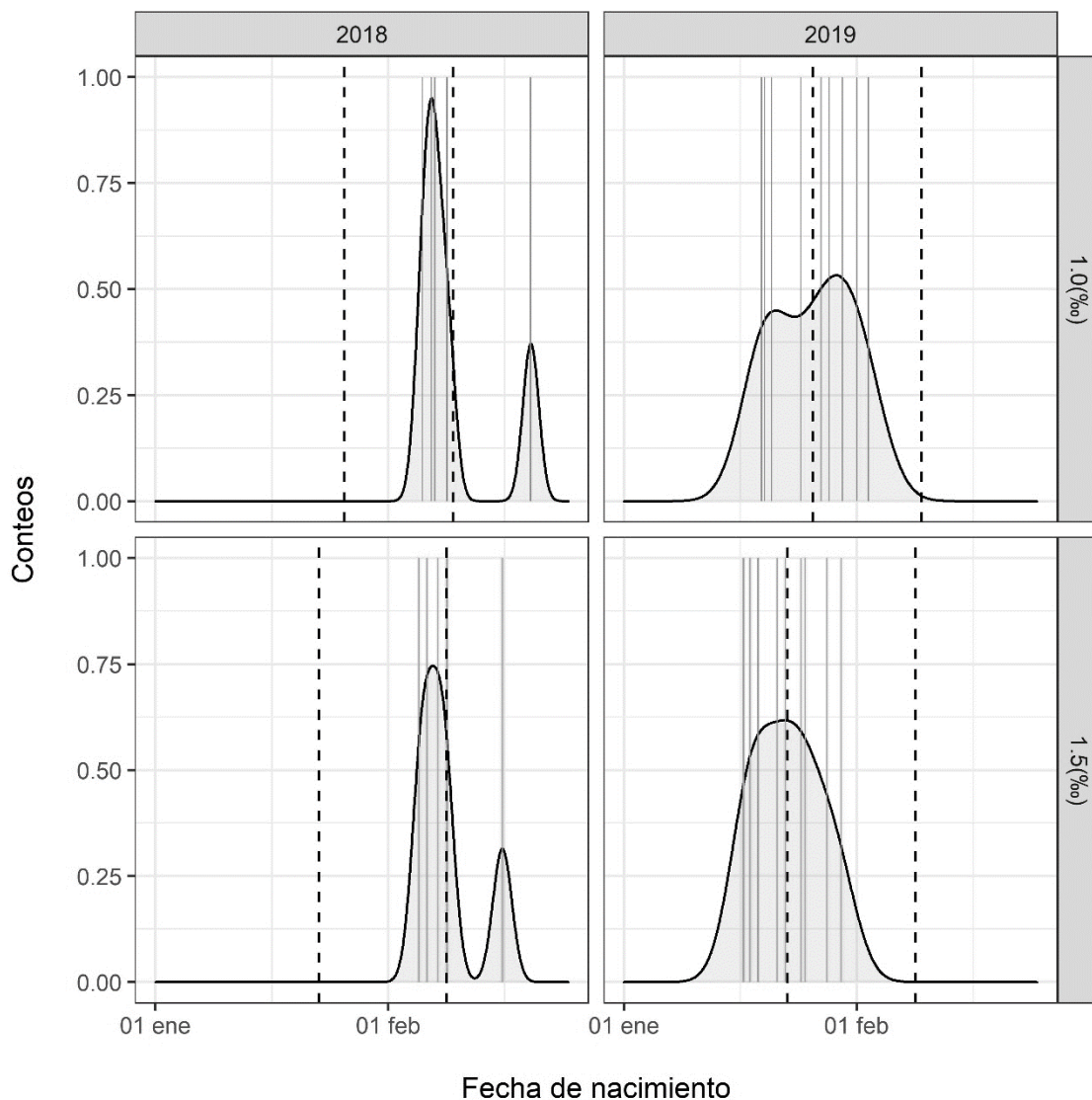
La comparación de los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  entre pares hembra-cría (Fig. 8) resultó en una variación mayor en la composición isotópica del nitrógeno que en la del carbono. Se asumió que la diferencia mayor entre la composición isotópica de una madre y su cría se registrara en las nacidas cerca del muestreo. La diferencia isotópica en carbono entre madre y feto fue calculada restando el valor máximo  $\delta^{13}\text{C}_{\text{cría}}$  al valor mínimo  $\delta^{13}\text{C}_{\text{madre}}$  y se registraron diferencias mínimas y máximas de 0.2‰ y de 1.4‰, respectivamente. La diferencia isotópica en nitrógeno entre

madre y feto fue calculada utilizando dos metodologías diferentes. Los resultados del “método 1” se obtuvieron mediante EC  $(\Delta)\delta^{15}\text{N}_{\text{cria-madre}}$  y los del “método 2” a través el valor máximo  $(\Delta)\delta^{15}\text{N}_{\text{cria-madre}}$ . En los pares donde los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  decrecieron de EC a EB (es decir, todas las parejas del 2018 y 2 de enero 2019), “método 1” y “método 2” dieron el mismo resultado, en cuanto el valor más alto se registró siempre en el EC; por el contrario, cuando se consideraron los pares restantes el “método 1” indicó una diferencia mayor en los valores isotópicos del nitrógeno entre el feto y la madre que el “método 2”. La diferencia calculada más baja fue de 0.9‰ (“método 2”) y la más alta de 1.5‰ (“método 1”). Debido a que dichos valores se calcularon en pares hembra-cría colectados en enero, al principio de la temporada de crianza de la especie (Jones y Swartz, 2009), se asumió que podrían aproximarse más al fraccionamiento isotópico real del nitrógeno entre madre y feto al final de la gestación.

El conocimiento del fraccionamiento isotópico madre-feto fue necesario para predecir el valor  $\delta^{15}\text{N}$  de la epidermis de la cría cuando en equilibrio con la gestación ( $\delta(0)$ ) (ecn. 5), valor que representa una de las variables incógnitas necesarias para predecir la edad de las crías (ecn. 4); por lo que se llevó a cabo un análisis de respuesta para evaluar el efecto de utilizar valores de fraccionamiento isotópico madre-feto diferentes, el cual consistió en predecir las edades de las crías utilizando los valores 1.5‰ (“método 1”) y  $\sim 1\%$  (“método 2”) (Fig. 9). Los resultados no difirieron significativamente entre métodos; mediante el “método 1” se calcularon fechas de nacimiento entre el 11 de enero y el 12 de febrero, con el “método 2” entre el 19 del enero y el 20 de febrero. Las fechas de nacimiento calculadas para las crías se distribuyeron en forma bimodal para todas las crías muestreadas en febrero 2018 independientemente del fraccionamiento isotópico utilizado, y en las crías del 2019 cuando se utilizó el “método 1”. La distribución bimodal de las fechas de nacimiento de las crías muestreadas en el año 2018 fue determinada por una única cría que se estimó que nació a la mitad de febrero. Independientemente de la metodología utilizada para calcular el fraccionamiento isotópico madre-feto, la distribución de las fechas de nacimiento estimadas para las crías del 2019 fue más amplia que en el 2018.

Los valores medios de las fechas de nacimiento calculadas para las crías del 2018 difieren de 1 a 2 días, dependiendo de la metodología utilizada. Por el contrario, los valores medios de las

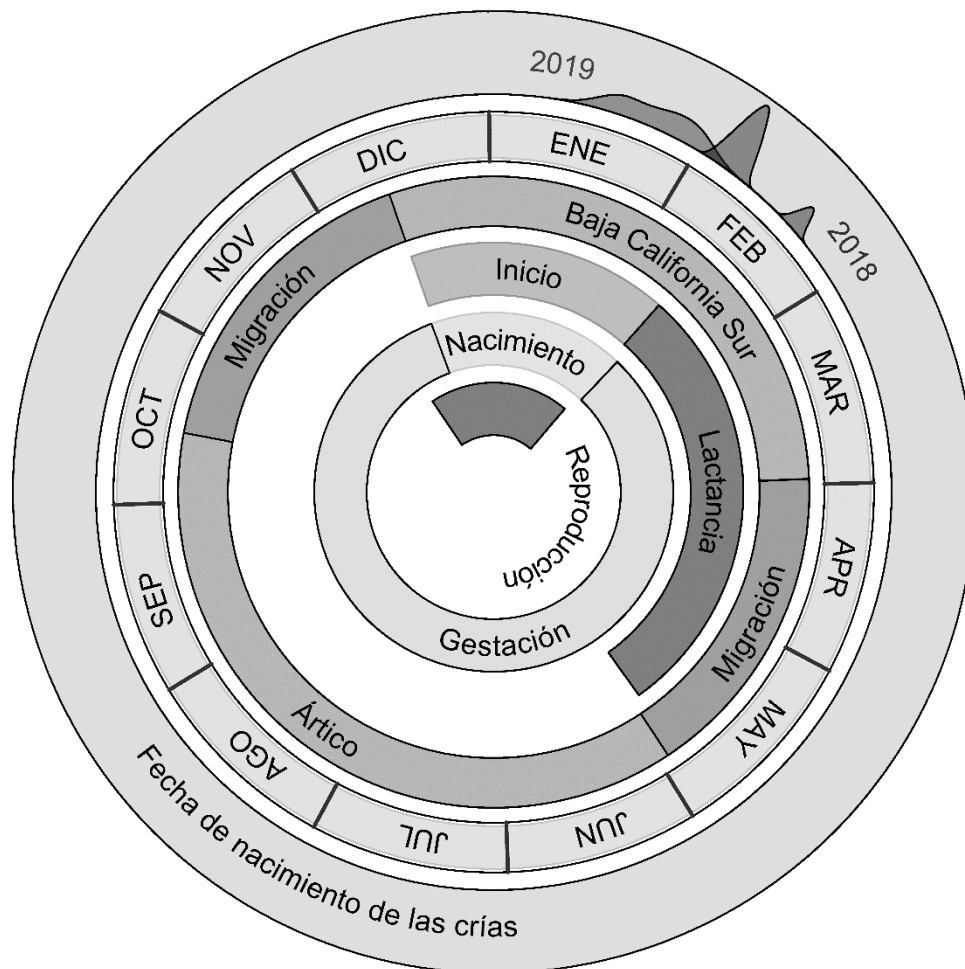
fechas de nacimiento estimados para las crías del 2019 difieren de 6 a 8 días, dependiendo de la metodología utilizada. Las estimaciones de crías más jóvenes se obtuvieron mediante el “método 2” y con el valor de  $\sim 1\%$  de fraccionamiento isotópico.



**Figura 9:** Representación gráfica de las fechas de nacimiento estimadas para las crías muestreadas con sus respectivas madres durante febrero 2018 y enero 2019 y. Las curvas muestran los patrones de las estimaciones mediante un factor de fraccionamiento trófico de 1‰ o de 1.5‰. Las líneas negras punteadas representan los valores promedios.

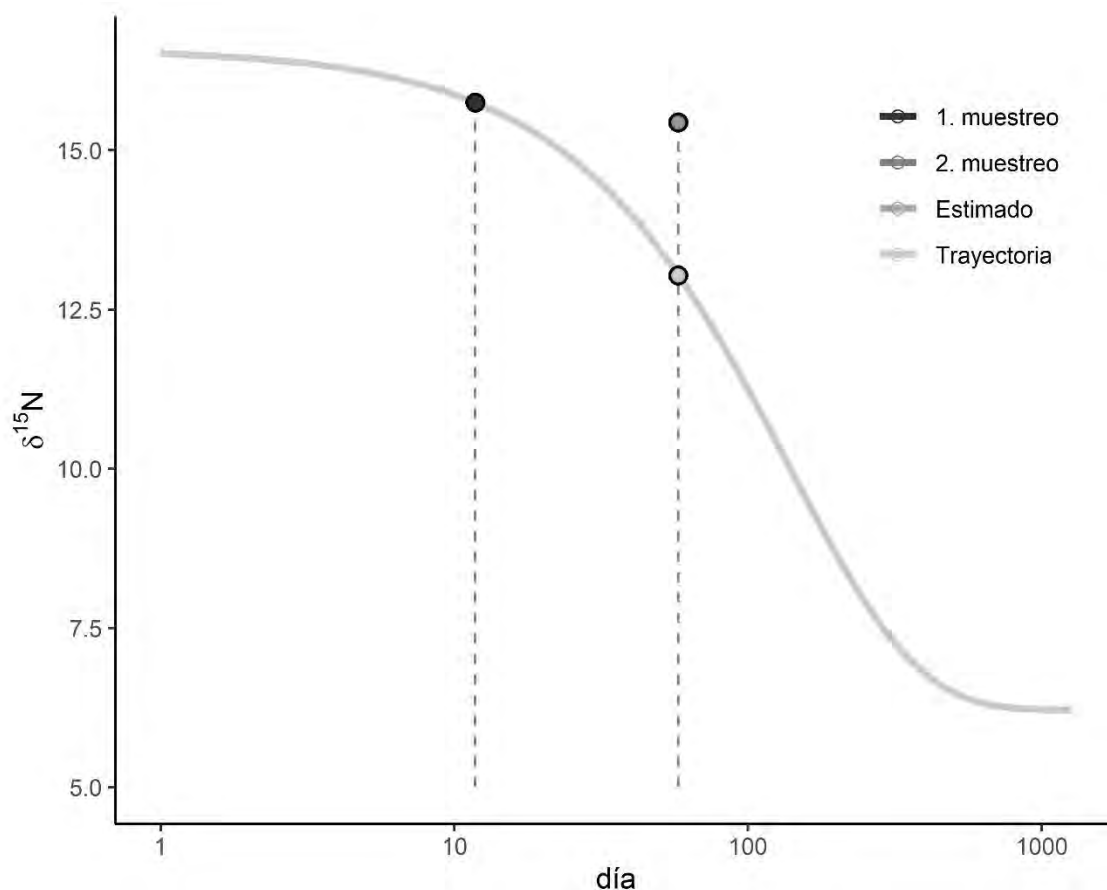
Cabe mencionar, que independientemente del valor del fraccionamiento utilizado, las estimaciones de las fechas de nacimiento de las crías coincidieron con los tiempos de alumbramientos conocidos para la población oriental de ballena gris. En la Fig. 10 se visualizó la

línea del tiempo esperada para la reproducción, gestación y lactancia, y se representaron las estimaciones de las fechas de nacimiento de las crías utilizando el “método 2” (es decir,  $\sim 1\%$ ). Al momento del muestreo, las crías del 2018 tenían entre 8 a 21 días ( $\pm 16$  días), mientras que las del 2019 entre 0 a 7 días ( $\pm 16$  días); por lo tanto, se infirió que las crías nacieron entre el 5 y 16 de febrero del 2018, y entre el 16 y 29 de enero del 2019.



**Figura 10:** Gráfica circular representante la distribución de las fechas de nacimiento estimadas para las crías, utilizando el fraccionamiento isotópico madre-cría de  $1\%$ , y los periodos de tiempo conocidos para la reproducción, gestación y lactancia en ballena gris (Jones y Swartz, 2009).

Como es visible en la Fig. 11, los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  de la epidermis de la cría capturada y recapturada en enero y marzo 2019, decrecieron más lentamente de lo predicho por el modelo de reloj isotópico.



**Figura 11:** Curva de decaimiento exponencial (“Trayectoria”) esperada para el  $\delta^{15}\text{N}$  del EB de la cría colectada y recolectada en enero y marzo 2019. El punto “1. muestreo” representa la fecha de nacimiento calculada del reloj isotópico a partir de los valores del EB de enero; el punto “2. muestreo” el valor de  $\delta^{15}\text{N}$  registrado en el EB después de 46 días, y el punto “Estimado” el valor de  $\delta^{15}\text{N}$  estimado por el modelo del reloj isotópico a la recolecta del EB en marzo 2019.

#### 7.4 Evaluación de la contribución de las presas del Ártico en la epidermis de hembras y crías

##### 7.4.1 Transformación de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ en probabilidades de contribución de presas

Las probabilidades de contribución de las presas consideradas por los modelos SIMMB-I en el EC de las hembras se presentan en el Anexo F. Los resultados indicaron una variación a nivel individual entre las estimaciones de las probables contribuciones de las presas; mostraron que diferentes hembras pudieron asimilar proporciones distintas de presas de laguna Ojo de Liebre, o bien asimilaron anfípodos o poliquetos; en un solo caso una hembra no presentó una dominancia en la probabilidad de contribución de alguna de ellas.

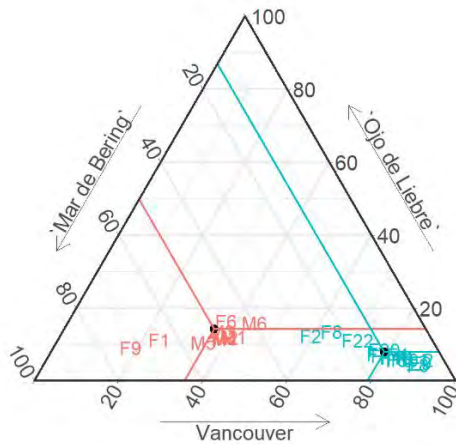
#### 7.4.2 Análisis de las probables contribuciones isotópicas

Las probabilidades de contribución de las presas en los SIMMB-II del EC y del EB de las hembras se observan en gráficas ternarias (Fig. 12A y B). En general, las fuentes del Mar de Bering y de Isla Vancouver tuvieron una probabilidad más alta en la composición isotópica de la epidermis de todas las hembras analizadas; sin embargo, la asimilación probable de las presas de laguna Ojo de Liebre (es decir, anfípodos o poliquetos) agrupó a hembras con diferentes fuentes de contribución en altas latitudes (es decir, MB y IV). En particular, las hembras cuyas probabilidades de haber consumido anfípodos en Mar de Bering (13%), fueron las que presentaron las mayores probabilidades de contribución de los anfípodos del LOL. Por el contrario, las hembras cuyas probabilidades de haber consumido misidáceos de Isla Vancouver (60%), fueron las que presentaron probabilidades de contribución más altas de haber asimilado los poliquetos de laguna Ojo de Liebre. El resto de las hembras (26%) se caracterizaron por presentar semejantes probabilidades de contribución de las presas del Mar de Bering y Isla Vancouver, y también algunas de ellas asimilaron con mayor probabilidad los anfípodos o poliquetos de LOL.

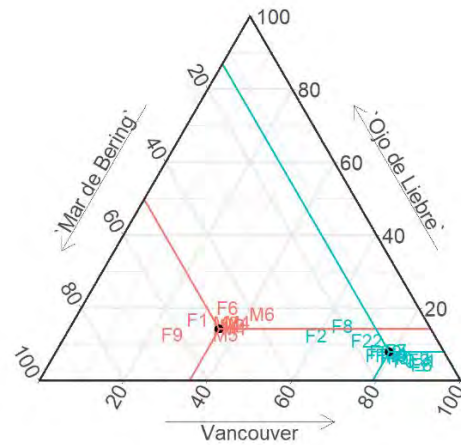
Las probabilidades de contribución de las presas en los SIMMB-III, sangre placentaria, y SIMMB-IV, leche, indicaron patrones fuertemente influenciados por la variabilidad individual en cada una de las crías (Fig. 12C y D). De manera general, en el 64% de las crías, las estimaciones de sangre placentaria y leche, mostraron una dominancia en la probabilidad de contribución de los misidáceos de Isla Vancouver. El 22% de las crías, mostraron una dominancia en la probabilidad de contribución de los anfípodos del Mar de Bering. Cabe señalar que en general las probabilidades de contribución de las presas de LOL variaron considerablemente; diferenciaron aquellas crías que se caracterizaron por asimilar una sange placentaria o leche, con una mayor influencia de algunas de las dos fuentes de laguna Ojo de Liebre. Aquellas que mostraron una influencia dominante por los anfípodos del MB alrededor del 60%, presentaron una probabilidad promedio de los anfípodos del LOL alrededor del 10%. Por el contrario, aquellas que mostraron una influencia dominante por los misidáceos de Isla Vancouver alrededor del 60%, presentaron una probabilidad promedio de poliquetos del LOL alrededor del 15%, y en algunos casos arriba del 20%.

La estimación de la contribución de las fuentes a la mezcla isotópica de los tejidos de la pareja madre-cría colectada y recolectada en enero y marzo 2019 se observa en la Fig. 13. En ambos individuos tanto en enero como en marzo, los misidáceos de Isla Vancouver mostraron una probabilidad más alta que los anfípodos del Mar de Bering, y de las presas dominantes de laguna Ojo de Liebre fueron los poliquetos. Sin embargo, el nivel de incertidumbre asociado a las estimaciones de los porcentajes de contribución de las fuentes del MB y de IV variaron entre madre y cría; en esta última, en particular, las desviaciones estándares de los valores estimados fueron mucho más amplias que en la madre, lo cual causó un traslape de esos valores de contribución posibles estimados para las presas del Mar de Bering y de Isla Vancouver. Por otro lado, la probable contribución de los poliquetos de la LOL fue parecida en ambos los individuos.

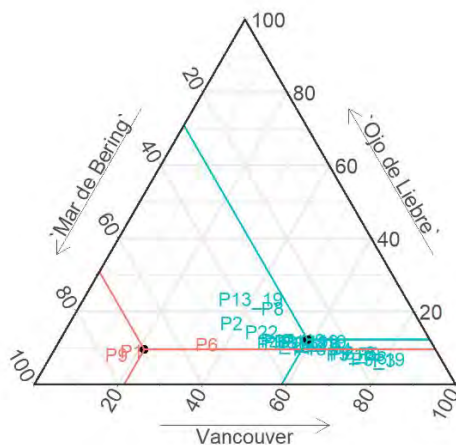
A



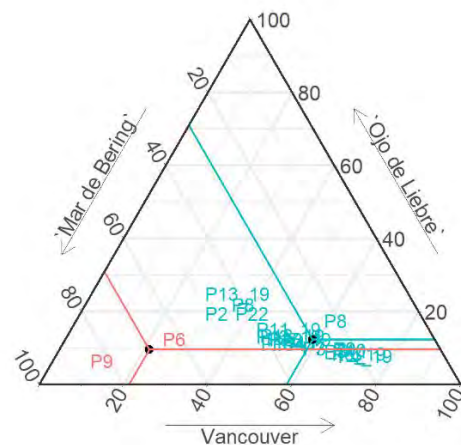
B



C



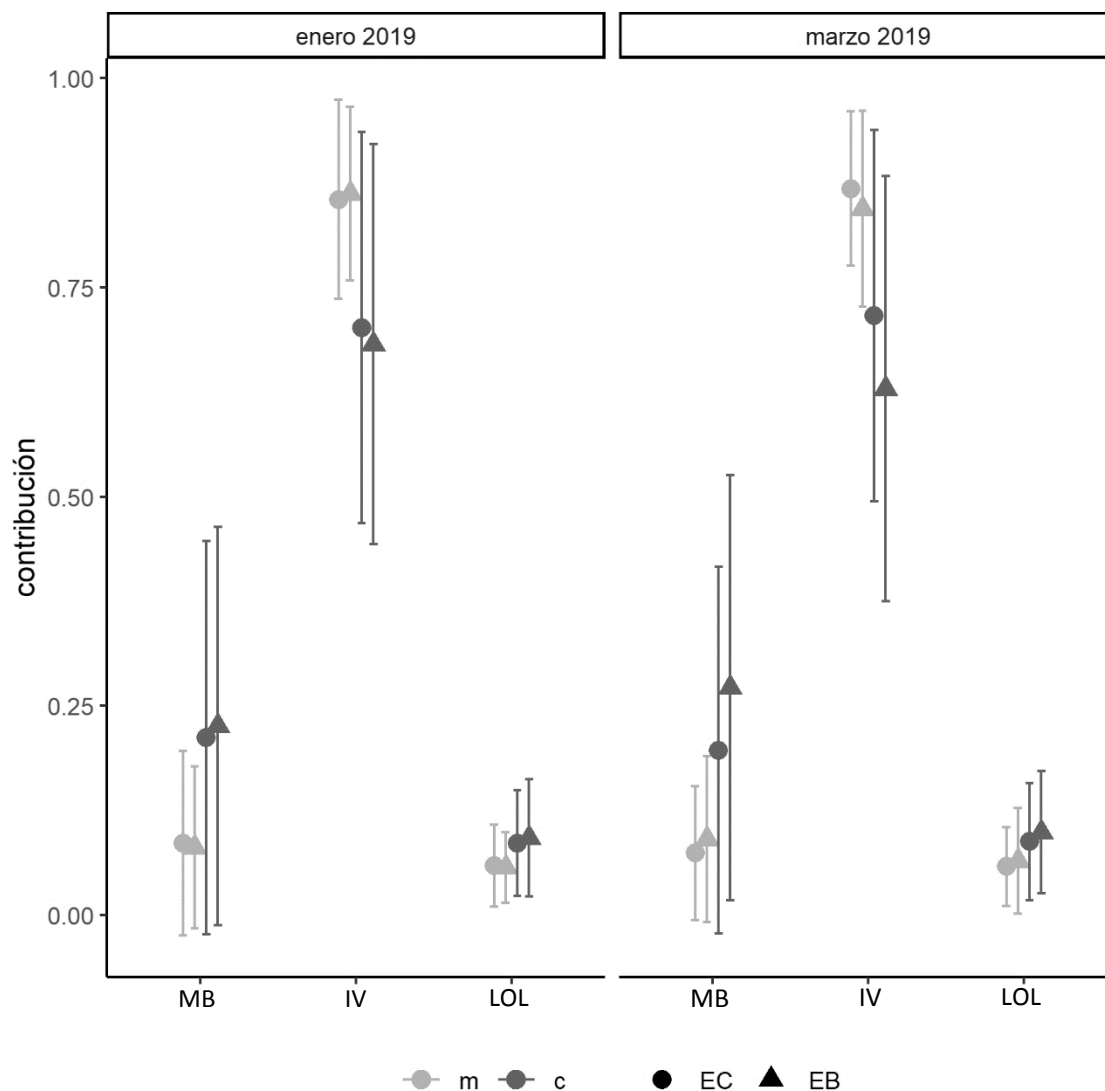
D



 ANFÍPODOS
  POLIQUETOS

**Figura 12:** Diagramas ternarios representantes la probabilidad de contribución isotópica de tres fuentes (“Mar de Bering”, “Vancouver”, “Ojo de Liebre”) al EC (A) y EB (B) de las hembras, sangre placentaria (C) y leche (D) estimadas mediante la ecn. 6. La coloración de los puntos indica si los resultados de los SIMMB-I estimaron que en el EC de cada hembra contribuían mayormente a los anfípodos (puntos rojos) o a los poliquetos (puntos azules) de LOL; las líneas de colores representan las probabilidades de contribución promedio de dichas variables categóricas.



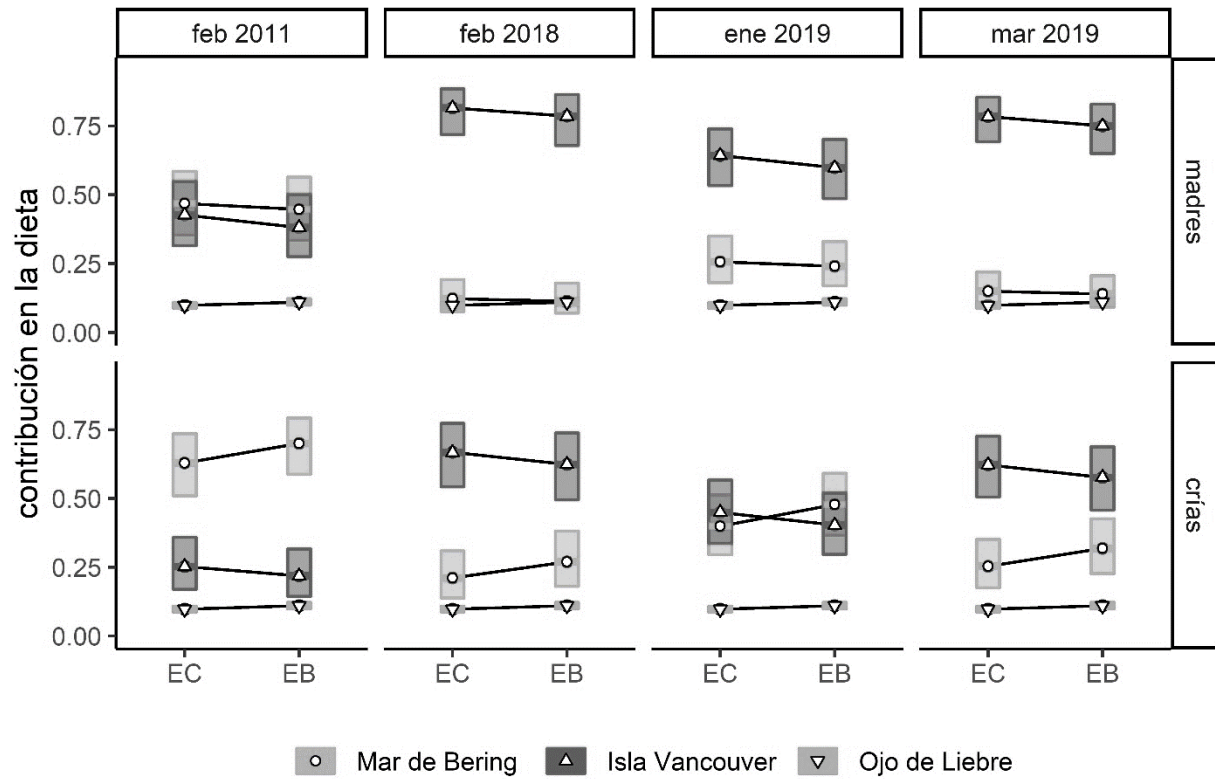


**Figura 13:** Probabilidades de contribución isotópicas de tres fuentes (MB, IV, LOL) a los estratos epidérmicos (EC, EB) de una madre (m), y la sangre placentaria y leche materna estimados a partir de los estratos epidérmicos (EC, EB) de su cría (c), colectados y recolectados en enero y marzo 2019.

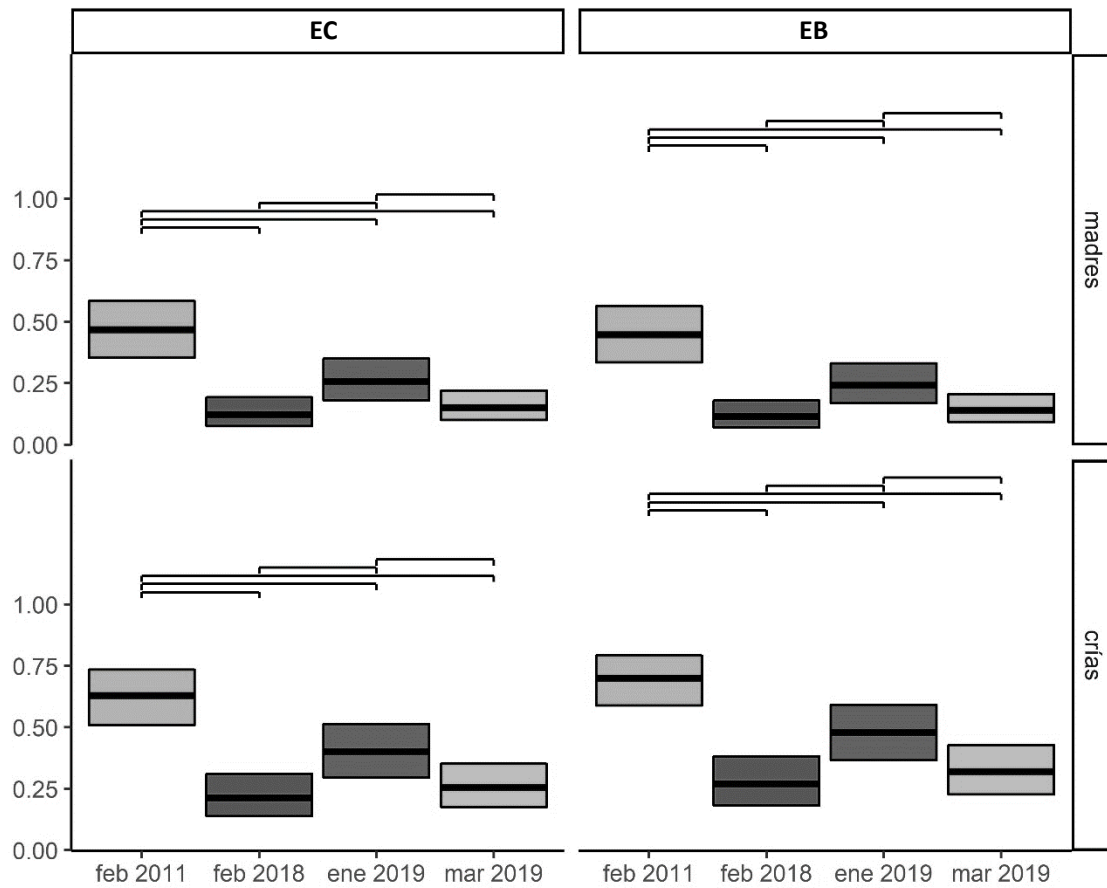
Los modelos GLME, mostraron que la contribución de las presas del Mar de Bering vario significativamente debido a las variables “estrato”, “edad” y “año y mes”, además en la interacción entre las variables “estrato\*edad” (Anexo G). Para el caso de Isla Vancouver (Fig. 14) únicamente en las variables “estrato”, “edad” y “año y mes” presentaron diferencias significativas (Anexo H).

También en la figura 14 se muestra que en las crías en general, la probabilidad de contribución del Mar de Bering se incrementó entre el EC y EB, mientras que la de Isla Vancouver decreció entre los mismos estratos. Para las hembras el patrón de Isla Vancouver es el mismo que en crías, sin embargo, el patrón del Mar de Bering no es muy claro.

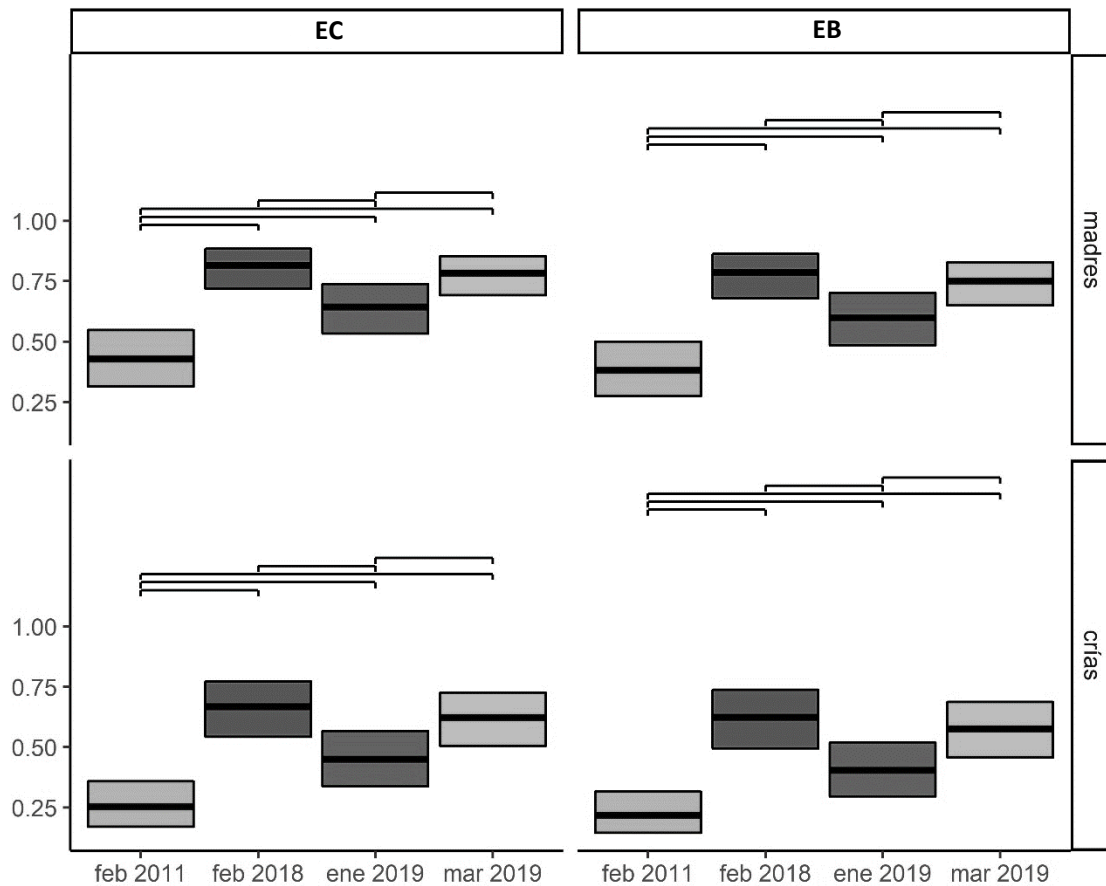
Con respecto a la contribución de las presas de laguna Ojo de Liebre, el GLME más parsimonioso (Anexo I) indicó que solamente el factor “estrato” causaba una diferencia significativa entre ellas. No se detectó ningún problema aparente de colinealidad, y la inspección visual de los residuos reveló una desviación de la normalidad, la cual, sin embargo, era menor y, por lo tanto, no se consideró necesario rechazar el modelo (Pereira, 2019). Los análisis post-hoc indicaron sucesivamente que las probables contribuciones de las fuentes del MB (Fig. 15) y de IV (Fig. 16) variaban significativamente entre todos los grupos formados por los factores determinados como importantes por el GLME más parsimonioso; en el caso de las fuentes de la LOL, se precisó que la diferencia significativa ( $p= 0.0001$ ) entre EC y EB era determinada por un aumento en el tiempo de la incorporación de las fuentes proporcionadas por la LOL.



**Figura 14:** Resultados de los modelos GLME más parsimoniosos. Se reporta el patrón de cambio en las probabilidades de contribución isotópica de tres fuentes (“Mar de Bering”, “Isla Vancouver”, “Ojo de Liebre”) según el efecto de las variables “estrato” (EC, EB), “edad” (madre y cría), “año y mes” (febrero 2011 y 2018, enero y marzo 2019).



**Figura 15:** Resultados post-hoc para el GLME más parsimonioso relativo a las probabilidades de contribución de los anfípodos de MB según el efecto de las variables “estrato” (EC, EB), “edad” (madre y cría), “año y mes” (febrero 2011 y 2018, enero y marzo 2019). Las diferencias significativas entre grupos se indican con líneas horizontales ( $p < 0.05$ ).



**Figura 16:** Resultados post-hoc para el GLME más parsimonioso relativo a las probabilidades de contribución de los misidáceos de IV según el efecto de las variables “estrato” (EC, EB), “edad” (madre y cría), “año y mes” (febrero 2011 y 2018, enero y marzo 2019). Las diferencias significativas entre grupos se indican con líneas horizontales ( $p < 0.05$ ).

## 8. DISCUSIÓN

Los resultados rechazaron la noción que los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  no varían significativamente entre los estratos epidérmicos de ballena gris. Por el contrario, demuestran que su variación (entre hembras, crías, hembras y crías, entre años y meses de muestreo), es útil para inferir la transición de gestación a lactancia, e indirectamente calcular la fecha de nacimiento de las crías mediante un modelo de reloj isotópico. De igual manera se expone la ventaja del análisis isotópico del carbono y del nitrógeno a lo largo de los estratos epidérmicos como una herramienta para investigar la ecología alimenticia y fisiología reproductiva de la ballena gris.

### 8.1 Cambios isotópicos entre estratos epidérmicos

Los resultados de los análisis de los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  registrados en la epidermis de hembras y crías indicaron diferencias significativas entre los estratos epidérmicos, y entre diferentes grupos de individuos. Lo cual no es congruente con los resultados reportados por el único estudio previo que evaluó la variación de la composición isotópica de la epidermis de esta especie (Lian *et al.*, 2020). Las firmas isotópicas de un estrato (por ejemplo, estrato corneo), no puede representar la composición isotópica de toda la epidermis de cualquier individuo, o de un conjunto de ellos al azar; quizás solo se puedan aplicar para organismos varados en diferentes estados de descomposición, pero no para la interpretación ecológica o fisiológica de la epidermis de hembras y crías silvestres. Por el contrario, corrobora la existencia de diferencias isotópicas entre estratos epidérmicos reportadas para otros mysticetos, por ejemplo ballena azul (Busquets-Vass *et al.*, 2017), rorcual común o ballena jorobada (Wild *et al.*, 2018), y en odontocetos como el cachalote (Wild *et al.*, 2018).

En particular, Lian y colaboradores (2020) reportan una homogeneidad de la composición isotópica en la epidermis de diferentes individuos de ballena gris, los cuales se encontraron varados a lo largo de las costas de California. Además de integrar toda la variabilidad isotópica entre estratos de los diferentes individuos en un promedio general de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ , no consideraron diferencias entre ellos como: clase de edad, sexo, talla, condiciones fisiológicas, estado nutricional, entre otros factores que podrían influenciar las composiciones isotópicas. Es posible que dichos factores no se pueden evaluar en epidermis de organismos varados; por

el contrario, este estudio muestra evidencia que las variables “estrato” (es decir, EC/ES/EB), “edad” (es decir, hembra/cría) y la interacción entre ellas (es decir, estrato\*edad), resultaron ser relevantes para la interpretación de los valores isotópico del carbono y nitrógeno. En específico, es evidente que la variación en los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  registrada entre estratos epidérmicos de hembras y crías de ballena gris lactantes, corresponde a la transición entre la fase de gestación a lactancia, lo cual en crías se identifica también como un cambio de dieta, es decir, de la fuente isotópica de la sangre placentaria a la leche materna.

### 8.1.1 Patrones de $\delta^{13}\text{C}$ en hembras y crías

Los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  registrados en las epidermis de las hembras variaron entre estratos siguiendo patrones crecientes y decrecientes (Fig. 5A). Resultados previos relativos a otras ballenas sugieren que en la epidermis de las jorobadas los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  disminuyen continuamente durante la gestación (Clark *et al.*, 2016), mientras que en los músculos de los rorcuales comunes los mismos aumentan durante la lactancia (Borrell *et al.*, 2016). Tal variación en los patrones de  $\delta^{13}\text{C}$  se puede asociar posiblemente a una movilización diferente de los lípidos durante gestación y lactancia. En particular, durante la gestación los lípidos son movilizados y utilizados inmediatamente por parte de la hembra para satisfacer todas aquellas necesidades asociadas a cumplir exitosamente el crecimiento del feto. Al contrario, la producción de leche enriquecida en lípidos, los cuales tienen valores bajos de  $\delta^{13}\text{C}$ , causa un enriquecimiento en  $^{13}\text{C}$  en los tejidos de las hembras lactantes (Borrell *et al.*, 2016). En este estudio, los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  aumentan solamente entre los estratos epidérmicos de algunas hembras muestreadas en enero y marzo 2019 (Fig. 5A), mientras que en todas las otras los patrones de cambio están influenciados por una fuerte variabilidad a nivel individual. La ausencia de tendencias claras en los patrones de cambios de  $\delta^{13}\text{C}$  se detectó en las crías también, lo cual complica una interpretación correcta de los resultados. La única evidencia previa (Horstmann-Dehn *et al.*, 2012) reporta una disminución de los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  entre parches de epidermis fetal y de cría de una ballena franca; sin embargo, solamente 22 de las 34 crías muestreadas en este trabajo tenían sus valores de  $\delta^{13}\text{C}$  más bajos en el estrato basal (estrato más nuevo) que el estrato corneo (estrato más antiguo), a pesar que todas eran lactantes. Es posible que la variabilidad encontrada en la composición isotópica del carbono de

la epidermis de hembras y crías sea el reflejo de una diferente expresión del cambio de la fase de gestación a la de lactancia, sin embargo, esta hipótesis debe ser investigada posteriormente.

### 8.1.2 Patrones de $\delta^{15}\text{N}$ en hembras

A diferencia de los valores de  $\delta^{13}\text{C}$ , el modelado de los patrones de  $\delta^{15}\text{N}$  permitió una mejor interpretación de los datos. En particular para las hembras, donde se indica que la variabilidad isotópica observada, en específico entre el estrato corneo y el estrato basal, no era significativa, sin embargo, se sugiere que los patrones observados (Fig. 5B) reflejan el efecto del cambio de la fase de gestación a la lactancia. La composición isotópica del nitrógeno en los tejidos animales puede también cambiar debido a condiciones de estrés nutricional (Hatch, 2012) y/o a la temperatura del medio en el cual se mueven (Martínez del Río y Carleton, 2012).

Con respecto al estrés nutricional, un estudio previo (Aguilar *et al.*, 2014), relativo al balance en los niveles de nitrógeno de los músculos y barbas del rorcual común en condición de ayuno, indica que solamente una situación severa de inanición puede determinar un cambio en los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  en esos tejidos. Además, los patrones de  $\delta^{15}\text{N}$  registrados en la epidermis y en el músculo de organismos de ballena gris silvestres y en organismos en condiciones corporales pobres, resultaron en un incremento de los valores isotópicos solamente en los tejidos musculares y no en los epidérmicos, por lo que se hipotetiza que las proteínas estructurales de la epidermis no son catabolizadas durante estrés nutricional, mientras que las de los músculos sí (Horstmann-Dehn *et al.*, 2012). En el contexto de todas estas evidencias, se descartó la posibilidad que la variabilidad encontrada en los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  registrados en los estratos epidérmicos de las hembras pudiera ser causa exclusivamente por la condición de ayuno en la cual se supone se encontraban los organismos durante la temporada reproductiva. En todas las temporadas involucradas en este estudio se observaron actividades de alimentación por parte de hembras en laguna Ojo de Liebre.

Por lo que concierne la temperatura, se ha reportado un efecto directo en la tasa catabólica de la epidermis de beluga (Aubin *et al.*, 1990); también, se ha hipotetizado que origina una disminución de la velocidad con la cual los isótopos del nitrógeno se acumulan en los tejidos de



ballena azul (Busquets-Vass *et al.*, 2017). Sin embargo, las especies analizadas en estos trabajos se distribuyen y mueven entre áreas que difieren de manera importante en sus rangos de temperaturas; la azul, por ejemplo, se muestreó en las aguas del Pacífico del Norte y en el Golfo de California, que son cuerpos de aguas con temperaturas superficiales muy diferentes. En este estudio, por el contrario, se muestrearon individuos de ballena gris que se movieron entre los extremos de su migración reproductiva (es decir, de alimentación y de reproducción); áreas con temperaturas que difirieron entre si por menos de 5°C (NOAA); por lo tanto, no se consideró viable que la temperatura estuviera determinando la variabilidad de los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  encontrada entre estratos epidérmicos.

### 8.1.3 Patrones de $\delta^{15}\text{N}$ en crías

En este estudio, la disminución de los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  entre el estrato epidérmico más antiguo (EC) y el más reciente (EB) en la mayoría de las crías se propone que sea determinado por el efecto de la lactancia. La única evidencia previa disponible para la epidermis de crías de ballena gris reporta también una disminución en los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  entre parches de epidermis fetales ( $\delta^{15}\text{N} = 14.8 \text{ ‰}$ ) y estratos epidérmicos representantes de la vida extra-uterina ( $\delta^{15}\text{N} = 12.4 \text{ ‰}$ ) (Horstmann-Dehn *et al.*, 2012). Por el contrario, en este estudio se registró una mayor variabilidad en los patrones de  $\delta^{15}\text{N}$  entre crías, como algunas en enero 2019; que sugieren que dichos organismos nacieron tan cerca de la fecha del muestreo, por lo que sus valores de  $\delta^{15}\text{N}$  no estaban reflejando aún los efectos de la lactancia en todos los estratos epidérmicos; sin embargo, esta asunción no pudo ser confirmada.

Por lo tanto, sí asumimos que la tasa de recambio celular de la epidermis de ballena gris es parecida a la de otros cetáceos, por ejemplo la del tursión (Hicks *et al.*, 1985) y la beluga (Aubin *et al.*, 1990), la contribución isotópica de la leche materna debería empezar a ser registrada en el estrato basal entre 10 y 20 días después del nacimiento. Se espera que las hembras gestantes den a luz en las áreas de reproducción mexicanas entre el final de diciembre y el principio de marzo (Jones y Swartz, 2009), sin embargo, en el 2019 se reportó un retraso en la fecha de llegada de las ballenas en el área de estudio, y las primeras crías fueron avistadas desde la mitad del mes de enero en adelante (datos no publicados, Reserva de la Biosfera “El Vizcaíno”). Por lo

tanto, es posible que las crías muestreadas en enero 2019 eran las más jóvenes entre todas las demás, y que sus valores epidérmicos de  $\delta^{15}\text{N}$  estaba representando tiempos diferentes, en el sentido de fecha de nacimiento y comienzo de lactancia.

## **8.2 Estimación del inicio del consumo de leche mediante la modelación de los valores isotópicos**

En este estudio se demostró por primera vez que mediante la modelación del fraccionamiento isotópico madre-cría y el uso de datos de la literatura es posible estimar la edad de los estratos epidérmicos de las crías y calcular cuando ocurrió el cambio de gestación a lactancia, es decir, la edad de cada cría muestreada, sin necesidad de observar el fenómeno de manera directa.

La composición isotópica de los fetos y crías de especies “capital breeders” se espera que es dependiente de la composición de sus respectivas madres (Jenkins *et al.*, 2001; Habran *et al.*, 2010; Borrell *et al.*, 2016). El modelo (es decir, LME) más parsimonioso indicó que los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  registrados en los estratos corneo de pares madre-cría son siempre diferentes, mientras que se encontró un patrón de convergencia en los  $\delta^{13}\text{C}$  de sus ES y en los  $\delta^{15}\text{N}$  de sus EB. La normalización de las diferencias isotópica entre estratos epidérmicos de pares madre-cría para los valores de los estratos corneo (Fig. 8) sugirió patrones más variables en las parejas colectadas en el 2019 que en las del 2018, la cual se asumió como efecto a lo ya mencionado con anterioridad, a las diferencias en los efectos de gestación y lactancia asociados a la edad de las crías.

En este estudio, el fraccionamiento isotópico del carbono entre madre y feto se calculó restando el valor máximo  $\delta^{13}\text{C}_{\text{cría}}$  del valor mínimo  $\delta^{13}\text{C}_{\text{madre}}$  registrados en sus estratos epidérmicos; los fraccionamientos máximos de 1.3‰, 1.4‰ y 1.4‰, encontrados en 3 parejas madre-cría muestreadas en enero 2019, difieren de los valores reportados en la literatura de los músculos del rorcual común (es decir, 1.1‰) (Borrell *et al.*, 2016). Aquí se sugiere que la diferencia entre dichos resultados se relaciona más a las distintas modalidades de muestreo que a una real diferencia entre fraccionamientos isotópicos en los tejidos. En particular, en esta investigación se colectaron organismos vivos y silvestres, mientras que Borrell y colaboradores (2016) analizaron individuos muertos, por lo cual se desconocía el tiempo de gestación en el que

se encontraban. Considerando que los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  se espera que disminuyan y aumenten continuamente en hembras y fetos respectivamente, hasta el final de la gestación (Clark *et al.*, 2016), es posible que Borrell y colaboradores (2016) analizaron organismos que no habían alcanzado esa fase final todavía. Los resultados aquí reportados enfatizan la importancia de no generalizar en la interpretación de los valores isotópicos, dado que ellos dependen íntimamente de la fisiología de cada individuo y también de cada par madre-cría.

Debido a que la observación directa del nacimiento de crías de ballena gris (como de cualquier misticeto) es extremadamente rara, se propone en este estudio el uso de un modelo de reloj isotópico (Klaassen *et al.*, 2010; Madigan *et al.*, 2012), basado en la composición isotópica del nitrógeno, como una metodología útil en la estimación de las edades de las crías muestreadas. El modelo del reloj isotópico se ha usado normalmente para estimar cuando los valores isotópicos varían en los tejidos de los animales debido a un cambio de dieta, y asumen que la contribución isotópica de la nueva dieta es constante (Klaassen *et al.*, 2010). Debido a que no fue posible estimar experimentalmente algunos de los parámetros requeridos para el modelo, en este estudio se procedió a usar datos de la literatura. Se considerarán tres asunciones para el modelo: 1) que los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  de la leche materna no cambia en el tiempo, 2) que los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  representantes de la vida uterina del feto pueden ser estimados a partir del cálculo del fraccionamiento isotópico madre-cría, y 3) que los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  de madre y cría son iguales a los 15 días después del nacimiento.

La colecta de muestras de leche de ballenas es un desafío logístico y no existe evidencia previa al respecto de la variación isotópica de ese tejido a lo largo de los diferentes periodos de lactancia. Registros previos disponibles para algunas especies de mamíferos marinos, como la foca gris (Cherel *et al.*, 2015), el rorcual común (Borrell *et al.*, 2016) y el oso polar (Polischuk *et al.*, 2001), no coinciden en sus resultados; además, el contenido isotópico de la leche del rorcual común se analizó en muestras colectadas desde carcasas colectadas en las áreas de alimentación y no en las de reproducción, lo cual complica la interpretación de los patrones de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ . Durante los primeros meses de lactancia, las especies “capital breeders” se espera que produzcan leche compuesta por ácidos grasos derivados del metabolismo de lípidos acumulados en la capa de grasa (Iverson *et al.*, 1997). Por lo tanto, en este estudio se asumió

que la composición isotópica de la leche producida por la ballena gris durante enero y febrero no variara significativamente en el tiempo.

La determinación de los valores isotópicos de la epidermis del feto cuando en equilibrio con la gestación ( $\delta(0)_{\text{cria}}$ ) es imposible de medir de manera directa; además de que no existen evidencias previas referente al fraccionamiento isotópico que ocurre entre las epidermis de madre y cría. Debido a que los resultados corroboran evidencias previas reportadas para otros tejidos (es decir, sangre total, plasma, pelo y musculo), en otras especies de mamíferos (es decir, elefante marino, humanos y rorcual común) (Fuller *et al.*, 2004; Habran *et al.*, 2010; Borrell *et al.*, 2016), la estimación del fraccionamiento isotópico del nitrógeno entre madres y crías presentada en este estudio la consideramos como una buena aproximación. En particular, en este trabajo se considera la implementación del “método 2” como la forma más conservadora para estimar correctamente el estado fisiológico (es decir, la transición entre el nacimiento y el inicio de lactancia); estado en el cual cada pareja madre-cría se encontraba al momento del muestreo. Aun así, se sugiere que los resultados de los modelos del reloj isotópico sean tomados con precaución al analizar crías recién nacidas, dado que es posible que los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  registrados en el estrato basal podrían diferir poco entre los otros estratos, y en consecuencia las predicciones podrían estar sesgadas por el “efecto borde” (Stevens, 2014). Lo anterior pudiera explicar porqué las predicciones de las fechas de nacimiento de las crías muestreadas en el 2019 indican edades menores utilizando el “método 2” que con el “método 1” (Fig. 9).

En este estudio no se pudieron determinar directamente los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  de la epidermis de las crías en equilibrio con la lactancia ( $\delta(\infty)_{\text{cria}}$ ), debido a que el destete ocurre en las áreas de alimentación del norte, meses después de la colecta de sus biopsias en las áreas de reproducción. Por tanto, el parámetro  $\delta(\infty)_{\text{cria}}$  fue estimado utilizando la información reportada por Jenkins y colaboradores (2001) para otras especies de mamíferos terrestres entre 12 y 14 días después del nacimiento los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  en madres y crías son iguales. Aunque no existe evidencia previa para mamíferos marinos de patrones parecidos a los estimados por Jenkins y colaboradores (2001), en este estudio se consideraron como relevantes por dos razones. La primera, debido a la histología de los estratos epidérmicos, la epidermis de las ballenas combina

tasas de recambio de pocos días hasta meses (Aguilar *et al.*, 2014; Busquets-Vass *et al.*, 2017; Wild *et al.*, 2018), las cuales son similares a las del plasma y células rojas, respectivamente (Ayliffe *et al.*, 2004; Cherel *et al.*, 2015). Además, evidencias previas (Hicks *et al.*, 1985; Aubin *et al.*, 1990; Giménez *et al.*, 2016; Busquets-Vass *et al.*, 2017) indican que las tasas de recambio isotópicas son comparables en animales de tamaños y masas corporales diferentes, también si se alimentan y distribuyen en hábitats distintos. La segunda, es que los resultados de este estudio reportan una disminución general de los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  entre estrato corneo y estrato basal en las crías, mientras que los de las hembras fueron menos variables; en todas las parejas madre-cría colectadas en el 2018 y 3 de enero 2019, los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  resultaron ser iguales entre estrato epidérmicos (Fig. 8). Por lo que se puede asumir que esas igualdades detectadas entre diferentes estratos estructurales puedan estar asociadas a las diferentes fechas de nacimiento de las crías y el efecto del cambio de gestación a lactancia en sus valores de  $\delta^{15}\text{N}$ .

Finalmente, debido a que la tasa de crecimiento afecta el tiempo en el que un tejido integra una nueva composición isotópica (Vander Zanden *et al.*, 2015), es posible asumir que la epidermis de las crías integran la composición isotópica de la leche más rápidamente que la epidermis de la hembra en reflejar un cambio fisiológico de gestación a lactancia. Esto se debe a que existen evidencias previas que indican que la incorporación isotópica en los tejidos corporales está influenciada por la temperatura, el tamaño corporal y la tasa de crecimiento (Martínez del Río y Carleton, 2012). Evidencias previas en otros cetáceos indican que la composición isotópica del nitrógeno de la epidermis no es afectada significativamente por dichas variables (Aubin *et al.*, 1990; Giménez *et al.*, 2016; Busquets-Vass *et al.*, 2017). Sin embargo, aunque en este estudio no se determinó si la transición de la vida fetal a la extrauterina cause un cambio en las tasas de recambio celular y de integración isotópica en la epidermis; se esperaría que esas tasas fueran más rápidas en las crías, que son más chicas que sus madres, dado que en ellas se espera tengan un crecimiento más rápido. Los datos aquí reportados para la pareja madre-cría muestreada en enero y marzo de la temporada 2019 (46 días de diferencia), indican que el fenómeno es más complejo, por lo que se recomienda realizar más estudios con recolecta de biopsias de parejas para entender mejor como la tasa de recambio proteica de los tejidos de distintas parejas difiere entre diferentes clases de edad.

### 8.3 Evaluación de la contribución de las presas del Ártico

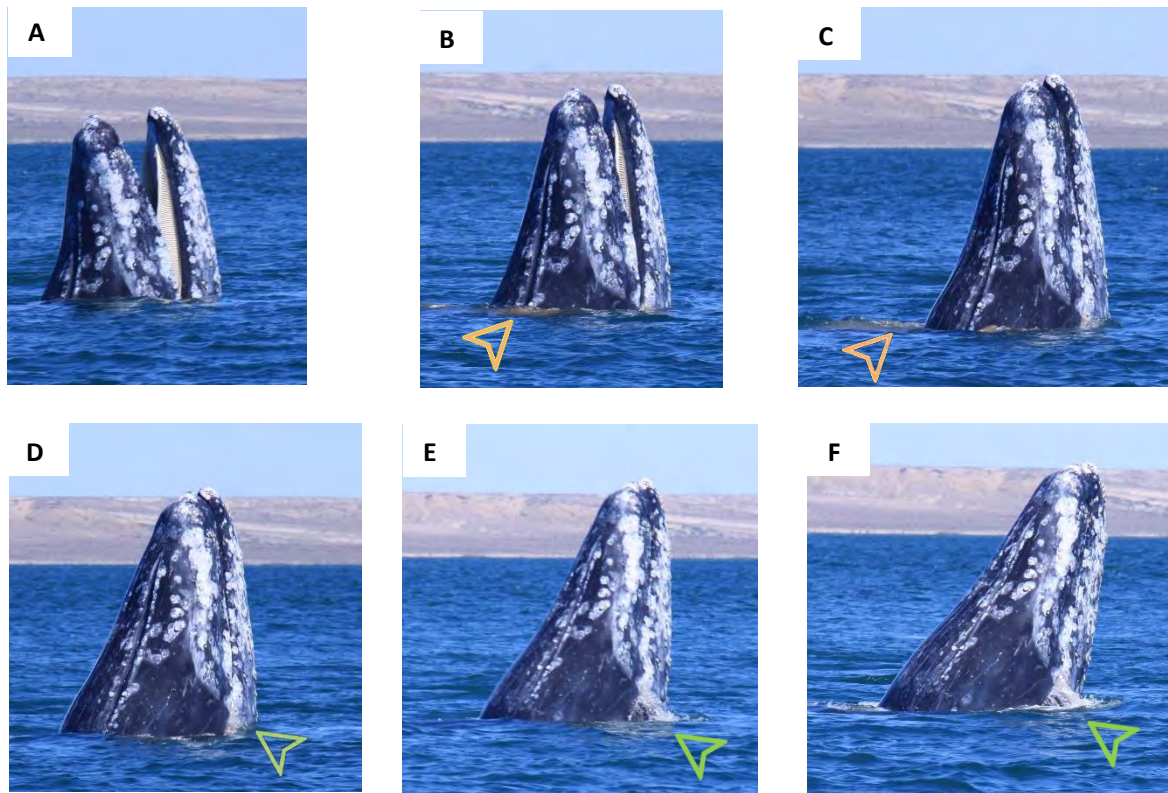
Este estudio evidencia por primera vez que las hembras gestantes y lactantes de ballena gris satisfacen sus necesidades fisiológicas integrando fuentes de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  de presas consumidas a lo largo del corredor migratorio, Mar de Bering, Isla Vancouver, e incluso en su área de reproducción principal, laguna Ojo de Liebre. Los resultados no permitieron sostener la idea tradicional de la literatura que sus necesidades fisiológicas relacionadas a la migración reproductiva se satisfacen exclusivamente de los anfípodos del Ártico.

La modelación de la probable contribución isotópica de las presas en el estrato epidérmico más antiguo (es decir, EC) y en el más nuevo (es decir, EB) indican que la ecología alimentaria de las hembras varía entre gestación y lactancia, respectivamente; también entre años y meses de muestreo, incluso entre individuos hay una estrategia de alimentación particular. Estos resultados resaltan la importancia de analizar el contenido isotópico de cada estrato epidérmico para poder entender correctamente las dinámicas de forrajeo de la ballena gris; lo cual contradice lo establecido en el estudio de Lian y colaboradores (2020), que concluyen que el estrato corneo puede ser fuente de información isotópica suficiente, para hipotetizar en relación a la historia de vida de la especie. Por el contrario, los resultados de este estudio, son consistentes con evidencias isotópicas reportadas a partir de la epidermis de otras especies, por ejemplo corrobora las evidencias reportadas para la ballena azul (Busquets-Vass *et al.*, 2017), ballena jorobada, rorcual común y cachalote (Wild *et al.*, 2018), que indican el análisis de la composición isotópica del nitrógeno y carbono en los diferentes estratos epidérmicos como necesarias, en particular para entender cambios de dieta y movimientos migratorios a lo largo del tiempo.

Los resultados de las hembras analizadas en este estudio resaltan posibles estrategias de alimentación diferentes entre y dentro de temporadas reproductivas, lo cual causó también diferencias significativas en la composición de la sangre placentaria/leche que afectó la epidermis de las crías. Estos resultados suportan por un lado todas aquellas evidencias previas que indican que la ballena gris es una especie dotada de gran plasticidad en la búsqueda y consumo de diferentes tipologías de alimento (Dunham y Duffus, 2001; Pyenson y Lindberg,

2011; Elizabeth Alter et al., 2015; Burnham y Duffus, 2018); sin embargo, también cuestionan la conceptualización clásica relacionada a la ecología alimentaria y reproductiva de la población oriental de esta especie; cuyo supuesto base, afirma que el éxito reproductivo varía entre años únicamente por la ocurrencia de alteraciones en la presencia y abundancia de las presas principales del Ártico (anfípodos bentónicos), relacionados a cambios en las condiciones ambientales del Mar de Bering y Chukchi (Boeuf *et al.*, 1999; Perryman *et al.*, 2002, 2020; Perryman y Lynn, 2002; Gulland *et al.*, 2005; Martínez-Aguilar *et al.*, 2019). En años negativos, en términos de un decremento en la producción de crías, ocurre una baja probabilidad de contribución de estas fuentes isotópicas principales; por el contrario, en años positivos, ocurre un incremento de la probabilidad de contribución de estas presas. Sin embargo, en este estudio, las hembras (n=4) en las que los anfípodos del Mar de Bering alcanzaron la mayor probabilidad de contribución isotópica, coincidió en un año negativo (es decir, 2019); mientras que las hembras colectadas en el 2011, considerado un año positivo en la producción de crías, la probabilidad de contribución de las presas Mar de Bering se compartió con las de Isla Vancouver. Ello sugiere que ambas áreas son de un uso importante para la migración reproductiva hacia el sur.

Por otro lado, es relevante señalar que la contribución de la probabilidad de contribución de las presas de laguna Ojo de Liebre aumentó significativamente a lo largo de la epidermis de todas las hembras analizadas (es decir, de EC a EB), independientemente del año de muestreo (Fig. 16), lo cual indica un uso constante del área de reproducción también como un sitio de alimentación (Fig. 19). Todas estas evidencias subrayan la importancia de redefinir el rol de las áreas de alimentación terciarias y de las áreas de reproducción en el éxito reproductivo de la ballena gris oriental, considerado hasta la fecha solo marginal (Villegas-Amtmann *et al.*, 2015).



**Figura 17:** Evidencia fotográfica de actividad alimenticia en laguna Ojo de Liebre. En particular, se puede observar como la ballena salió del agua con la boca abierta (**A y B**), para luego cerrarla (**C**) y expulsar agua (**D, E, F**, flechas verdes). La ballena se inclinó también hacia atrás (**E, F**), muy probablemente para tragar más fácilmente la comida. Se observan partículas de sedimento alrededor del cuerpo de la ballena después de su emersión (**A, B**, flechas amarillas) (©M. Gelippi, 2019).

Este estudio no es el primero en proponer posibles conexiones tróficas entre la población oriental de ballena gris y diferentes áreas del Ártico. A principio del año 2000, se inició una línea de investigación dirigida a explorar la conectividad trófica las redes tróficas de las lagunas de reproducción y las hembras que inician las actividades de lactancia cada año. Se propuso que tal conectividad está relacionada a ácidos grasos *omega-6*, componentes nutricionales disponibles quizás únicamente en las costas más sureñas de la ruta migratoria, en particular en las lagunas de reproducción (Caraveo-Patiño *et al.*, 2009). La composición nutricional de las redes árticas es dominada preferentemente por ácidos grasos *omega-3* (Ackman, 1989), mientras que en las redes tróficas de latitudes mas bajas y donde consecuentemente, se registran temperatura mayores, aumenta el contenido de *omega-6* (Lahdes *et al.*, 2000).



La detección de altos niveles de ácidos *omega-6* en las membranas los tejidos activos como músculo e hígado muestran la primera evidencia que sustenta que la fisiología de esta especie, y la de otros cetáceos, está basada en una fisiología dependiente de los ácidos grasos *omega-6*, y en consecuencia una continua búsqueda de estos nutrientes esenciales (Caraveo-Patiño *et al.*, 2009). Mas aún, la cantidades bajas de los mismos ácidos grasos en la capa de grasa de hembras lactantes (Hernández-Aguierre, 2012), confirman la asunción sugerida por Caraveo-Patiño y colaboradores (2009) quienes señalaron que la reproducción de la ballena gris debería estar relacionada con la búsqueda de presas ricas en ácidos grasos *omega-6*, debido a que las hembras al final de su gestación o inicio de la lactancia requieren estos ácidos grasos esenciales para incluirlos en la leche, nutrientes estructurales esenciales para el desarrollo del sistema nervioso central. Estudios previos mediante isótopos estables has reportado evidencia de esta conectividad trófica entre hembras y presas de las lagunas de reproducción (Caraveo-Patiño y Soto, 2005; Caraveo-Patiño *et al.*, 2007); por lo que el contenido nutricional de dichas presas podría ser transferido a las crías mediante la leche (Caraveo-Patiño y Soto, 2005). Sin embargo, esta conectividad trófica mediante el uso de isótopos estables quedó sin respuesta. En particular, este estudio otorga evidencia en esta dirección. La formación de la epidermis de las hembras sustenta la idea de que isotópicamente podría estar influenciada en mayor proporción por una continua actividad de forrajeo de altas biomasas de alimento durante ciertos periodos de tiempo (es decir, durante la gestación), en particular a partir de presas como las del Mar de Bering y Isla Vancouver; mientras que la evidencia isotópica inferida por la sangre placentaria y leche, podrían depender mayormente de la transformación de las reservas energéticas acumuladas en las capas de grasas de las madres y las presas consumidas durante su estancia en las áreas de reproducción.

La modelación de los patrones isotópicos registrados en la epidermis de las hembras lactantes sustenta la hipótesis de que existe una exigencia nutricional específica que tiene que ser satisfecha mediante el consumo continuo de ciertas presas a lo largo del corredor migratorio, incluyendo las áreas de reproducción. Además, la relación encontrada entre tipos de presas consumidas en laguna Ojo de Liebre y en las áreas de alimentación permite suponer respecto a lo antes mencionado, la posible implementación de diferentes estrategias de alimentación entre hembras de una misma población, las cuales quizás, pueden afectar el éxito reproductivo

individual, y consecuentemente, el de toda la población. En particular, las hembras que presentaron probabilidades mayormente de anfípodos en laguna Ojo de Liebre, presentaron las mayores probabilidades de contribución de los anfípodos del Mar de Bering, o bien probabilidades de ambos tipos de presas de su corredor migratorio, anfípodos del Mar de Bering y/o misidáceos de Isla Vancouver. Por el contrario, las hembras que presentaron las mayores probabilidades de poliquetos de laguna Ojo de Liebre reportaron las mayores probabilidades de contribución de misidáceos de Isla Vancouver.

Actualmente, el conocimiento de los hábitos alimenticios en las áreas de reproducción es demasiado escaso para poder responder con precisión la siguiente pregunta: ¿por qué las hembras se alimentaron de presas diferentes en laguna Ojo de Liebre? En este estudio no se analizó la abundancia y la distribución de las posibles presas en laguna Ojo de Liebre; sin embargo, es posible que su disponibilidad y/o abundancia varíe entre años, hasta adentro de una misma temporada reproductiva, como sugiere el hecho que todas las hembras muestreadas en el 2011 se alimentaron solamente de anfípodos en laguna Ojo de Liebre, a pesar de haber consumido también misidáceos de Isla Vancouver. Por otro lado, algunas hembras podrían conservar ciertas estrategias de forrajeo entre distintas áreas de alimentación a lo largo del corredor migratorio, lo cual quizás las limitaría aprovechar diferentes tipos de alimento de ambientes distintos (por ejemplo, ambiente pelágico). Esta asunción sugiere que, a pesar de una disponibilidad parecida de las presas, las hembras se alimentan solamente de algún tipo en especial, como posiblemente ocurrió durante el 2018, cuando todas las hembras posiblemente forrajearon solo poliquetos; o durante enero 2019, cuando ciertas hembras se alimentaron de anfípodos y otras de poliquetos.

Toda la evidencia anterior corrobora la gran plasticidad en los hábitos alimenticios de esta especie. En particular, la hipótesis de que ciertas hembras tienen una menor o mayor plasticidad en la estrategia de alimentación, que permite inferir efectos en los éxitos reproductivos individuales. Sin embargo, es recomendable seguir colectando epidermis de pares hembra-cría durante cada estación reproductiva, al principio (es decir, diciembre-enero) y al final (es decir, final de marzo) de ellas, y analizar su contenido isotópico de carbono y nitrógeno. En particular, los esfuerzos de muestreo se tendrán que dirigir a la colecta y recolecta de parejas

madre-cría durante su estancia en laguna Ojo de Liebre; los datos obtenidos permitirán afinar los resultados de los modelos del reloj isotópico, el cual, en este estudio, se ha demostrado ser una herramienta eficaz para la determinación de la fecha de nacimiento de las crías, parámetro difícil de medir en campo. Además, el continuo monitoreo isotópico a lo largo de los años consentirá evaluar cambios en los hábitos alimenticios entre temporadas de bajo y alto éxito reproductivo, ya que el número total de ballenas grises de la población oriental se considera aumentar y decrecer cíclicamente debido a eventos anómalos a corto plazo (Stewart y Weller, 2021).

El protocolo de muestreo implementado en este estudio fue exitoso y seguro, tanto para animales como investigadores; al coleccionar primero a las crías, se incrementó la probabilidad de obtener las biopsias de sus respectivas madres, lo cual permitió obtener un número considerable de muestras de pares hembra-cría. Además, los resultados aquí presentados indican que sí el muestreo de piel de las madres no es factible (por ejemplo, comportamiento de elusión de la hembra y las condiciones de seguridad disminuyen), el estudio de la composición isotópica de la epidermis de las crías permite inferir los posibles patrones isotópicos de las hembras faltantes; evidencia corroborada gracias al análisis de la variación isotópica en los estratos epidérmicos de la pareja madre-cría coleccionada y recolectada en enero y marzo del 2019 (Fig. 13), lo cual resultó ser semejante a los resultados de los GLME en globales.

No obstante que el estudio de datos históricos de abundancia de la especie es información valiosa en el planteamiento de planes de manejo y conservación, es crítico contar también con información reciente, relacionada con la evaluación de la ecología de la ballena gris bajo las condiciones ambientales actuales e históricas. Debido a que el éxito reproductivo de la especie está influenciado por el balance energético que existe entre la acumulación de los nutrientes en sus capas de grasas, y el uso de estos para satisfacer las necesidades fisiológicas de la reproducción; por lo tanto, es indispensable entender de manera correcta la interacción estricta que existe entre ecología alimenticia y la fisiología de la reproducción en hembras y crías lactantes. En particular, debido a que, en este estudio, se detectó que otras presas, además de los anfípodos árticos, tienen una probabilidad alta de ser fuentes isotópicas que integran la

epidermis, sangre placentaria y leche de la población oriental de ballena gris. Se recomienda explorar los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  de todos aquellos organismos que podrían ser aprovechados por la especie en otras áreas diferentes a las del Mar de Bering, como las más norteñas del Mar de Beufort, Rusia, y las más sureñas ubicadas en las lagunas de reproducción de Baja California Sur.

## 9. CONCLUSIONES

Este estudio demostró lo siguiente:

- Los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  varían significativamente entre los estratos epidérmicos de las hembras, crías, y hembras y crías, entre años y meses de muestreo. Dichas diferencias permitieron estimar y modelar el fraccionamiento isotópico del nitrógeno entre pares madre-cría para determinar el efecto de la transición de la gestación a la lactancia y, consecuentemente, inferir indirectamente la fecha de nacimiento de las crías mediante el reloj isotópico.
- El análisis isotópico del carbono y del nitrógeno a lo largo de los estratos epidérmicos es una herramienta útil a la investigación de la ecología alimentaria y fisiología reproductiva de la ballena gris.
- La estimación de las probabilidades de contribución de varias tipologías de presas a la composición isotópica de los estratos de la epidermis de hembras y crías lactantes aportan información de fuentes isotópicas provenientes de diferentes áreas ubicadas a lo largo del corredor migratorio (desde las zonas más norteñas hasta las más sureñas) pueden proporcionar nutrientes importantes para el éxito reproductivo de la ballena gris oriental.
- El Mar de Bering e Isla Vancouver emergen ambos como áreas de alimentación importante para la población oriental de la ballena gris.
- La asimilación constante de presas en la Laguna Ojo de Liebre sugiere que la ballena gris necesita satisfacer algunas necesidades fisiológicas específicas ligadas a la reproducción.

Este estudio delinea una nueva forma de entender la conectividad entre la ecología alimentaria y la producción de crías que ocurren anualmente en la población oriental de ballena gris, desde una nueva perspectiva conceptual y metodológica. Por tanto, este estudio puede proporcionar nuevas hipótesis para atender la necesidad de planteamientos y estrategias que permitan la recuperación de la población del oeste de ballena gris, la cual se estima cuenta con un número inferior a los 300 individuos (Cooke, 2020). Se calcula que el 48% de esos individuos usan las áreas de alimentación del oeste y las de reproducción del este (Cooke, 2020), lo cual evidencia la necesidad de entender desde una nueva perspectiva la conectividad trófica que existe entre áreas de crianza y alimentación de la ballena gris a mayor profundidad y escala espacial.

## 10. LITERATURA CITADA

- Ackman, R. G. (1989) "Nutritional composition of fats in seafoods", *Progress in Food and Nutrition Science*, pp. 161–289. Disponible en: <https://europepmc.org/article/med/2699043> (Consultado: el 18 de julio de 2021).
- Aguilar, A., Giménez, J., Gómez-Campos, E., Cardona, L. y Borrell, A. (2014) " $\delta^{15}\text{N}$  value does not reflect fasting in mysticetes", *PLoS ONE*, 9(3). doi:10.1371/journal.pone.0092288.
- Alter, S. E., Newsome, S. D. y Palumbi, S. R. (2012) "Pre-whaling genetic diversity and population ecology in eastern pacific gray whales: Insights from ancient DNA and stable isotopes", *PLoS ONE*. Editado por M. Knapp. Public Library of Science, 7(5), p. e35039. doi:10.1371/journal.pone.0035039.
- Aubin, D. J. St., Smith, T. G. y Geraci, J. R. (1990) "Seasonal epidermal molt in beluga whales, *Delphinapterus leucas*", *Canadian Journal of Zoology*, 68(2), pp. 359–367. doi:10.1139/z90-051.
- Ayliffe, L. K., Cerling, T. E., Robinson, T., West, A. G., Sponheimer, M., Passey, B. H., Hammer, J., Roeder, B., Dearing, M. D. y Ehleringer, J. R. (2004) "Turnover of carbon isotopes in tail hair and breath  $\text{CO}_2$  of horses fed an isotopically varied diet", *Oecologia*, 139(1), pp. 11–22. doi:10.1007/s00442-003-1479-x.
- Baker, H. (1992) *ASM Handbook: Alloy Phase Diagrams*, ASM Handbook Alloy Phase Diagrams. Editado por H. Baker. ASM International, Materials Park, Ohio.
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B. M. y Walker, S. C. (2015) "Fitting linear mixed-effects models using lme4", *Journal of Statistical Software*, 67(1). doi:10.18637/jss.v067.i01.
- Boecklen, W. J., Yarnes, C. T., Cook, B. A. y James, A. C. (2011) "On the Use of Stable Isotopes in Trophic Ecology", *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 42(1), pp. 411–440. doi:10.1146/annurev-ecolsys-102209-144726.
- Boeuf, B. J., Perez-Cortes, H., Urbán, J., Mate, B. R. y Ollervides, F. (1999) "High gray whale mortality and low recruitment in 1999: potential causes and implications", *J Cetacean Res. Manage.*, 2(2), pp. 85–99.
- Borrell, A., Gómez-Campos, E. y Aguilar, A. (2016) "Influence of Reproduction on Stable-Isotope Ratios: Nitrogen and Carbon Isotope Discrimination between Mothers, Fetuses, and Milk in the Fin Whale, a Capital Breeder", *Physiological and Biochemical Zoology*, 89(1), pp. 41–50. doi:10.1086/684632.
- Burnham, R. y Duffus, D. (2018) "Patterns of predator-prey dynamics between gray whales (*Eschrichtius robustus*) and mysid species in Clayoquot Sound", *Journal of Cetacean Research and Management*, 19, pp. 95–103.
- Busquets-Vass, G., Newsome, S. D., Calambokidis, J., Serra-Velente, G., Jacobsen, J. K., Aguíñiga-García, S. y Gendron, D. (2017) "Estimating blue whale skin isotopic incorporation rates and baleen growth rates: Implications for assessing diet and movement patterns in mysticetes", *PLOS ONE*. Editado por M. S. Boyce, 12(5), pp. 1–25. doi:10.1371/journal.pone.0177880.
- Calambokidis, J., Steiger, G. H., Evenson, J. R., Cubbage, J. C. y Osborne, R. W. (1991) "Gray whales in Puget Sound and the Strait of Juan de Fuca", *Puget Sound Research*, 91, pp. 414–422. Disponible en: [https://scholar.google.com/scholar?hl=it&as\\_sdt=0%2C5&q=Calambokidis+J%2C+Steiger+GH%2C+Evenson+JR%2C+Cubbage+JC%2C+Osborne+RW+%281991%29+Gray+whales+in+Puget+Sound+and+the+Strait+of+Juan+de+Fuca.+&btnG=#d=gs\\_cit&u=%2Fscholar%3Fq%3Dinfo%3ATxn8JRS9vgJ%3As](https://scholar.google.com/scholar?hl=it&as_sdt=0%2C5&q=Calambokidis+J%2C+Steiger+GH%2C+Evenson+JR%2C+Cubbage+JC%2C+Osborne+RW+%281991%29+Gray+whales+in+Puget+Sound+and+the+Strait+of+Juan+de+Fuca.+&btnG=#d=gs_cit&u=%2Fscholar%3Fq%3Dinfo%3ATxn8JRS9vgJ%3As) (Consultado: el 22 de junio de 2021).
- Caraveo-Patiño, J. (2004) *Ecología alimenticia de la ballena gris (Eschrichtius robustus, Lilljeborg,*

1861): una ventana a la dinámica interna de los ecosistemas. CIBNOR.

Caraveo-Patiño, J., Hobson, K. A. y Soto, L. A. (2007) "Feeding ecology of gray whales inferred from stable-carbon and nitrogen isotopic analysis of baleen plates", *Hydrobiologia*, 586(1), pp. 17–25. doi:10.1007/s10750-006-0477-5.

Caraveo-Patiño, J. y Soto, L. A. (2005) "Stable carbon isotope ratios for the gray whale (*Eschrichtius robustus*) in the breeding grounds of Baja California Sur, Mexico", *Hydrobiologia*, 539(1), pp. 99–107. doi:10.1007/s10750-004-3370-0.

Caraveo-Patiño, J., Wang, Y., Soto, L. A., Ghebremeskel, K., Lehane, C. y Crawford, M. A. (2009) "Eco-physiological repercussions of dietary arachidonic acid in cell membranes of active tissues of the Gray whale", *Marine Ecology*, 30(4), pp. 437–447. doi:10.1111/j.1439-0485.2009.00289.x.

Cherel, Y., Hobson, K. A. y Guinet, C. (2015) "Milk isotopic values demonstrate that nursing fur seal pups are a full trophic level higher than their mothers", *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 29(16), pp. 1485–1490. doi:10.1002/rcm.7243.

Clark, C. T., Fleming, A. H., Calambokidis, J., Kellar, N. M., Allen, C. D., Catelani, K. N., Robbins, M., Beaulieu, N. E., Steel, D. y Harvey, J. T. (2016) "Heavy with child? Pregnancy status and stable isotope ratios as determined from biopsies of humpback whales", *Conservation Physiology*, 4(1), pp. 1–13. doi:10.1093/conphys/cow050.

Cooke, J. G. (2020) "Population Assessment Update for Sakhalin Gray Whales", *Western Gray Whale Advisory Panel*, 13(November).

DeNiro, M. J. y Epstein, S. (1981) "Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals", *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 45, pp. 341–351. doi:10.1016/0016-7037(78)90199-0.

Ducatez, S., Dalloyau, S., Richard, P., Guinet, C. y Cherel, Y. (2008) "Stable isotopes document winter trophic ecology and maternal investment of adult female southern elephant seals (*Mirounga leonina*) breeding at the Kerguelen Islands", *Marine Biology*, 155(4), pp. 413–420. doi:10.1007/s00227-008-1039-3.

Dunham, J. S. y Duffus, D. A. (2001) "Foraging patterns of gray whales in central Clayoquot Sound, British Columbia, Canada", *Marine Ecology Progress Series*, 223, pp. 299–310. doi:10.3354/meps223299.

Elizabeth Alter, S., Meyer, M., Post, K., Czechowski, P., Gravlund, P., Gaines, C., Rosenbaum, H. C., Kaschner, K., Turvey, S. T., Van Der Plicht, J., Shapiro, B. y Hofreiter, M. (2015) "Climate impacts on transoceanic dispersal and habitat in gray whales from the Pleistocene to 2100", *Molecular Ecology*, 24(7), pp. 1510–1522. doi:10.1111/mec.13121.

Folch, J., Lees, M. y Stanley, G. H. S. (1957) "A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues", *J Biol Chem*, pp. 497–509. doi:10.1007/s10858-011-9570-9.

Frasier, T. R., Koroscil, S. M., White, B. N. y Darling, J. D. (2011) "Assessment of population substructure in relation to summer feeding ground use in the eastern North Pacific gray whale", *Endangered Species Research*, 14(1), pp. 39–48. doi:10.3354/esr00340.

Fuller, B. T., Fuller, J. L., Sage, N. E., Harris, D. A., O'Connell, T. C. y 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(23), pp. 2889–2896. doi:10.1002/rcm.1708.

Gelippi, M., Popp, B., Gauger, M. F. W. y Caraveo-Patiño, J. (2020) "Tracing gestation and lactation in free ranging gray whales using the stable isotopic composition of epidermis layers", *PLoS ONE*, 15(10 October), pp. 1–23. doi:10.1371/journal.pone.0240171.

Giménez, J., Ramírez, F., Almunia, J., G. Forero, M. y de Stephanis, R. (2016) "From the pool to the sea: Applicable isotope turnover rates and diet to skin discrimination factors for bottlenose

- dolphins (*Tursiops truncatus*)", *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. Elsevier B.V., 475(October), pp. 54–61. doi:10.1016/j.jembe.2015.11.001.
- Grebmeier, J. M., Overland, J. E., Moore, S. E., Farley, E. V., Carmack, E. C., Cooper, L. W., Frey, K. E., Helle, J. H., McLaughlin, F. A. y McNutt, S. L. (2006) "A major ecosystem shift in the northern Bering sea", *Science*, 311(5766), pp. 1461–1464. doi:10.1126/science.1121365.
- Gulland, F., Pérez-Cortés, H., Urbán, J. R., Rojas-Bracho, L., Ylitalo, G., Weir, J., Norman, S., Muto, M., Rugh, D., Kreuder, C. y Rowles, T. (2005) "Eastern North Pacific gray whale (*Eschrichtius robustus*) unusual mortality event, 1999–2000", *U.S. Department of Commerce. NOAA Technical Memorandum. NMFS-AFSC-150.*, (March), p. 33 pp. Disponible en: <http://www.afsc.noaa.gov/publications/AFSC-TM/NOAA-TM-AFSC-150.pdf>.
- Habran, S., Damseaux, F., Pomeroy, P., Debier, C., Crocker, D., Lepoint, G. y Das, K. (2019) "Changes in stable isotope compositions during fasting in phocid seals", *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 33(2), pp. 176–184. doi:10.1002/rcm.8308.
- Habran, S., Debier, C., Crocker, D. E., Houser, D. S., Lepoint, G., Bouqueneau, J. M. y Das, K. (2010) "Assessment of gestation, lactation and fasting on stable isotope ratios in northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*)", *Marine Mammal Science*, 26(4), pp. 880–895. doi:10.1111/j.1748-7692.2010.00372.x.
- Hatch, K. A. (2012) "The Use and Application of Stable Isotope Analysis to the Study of Starvation, Fasting, and Nutritional Stress in Animals", en McCue. Marshall D. (ed.) *Comparative Physiology of Fasting, Starvation, and Food Limitation*. Springer, pp. 337–364.
- Hernández-Aguierre, D. (2012) "ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN LOS ESTRATOS DE LA CAPA DE GRASA (BLUBBER) DE LA BALLENA GRIS *Eschrichtius robustus* (LILLJEBORG, 1861)", *Tesis de maestría CIBNOR*.
- Hicks, B. D., St. Aubin, D. J., Geraci, J. R. y Brown, W. R. (1985) "Epidermal growth in the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*", *Journal of Investigative Dermatology*. Elsevier Masson SAS, 85(1), pp. 60–63. doi:10.1111/1523-1747.ep12275348.
- Hopkins, J. B. y Ferguson, J. M. (2012) "Estimating the diets of animals using stable isotopes and a comprehensive Bayesian mixing model", *PLoS ONE*, p. 28478. doi:10.1371/journal.pone.0028478.
- Horstmann-Dehn, L., Follmann, E. H., Rosa, C., Zelensky, G. y George, C. (2012) "Stable carbon and nitrogen isotope ratios in muscle and epidermis of arctic whales", *Marine Mammal Science*, 28(2). doi:10.1111/j.1748-7692.2011.00503.x.
- Houston, A. I., Stephens, P. A., Boyd, I. L., Harding, K. C. y McNamara, J. M. (2007) "Capital or income breeding? A theoretical model of female reproductive strategies", *Behavioral Ecology*. Oxford University Press, 18(1), pp. 241–250. doi:10.1093/beheco/arl080.
- Huang, S. L., Chou, L. S., Shih, N. T. y Ni, I. H. (2011) "Implication of life history strategies for prenatal investment in cetaceans", *Marine Mammal Science*, 27(1), pp. 182–194. doi:10.1111/j.1748-7692.2010.00392.x.
- Iverson, S. J., Arnould, J. P. Y. y Boyd, I. L. (1997) "Milk fatty acid signatures indicate both major and minor shifts in the diet of lactating Antarctic fur seals", *Canadian Journal of Zoology*, 75(2), pp. 188–197. doi:10.1139/z97-026.
- Jenkins, S. G., Partridge, S. T., Stephenson, T. R., Farley, S. D. y Robbins, C. T. (2001) "Nitrogen and carbon isotope fractionation between mothers, neonates, and nursing offspring", *Oecologia*, 129(3), pp. 336–341. doi:10.1007/s004420100755.
- Jones, M. Lou y Swartz, S. L. (2009) "Gray whale", en Academic Press (ed.) *Encyclopedia of Marine Mammals*, p. 1352.



- Jorge Urbán, R., Alejandro Gómez-Gallardo, U. y Ludwig, S. (2003) "Abundance and mortality of gray whales at Laguna San Ignacio, Mexico, during the 1997-98 El Niño and the 1998-99 La Niña", *Geofísica Internacional*, 42(3), pp. 439–446.
- Kim, L. y Oliver, J. S. (1989) "Swarming benthic crustaceans in the Bering and Chukchi seas and their relation to geographic patterns in gray whale feeding", *Canadian Journal of Zoology*, 67(October), pp. 1531–1542. doi:10.1139/z89-218.
- Klaassen, M., Piersma, T., Korthals, H., Dekinga, A. y Dietz, M. W. (2010) "Single-point isotope measurements in blood cells and plasma to estimate the time since diet switches", *Functional Ecology*, 24(4), pp. 796–804. doi:10.1111/j.1365-2435.2010.01689.x.
- Ko, A. R., Ju, S. J., Choi, S. G. y Shin, K. H. (2016) "The feasibility of assessing the diets of minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) in the East Sea through fatty acid composition in blubber and stable isotopic ratio of skin", *Ocean Science Journal*, 51(3), pp. 397–410. doi:10.1007/s12601-016-0036-6.
- Kohl, K. D., Coogan, S. C. P. y Raubenheimer, D. (2015) "Do wild carnivores forage for prey or for nutrients?: Evidence for nutrient-specific foraging in vertebrate predators", *BioEssays*, 37(6), pp. 701–709. doi:10.1002/bies.201400171.
- Lagerquist, B. A., Palacios, D. M., Winsor, M. H., Irvine, L. M., Follett, T. M. y Mate, B. R. (2019) "Feeding home ranges of pacific coast feeding group gray whales", *Journal of Wildlife Management*, 83(4), pp. 925–937. doi:10.1002/jwmg.21642.
- Lahdes, E., Balogh, G., Fodor, E. y Farkas, T. (2000) "Adaptation of composition and biophysical properties of phospholipids to temperature by the crustacean, *Gammarus* spp", *Lipids*. Springer, 35(10), pp. 1093–1098. doi:10.1007/s11745-000-0624-9.
- Lang, A. R., Calambokidis, J., Scordino, J., Pease, V. L., Klimek, A., Burkanov, V. N., Gearin, P., Litovka, D. I., Robertson, K. M., Mate, B. R., Jacobsen, J. K. y Taylor, B. L. (2014) "Assessment of genetic structure among eastern North Pacific gray whales on their feeding grounds", *Marine Mammal Science*, 30(4), pp. 1473–1493. doi:10.1111/mms.12129.
- Lesage, V., Morin, Y., Rioux, È., Pomerleau, C., Ferguson, S. H. y Pelletier, É. (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, pp. 249–265. doi:10.3354/meps08825.
- Lian, M., Castellini, J. M., Miller, D., Griff, B., Vertyankin, V. V., Dupont, J., Broker, K., Godard-Codding, C. A. J. y O'Hara, T. M. (2020) "Assessing  $\delta^{13}C$ ,  $\delta^{15}N$  and Total Mercury Measures in Epidermal Biopsies From Gray Whales", *Frontiers in Marine Science*, 7(March), pp. 1–9. doi:10.3389/fmars.2020.00133.
- Lübcker, N., Whiteman, J. P., Newsome, S. D., Millar, R. P. y Bruyn, P. J. N. De (2020) "Can the carbon and nitrogen isotope values of offspring be used as a proxy for their mother's diet? Using foetal physiology to interpret bulk tissue and amino acid  $\delta^{15}N$  values", *Conservation Physiology*, 8, pp. 1–16. doi:10.1093/conphys/coaa060.
- Machovsky-Capuska, G. E., Coogan, S. C. P., Simpson, S. J., Raubenheimer, D. y Bshary, R. (2016) "Motive for Killing: What Drives Prey Choice in Wild Predators?", *Ethology*, 122(9), pp. 703–711. doi:10.1111/eth.12523.
- Macías-Zamora, J. V., Sánchez-Osorio, J. L., Ríos-Mendoza, L. M., Ramírez-Álvarez, N., Huerta-Díaz, M. A. y López-Sánchez, D. (2008) "Trace metals in sediments and *Zostera marina* of San Ignacio and Ojo de Liebre lagoons in the central pacific coast of Baja California, Mexico", *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 55(2), pp. 218–228. doi:10.1007/s00244-007-9115-0.

- Madigan, D. J., Litvin, S. Y., Popp, B. N., Carlisle, A. B., Farwell, C. J. y Block, B. A. (2012) "Tissue Turnover Rates and Isotopic Trophic Discrimination Factors in the Endothermic Teleost, Pacific Bluefin Tuna (*Thunnus orientalis*)", *PLoS ONE*, 7(11), pp. 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0049220.
- Mann, J. (1999) "Behavioral Sampling Methods for Cetaceans: a Review and Critique", *Marine Mammal Science*, 15(1), pp. 102–122. doi:10.1111/j.1748-7692.1999.tb00784.x.
- Marcel, Y. L., Christiansen, K. y Holman, R. T. (1968) "The preferred metabolic pathway from linoleic acid to arachidonic acid in vitro", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism*, 164(1), pp. 25–34. doi:10.1016/0005-2760(68)90067-2.
- Martínez-Aguilar, S., Mariano-Meléndez, E., Lopez-Paz, F., Castillo-Romero, G. A., Zaragoza-Aguilar, F., Castillo-Romero, J., Rivera-Rodríguez, S., Swartz, S., Vilorio-Gómora, L. y Urbán, R. (2019) "Gray Whale (*Eschrichtius robustus*) stranding records in Mexico during the winter breeding season in 2019.", *IWC*, (June).
- Martínez del Río, C. y Carleton, S. A. (2012) "How fast and how faithful: the dynamics of isotopic incorporation into animal tissues: Fig. 1", *Journal of Mammalogy*, 93(2), pp. 353–359. doi:10.1644/11-mamm-s-165.1.
- Martínez Del Río, C., Wolf, N., Carleton, S. A. y Gannes, L. Z. (2009) "Isotopic ecology ten years after a call for more laboratory experiments", *Biological Reviews*, pp. 91–111. doi:10.1111/j.1469-185X.2008.00064.x.
- McKinney, C. R., McCrea, J. M., Epstein, S., Allen, H. A. y Urey, H. C. (1950) "Improvements in mass spectrometers for the measurement of small differences in isotope abundance ratios", *Review of Scientific Instruments*, 21(8), pp. 724–730. doi:10.1063/1.1745698.
- Moore, J. W. y Semmens, B. X. (2008) "Incorporating uncertainty and prior information into stable isotope mixing models", *Ecology Letters*, 11(5), pp. 470–480. doi:10.1111/j.1461-0248.2008.01163.x.
- Moore, S. E., Grebmeier, J. M. y Davies, J. R. (2003) "Gray whale distribution relative to forage habitat in the northern Bering Sea: Current conditions and retrospective summary", *Canadian Journal of Zoology*, 81(4), pp. 734–742. doi:10.1139/z03-043.
- Moore, S. y Huntington, H. (2008) "Arctic Marine Mammals and Climate Change : Impacts and Resilience", *Ecological Applications*, 18(2), pp. 157–165. doi:10.1890/06-0571.1.
- Nerini, M. (1984) *A review of gray whale feeding ecology*. Jones ML,. Academic Press, Orlando. Disponible en: [https://books.google.com.mx/books?hl=it&lr=&id=GfGITi5NmJoC&oi=fnd&pg=PA423&dq=Nerini+M+\(1984\)+A+review+of+gray+whale+feeding+ecology.+In:+Jones+ML,+Swartz+S,+Leatherwood+S+\(eds\)+The+gray+whale+\(Eschrichtius+robustus\).+Academic+Press,+Orlando,+p+423-450&oeq=1](https://books.google.com.mx/books?hl=it&lr=&id=GfGITi5NmJoC&oi=fnd&pg=PA423&dq=Nerini+M+(1984)+A+review+of+gray+whale+feeding+ecology.+In:+Jones+ML,+Swartz+S,+Leatherwood+S+(eds)+The+gray+whale+(Eschrichtius+robustus).+Academic+Press,+Orlando,+p+423-450&oeq=1) (Consultado: el 22 de junio de 2021).
- New, L. F., Clark, J. S., Costa, D. P., Fleishman, E., Hindell, M. A., Klanjšček, T., Lusseau, D., Kraus, S., McMahon, C. R., Robinson, P. W., Schick, R. S., Schwarz, L. K., Simmons, S. E., Thomas, L., Tyack, P. y Harwood, J. (2014) "Using short-term measures of behaviour to estimate long-term fitness of southern elephant seals", *Marine Ecology Progress Series*, 496, pp. 99–108. doi:10.3354/meps10547.
- Newsome, S. D., Clementz, M. T. y Koch, P. L. (2010) "Using stable isotope biogeochemistry to study marine mammal ecology.", *Mar. Mammal Sci.*, pp. 509–572.
- Newsome, S. D., Koch, P. L., Etnier, M. A. y Aurióles-Gamboa, D. (2006) "Using carbon and nitrogen isotope values to investigate maternal strategies in Northeast Pacific otariids", *Marine Mammal Science*, 22(3), pp. 556–572. doi:10.1111/j.1748-7692.2006.00043.x.

- Parnell, A. C., Phillips, D. L., Bearhop, S., Semmens, B. X., Ward, E. J., Moore, J. W., Jackson, A. L., Grey, J., Kelly, D. J. y Inger, R. (2013) "Bayesian stable isotope mixing models", *Environmetrics*, 24(6), pp. 387–399. doi:10.1002/env.2221.
- Perryman, W. L., Donahue, M. A., Perkins, P. C. y Reilly, S. B. (2002) "Gray Whale Calf Production 1994-2000: Are Observed Fluctuations Related To Changes in Seasonal Ice Cover?", *Marine Mammal Science*, 18(1), pp. 121–144. doi:10.1111/j.1748-7692.2002.tb01023.x.
- Perryman, W. L., Joyce, T., Weller, D. W. y Durban, J. W. (2020) "Environmental factors influencing eastern North Pacific gray whale calf production 1994–2016", *Marine Mammal Science*. John Wiley & Sons, Ltd, 37(2), pp. 448–462. doi:10.1111/mms.12755.
- Perryman, W. L. y Lynn, M. S. (2002) "Evaluation of nutritive condition and reproductive status of migrating gray whales (*Eschrichtius robustus*) based on analysis of photogrammetric data", *Journal of Cetacean Research and Management*, 4(2), pp. 155–164.
- Phillips, D. L. (2012) "Converting isotope values to diet composition: The use of mixing models", *Journal of Mammalogy*, pp. 342–352. doi:10.1644/11-MAMM-S-158.1.
- Piatt, J. F., Parrish, J. K., Renner, H. M., Schoen, S. K., Jones, T. T., Arimitsu, M. L., Kuletz, K. J., Bodenstern, B., García-Reyes, M., Duerr, R. S., Corcoran, R. M., Kaler, R. S. A., McChesney, G. J., Golightly, R. T., Coletti, H. A., Suryan, R. M., Burgess, H. K., Lindsey, J., Lindquist, K., Warzybok, P. M., Jahncke, J., Roletto, J. y Sydeman, W. J. (2020) *Extreme mortality and reproductive failure of common murrelets resulting from the northeast Pacific marine heatwave of 2014-2016*, *PLoS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0226087.
- Pirotta, E., Mangel, M., Costa, D. P., Mate, B., Goldbogen, J. A., Palacios, D. M., Hückstädt, L. A., McHuron, E. A., Schwarz, L. y New, L. (2018) *A dynamic state model of migratory behavior and physiology to assess the consequences of environmental variation and anthropogenic disturbance on marine vertebrates*, *American Naturalist*. doi:10.1086/695135.
- Polischuk, S. C., Hobson, K. A. y Ramsay, M. A. (2001) "Use of stable-carbon and -nitrogen isotopes to assess weaning and fasting in female polar bears and their cubs", *Canadian Journal of Zoology*, 79(3), pp. 499–511. doi:10.1139/cjz-79-3-499.
- Pyenson, N. D. y Lindberg, D. R. (2011) "What happened to gray whales during the pleistocene? The ecological impact of sea-level change on benthic feeding areas in the north pacific ocean", *PLoS ONE*, 6(7). doi:10.1371/journal.pone.0021295.
- Reeb, D. y Best, P. B. (2006) "A biopsy system for deep core sampling of the blubber of southern right whales, *Eubalaena australis*", *Marine Mammal Science*, 22(1), pp. 206–213. doi:10.1111/j.1748-7692.2006.00015.x.
- Reeb, D., Best, P. B. y Kidson, S. H. (2007) "Structure of the integument of southern right whales, *Eubalaena australis*", *Anatomical Record*, 290(6), pp. 596–613. doi:10.1002/ar.20535.
- Rugh, D. J., Muto, M. M., Moore, S. E. y DeMaster, D. P. (1999) "Status review of the eastern North Pacific stock of gray whales", *U.S. Dep. Commer., NOAA Tech. Memo. NMFS-AFSC-103*, (August), p. 93. Disponible en: <http://www.afsc.noaa.gov/Publications/AFSC-TM/NOAA-TM-AFSC-103.pdf> (Consultado: el 5 de julio de 2021).
- Scheinin, A. P., Kerem, D., MacLeod, C. D., Gazo, M., Chicote, C. A. y Castellote, M. (2011) "Gray whale (*Eschrichtius robustus*) in the Mediterranean Sea: Anomalous event or early sign of climate-driven distribution change?", *Marine Biodiversity Records*, 4. doi:10.1017/S1755267211000042.
- Schell, D. M., Rowntree, V. J. y Pfeiffer, C. J. (2000) "Stable-isotope and electron-microscopic evidence that cyamids (Crustacea: Amphipoda) feed on whale skin", *Canadian Journal of Zoology*, 78(5), pp. 721–727. doi:10.1139/z99-249.

- Sokolov, V. E. (1982) *Mammal skin*. University of California Press.
- Spitz, J., Trites, A. W., Becquet, V., Brind'Amour, A., ChereI, Y., Galois, R. y Ridoux, V. (2012) "Cost of Living Dictates what Whales, Dolphins and Porpoises Eat: The Importance of Prey Quality on Predator Foraging Strategies", *PLoS ONE*. Editado por K. Q. Sakamoto. Public Library of Science, 7(11), p. e50096. doi:10.1371/journal.pone.0050096.
- Stephens, P. A., Houston, A. I., Harding, K. C., Boyd, I. L. y McNamara, J. M. (2014) "Capital and income breeding: the role of food supply", *Ecology*, 95(4), pp. 882–896.
- Stevens, J. D. L. (2014) "Edge Effect", en *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. doi:10.1002/9781118445112.stat07571.
- Stewart, J. D. y Weller, D. W. (2021) "NOAA Technical Memorandum NMFS ABUNDANCE OF EASTERN NORTH PACIFIC GRAY WHALES 2019 / 2020", (January).
- Thomas, P. O., Reeves, R. R. y Brownell, R. L. (2016) "Status of the world's baleen whales", *Marine Mammal Science*, 32(2), pp. 682–734. doi:10.1111/mms.12281.
- Tieszen, L. L., Boutton, T. W., Tesdahl, K. G. y 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(1–2), pp. 32–37. doi:10.1007/BF00379558.
- Urbán R., J., Rojas-Bracho, L., Pérez-Cortés, H., Gómez-Gallardo U, A., Swartz, S. L., Ludwig, S. y Brownell Jr, R. L. (2003) "A review of gray whales (*Eschrichtius robustus*) on their wintering grounds in Mexican waters", *Journal of Cetacean Research and Management*, 5(3), pp. 281–295. Disponible en: [http://www.researchgate.net/publication/233936361\\_A\\_review\\_of\\_gray\\_whales\\_\(Eschrichtius\\_robustus\)\\_on\\_their\\_wintering\\_grounds\\_in\\_Mexican\\_waters/file/32bfe50d387f8bb129.pdf](http://www.researchgate.net/publication/233936361_A_review_of_gray_whales_(Eschrichtius_robustus)_on_their_wintering_grounds_in_Mexican_waters/file/32bfe50d387f8bb129.pdf).
- Urian, K., Gorgone, A., Read, A., Balmer, B., Wells, R. S., Berggren, P., Durban, J., Eguchi, T., Rayment, W. y Hammond, P. S. (2015) "Recommendations for photo-identification methods used in capture-recapture models with cetaceans", *Marine Mammal Science*, 31(1), pp. 298–321. doi:10.1111/mms.12141.
- Villegas-Amtmann, S., Schwarz, L. K., Sumich, J. L. y Costa, D. P. (2015) "A bioenergetics model to evaluate demographic consequences of disturbance in marine mammals applied to gray whales", *Ecosphere*, 6(10), p. art183. doi:10.1890/ES15-00146.1.
- Wade, P. R. y Perryman, W. (2002) "An assessment of the eastern gray whale population in 2002 Population dynamics Model", *Paper SC/54/BRG7*.
- Wild, L. A., Chenoweth, E. M., Mueter, F. J. y Straley, J. M. (2018) "Evidence for dietary time series in layers of cetacean skin using stable carbon and nitrogen isotope ratios", *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 32(16), pp. 1425–1438. doi:10.1002/rcm.8168.
- Williams, G., Crawford, M. a. y Perrin, W. F. (1987) "Comparison of the fatty acid component in structural lipids from dolphins, zebra and giraffe: possible evolutionary implications", *Journal of the Zoological Society of London*, 213, pp. 673–684. doi:10.1111/j.1469-7998.1987.tb03733.x.
- Vander Zanden, M. J., Clayton, M. K., Moody, E. K., Solomon, C. T. y Weidel, B. C. (2015) "Stable isotope turnover and half-life in animal tissues: A literature synthesis", *PLoS ONE*, 10(1), pp. 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0116182.

## 11. ANEXOS

### Anexo A: Selección en avance del modelo lineal de efectos mixtos mas parsimonioso para los isótopos del carbono.

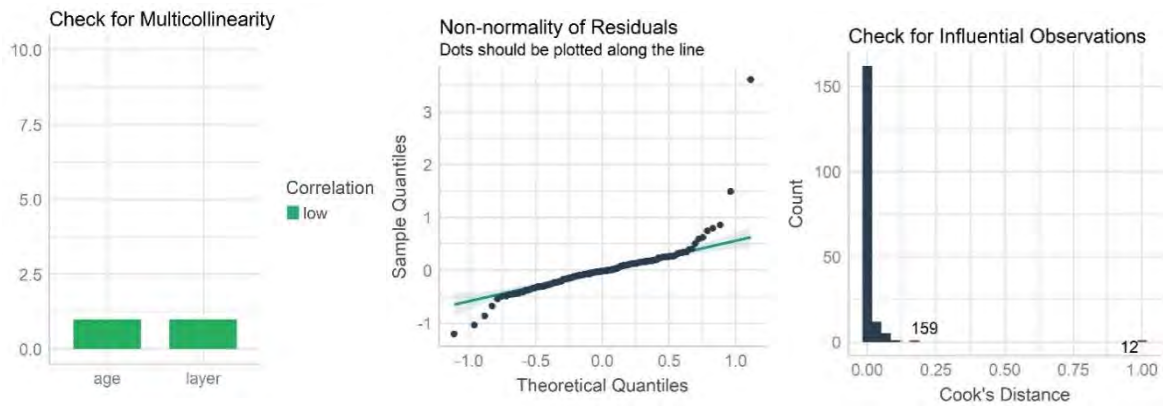
Fórmula	AICc	dAICc	df	AICcwt
$\delta^{13}\text{C} \sim 1$	611,72	225,15	2	0
$\delta^{13}\text{C} \sim 1 + (\sim 1   \text{ID}) + (1   \text{mcp})$	426,5	41,89	4	0
$\delta^{13}\text{C} \sim 1 + (\sim 1   \text{mcp:ID})$	426,5	41,89	4	0
$\delta^{13}\text{C} \sim 1 + (\sim 1   \text{mcp:ID}) + (1   \text{AM})$	425,09	40,48	5	0
$\delta^{13}\text{C} \sim \text{estrato} + (\sim 1   \text{mcp:ID}) + (1   \text{AM})$	417,66	33,06	7	0
$\delta^{13}\text{C} \sim \text{edad} + (\sim 1   \text{mcp:ID}) + (1   \text{AM})$	391,9	7,29	6	0,02
$\delta^{13}\text{C} \sim \text{mes} + (\sim 1   \text{mcp:ID}) + (1   \text{AM})$	427	42,39	7	0
$\delta^{13}\text{C} \sim \text{estrato} + \text{edad} + (\sim 1   \text{mcp:ID}) + (1   \text{AM})$	384,61	0	8	0,71*
$\delta^{13}\text{C} \sim \text{estrato} * \text{edad} + (\sim 1   \text{mcp:ID}) + (1   \text{AM})$	386,57	1,96	10	0,27

### Anexo B: Selección en avance del modelo lineal de efectos mixtos mas parsimonioso para los isótopos del nitrógeno.

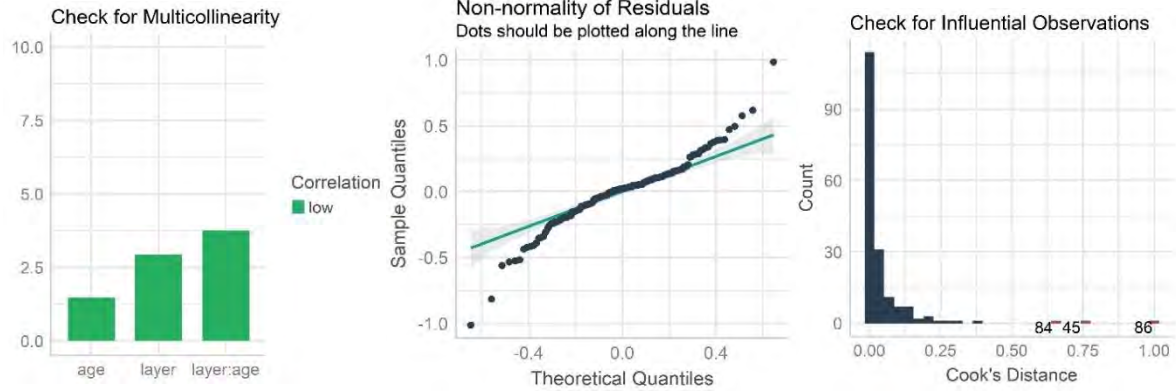
Fórmula	AICc	dAICc	df	AICcwt
$\delta^{15}\text{N} \sim 1$	690,2	415,19	2	0
$\delta^{15}\text{N} \sim 1 + (\sim 1   \text{ID}) + (1   \text{mcp})$	379,71	104,7	4	0
$\delta^{15}\text{N} \sim 1 + (\sim 1   \text{mcp:ID})$	379,71	104,7	4	0
$\delta^{15}\text{N} \sim 1 + (\sim 1   \text{mcp:ID}) + (1   \text{AM})$	376,55	101,54	5	0
$\delta^{15}\text{N} \sim \text{estrato} + (\sim 1   \text{mcp:ID}) + (1   \text{AM})$	364,19	89,18	7	0
$\delta^{15}\text{N} \sim \text{edad} + (\sim 1   \text{mcp:ID}) + (1   \text{AM})$	318,39	43,37	6	0
$\delta^{15}\text{N} \sim \text{mes} + (\sim 1   \text{mcp:ID}) + (1   \text{AM})$	380,62	105,6	7	0
$\delta^{15}\text{N} \sim \text{estrato} + \text{edad} + (\sim 1   \text{mcp:ID}) + (1   \text{AM})$	305,78	30,77	8	0
$\delta^{15}\text{N} \sim \text{estrato} * \text{edad} + (\sim 1   \text{mcp:ID}) + (1   \text{AM})$	275,01	0	10	1*

### Anexo C: Pruebas de desviación de la normalidad del modelo mas parsimoniosos del $\delta^{13}\text{C}$ (i) y del $\delta^{15}\text{N}$ (ii).

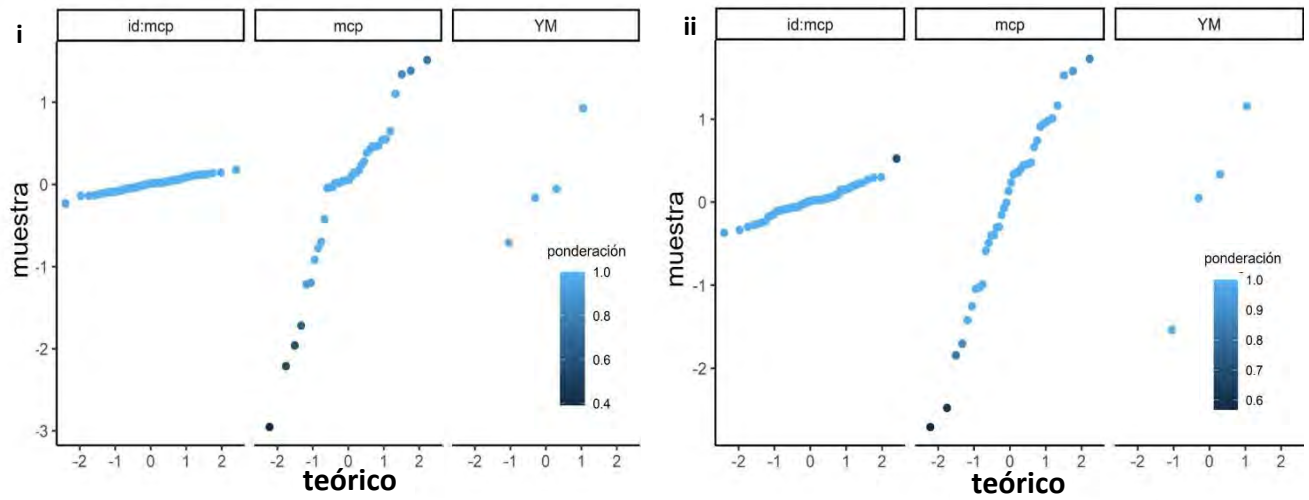
i



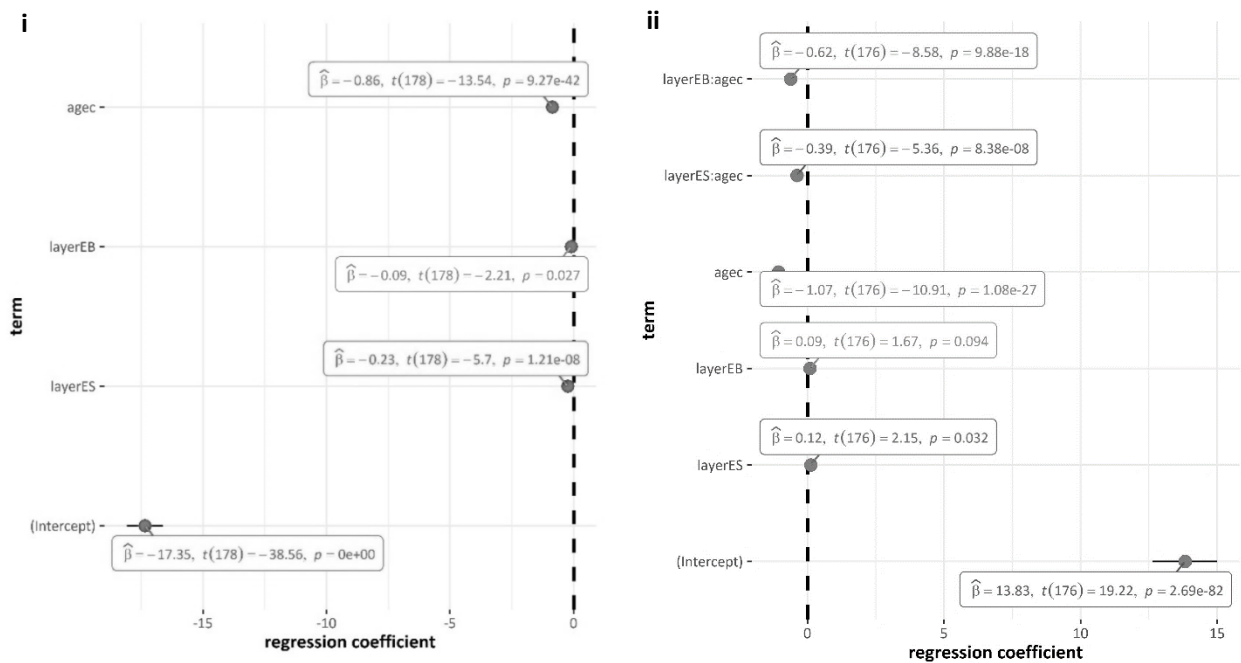
ii



Anexo D: Ponderación de los residuos del modelo lineal de efectos mixtos mas parsimonioso para  $\delta^{13}\text{C}$  (i) y  $\delta^{15}\text{N}$ (ii) utilizando la estadística robusta para los factores ID (“id”), parejas madre-cría (“mcp” y año y mes de muestreo (“YM”).



Anexo E: Coeficientes del modelo lineal de efectos mixtos mas parsimonioso para  $\delta^{13}\text{C}$  (i) y  $\delta^{15}\text{N}$ (ii) calculados utilizando la estadística robusta.



**Anexo F: Resultados de los SIMMB-I, relativos a las estimaciones de las probabilidades de contribución de cuatro fuentes al EC de todas las hembras muestreadas.**

<b>ID</b>	<b>PRESA</b>	<b>PROMEDIO</b>	<b>DS</b>	<b>MES</b>	<b>ESTRATO</b>	<b>AÑO</b>
<b>F1</b>	MB	0,46	0,20	j	EC	2019
<b>F1</b>	IV	0,21	0,16	j	EC	2019
<b>F1</b>	LOL_a	0,22	0,13	j	EC	2019
<b>F1</b>	LOL_p	0,11	0,06	j	EC	2019
<b>F2</b>	MB	0,56	0,21	j	EC	2019
<b>F2</b>	IV	0,17	0,15	j	EC	2019
<b>F2</b>	LOL_a	0,19	0,13	j	EC	2019
<b>F2</b>	LOL_p	0,08	0,05	j	EC	2019
<b>F6</b>	MB	0,33	0,16	j	EC	2019
<b>F6</b>	IV	0,25	0,17	j	EC	2019
<b>F6</b>	LOL_a	0,23	0,13	j	EC	2019
<b>F6</b>	LOL_p	0,19	0,09	j	EC	2019
<b>F7</b>	MB	0,16	0,15	j	EC	2019
<b>F7</b>	IV	0,44	0,19	j	EC	2019
<b>F7</b>	LOL_a	0,07	0,05	j	EC	2019
<b>F7</b>	LOL_p	0,33	0,13	j	EC	2019
<b>F8</b>	MB	0,29	0,15	j	EC	2019
<b>F8</b>	IV	0,26	0,18	j	EC	2019
<b>F8</b>	LOL_a	0,14	0,09	j	EC	2019
<b>F8</b>	LOL_p	0,31	0,11	j	EC	2019
<b>F9</b>	MB	0,54	0,21	j	EC	2019
<b>F9</b>	IV	0,18	0,15	j	EC	2019
<b>F9</b>	LOL_a	0,21	0,13	j	EC	2019
<b>F9</b>	LOL_p	0,08	0,05	j	EC	2019
<b>F10</b>	MB	0,08	0,09	j	EC	2019
<b>F10</b>	IV	0,61	0,16	j	EC	2019
<b>F10</b>	LOL_a	0,05	0,04	j	EC	2019
<b>F10</b>	LOL_p	0,26	0,15	j	EC	2019
<b>F3_1</b>	MB	0,10	0,10	j	EC	2019
<b>F3_1</b>	IV	0,40	0,17	j	EC	2019
<b>F3_1</b>	LOL_a	0,05	0,03	j	EC	2019
<b>F3_1</b>	LOL_p	0,45	0,15	j	EC	2019
<b>F3</b>	MB	0,06	0,06	f	EC	2018
<b>F3</b>	IV	0,53	0,20	f	EC	2018
<b>F3</b>	LOL_a	0,04	0,03	f	EC	2018
<b>F3</b>	LOL_p	0,38	0,20	f	EC	2018
<b>F2</b>	MB	0,33	0,19	f	EC	2018
<b>F2</b>	IV	0,30	0,20	f	EC	2018
<b>F2</b>	LOL_a	0,11	0,08	f	EC	2018



<b>F2</b>	LOL_p	0,26	0,10	f	EC	2018
<b>F4</b>	MB	0,18	0,13	f	EC	2018
<b>F4</b>	IV	0,29	0,17	f	EC	2018
<b>F4</b>	LOL_a	0,07	0,04	f	EC	2018
<b>F4</b>	LOL_p	0,46	0,12	f	EC	2018
<b>F8</b>	MB	0,05	0,06	f	EC	2018
<b>F8</b>	IV	0,65	0,18	f	EC	2018
<b>F8</b>	LOL_a	0,04	0,03	f	EC	2018
<b>F8</b>	LOL_p	0,26	0,18	f	EC	2018
<b>F9</b>	MB	0,09	0,07	f	EC	2018
<b>F9</b>	IV	0,19	0,11	f	EC	2018
<b>F9</b>	LOL_a	0,04	0,03	f	EC	2018
<b>F9</b>	LOL_p	0,68	0,10	f	EC	2018
<b>F14</b>	MB	0,12	0,13	m	EC	2019
<b>F14</b>	IV	0,50	0,18	m	EC	2019
<b>F14</b>	LOL_a	0,06	0,04	m	EC	2019
<b>F14</b>	LOL_p	0,32	0,14	m	EC	2019
<b>F16</b>	MB	0,13	0,12	m	EC	2019
<b>F16</b>	IV	0,42	0,18	m	EC	2019
<b>F16</b>	LOL_a	0,06	0,04	m	EC	2019
<b>F16</b>	LOL_p	0,40	0,15	m	EC	2019
<b>F19</b>	MB	0,10	0,11	m	EC	2019
<b>F19</b>	IV	0,48	0,17	m	EC	2019
<b>F19</b>	LOL_a	0,06	0,04	m	EC	2019
<b>F19</b>	LOL_p	0,36	0,15	m	EC	2019
<b>F20</b>	MB	0,22	0,14	m	EC	2019
<b>F20</b>	IV	0,27	0,17	m	EC	2019
<b>F20</b>	LOL_a	0,08	0,05	m	EC	2019
<b>F20</b>	LOL_p	0,43	0,11	m	EC	2019
<b>F21</b>	MB	0,25	0,13	m	EC	2019
<b>F21</b>	IV	0,26	0,18	m	EC	2019
<b>F21</b>	LOL_a	0,24	0,13	m	EC	2019
<b>F21</b>	LOL_p	0,25	0,11	m	EC	2019
<b>F22</b>	MB	0,27	0,14	m	EC	2019
<b>F22</b>	IV	0,25	0,18	m	EC	2019
<b>F22</b>	LOL_a	0,11	0,07	m	EC	2019
<b>F22</b>	LOL_p	0,37	0,11	m	EC	2019
<b>F3_2</b>	MB	0,11	0,09	m	EC	2019
<b>F3_2</b>	IV	0,28	0,15	m	EC	2019
<b>F3_2</b>	LOL_a	0,05	0,03	m	EC	2019
<b>F3_2</b>	LOL_p	0,56	0,12	m	EC	2019
<b>M5</b>	MB	0.329	0.173	f	EC	2011
<b>M5</b>	IV	0.217	0.155	f	EC	2011

M5	LOL_a	0.327	0.155	f	EC	2011
M5	LOL_p	0.127	0.071	f	EC	2011
M2	MB	0.304	0.159	f	EC	2011
M2	IV	0.232	0.161	f	EC	2011
M2	LOL_a	0.310	0.146	f	EC	2011
M2	LOL_p	0.154	0.080	f	EC	2011
M3	MB	0.322	0.162	f	EC	2011
M3	IV	0.239	0.163	f	EC	2011
M3	LOL_a	0.277	0.143	f	EC	2011
M3	LOL_p	0.162	0.082	f	EC	2011
M6	MB	0.260	0.141	f	EC	2011
M6	IV	0.259	0.177	f	EC	2011
M6	LOL_a	0.273	0.146	f	EC	2011
M6	LOL_p	0.208	0.100	f	EC	2011
M1	MB	0.289	0.154	f	EC	2011
M1	IV	0.240	0.166	f	EC	2011
M1	LOL_a	0.309	0.146	f	EC	2011
M1	LOL_p	0.161	0.083	f	EC	2011
M4	MB	0.304	0.158	f	EC	2011
M4	IV	0.227	0.157	f	EC	2011
M4	LOL_a	0.323	0.153	f	EC	2011
M4	LOL_p	0.146	0.078	f	EC	2011

**Anexo G: Selección en avance del modelo generalizado de efectos mixtos de la composición de Mar de Bering.**

Formula	AICc	dAICc	df	AICwt
MB ~ 1	-48,2685	183,3	2	<0.001
MB ~ 1 + (~1   ID)	-59,3685	172,2	3	<0.001
MB ~ 1 + (~1   mcp:ID)	-155,8685	75,7	4	<0.001
MB ~ edad + (~1   mcp:ID)	-160,1685	71,4	5	<0.001
MB ~ estrato + (~1   mcp:ID)	-164,6685	66,9	5	<0.001
MB ~ AM + (~1   mcp:ID)	-172,9685	58,6	7	<0.001
MB ~ estrato + edad + (~1   mcp:ID)	-168,9685	62,6	6	<0.001
MB ~ estrato + AM + (~1   mcp:ID)	-181,4685	50,1	8	<0.001
MB ~ AM + edad + (~1   mcp:ID)	-185,6685	45,9	8	<0.001
MB ~ estrato * edad + (~1   mcp:ID)	-206,4685	25,1	7	<0.001
MB ~ estrato * AM + (~1   mcp:ID)	-179,7685	51,8	11	<0.001
MB ~ AM * edad + (~1   mcp:ID)	-179,7685	51,8	11	<0.001
MB ~ estrato + AM + edad + (~1   mcp:ID)	-194,0685	37,5	9	<0.001
MB ~ estrato * edad + AM + (~1   mcp:ID)	-231,5685	0	10	0,968*
MB ~ estrato * edad * AM + (~1   mcp:ID)	-224,7685	6,8	19	0,032
MB ~ estrato + mes + edad + (~1   mcp:ID)	-169,6685	61,9	8	<0.001

**Anexo H: Selección en avance del modelo generalizado de efectos mixtos de la composición de Isla Vancouver.**

Fórmula	AIC	dAICc	df	AICcwt
IV ~ 1	-27,7383	158,1	2	<0.001
IV ~ 1 + (~1   ID)	-38,8383	147	3	<0.001
IV ~ 1 + (~1   mcp:ID)	-137,0383	48,8	4	<0.001
IV ~ edad + (~1   mcp:ID)	-140,3383	45,5	5	<0.001
IV ~ estrato + (~1   mcp:ID)	-159,4383	26,4	5	<0.001
IV ~ AM + (~1   mcp:ID)	-153,4383	32,4	7	<0.001
IV ~ estrato + edad + (~1   mcp:ID)	-162,7383	23,1	6	<0.001
IV ~ estrato + AM + (~1   mcp:ID)	-175,5383	10,3	8	0,0058
IV ~ AM + edad + (~1   mcp:ID)	-163,9383	21,9	8	<0.001
IV ~ estrato * edad + (~1   mcp:ID)	NA	NA	7	NA
IV ~ estrato * AM + (~1   mcp:ID)	-174,6383	11,2	11	0,0037
IV ~ AM * edad + (~1   mcp:ID)	-158,0383	27,8	11	<0.001
IV ~ estrato + AM + edad + (~1   mcp:ID)	-185,8383	0	9	0,9904*
IV ~ estrato * edad + AM + (~1   mcp:ID)	NA	NA	10	NA
IV ~ estrato * edad * AM + (~1   mcp:ID)	NA	NA	19	NA
IV ~ estrato + mes + edad + (~1   mcp:ID)	-163,6383	22,2	8	<0.001

**Anexo I: Selección en avance del modelo generalizado de efectos mixtos de la composición de laguna Ojo de Liebre.**

Formula	AIC	dAICc	df	weight
LOL ~ 1	-330,49	50,4	2	<0.001
LOL ~ 1 + (~1   ID)	-342,49	38,4	3	<0.001
LOL ~ 1 + (~1   mcp:ID)	-369,49	11,4	4	0,0013
LOL ~ edad + (~1   mcp:ID)	-368,39	12,5	5	<0.001
LOL ~ estrato + (~1   mcp:ID)	-380,89	0	5	0,3911*
LOL ~ AM + (~1   mcp:ID)	-366,79	14,1	7	<0.001
LOL ~ estrato + edad + (~1   mcp:ID)	-379,69	1,2	6	0,2151
LOL ~ estrato + AM + (~1   mcp:ID)	-377,89	3	8	0,0866
LOL ~ AM + edad + (~1   mcp:ID)	-365,99	14,9	8	<0.001
LOL ~ estrato * edad + (~1   mcp:ID)	-379,09	1,8	7	0,1612
LOL ~ estrato * AM + (~1   mcp:ID)	-374,29	6,6	11	0,0141
LOL ~ AM * edad + (~1   mcp:ID)	-370,69	10,2	11	0,0024
LOL ~ estrato + AM + edad + (~1   mcp:ID)	-376,99	3,9	9	0,0554
LOL ~ estrato * edad + AM + (~1   mcp:ID)	-376,29	4,6	10	0,0394
LOL ~ estrato * edad * AM + (~1   mcp:ID)	-375,89	5	8	0,0322