



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS**



**DISCRIMINACIÓN DE GRUPOS DE
CALDERONES DE ALETAS CORTAS
(*Globicephala macrorhynchus*) EN EL GOLFO
DE CALIFORNIA, MÉXICO MEDIANTE ANÁLISIS
DE ÁCIDOS GRASOS**

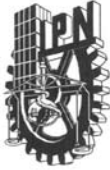
TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN
MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

PRESENTA:

JOCELIN TRACONIS CORRES

LA PAZ, B.C.S., JUNIO DE 2010



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 25 del mes de Mayo del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

**"DISCRIMINACIÓN DE GRUPOS DE CALDERONES DE ALETAS CORTAS
(Globicephala microrhynchus) EN EL GOLFO DE CALIFORNIA, MÉXICO,"
MEDIANTE ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS"**

Presentada por el alumno:

TRACONIS
Apellido paterno

CORRES
materno

JOCELIN
nombre(s)

Con registro:

A	0	8	0	0	7	1
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

MAESTRIA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Directores de Tesis

DR. SERGIO AGUÍNIGA GARCÍA
Director de Tesis

MC. LAURA CARREÓN PALAU
Director de Tesis

DRA. DIANE GENDRON LANIER

DR. VÍCTOR MANUEL GÓMEZ MUÑOZ

DR. RAÚL ENRIQUE DÍAZ GAMBOA

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

DR. RAFAEL CERVANTES DUARTE



**IPN
CICIMAR
DIRECCION**



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 01 del mes Junio del año 2010, el (la) que suscribe BIOL. JOCELIN TRACONIS CORRES alumno(a) del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS con número de registro A080071 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de: DR. SERGIO AGUÍNIGA GARCÍA y MC. LAURA CARREÓN PALAU y ceden los derechos del trabajo titulado: "DISCRIMINACIÓN DE GRUPOS DE CALDERONES DE ALETAS CORTAS (*Globicephala macrorhynchus*) EN EL GOLFO DE CALIFORNIA, MÉXICO, MEDIANTE ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS" al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: saguini@ipn.mx - jos_tc07@hotmail.com - lcarreon@cibnor.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


BIOL. JOCELIN TRACONIS CORRES

nombre y firma

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR-IPN) por permitirme realizar este posgrado y a todo el personal que labora en él, por su apoyo y ayuda.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada durante este estudio, al Programa Institucional de Formación de Investigadores (PIFI) y a la beca tesis del IPN, por el apoyo financiero para finalizar este proyecto.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), en especial al Laboratorio de Biotecnología de Microalgas por haberme permitido realizar el proceso metodológico de esta tesis.

Mi sincero agradecimiento a la M.C. Laura Carreón Palau por su dirección, consejos y apoyo en todo momento para la realización de esta tesis, por su invaluable enseñanza tanto en el laboratorio como en el conocimiento de los ácidos grasos, pero sobretodo por brindarme su valiosa amistad y confianza.

Al Dr. Sergio Aguíñiga García por su dirección, por la confianza y apoyo constante y generoso para la realización de esta tesis, así como por sus atinados comentarios, sugerencias y buen ánimo.

Le agradezco al Dr. Raúl Díaz Gamboa por emprender este proyecto, por su asesoría y enseñanzas, por creer en mí y brindarme su apoyo incondicional desde mi llegada a la Paz, por sus consejos y acertados comentarios, pero sobre todo por su amistad e inolvidables momentos, fiestas y reuniones compartidas.

A la Dra. Diane Gendron por brindarme un espacio en el Laboratorio de Ecología de Mamíferos Marinos, por sus comentarios y sugerencias para el desarrollo de la tesis.

Al Dr. Víctor Gómez Muñoz por su colaboración en la revisión de la tesis, por sus buenos comentarios y aportaciones sobre los análisis estadísticos.

Gracias a la M.C. Eloísa Matus por su cooperación y ayuda en el laboratorio con las pruebas de oxidación. A la M.C. Ma. del Carmen Rodríguez Jaramillo por su asesoría en la parte histológica de la tesis. Al M.C. Jorge del Ángel Rodríguez, por el apoyo y buenos comentarios.

A mis compañeros del Laboratorio de Ecología de Mamíferos Marinos por sus sugerencias y comentarios durante el desarrollo de la tesis y por los que me brindaron su sincera amistad.

Al Lic. Humberto Ceseña y María Magdalena Mendoza Tlapa por su paciencia y ayuda respecto a todo lo administrativo y académico.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco y dedico esta tesis a mi hermosa Familia, que a pesar de la distancia siempre han estado junto a mí, en espíritu y corazón. Sin ustedes familia, esto no hubiera sido posible, me hacen inmensamente feliz, los amo mucho.

A mis padres, Moisés Traconis y Catalina Corres por el amor incondicional que siempre me han brindado, por creer en mí, por el gran apoyo en esta aventura, por ayudarme a alcanzar una meta más y por darme la fuerza para salir siempre adelante con su ejemplo, por ser los mejores padres que cualquier hijo pueda pedir.

A mis hermanos, Damis (Tuki) que siempre ha sido un gran apoyo e impulso en mi vida, gracias por su amor y por darme fortaleza cuando más lo he necesitado, por ser la mejor hermana, por esas horas compartidas por teléfono que me hacían sentir tan cerca a pesar de la distancia. A mi hermano, Moy por existir y formar parte de esta familia, por su amor y buen humor, por hacerme sentir que siempre podre contar con su apoyo.

Al amor de mi vida, Armando Salomón por su gran amor en estos años, compañía, comprensión, ayuda y apoyo cada día, por ser uno de los motores más importantes que mueven mi mundo. Por siempre estar cuando más lo necesito. Por hacerme tan feliz. Te amo y amare siempre.

A mi familia de la Paz, Dr. Mario Salomón, Oralia Paz Cantú, Juárez Salomón y Judith Torres, por el apoyo constante en todos los sentidos, por el cariño y amistad, por hacerme sentir parte de la familia. Por los felices momentos vividos.

A mis abuelas, tíos, primos que desde la distancia me mandaron sus buenos deseos y cariño.

A mis entrañables amigos, Diana, Alejandra y Daniel por su hermosa amistad a través de tantos años, por estar en los buenos y malos momentos, por el apoyo y consejos, por poder siempre contar con ustedes, los quiero mucho.

A mis amigos de Mérida, que a pesar de estar tan lejos, siempre he contado con su amistad y buenos deseos.

Agradezco a las personas que durante esta estancia en la Paz, me brindaron su amistad, por el apoyo y vivencias compartidas, por los momentos y pachangas inolvidables, siempre los recordaré con mucho cariño: Marisol, Agnès, Felipe, Dení, Laura, Tiffany, Emilio, Jareny y Elín (Comadres).

¡A todos ellos Muchísimas Gracias!

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABLAS	IV
GLOSARIO	V
RESUMEN	VII
ABSTRACT	IX
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
II.1. Estudios Tróficos	4
II.2. Ácidos Grasos	6
II.2.1. Ingestión y Metabolismo de Lípidos	8
II.2.2. Ácidos Grasos como Biomarcadores o Trazadores Tróficos	10
II.3. Estudios Tróficos en Cetáceos	11
II.4. Análisis Multivariado: Interpretación de los Datos	12
III. JUSTIFICACIÓN	14
IV. HIPÓTESIS	14
V. OBJETIVOS	15
General	15
Específicos	15
VI. ÁREA DE ESTUDIO	16
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	18
Trabajo de Campo:	19
Trabajo de Laboratorio:	19
VIII. RESULTADOS	23
VIII.1. Caracterización Histológica de las Biopsias	23
VIII.2. Caracterización Bioquímica (Ácidos Grasos) de los Tejidos	26
VIII.2.1. Lípidos	26
VIII.2.2. Ácidos Grasos presentes en Lípidos de Reserva (Neutros)	28
VIII.2.3. Identificación de Rutas Tróficas mediante Biomarcadores del alimento en Lípidos Neutros	41
VIII.2.4. Ácidos Grasos presentes en Lípidos Estructurales (Polares)	44
VIII.2.5. Identificación de Stocks mediante Fosfolípidos de Piel	55

IX. DISCUSIÓN	59
IX.1. Organización Histológica de Piel y Grasa Subcutánea	59
IX.2. Lípidos Neutros	60
IX.3. Detección de Rutas Tróficas (biomarcadores)	61
IX.4. Lípidos Polares	64
IX.5. Identificación de Stocks	65
X. CONCLUSIONES	67
XI. RECOMENDACIONES	68
XII. LITERATURA CITADA	69
XIII. ANEXOS	77

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. (a) Ubicación geográfica de los grupos de <i>G. macrorhynchus</i> muestreados en el Golfo de California; (b) Valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ por grupos muestreados (Tomado con permiso de Díaz-Gamboa, 2009).	5
Figura 2. Área de estudio.	16
Figura 3. Zonas del Golfo de California donde fueron colectadas las biopsias.	18
Figura 4. Corte histológico de piel y grasa de una biopsia de calderón de aletas cortas, teñida con la técnica de Hematoxilina-Eosina; el color morado representa los núcleos y el color rosa el citoplasma.	24
Figura 5. Corte histológico de piel de una biopsia de calderón de aletas cortas, teñida con la técnica de Hematoxilina-Eosina; el color morado representa los núcleos y el color rosa el citoplasma.	25
Figura 6. Corte histológico de grasa de una biopsia de calderón de aletas cortas en corte transversal, A=adipocitos, VS= vista longitudinal de vasos sanguíneos y LVS= luz del vaso sanguíneo.....	26
Figura 7. Porcentaje de lípidos totales (% LT) entre grupos. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza al 95%.	26
Figura 8. Comparación del porcentaje de LN y LP en grasa por grupos. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza al 95%.	27
Figura 9. Comparación del porcentaje de LN y LP en piel por grupos. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza al 95%.	27
Figura 10. Perfil de ácidos grasos de reserva en grasa de <i>G. macrorhynchus</i> en el Golfo de California. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza al 95%.	30
Figura 11. Análisis de componentes principales de los AG de los lípidos de reserva en grasa de grupos de calderones, (a) Valores de AG del CP1 vs CP2; (b) Peso de cada ácido graso en los componentes, los círculos encierran los AG con coeficientes de correlación mayor a 0.7.	31
Figura 12. Análisis de componentes principales de los AG de los lípidos de reserva en grasa de grupos de calderones, (a) Valores de AG del CP1 vs CP3; (b) Peso de	

cada ácido graso en los componentes, los círculos encierran los AG con coeficientes de correlación mayor a 0.7.....	31
Figura 13. Análisis de funciones discriminantes entre grupos de calderones determinado por biomarcadores tróficos en grasa.	32
Figura 14. Biomarcadores tróficos (AG) que contribuyeron a la separación de los grupos en el análisis discriminante.....	33
Figura 15. Perfil de ácidos grasos de reserva en piel de <i>G. macrorhynchus</i> en el Golfo de California. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza al 95%.....	38
Figura 16. Análisis de componentes principales de los AG de los lípidos de reserva en piel de grupos de calderones, (a) Valores de AG del CP1 vs CP2; (b) Peso de cada ácido graso en los componentes, los círculos encierran los AG con coeficientes de correlación mayor a 0.7.....	39
Figura 17. Análisis de componentes principales de los AG de los lípidos de reserva en piel de grupos de calderones, (a) Valores de AG del CP1 vs CP3; (b) Peso de cada ácido graso en los componentes, los círculos encierran los AG con coeficientes de correlación mayor a 0.7.....	39
Figura 18. Análisis de funciones discriminantes entre grupos de calderones determinado por biomarcadores tróficos en lípidos de reserva en la piel.....	40
Figura 19. Posibles rutas tróficas de los grupos de calderones.....	42
Figura 20. Rutas tróficas de los grupos de calderones usando biomarcadores tróficos. A) Porcentaje de los biomarcadores de la ruta trófica calderón–merluza–langostilla–detritus, B) Porcentaje de los biomarcadores de la ruta trófica Calderón–calamar–mictófidios–zooplancton–fitoplancton y C) Porcentaje de los biomarcadores de la ruta trófica Calderón–calamar–sardina zooplancton–fitoplancton. ^a Valores significativamente mayores; ^{ab} valores intermedios; ^b valores significativamente menores. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza al 95%.....	43
Figura 21. Perfil de ácidos grasos estructurales en grasa de <i>G. macrorhynchus</i> en el Golfo de California. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza al 95%.....	47

Figura 22. Análisis de componentes principales de los AG de los lípidos polares en grasa de grupos de calderones, (a) Valores de AG del CP1 vs CP2; (b) Peso de cada ácido graso en los componentes, los círculos encierran los AG con coeficientes de correlación mayor a 0.7.....	48
Figura 23. Análisis de componentes principales de los AG de los lípidos polares en grasa de grupos de calderones, (a) Valores de AG del CP1 vs CP3; (b) Peso de cada ácido graso en los componentes, los círculos encierran los AG con coeficientes de correlación mayor a 0.7.....	48
Figura 24. Análisis de funciones discriminantes entre grupos determinado por ácidos grasos comunes en fosfolípidos, identificados en grasa.	49
Figura 25. Perfil de ácidos grasos estructurales en piel de <i>G. macrorhynchus</i> en el Golfo de California. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza al 95%.....	53
Figura 26. Análisis de componentes principales de los AG de los lípidos polares en piel de grupos de calderones, (a) Valores de AG del CP1 vs CP2; (b) Peso de cada ácido graso en los componentes, los círculos encierran los AG con coeficientes de correlación mayor a 0.7.....	54
Figura 27. Análisis de componentes principales de los AG de los lípidos polares en piel de grupos de calderones, (a) Valores de AG del CP1 vs CP3; (b) Peso de cada ácido graso en los componentes, los círculos encierran los AG con coeficientes de correlación mayor a 0.7.....	54
Figura 28. Análisis de funciones discriminantes entre grupos determinado por ácidos grasos presentes en fosfolípidos de la piel.	55
Figura 29. AG de fosfolípidos que contribuyeron a la separación de los grupos en el análisis discriminante.	56
Figura 30. Porcentajes de Lípidos Neutros (Grasa) vs Lípidos Polares (Piel), AGMI=ácidos grasos monoinsaturados; ω -3= ácidos grasos de la familia omega 3; AGS= ácidos grasos saturados y ω -6=ácidos grasos de la familia omega 6. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza al 95%.....	58

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Nivel trófico estimado de grupos de calderones de aletas cortas.	5
Tabla 2. Biopsias de calderones de aletas cortas.	18
Tabla 3. Porcentaje de los ácidos grasos con respecto al total de AG de reserva en grasa. Se muestra el intervalo de confianza del promedio del porcentaje al 95%.	28
Tabla 4. Valores de probabilidad de diferencia entre grupos de calderones. Se considera diferencia significativa cuando $p < 0.05$	33
Tabla 5. Matriz de clasificación de grupos de calderones. Lípidos de reserva en grasa.	34
Tabla 6. Ácidos grasos considerados como biomarcadores tróficos.	34
Tabla 7. Porcentaje de los ácidos grasos con respecto al total de AG de reserva en piel. Se muestra el intervalo de confianza del promedio del porcentaje al 95%.	35
Tabla 8. Valores de probabilidad de diferencia entre grupos de calderones. Se considera diferencia significativa cuando $p < 0.05$	41
Tabla 9. Matriz de clasificación de grupos de calderones. Lípidos de reserva en piel.	41
Tabla 10. Porcentaje de los ácidos grasos con respecto al total de AG estructurales en grasa. Se muestra el intervalo de confianza del promedio del porcentaje al 95%.	44
Tabla 11. Valores de probabilidad de diferencia entre grupos de calderones. Se considera diferencia significativa cuando $p < 0.05$	50
Tabla 12. Matriz de clasificación de grupos de calderones. Lípidos estructurales en grasa.	50
Tabla 13. Ácidos grasos característicos de fosfolípidos (Christie, 2003).	50
Tabla 14. Porcentaje de los ácidos grasos con respecto al total de AG estructurales en piel. Se muestra el intervalo de confianza del promedio del porcentaje al 95%. ...	51
Tabla 15. Valores de probabilidad de diferencia entre grupos de calderones. Se considera diferencia significativa cuando $p < 0.05$	56
Tabla 16. Matriz de clasificación de grupos de calderones. Lípidos estructurales en piel.	56

GLOSARIO

Ácidos grasos (AG): representan un grupo extenso de moléculas, las cuales constituyen la mayoría de los lípidos que se encuentran en todos los organismos. Están formados generalmente por un número par de carbonos, con un grupo carboxilo en un extremo y pueden ser saturados o insaturados.

AG saturados (AGS): ácidos grasos que no tienen ninguna insaturación (doble enlace) presente en la cadena de carbonos.

AG monoinsaturado (AGMI): ácidos con un doble enlace en la cadena de carbonos.

AG poliinsaturados (AGPI): ácidos grasos que tienen de dos a más dobles enlaces en la cadena de carbonos.

AG biomarcadores: característicos de organismos o grupos de organismos, los cuáles pueden ser transferidos sin sufrir modificaciones a través de las cadenas tróficas y ser detectados en los depredadores tope.

AG esenciales (AGE): ácidos grasos que los organismos vertebrados no pueden sintetizar y que deben ser adquiridos por medio de la dieta, sintetizados por las células vegetales.

Cadena trófica: Conjunto de relaciones alimentarias entre especies dentro de un ecosistema, que va desde productores primarios a depredadores tope.

Grupos de cetáceos: tipos de congregaciones que exhiben elevados niveles de organización; una relación co-específica en un área limitada (típicamente, dentro de varios cientos de metros), frecuentemente comprometidos en actividades similares y moviéndose en la misma dirección, mantenidos por factores sociales como una unidad; los grupos pueden ser estables durante largos periodos de tiempo o pueden cambiar su composición en periodos cortos.

Isótopos estables: son átomos de un mismo elemento con igual número de protones pero diferente número de neutrones.

Lípidos: son los ácidos grasos y sus derivados, así como las sustancias relacionadas biosintética o funcionalmente con ellos.

Lípidos neutros: son aquellos que mediante el proceso de saponificación producen como máximo dos tipos de productos primarios de hidrólisis (ácidos grasos, glicerol, etc.) por cada mol y constituyen la reserva energética de los animales (principalmente triglicéridos).

Lípidos polares: son aquellos que mediante la saponificación producen tres o más productos primarios por mol y forman la estructura de las membranas celulares (principalmente fosfolípidos y esfingolípidos).

Nivel trófico: clasificación funcional de los organismos de una comunidad conforme a sus relaciones alimenticias o a la manera en la cuál obtiene su materia y energía.

Stock: término utilizado para referirse a entidades biológicas o de manejo. Un stock biológico se caracteriza por presentar poco o nulo intercambio genético con otros individuos pertenecientes a un stock distinto, es decir que tienden a reproducirse entre miembros de un mismo stock.

Teutófagos: organismos que se alimentan principalmente de cefalópodos.

$\delta^{13}\text{C}$: relación isotópica de carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) expresada en partes por mil sobre un estándar (Pee Dee Belemnite).

$\delta^{15}\text{N}$: relación isotópica de nitrógeno ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) expresada en partes por mil sobre un estándar (Nitrógeno atmosférico).

RESUMEN

Los calderones de aletas cortas *Globicephala macrorhynchus* son frecuentes en la comunidad de cetáceos del Golfo de California (GC), se ha reportado que tienen hábitos alimentarios teutófagos y en menor medida ictiófagos. Una investigación basada en $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ para determinar relaciones tróficas entre *Dosidicus gigas* (presa principal del calderón en el GC) y cetáceos teutófagos, reveló diferencias significativas de ~ 2.5 ‰ en $\delta^{15}\text{N}$ en la piel de diferentes grupos de calderones que se encontraron en las regiones central y sur del GC. Considerando un $\delta^{15}\text{N} \sim 10.4$ ‰ del material orgánico particulado (MOP), se estima una variación en el nivel trófico entre 3 y 3.6 entre grupos sugiriendo diferencias de hábitos alimentarios intraespecíficos o un aporte de nitrógeno diferente entre zonas geográficas. En este estudio se analizaron los perfiles de ácidos grasos (AG) de grasa y piel, como una herramienta complementaria dada su utilidad como biomarcadores tróficos. Los AG de lípidos neutros (LN) de la grasa permiten inferir sobre los hábitos de alimentación, mientras que los AG de lípidos polares (LP) de tejidos más conservativos como la piel permiten diferenciar entre poblaciones o stocks posiblemente relacionados con diferentes zonas geográficas. Se determinaron los perfiles de AG en biopsias de *G. macrorhynchus* colectadas de febrero a abril de 2005 (n=28) en las regiones central y sur del GC. Se realizó una caracterización histológica en una biopsia de calderón para determinar si existían estratos en la grasa subcutánea. Se cuantificaron los lípidos totales (LT) previo a la separación de lípidos de reserva (LN) y estructurales (LP) en grasa y piel. El análisis histológico mostró que la grasa subcutánea no presentó un patrón de estratificación definido, por lo que se consideró la biopsia de grasa como homogénea. Los LT no mostraron diferencias significativas entre grupos ($p > 0.05$). Se detectaron 31 AG en LN de la grasa y mediante un análisis multivariado de componentes principales (ACP) y se observó un alto porcentaje (52.67%) explicado por los dos primeros componentes sin alguna separación aparente entre grupos, sin embargo, al utilizar AG considerados como biomarcadores tróficos y el análisis de funciones discriminantes (AFD), hay una separación significativa entre los grupos 1 y 2 ($p < 0.0001$) coincidiendo con lo

reportado mediante isótopos estables. Las diferencias en los AG de reserva (largo plazo) entre grupos de calderones se atribuyeron a distintas rutas tróficas, determinadas por distintos biomarcadores sugiriendo que las diferencias de $\delta^{15}\text{N}$ entre grupos se deben a distintos hábitos alimentarios intraespecíficos. Así mismo, se detectaron 25 AG en LP de la piel y mediante un ACP se observó un bajo porcentaje (39.54%) explicado por los dos primeros componentes sin alguna separación de grupos, no obstante, utilizando AG asociados a fosfolípidos mediante un AFD, hay una separación significativa del grupo 1 vs los grupos 2, 3 y 4 ($p < 0.0018$), sugiriendo la presencia de 2 stocks de calderones mediante los ácidos grasos estructurales de la piel, esto no coincide con los niveles tróficos de los diferentes grupos reportados para las mismas muestras de las cuales se analizaron isótopos estables de N y C, se deduce entonces, que la variación en $\delta^{15}\text{N}$ no está relacionado con zonas con diferentes aportes de nitrógeno.

ABSTRACT

The short-finned pilot whale *Globicephala macrorhynchus* are common in the community of cetaceans in the Gulf of California (GC), they have teutophagous feeding habits, although piscivore behaviors have been reported. A study based on $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ to determine trophic relationships between *Dosidicus gigas* (main prey of pilot whale in the GC) and teutophagous cetaceans revealed significant differences of ~ 2.5 ‰ in $\delta^{15}\text{N}$ in the skin of different groups of pilot whale that were found in the central and southern GC. Considering a $\delta^{15}\text{N} = \sim 10.4$ ‰ of particulate organic matter (POM), trophic levels were estimated between 3 and 3.6 of the groups indicating intraspecific differences in feeding habits or different nitrogen supply between geographical areas. In this study we examined fatty acid (FA) profiles from fat and skin from short-finned pilot whales as a complementary tool because of its usefulness as trophic biomarkers. The FA from neutral lipids (NL) from fat can infer about feeding habits, while FA from polar lipids (PL) from more conservative tissues such as skin could differentiate between populations or stocks related with different geographic areas. FA profiles were determined in biopsies of *G. macrorhynchus* collected since February to april of 2005 (n=28) in the central and southern GC. Histological characterization was performed on a biopsy to determine whether there was a stratum in the subcutaneous fat. Total lipids (TL) were quantified previous to the separation of reserve lipids (NL) and structural lipids (PL) in fat and skin. Histological analysis showed that the biopsy does not show a clearly-defined pattern of stratification, the fat biopsy was considered as homogeneous. The TL, do not showed significant differences between groups ($p > 0.05$). A total of 31 AG were detected in LN of fat and by multivariate analysis (PCA) showed a high explained percentage (52.67%) by the first two components without any apparent separation between groups, however, when the FA considered as trophic biomarkers were used in the discriminate function analysis (DFA), a significant separation was revealed between groups 1 and 2 ($p < 0.0001$), coinciding with that previously reported using stable isotopes. Differences in the reserve FA (long term) between groups of short-finned pilot whales were attributed to different trophic pathways, determined by different

biomarkers, suggesting that $\delta^{15}\text{N}$ differences between groups are due to different dietary habits. Likewise, there were 25 AG in LP of the skin and through ACP showed a low explained percentage (39.54%) by the first two components without any separation of groups, however, using FA associated to phospholipids by DFA, there was a significant separation from group 1 vs groups 2, 3 and 4 ($p < 0.0018$), suggesting the presence of two stocks of short-finned pilot whale by structural fatty acids of the skin not related with the trophic levels reported by stable isotopes of N and C, suggesting that variation of $\delta^{15}\text{N}$ is not related with differences in nitrogen supply.

I. INTRODUCCIÓN

El calderón de aletas cortas (*Globicephala macrorhynchus*), pertenece a la familia Delphinidae (Folkens *et al.*, 2002). Tiene una distribución tropical y subtropical en los Océanos Atlántico, Pacífico e Índico (Moore y Chieh, 2007; IFAW, 2007). Su distribución a lo largo del Océano Pacífico Oriental comprende la Isla Vancouver, California, la costa occidental de la Península de Baja California, hasta el Golfo de California (Guerrero *et al.*, 2006), e incluso en islas Hawaianas (Baird *et al.*, 2006), igualmente se ha reportado en el Pacífico Central en las costas de Ecuador (Félix, 2004) y en la zona Sur, se tienen avistamientos en las costas de Chile (Aguayo-Lobo, 1999).

En el Golfo de California, *G. macrorhynchus*, es una especie común dentro de la comunidad de cetáceos, esto ha sido confirmado a través de diferentes estudios como el de Mangels y Gerrodette (1994), en el cuál se reportaron más de 60 avistamientos, predominando en la región central y suroeste. En la Bahía de La Paz se estimó un tamaño poblacional de 1,500 individuos (I.C. = 991-2,262) (Vázquez-Morquecho, 1997). Algunos estudios revelan que los calderones están presentes durante la temporada cálida (Salvadeo, 2008; Pardo, 2009). Los calderones poseen una organización social compleja, únicamente encontrados en grupos, de entre 20 a 90 individuos conformados por machos adultos, hembras, juveniles y crías (Olson y Reilly, 2002; Carrillo y Tejedor, 2003).

Los calderones tienen una dieta de tipo teutófaga, la cuál es compartida por varias especies de cetáceos presentes en el Golfo de California como son los cachalotes *Physeter macrocephalus* y tursiones *Tursiops truncatus*, sugiriendo una aparentemente competencia por éste recurso en está área (Díaz-Gamboa, 2003; Cruz-Vizcaíno, 2005; Díaz-Gamboa y Guerrero-De la Rosa, 2005).

Tanto en los calderones como en otros cetáceos, los estudios de contenidos estomacales están limitados a organismos varados y sólo permiten determinar el alimento ingerido recientemente, además del sesgo que implica la identificación de estructuras duras que aún no han sido digeridas, como los otolitos y picos de calamares (Todd *et al.*, 1997; Hooker *et al.*, 2001). Sin embargo; con base en este tipo de estudios, se ha reportado que los calderones se alimentan de *Loligo opalescens* en las costas de California (Hacker, 1986) y de otros calamares como *Todarodes sagittatus*, *Cranchia* sp., *Megalocranchia* sp. y *Cycloteuthis* sp. en el Atlántico Nor-oriental (Hernández-García y Martín, 1994), aunque eventualmente se han detectado comportamientos ictiófagos (Carrillo y Tejedor, 2003; Ho *et al.*, 2007).

Los estudios tróficos más recientes en cetáceos se basan en técnicas químicas y bioquímicas que complementan los estudios de contenidos estomacales, como los análisis de isótopos estables de carbono y nitrógeno (C y N) usando piel (Gendron *et al.*, 2001) y los de ácidos grasos usando grasa subcutánea (Budge *et al.*, 2006). Los isótopos estables de carbono y nitrógeno permiten determinar niveles tróficos relativos de los organismos, así como distinguir las fuentes primarias potenciales que contribuyen a la red trófica (Das *et al.*, 2003; Díaz-Gamboa, 2003). Los ácidos grasos (AG) se han considerado como indicadores del alimento de cetáceos debido a que las cadenas de más de 14 carbonos son más difíciles de digerir que los carbohidratos o las proteínas y pueden ser depositadas en los tejidos animales prácticamente sin modificaciones (Smith *et al.*, 1995). Los AG han sido utilizados como biomarcadores, ya que siendo estos característicos de algunos organismos o grupos de organismos, por ejemplo diatomeas, dinoflagelados, plantas terrestres, actividad bacteriana, etc., pueden ser detectados dentro de la cadena trófica hasta los depredadores tope sin ninguna modificación (Parrish *et al.*, 2000; Copeman *et al.*, 2009; Rodríguez-Valenzuela, 2009). Sin embargo, se ha demostrado que la incorporación de ácidos grasos en los diferentes tejidos de los organismos es diferencial (Joensen & Grahl-Nielsen, 2001).

Los ácidos grasos son las unidades básicas de los lípidos, que pueden ser de reserva (principalmente neutros), constituyendo un reservorio energético de los animales (principalmente triglicéridos), y los estructurales (polares), que forman las membranas celulares (principalmente fosfolípidos y esfingolípidos) (Christie, 1989). Los ácidos grasos de la capa subcutánea de grasa permiten inferir sobre los hábitos alimentarios (Iverson *et al.*, 2004), mientras que los AG de tejidos más conservativos como la piel se han utilizado para diferenciar poblaciones relacionadas con diferentes zonas geográficas (Yunoki *et al.*, 2008).

Estudios recientes en cetáceos indican la importancia de caracterizar histológicamente las biopsias al utilizar la técnica de ácidos grasos, debido a que la información obtenida depende del tipo de tejido a analizar, de su posible estratificación y de la distribución de las diferentes clases lipídicas a lo largo del tejido. Sin este previo análisis puede haber una interpretación incorrecta de los resultados (Cruz-Vizcaíno, 2005; Rueda-Flores, 2007).

Actualmente se desconoce la distribución de las diferentes clases lipídicas en el tejido de reserva de los calderones de aletas cortas, así como los perfiles de ácidos grasos de una biopsia completa (piel y grasa). Por lo que este estudio representa la primera aproximación de inferencia de hábitos alimentarios usando ácidos grasos para la especie.

En el presente estudio se analizaron los ácidos grasos neutros y polares de grasa y piel de calderones de aletas cortas, como una herramienta complementaria dada su utilidad como biomarcadores tróficos, para identificar posibles variaciones en la dieta según la información obtenida con análisis de isótopos estables de 4 grupos de calderones de aletas cortas (los grupos no se identificaron con el análisis de isótopos).

II. ANTECEDENTES

II.1. Estudios Tróficos

En relación a estudios tróficos de aplicación de isótopos estables de carbono y nitrógeno para estimar relaciones tróficas entre el calamar gigante (*Dosidicus gigas*) con los cetáceos teutófagos presentes en el Golfo de California, Díaz-Gamboa (2009) encontró diferencias entre grupos de calderones de aletas cortas. Los grupos se distinguieron con respecto al $\delta^{15}\text{N}$ con diferencias significativas de ~ 2.5 ‰ entre grupos de calderones que se encontraron en la región central y sur del Golfo de California (Fig. 1). Por lo consiguiente existían dos posibilidades, que estas diferencias en $\delta^{15}\text{N}$ se debieran a zonas con diferentes aportes de N o a distintos hábitos alimentarios entre grupos. Las fuentes de cambio en los valores en $\delta^{15}\text{N}$ en depredadores tope de una misma especie, incluyen varios niveles de pasos tróficos y variabilidad isotópica en la base en la cadena trófica que se refleja en el depredador tope (Aguíñiga *et al.*, 2007; Menard *et al.*, 2007). En el caso de los calderones teutófagos del Golfo de California, se considera a *D. gigas* como la principal fuente de alimentación (Díaz-Gamboa, 2009), sin embargo las evidencias del $\delta^{15}\text{N}$ sugieren que *Globicephala macrorhynchus* pudiera tener una dieta más amplia.

Suponiendo un valor de $\delta^{15}\text{N} \sim 10.4$ ‰ (Aguíñiga *et al.*, 2007) del material orgánico particulado (MOP) entre las diferentes áreas muestreadas y aplicando el algoritmo de Hobson (1993), se estimaron niveles tróficos entre 3 y 3.6 entre los grupos de calderones (Tabla 1), sugiriendo la existencia de un espectro trófico más amplio que el esperado para organismos teutófagos.

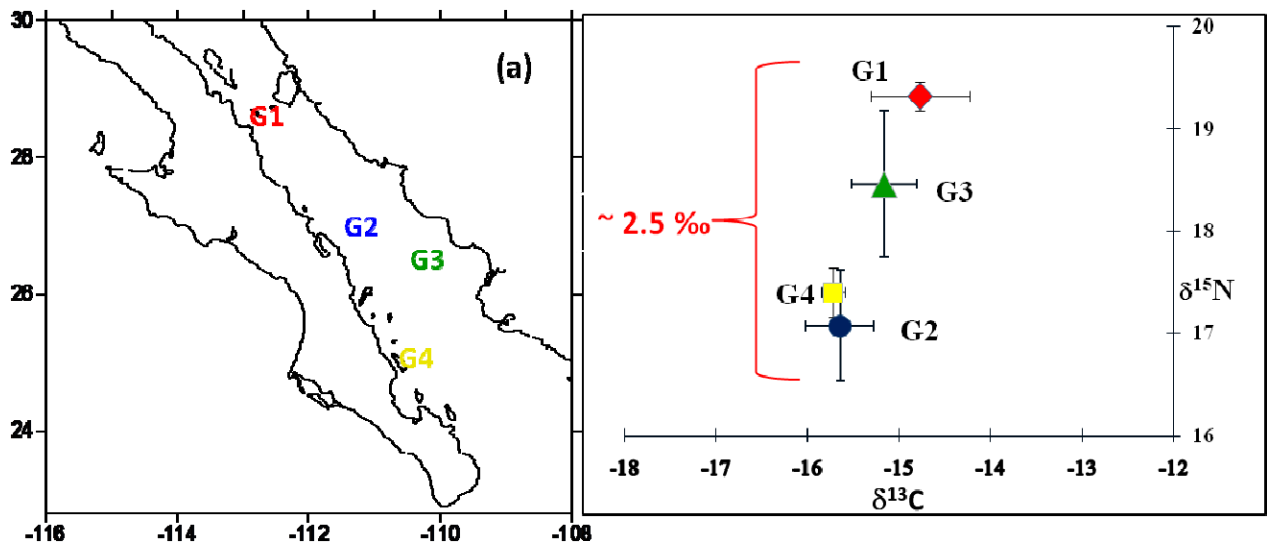


Figura 1. (a) Ubicación geográfica de los grupos de *G. macrorhynchus* muestreados en el Golfo de California; (b) Valores de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ por grupos muestreados (Tomado con permiso de Díaz-Gamboa, 2009).

Tabla 1. Nivel trófico estimado de grupos de calderones de aletas cortas.

<i>Globicephala macrorhynchus</i>	Nivel trófico
Grupo 1	3.6
Grupo 2	3.0
Grupo 3	3.4
Grupo 4	3.1

Como referencia de las posibles rutas tróficas que los calderones de aletas cortas y sus presas puedan tener, se encuentra el estudio de Markaida y Sosa-Nishizaki (2003) en el Golfo de California sobre los hábitos alimentarios y dieta en distintas tallas de calamar gigante *D. gigas* (presa principal del calderón en el GC), en el cuál se reporta como presas principales a los mictófidos *Benthoosema panamense* y *Triphoturus mexicanus*, seguido de calamares micronectónicos como *Leachia* sp., la langostilla *Pleuoncodes planipes* y como presas secundarias a peces

pelágicos como la sardina Monterrey *Sardinops sagax*, así como un marcado canibalismo.

También se ha reportado que los calderones pueden llegar a consumir peces, entre las especies se encuentra la merluza enana *Merluccius angustimanus*, la merluza nortea *Merluccius productus*, la caballa *Scomber japonicus* y el tiburón espinoso *Squalus acanthias* (Olson y Reilly, 2002) distribuidos también en el Golfo de California.

II.2. Ácidos Grasos

Los lípidos están constituidos por ácidos grasos y sus derivados, así como de sustancias relacionadas a estos de manera biosintética o funcionalmente. Se dividen en dos clases: neutros y polares. Los neutros son aquellos que mediante el proceso de saponificación producen como máximo dos tipos de productos primarios de hidrólisis por cada mol (ácidos grasos, glicerol, etc.), por ejemplo triglicéridos (TG) o ésteres de colesterol. Los polares son aquellos que mediante la saponificación producen tres o más productos primarios por mol, por ejemplo glicolípidos y fosfolípidos (FL) (Christie, 1989).

Los ácidos grasos representan un grupo extenso de moléculas, las cuáles constituyen la mayoría de los lípidos que se encuentran en todos los organismos (Budge *et al.*, 2006). Están formados generalmente por un número par de carbonos, con un grupo carboxilo en un extremo. En tejidos de animales, los ácidos grasos comunes forman cadenas con una extensión que varía de 14 a 22 carbonos, pero en ocasiones el rango puede variar de 2 a 36 carbonos o más y pueden tener de uno a seis dobles enlaces. Se pueden dividir en 2 grupos: 1) saturados (AGS), cuando los carbonos en la cadena ocupan todos sus enlaces e 2) insaturados, cuando tienen presentes dobles enlaces; monoinsaturados (AGMI), si sólo se presenta un doble enlace y poliinsaturados (AGPI), cuando en la cadena están presentes dos a más dobles enlaces (Christie, 2003). Respecto a la longitud de cadena pueden ser

divididos en tres clases: a) los llamados de cadena corta, cuando tienen una longitud de cadena entre 2 y 4 carbonos, b) los considerados de cadena media, cuando tienen una longitud entre 6 y 10 y c) los de cadena larga, que van desde 12 a 24 carbonos (Carreón-Palau *et al.*, 2007).

Así mismo, se encuentran los AG esenciales (AGE) que son aquellos que no pueden ser sintetizados por los vertebrados en general y por mamíferos marinos en particular, sino que deben ser obtenidos por medio de la dieta (Christie, 1989). Entre estos se encuentran los de las familias ω -3 y ω -6 como el linoléico (AL) 18:2 (n-6), α -linolénico (ALA) 18:3 (n-3), araquidónico (ARA) 20:4 (n-6), eicosapentaenoico (EPA) 20:5 (n-3) y docosahexaenoico (DHA) 22:6 (n-3); es posible utilizarlos como biomarcadores o trazadores tróficos ya que pueden conservarse de un nivel trófico a otro (Hooker *et al.*, 2001; Bradshaw *et al.*, 2003). La biosíntesis de estos AG de la familia ω -3 proviene de la siguiente vía: 18:3 n-3 \rightarrow 18:4 n-3 \rightarrow 20:4 n-3 \rightarrow 20:5 n-3 \rightarrow 22:5 n-3 \rightarrow 22:6 n-3 y para la familia ω -6 la vía es: 18:2 n-6 \rightarrow 18:3 n-6 \rightarrow 20:3 n-6 \rightarrow 20:4 n-6 \rightarrow 22:4 n-6 \rightarrow 22:5 n-6 (Bergé y Barnathan, 2005).

En los animales los ácidos grasos presentan tres funciones principalmente: 1) constituyen la principal reserva energética de los organismos, conformada en su mayoría por triglicéridos, permitiendo inferir sobre la dieta y los hábitos de alimentación, 2) forman las bicapas lipídicas de las membranas, compuestas en su mayoría de fosfolípidos y esfingolípidos, permitiendo diferenciar entre poblaciones, grupos o zonas geográficas, 3) pueden ser precursores de sustancias llamadas eicosanoides o icosanoides, que regulan procesos tales como la vaso constricción, vaso dilatación, coagulación e inflamación (Christie, 1989; Iverson *et al.*, 2004; Samuel y Worthy, 2004).

II.2.1. Ingestión y Metabolismo de Lípidos

El conocimiento básico acerca del metabolismo y bioquímica de los lípidos, permite obtener una mejor interpretación de los patrones de los ácidos grasos en los tejidos de reserva de los depredadores. La composición de AG se debe al resultado de tres fuentes metabólicas: 1) ácidos grasos no modificados de la dieta que son directamente depositados en el tejido adiposo, 2) ácidos grasos de la dieta que son modificados en la sangre en algún punto entre su absorción y deposición, 3) ácidos grasos que son derivados endógenamente, los cuáles surgen de la síntesis *de novo* (biosíntesis a partir de los carbohidratos) en los depredadores. Por lo tanto la comprensión de cada proceso es primordial en cualquier tejido del depredador que se vaya analizar (Budge *et al.*, 2006; Iverson, 2008).

Cualquier lípido que contenga un ácido graso esterificado es llamado acil lípido. Una presa contiene solamente acil lípidos como los TG y FL. Durante la digestión de los depredadores, los lípidos ingeridos son hidrolizados (se rompen los enlaces éster), para sintetizar ácidos grasos libres, como los monoacilglicérols y en el caso de los FL, lisofosfolípidos (un enlace glicerol con un ácido fosfatídico derivado y un solo AG). Estos ácidos pasan a través de la pared de la mucosa del intestino delgado convirtiéndose nuevamente en acil lípidos (TG y FL) y transportados por los quilomicrones (lipoproteínas que transportan AG derivados de la dieta, especialmente TG) de la sangre a los tejidos (Budge y Iverson, 2003). No obstante, los ácidos grasos de cadena corta o media de menos de 14 carbonos son la excepción, ya que no son incorporados en los quilomicrones, sin embargo son transportados al hígado, donde inmediatamente se oxidan. Por lo tanto, los AG de menos de 14 carbonos que se encuentran en los depredadores, se originan únicamente a partir de la biosíntesis *de novo* y no pueden ser relacionados con la dieta. Una vez que los quilomicrones-TG llegan a los tejidos son nuevamente hidrolizados. Luego, los AG son metabolizados para energía o son re-esterificados en TG como reserva (Budge *et al.*, 2006).

Algunos AG son usados de la misma manera para formar tejido estructural (FL) o pueden ser transformados en mensajeros secundarios u hormonas. Aunque todos los tejidos contienen ácidos grasos en las estructuras de las membranas celulares o en pequeños depósitos de lípidos, el tejido adiposo (o capa de grasa en el caso de mamíferos marinos), es el principal sitio de almacenamiento de AG y está compuesto fundamentalmente de triglicéridos. Esta grasa representa la principal reserva de energía en los animales, ya que estos tienen una limitada capacidad para poder almacenar carbohidratos. Todos los AG consumidos en exceso son inmediatamente depositados en el tejido de reserva (Budge *et al.*, 2006).

La mínima modificación que pueda haber en las cadenas de carbono de los ácidos grasos, sucede entre la ingestión y la deposición. Los mamíferos marinos son capaces de agregar dos unidades de carbono (elongar) y agregar dobles enlaces (desaturar) en las cadenas de carbono de los ácidos grasos que provienen de la dieta (Budge *et al.*, 2006). No obstante, estas modificaciones son especialmente limitadas a ácidos grasos saturados y monoinsaturados, los cuáles son inhibidos con el ayuno o con el alto consumo de grasa (más del 30% del total de calorías) en la dieta, particularmente si se consumen ácidos grasos poliinsaturados. Cuando los animales ayunan no sintetizan ni modifican la grasa, si no que la movilizan y oxidan para obtener energía. Por el contrario, cuando están consumiendo una dieta que contiene grasa en cantidades adecuadas o en exceso, incluyendo todos los AGE, no necesitan elongar y/o desaturar grasa. En mamíferos marinos la síntesis *de novo* ocurre típicamente cuando en la dieta están consumiendo una baja cantidad de grasa (alrededor del 10% del total de calorías) y altas cantidades de carbohidratos (Budge *et al.*, 2006). Entre los AG *de novo* que han sido reportados en los animales se encuentran los AGS 14:0, 16:0 y 18:0, así como los AGMI 14:1 n-5, 16:1 n-7 y 18:1 n-9 (Iverson, 2008).

II.2.2. Ácidos Grasos como Biomarcadores o Trazadores Tróficos

Los AG han sido utilizados recientemente como biomarcadores o trazadores tróficos en ambientes pelágicos marinos. Este concepto ha sido utilizado con certeza basado en la observación de que los patrones de ácidos grasos de algunos productores primarios (origen de la cadena trófica) pueden ser transferidos a través de las cadenas tróficas marinas sin ser modificados y por lo tanto pueden ser reconocidos en los depredadores tope (Parrish *et al.*, 2000; Bergé y Barnathan, 2005; Iverson, 2008).

Entre los ácidos grasos representativos de algunos grupos de organismos se encuentran el 14:0, 16:1 n-7 y 20:5 n-3 característicos de diatomeas (Mourente *et al.*, 1990) el 18:4 n-3 y 22:6 n-3 de dinoflagelados (Cohen *et al.*, 1995); entre los indicadores de actividad bacteriana están el iso 14:0, 15:0, iso 15:0, 17:0 y TM (tetrametilo) 16:0 (Parrish *et al.*, 2009), así como también el 20:1 y 22:1 específicos de zooplancton (Parrish *et al.*, 2000), y para plantas vasculares el 18:2 n-6 y 18:3 n-3 entre otros (Copeman *et al.*, 2009).

Recientemente, en Bahía Magdalena B.C.S. Rodríguez-Valenzuela (2009) reportó que los ácidos grasos biomarcadores de fitoplancton y bacterias en el detritus se rastrearon exitosamente en cada nivel trófico de dos rutas tróficas (periodo frío y periodo cálido) hasta llegar al depredador tope del estudio, el lobo marino de California (*Zalophus californianus*). Tanto el lobo marino como sus presas principales (*Sardinops sagax*, *Merluccius angustimanus*, *Kathetostoma avaruncus*), presentaron mayor concentración de los AGPI y AGE, indicando una transferencia eficiente de estos ácidos grasos a lo largo de las rutas tróficas hasta éste depredador tope.

II.3. Estudios Tróficos en Cetáceos

En un estudio sobre el misticeto rorcual Minke (*Balaenoptera acutorostrata*), Olsen y Grahl-Nielsen (2003) observaron que los ácidos grasos saturados y de cadena corta, en especial los ω -3 poliinsaturados, aumentan hacia la capa más interna de la grasa y que se asocian con la dieta a corto plazo. Los ácidos grasos monoinsaturados y los ω -6 se encontraron en mayor cantidad en la capa más externa y se relacionaron con cambios en la dieta ocurridos a largo plazo y por consiguiente a la separación geográfica de este rorcual, coincidiendo con la separación en dos stocks reportada por la Comisión Ballenera Internacional para esta especie.

En cuanto a los odontocetos, Samuel y Worthy (2004) realizaron un estudio con el delfín nariz de botella *T. truncatus*, para determinar la variabilidad de los ácidos grasos en función del sitio de muestreo en el cuerpo del delfín, la estación de muestreo y el estado reproductivo, encontrando que los ácidos grasos de la dieta se incorporan al tejido con poco o nulo cambio y que los sitios de muestreo a lo largo del cuerpo no son diferentes en su composición bioquímica. Establecen que el análisis de AG es una herramienta útil para evaluar interacciones alimentarias depredador-presa en tursiones.

En cetáceos del Golfo de California se han realizado análisis de ácidos grasos para identificar la presencia de dos sub-poblaciones de cachalotes (*P. macrocephalus*), utilizando ácidos grasos estructurales en biopsias de la aleta caudal (Cruz-Vizcaíno, 2005). Por su parte Rueda-Flores (2007) encontró que existen diferencias en el perfil de ácidos grasos de reserva de las ballenas azules (*Balaenoptera musculus*) en el Golfo de California, en función de su estado de madurez y su sexo. Recientemente en otro estudio con ballena azul, Espino-Pérez (2009) reportó que los cambios relacionados con el alimento se pueden observar en los perfiles de ácidos grasos en grasa de esta especie, después de 3 meses que han consumido alimento. Además, identifica algunos biomarcadores como el 14:0, 16:1 n-

7, 18:4 n-3 y 22:6 n-3, característicos de diatomeas y dinoflagelados en la grasa de esta especie.

Entre los estudios tróficos que han utilizado ácidos grasos e isótopos estables se encuentran el de Hooker *et al* (2001) quien reporta que la dieta del zífido nariz de botella del Norte (*Hyperoodon ampullatus*) está conformada en su mayoría por el calamar del género *Gonatus*, el mismo resultado fue obtenido utilizando ambas técnicas. De la misma forma, Herman *et al* (2005) definen la ecología de alimentación de la orca del Pacífico Norte (*Orcinus orca*) mediante ambos métodos distinguiendo tres stocks (residentes, transitorios y oceánicos) y sugieren que la población de orcas oceánicas se alimentan de distintos mamíferos marinos.

II.4. Análisis Multivariado: Interpretación de los Datos

El análisis multivariado ha sido utilizado eficazmente como herramienta en el análisis de ácidos grasos para examinar interacciones tróficas y diferencias espacio temporales entre distintos grupos de animales (Cruz-Vizcaíno, 2005; Budge *et al.*, 2006; Rueda-Flores, 2007; Iverson, 2008; Rodríguez-Valenzuela, 2009), ya que representa una serie de métodos estadísticos cuya finalidad es analizar simultáneamente conjuntos de datos multivariados para cada individuo u objeto estudiado.

Una de las técnicas principalmente utilizadas del análisis multivariado es el análisis de componentes principales (ACP), en éste las variables originales se transforman en nuevas variables no correlacionadas llamadas componentes principales. Cada componente principal (CP), es una combinación lineal de las variables originales y cada muestra es posicionada en un espacio multidimensional descrito por las variables (ácidos grasos). Los primeros componentes principales, describen en orden las varianzas más grandes entre las muestras. Los resultados de la subdivisión de los componentes principales pueden ser usados subsecuentemente en otro tipo de análisis multivariado (Granhil-Nielsen, 2004; Standal *et al.*, 2008).

Otra de las técnicas más empleadas es el análisis de funciones discriminantes (AFD), el cuál es capaz de describir que variables permiten diferenciar a los grupos y cuántas de estas variables son necesarias para alcanzar la mejor clasificación posible. La pertenencia a los grupos, conocida de antemano, se utiliza como variable dependiente (una variable categórica con tantos valores discretos como grupos). Las variables en las que suponemos que se diferencian los grupos se utilizan como variables independientes. Esta técnica tiene como objetivo encontrar la combinación lineal de las variables independientes que mejor permita diferenciar (discriminar) a los grupos. Una vez encontrada esa combinación (la función discriminante), se podrá utilizar para clasificar nuevos casos. Se trata de una técnica que es capaz de aprovechar las relaciones existentes entre una cantidad de variables independientes para maximizar la capacidad de discriminación (Budge *et al.*, 2006).

III. JUSTIFICACIÓN

Los isótopos estables de nitrógeno indican diferencias de hasta un nivel trófico entre grupos de calderones de aletas cortas en el Golfo de California, sin embargo no dan información acerca de las presas o rutas tróficas que expliquen estas diferencias. En cambio, los ácidos grasos no nos permiten distinguir entre especies de las presas pero si entre fitoplanctófagos, zooplanctófagos, detritívoros etc., por lo que pueden aportar información más precisa sobre sus hábitos alimentarios, ampliar la información sobre las relaciones tróficas entre grupos y generar los primeros registros de su perfil de ácidos grasos y condición fisiológica.

IV. HIPÓTESIS

Las diferencias de valores de $\delta^{15}\text{N}$ entre grupos de calderones de aletas cortas en el Golfo de California corresponden a distintos hábitos alimentarios que pueden distinguirse mediante el análisis de ácidos grasos.

V. OBJETIVOS

General

Distinguir hábitos alimentarios mediante el análisis de ácidos grasos relacionados con diferentes niveles tróficos en grupos de calderones de aletas cortas presentes en la región central y sur del Golfo de California.

Específicos

- Determinar si la grasa de las biopsias del calderón de aletas cortas se encuentra estratificada mediante una caracterización histológica.
- Identificar y cuantificar los lípidos neutros y polares de la grasa y piel.
- Determinar si existen diferencias en los perfiles de ácidos grasos de reserva de grasa y piel entre grupos de calderones.
- Determinar si existen diferencias en los perfiles de ácidos grasos estructurales de grasa y piel entre grupos de calderones.

VI. ÁREA DE ESTUDIO

El Golfo de California (Mar de Cortés) (Fig. 2) es un mar semi-cerrado que excede los 1,000 km de longitud, con 258,593 km² de área de superficie, abarcando cerca de 9 ° de latitud y atravesando el Trópico de Cáncer en sus límites sureños (hasta Cabo San Lucas, Baja California Sur y hasta Cabo Corrientes, Jalisco) (Case y Cody, 1993; Brusca y Findley, 2005). Al oeste limita con la Península de Baja California y al este con los estados de Sonora, Sinaloa, Nayarit y Jalisco (Roden, 1964).



Figura 2. Área de estudio.

El Golfo de California constituye un área subtropical de alta productividad primaria debido a sus características oceanográficas, donde ocurren procesos de mezcla por mareas y surgencias estacionales. Las surgencias en la costa este transcurren durante el invierno y primavera con vientos del noroeste y en la costa oeste durante el verano con vientos del sureste (Álvarez-Borrego y Lara-Lara, 1991). Estos procesos causan una excepcional productividad del fitoplancton, con tasas en

el Golfo de dos a tres veces mayores que en el océano abierto del Atlántico o del Pacífico a latitudes similares (Valdéz-Holguín y Lara-Lara, 1987).

En el Golfo de California se producen dos corrientes: la que lleva aguas del Océano Pacífico, penetra por el oriente del Golfo, es decir, por las costas de Sinaloa y Sonora; y la que sale del Golfo, se desliza por las costas de la península de Baja California (Robles, 1985).

Topográficamente, el Golfo está constituido por una serie de trincheras y cuencas que van aumentando en profundidad hacia el sur; está dividido en 3 zonas: norte, central y sur (Álvarez-Borrego y Lara-Lara, 1991).

El Golfo norte comprende desde el delta Río Colorado hasta el sur de las Islas del Cinturón o las Grandes Islas del Golfo, los niveles de nutrientes son altos todo el año y muestran muy poca variación estacional; las aguas poco profundas, los altos niveles de nutrientes y la fuerte mezcla por las mareas, se combinan para hacer a esta zona una de las regiones marinas más productivas. El Golfo central y sureño mantienen condiciones más oceánicas, las cuencas alcanzan profundidades de más de 3000 m y representan centros de expansión del lecho oceánico, con ventilas hidrotermales. El agua profunda en las cuencas centrales y sureñas es una intrusión de la masa sub-superficial Ecuatorial, caracterizada por una capa mínima de oxígeno (Brusca y Findley, 2005). El Golfo se considera como una “cuenca de evaporación”, particularmente su parte septentrional, las salinidades aumentan gradualmente en la zona norte; mientras que en el Golfo central y sureño las salinidades están más cerca de aguas oceánicas normales (Brusca y Findley, 2005).

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se realizó con 28 biopsias de *G. macrorhynchus* provenientes de 4 grupos (Tabla 2) que fueron colectadas de febrero a abril de 2005 en diferentes zonas de la región central y sur del Golfo de California (Fig. 3), en las cuáles se determinaron perfiles de ácidos grasos metilados.

Tabla 2. Biopsias de calderones de aletas cortas.

Grupo	Número de biopsias	Fecha	Latitud grados y minutos	Longitud grados y minutos
1	8	Marzo	28°, 28.9'	112°, 50.5'
2	9	Abril	26°, 50.7'	111°, 7.17'
3	6	Abril	26°, 22.1'	110°, 4.14'
4	5	Febrero	25°, 6.47'	110°, 47.3'

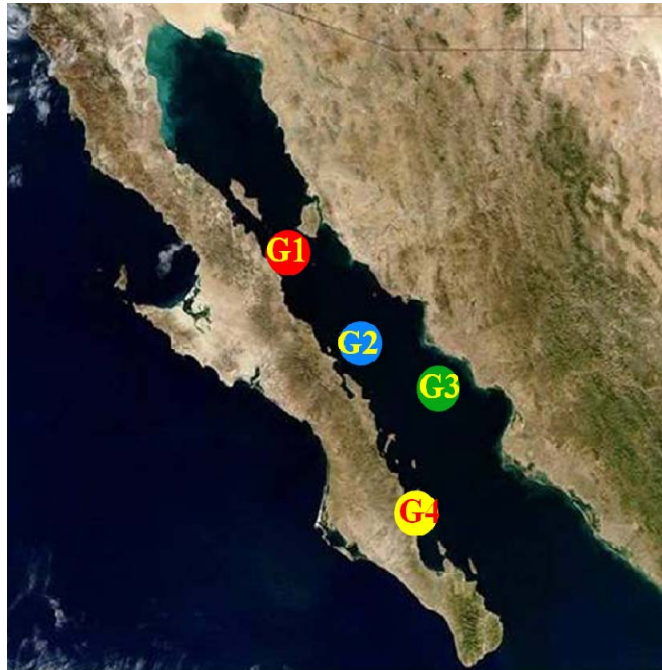


Figura 3. Zonas del Golfo de California donde fueron colectadas las biopsias.

Trabajo de Campo:

Se obtuvieron biopsias de piel y grasa de *G. macrorhynchus* por medio de una ballesta, con las especificaciones sugeridas para pequeños cetáceos (Patenaude y White, 1995), y una flecha con punta modificada en forma de cilindro de acero inoxidable de 5 mm de diámetro y 30 mm de largo para la colección de las muestras. Las biopsias se removieron del cilindro colector mediante pinzas esterilizadas de acero inoxidable, se colocaron en papel aluminio esterilizado y se depositaron dentro de viales criogénicos en nitrógeno líquido. Antes y después de cada biopsia, el cilindro colector se remojava en cloro, alcohol al 96% y al fuego mediante un soplete por 10 segundos, con el fin de remover y/o destruir cualquier resto de materia orgánica y para prevenir contaminación entre muestras (Díaz-Gamboa, 2009).

Trabajo de Laboratorio:

Para verificar que el tejido subcutáneo se encontraba en buenas condiciones para su posterior análisis, se realizó una cromatografía en capa fina en dos biopsias, extrayéndose primero los lípidos totales (Folch *et al.*, 1957) empleando Cloroformo: metanol (2:1 v:v) con 0.01% de BHT. Para la cromatografía (Henderson y Tocher, 1992) se utilizaron placas de vidrio, en las que se inyectó el extracto de lípidos totales de ambas muestras, se colocaron en una cámara de vidrio con un solvente neutro, se sacaron, rociándolas con dicloro-fluoresceína y se observaron con un espectrofotómetro. Como resultado obtuvimos que la grasa de ambas muestras no presentaban metil-ésteres, es decir, no se encontraba en oxidación, esto debido a que en condiciones normales de conservación dichos compuestos orgánicos no deben encontrarse en el tejido.

HISTOLOGÍA

Se realizó la caracterización histológica de una biopsia de una hembra de calderón de aletas cortas varada en el Mogote, B.C.S (2008) para describir la posible

estratificación de diferentes tejidos que pudieran almacenar distintas clases lipídicas, para lo que se emplearon las siguientes técnicas:

Cortes por congelación

Se hizo un corte de la grasa y piel de manera longitudinal y se colocó en un molde redondo y se cubrió con Tissue Teck (medio de soporte para el corte). Posteriormente se colocó el soporte del criostato en el molde y se dejó enfriar (-26°C). Una vez congelado se realizaron los cortes a 10 micras de grosor en un criostato MICROM HM-505N, cada corte se colocó en un portaobjetos previamente lavado con alcohol etílico al 100%, secado y bañado en una solución poli-L-lisina para evitar que los cortes se despegaran durante la tinción. Cada corte se guardó en congelación hasta su tinción. Para detectar la presencia de lípidos insolubles se utilizó la técnica de tinción de Sudán Negro para grasas siguiendo la metodología propuesta por Rodríguez-Jaramillo, 2004 (Anexo 3).

Técnica de inclusión en parafina

Una sección de cortes de la biopsia congelada fue fijada en solución de Davidson, posteriormente se colocaron en casetes para deshidratar el tejido en una serie de alcoholes de menor a mayor concentración (70, 80, 90 y 100%); después los tejidos fueron aclarados en xileno e incluidos en Paraplast X-Tra (Anexo 1). De las inclusiones se obtuvieron cortes de 3 µm de grosor mediante un micrótopo de rotación LEICA RM-2155. Posteriormente se aplicó la técnica de tinción Hematoxilina-Eosina (Anexo 2) para identificar el tipo de tejido de la muestra.

Cuantificación del área

Cada corte se observó al microscopio con un objetivo de 4X. Se tomaron fotografías secuenciadas desde la piel hasta la capa interna de la grasa y se

analizaron mediante un software para análisis de imágenes (Image Pro PLUS, versión 4.1.5) adaptado a una cámara COOLSNAP (Media Cybernetics, Bethesda, MD) conectada a un microscopio OLYMPUS BX41, se utilizaron las imágenes de la técnica de Hematoxilina-Eosina, se calculó el área ocupada por cada clase lipídica respecto al área total ocupada por los adipocitos (asumiendo que los espacios vacíos estaban ocupados por triglicéridos que se lavaron durante la deshidratación) y el resto total del área se asumió como fosfolípidos asociados a las membranas celulares (Rodríguez-Jaramillo, 2004).

ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS

En el laboratorio se separó la grasa de la piel de los calderones y se analizó cada tejido por separado. Los ácidos grasos se extrajeron con el método de Folch *et al.*, 1957. La cuantificación de lípidos totales se realizó con una alícuota del extracto lipídico utilizando el método de Marsh y Weinstein (1966). El resto del extracto se separó en lípidos neutros (de reserva) y polares (estructurales), utilizando una columna de sílica gel prequemada a 450°C por 4 horas, rehidratada con el 6% de agua destilada y homogenizada con un roto-evaporador HEIDOLPH WHEATON. La separación de tipos de lípidos se realizó con goteo constante de una solución de cloroformo: metanol (98:2) para los neutros (10 ml) y metanol (15 ml) en la misma columna para los lípidos polares, de acuerdo al índice de polaridad de cada solvente (Christie, 1989).

Los lípidos neutros y polares fueron metil esterificados mediante una derivatización ácida (Sato y Murata, 1988) adicionando 2.5 ml de HCl: metanol (5:95 v/v) permaneciendo 2.5 horas en baño María a 85°C en un termo-baño TERLAB MA40. Posteriormente los metil-ésteres obtenidos fueron extraídos mediante dos lavados de hexano de 2 ml cada uno e inyectados en un cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas VARIAN 3800, dando como resultado un cromatograma. Cada pico del cromatograma estuvo asociado a un espectro de masas que se identificó por interpretación de espectros mediante un software (WSEARCH32 Ver

1.6.2005) y comparados con los tiempos de retención de una mezcla de 37 estándares SUPELCO 47885-U encontrados comúnmente en organismos marinos. La cuantificación se realizó mediante la interpolación de las áreas bajo el pico de cada AG con la curva de calibración de los mismos 37 estándares realizada con cinco puntos utilizando las siguientes concentraciones: 5, 10, 20, 40 y 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$. La concentración de AG totales ($\mu\text{g mL}^{-1}$) fue considerada como el 100% y la concentración de cada AG como porcentaje del total.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la cuantificación y el análisis estadístico primero se tuvieron que transformar los datos de los AG, la suma de todas las concentraciones de los diferentes ácidos grasos es el 100% y la contribución relativa de cada ácido graso se transformó a arcoseno [raíz (%/100)] (Zar, 1996), dando como resultado varianzas independientes de las medias y de la distribución de datos normalizados. Se realizaron pruebas de ANOVA en el contenido de lípidos totales para ver si existían diferencias significativas entre grupos. Para los ácidos grasos de reserva de la grasa y piel se realizaron análisis de componentes principales (ACP) utilizando todos los AG para observar cómo se distribuían los 4 grupos de calderones. Posteriormente se realizó un análisis de funciones discriminantes (AFD), utilizando AG solamente considerados como biomarcadores tróficos para ver cómo se distribuían los grupos de acuerdo a afinidades en los hábitos alimentarios.

Así mismo, para los ácidos grasos estructurales de la piel y grasa se realizaron análisis de componentes principales para observar cómo se distribuían los 4 grupos de calderones. Posteriormente se realizó un análisis de funciones discriminantes, utilizando AG de fosfolípidos para ver la posible separación de los grupos. Finalmente, se realizó un ANOVA con los biomarcadores que contribuyeron a separar a los grupos, para poder definir las posibles rutas tróficas entre estos.

VIII. RESULTADOS

VIII.1. Caracterización Histológica de las Biopsias

En el análisis histológico, se observaron de arriba para abajo gránulos de melanina que fueron disminuyendo desde la epidermis hacia la dermis. La grasa subcutánea se caracterizó, por espacios con adipocitos inervados con vasos sanguíneos desde la hipodermis hasta la zona próxima al músculo, lo que significó que no se encontró un patrón de estratificación definido en la biopsia del calderón de aletas cortas (Fig. 4).

Los cortes de congelación que se obtuvieron para la técnica de Sudán Negro para grasas no fueron óptimos para la cuantificación de las clases lipídicas, debido a la falta de gas del criostato que no permitió el descenso de la temperatura a -20°C , por lo que se optó por utilizar las imágenes obtenidas mediante la técnica Hematoxilina-Eosina.

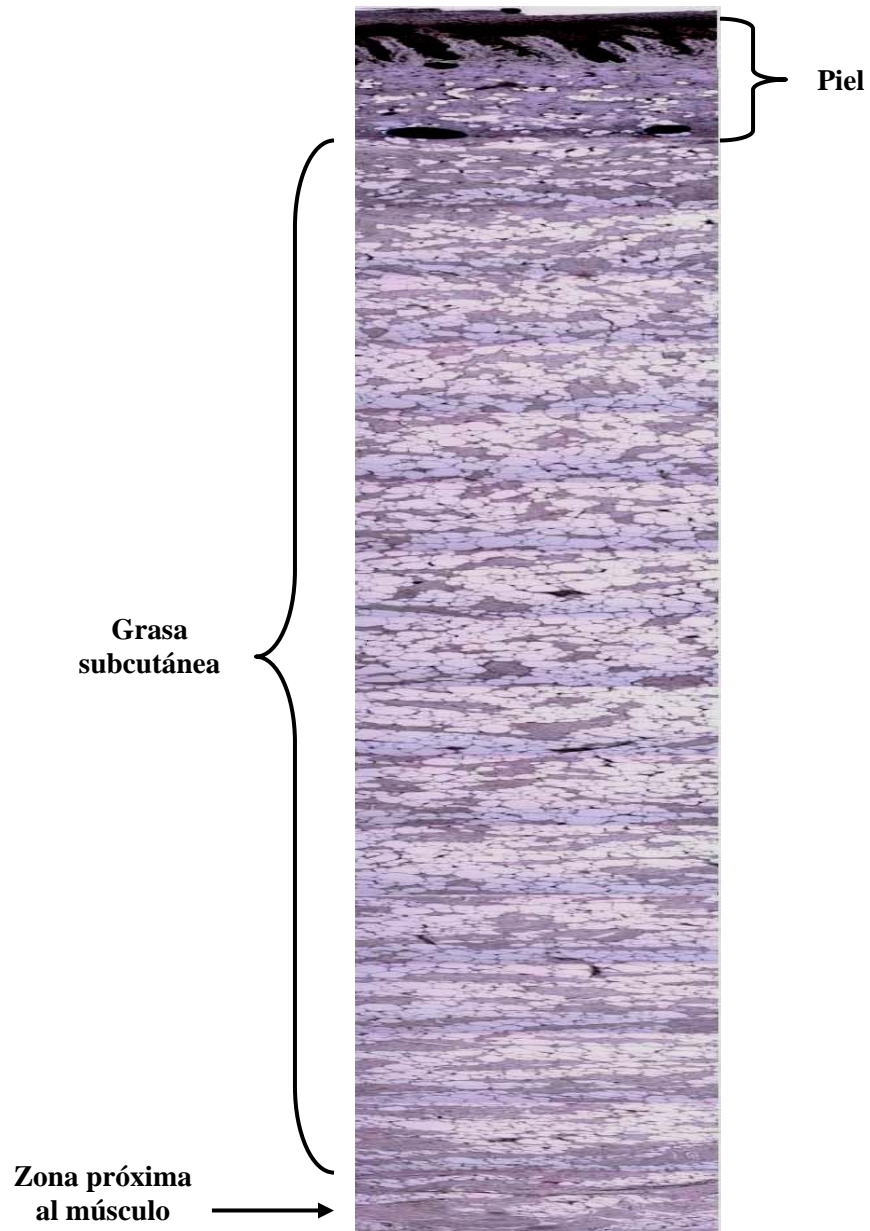


Figura 4. Corte histológico de piel y grasa de una biopsia de calderón de aletas cortas, teñida con la técnica de Hematoxilina-Eosina; el color morado representa los núcleos y el color rosa el citoplasma.

La piel estuvo conformada por tres capas: epidermis, dermis e hipodermis. La capa epidérmica constituida con prolongaciones de células epiteliales con gránulos de melanina que se distribuyeron de menor a mayor cantidad desde la capa externa hacia la capa dérmica. La dermis se caracterizó por tejido conectivo denso, laxo y por haces de fibra, situada entre las crestas epidérmicas. La hipodermis que constituye la grasa se caracterizó por presentar tejido conectivo laxo con fibras elásticas y de colágeno, así como células grasas o adipocitos (Fig. 5).

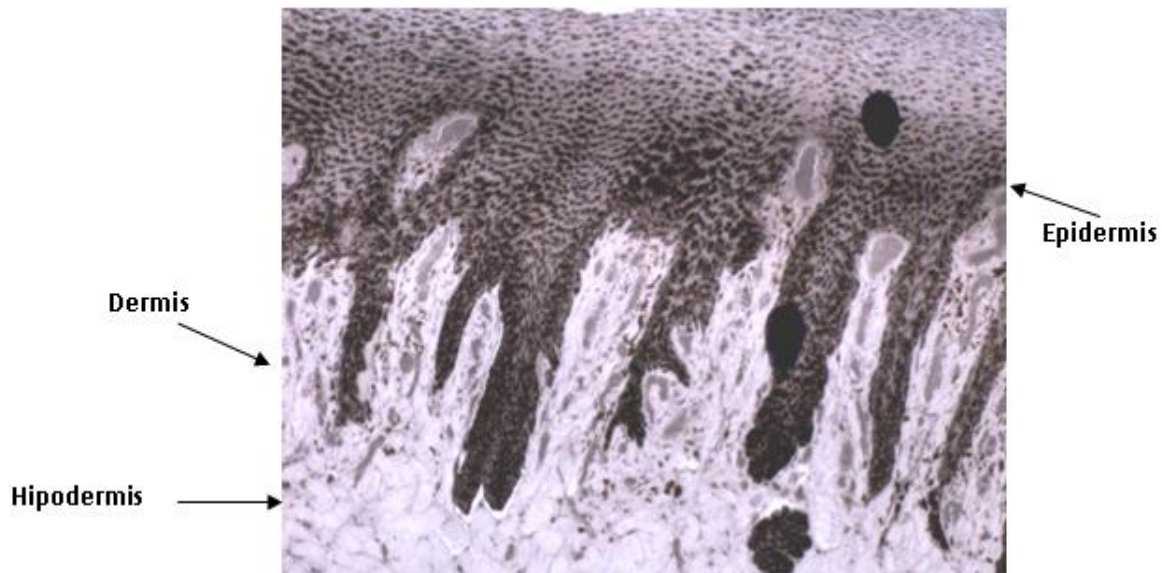


Figura 5. Corte histológico de piel de una biopsia de calderón de aletas cortas, teñida con la técnica de Hematoxilina-Eosina; el color morado representa los núcleos y el color rosa el citoplasma.

En la grasa, los triglicéridos, que forman parte del tejido de reserva, representaron aproximadamente el 70% de la biopsia, mientras que los fosfolípidos, que forman parte del tejido estructural, representaron aproximadamente el 30% de la biopsia. Además la grasa se encontró inervada con vasos sanguíneos a lo largo de toda la biopsia (Fig. 6).

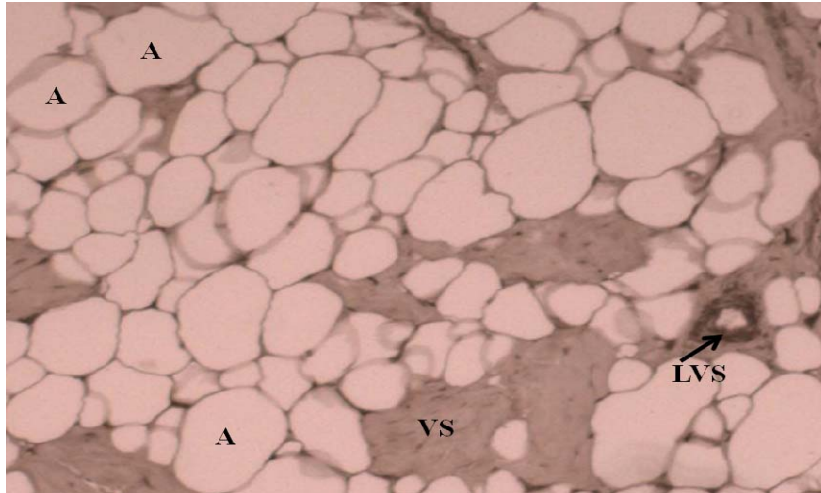


Figura 6. Corte histológico de grasa de una biopsia de calderón de aletas cortas en corte transversal, A=adipocitos, VS= vista longitudinal de vasos sanguíneos y LVS= luz del vaso sanguíneo.

VIII.2. Caracterización Bioquímica (Ácidos Grasos) de los Tejidos

VIII.2.1. Lípidos

En cuanto a lípidos totales no se encontraron diferencias significativas $F_{(6,44)} = 2.0579$, $p = 0.07786$) entre grupos (Fig. 7), siendo el grupo 2 el que presentó la mayor cantidad de lípidos y el grupo 1 el menor.

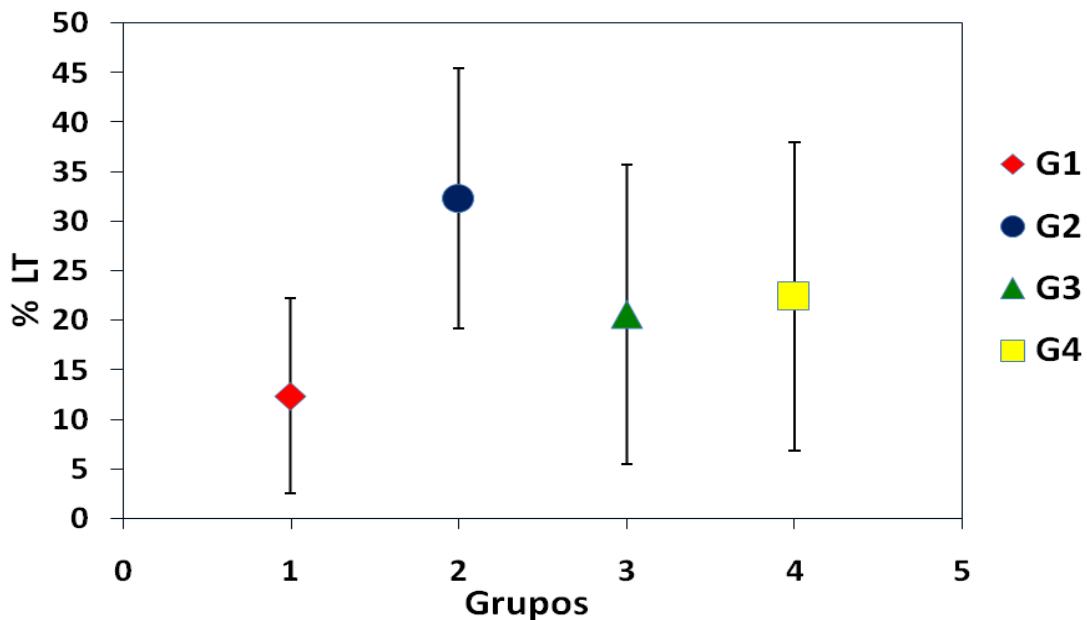


Figura 7. Porcentaje de lípidos totales (% LT) entre grupos. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza al 95%.

Al realizar la comparación de las dos clases lipídicas en grasa y piel por grupos, el porcentaje de lípidos neutros fue mayor al 80%, mientras que los lípidos polares representaron menos del 20% en ambos tejidos (Fig. 8 y Fig. 9).

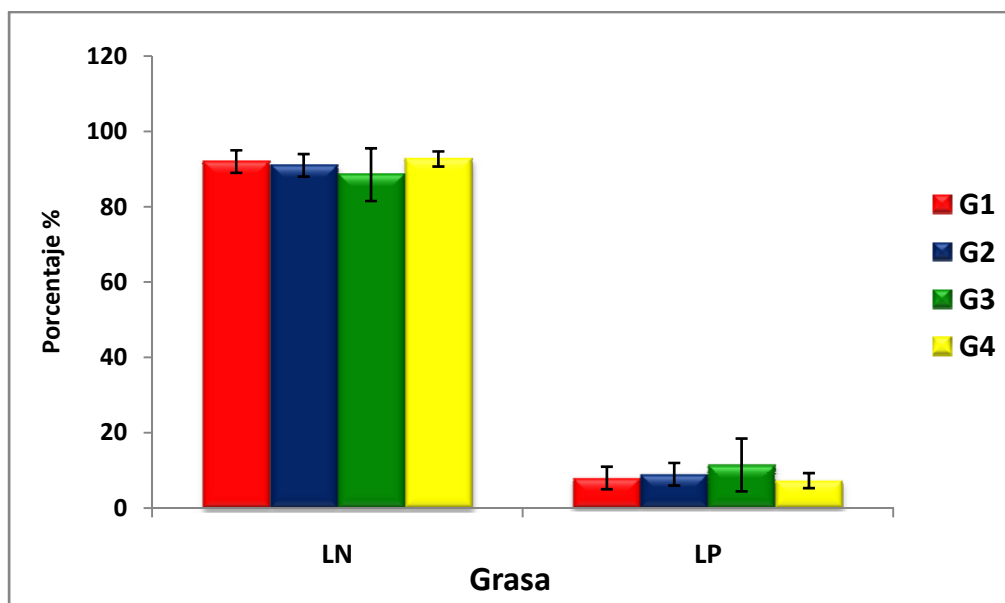


Figura 8. Comparación del porcentaje de LN y LP en grasa por grupos. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza al 95%.

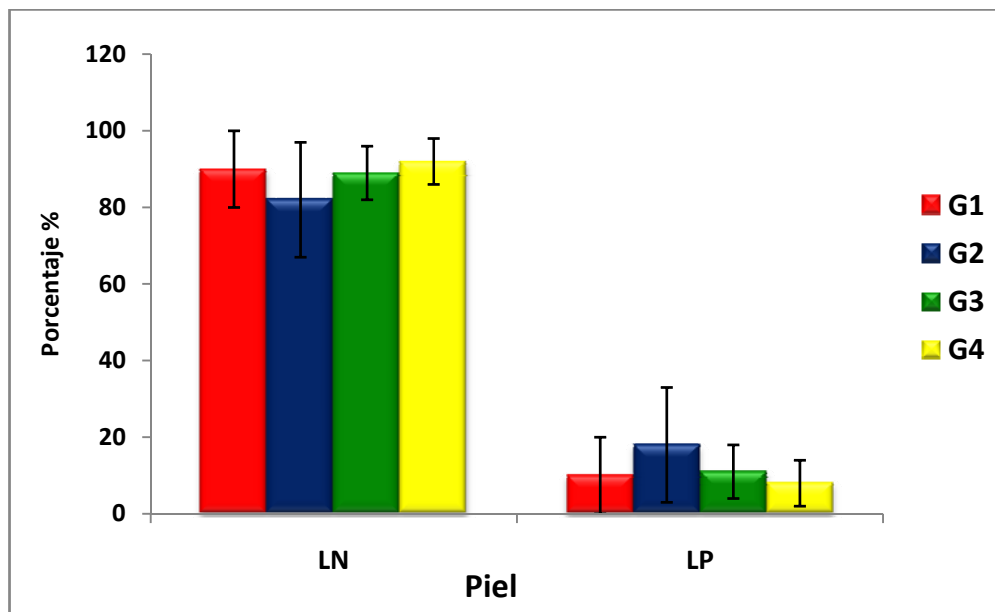


Figura 9. Comparación del porcentaje de LN y LP en piel por grupos. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza al 95%.

VIII.2.2. Ácidos Grasos presentes en Lípidos de Reserva (Neutros)

En Grasa:

Se detectaron 31 ácidos grasos de reserva en grasa de calderón de aletas cortas en el Golfo de California (Tabla 3), se destacó un mayor porcentaje de los ácidos grasos monoinsaturados (20:1n-11 y 22:1n-11) del grupo 2 con respecto a los otros grupos (Fig. 10).

Tabla 3. Porcentaje de los ácidos grasos con respecto al total de AG de reserva en grasa. Se muestra el intervalo de confianza del promedio del porcentaje al 95%.

Ácido graso	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
14:0*	6.2 ± 0.5	5.2 ± 0.4	5.5 ± 0.4	5 ± 0.6
15:0*	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.03	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1
16:0	12.7 ± 1.0	11.6 ± 0.7	12.5 ± 1.9	13.8 ± 1.0
17:0*	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.9 ± 0.1
18:0	3.1 ± 0.5	2.9 ± 0.3	3.3 ± 0.9	4 ± 0.8
19:0	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.04	0.1 ± 0.02	0.2 ± 0.1
20:0	0.2 ± 0.04	0.4 ± 0.4	0.2 ± 0.04	0.2 ± 0.1
∑ Saturados	23.8 ± 2.2	21.5 ± 1.9	23.2 ± 3.6	24.9 ± 2.8
iso 14:0*	0.3 ± 0.03	0.3 ± 0.03	0.3 ± 0.04	0.3 ± 0.1
iso 15:0	0.2 ± 0.04	0.2 ± 0.02	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1
TM 16:0	0.1 ± 0.03	0.1 ± 0.02	0.1 ± 0.02	0.1 ± 0.01
iso 17:0	0.2 ± 0.03	0.3 ± 0.02	0.3 ± 0.04	0.3 ± 0.04
∑ Ramificados	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.8 ± 0.3
16:1 n-9	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.3
16:1 n-7	18.1 ± 2.8	12.8 ± 1.7	15.9 ± 4.7	9.2 ± 6.5
17:1 n-9	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.1 ± 0.3	0.9 ± 0.2
14:1	1.2 ± 0.3	0.9 ± 0.2	1.1 ± 0.5	0.7 ± 0.5
18:1 n-9c	27.9 ± 1.3	31 ± 1.8	27.1 ± 2.5	29.2 ± 5.1
18:1 n-7c	3.1 ± 0.2	3.3 ± 0.2	3.4 ± 0.5	3.3 ± 0.3
20:1 n-11*	0.6 ± 0.1	3.2 ± 0.7	0.7 ± 0.1	1.1 ± 0.6
20:1 n-9	4 ± 0.4	4.9 ± 1.0	4.5 ± 0.6	5.2 ± 1.0
22:1 n-11*	0.3 ± 0.04	1.1 ± 0.3	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.2
22:1 n-9*	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1
∑ Mono-Insaturados	57.3 ± 5.5	59.4 ± 6.1	55.5 ± 9.5	51.5 ± 14.9

Tabla 3. *continuación...*

18:2 n-6c	0.7 ± 0.04	0.8 ± 0.03	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1
18:3 n-3	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.04	0.4 ± 0.04	0.3 ± 0.1
18:4 n-3*	0.1 ± 0.04	0.1 ± 0.03	0.2 ± 0.03	0.1 ± 0.03
20:4 n-6*	1.6 ± 0.1	1.1 ± 0.2	1.5 ± 0.1	1.4 ± 0.2
20:4 n-3	0.3 ± 0.03	0.6 ± 0.6	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.04
20:5 n-3	2.8 ± 0.5	2.2 ± 0.5	3 ± 0.9	3 ± 0.9
22:4 n-6	0.6 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.2	0.8 ± 0.4
22:5 n-6	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.3
22:5 n-3	2.3 ± 0.5	2.8 ± 0.7	2.4 ± 1.0	3.5 ± 1.6
22:6 n-3	8.8 ± 2.3	9.1 ± 2.6	10.7 ± 3.8	12 ± 5.1
∑ Poli-Insaturados	18.0 ± 3.8	18.2 ± 5.0	20.4 ± 6.6	22.8 ± 8.7
18:2 n-6c	0.7 ± 0.04	0.8 ± 0.03	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1
18:3 n-3	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.04	0.4 ± 0.04	0.3 ± 0.1
20:4 n-6*	1.6 ± 0.1	1.1 ± 0.2	1.5 ± 0.1	1.4 ± 0.2
20:5 n-3	2.8 ± 0.5	2.2 ± 0.5	3 ± 0.9	3 ± 0.9
22:6 n-3	8.8 ± 2.3	9.1 ± 2.6	10.7 ± 3.8	12 ± 5.1
∑ Esenciales	14.0 ± 3.0	14.0 ± 3.0	16.0 ± 5.0	17.0 ± 6.0
14:1	1.2 ± 0.3	0.9 ± 0.2	1.1 ± 0.5	0.7 ± 0.5
16:0	12.7 ± 1.0	11.6 ± 0.7	12.5 ± 1.9	13.8 ± 1.0
16:1 n-9	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.3
18:0	3.1 ± 0.5	2.9 ± 0.3	3.3 ± 0.9	4 ± 0.8
18:1 n-9c	27.9 ± 1.3	31 ± 1.8	27.1 ± 2.5	29.2 ± 5.1
∑ De novo	46.8 ± 3.3	48.2 ± 3.2	46.0 ± 6.2	49.5 ± 7.9
18:3 n-3	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.04	0.4 ± 0.04	0.3 ± 0.1
18:4 n-3*	0.1 ± 0.04	0.1 ± 0.03	0.2 ± 0.03	0.1 ± 0.03
20:4 n-3	0.3 ± 0.03	0.6 ± 0.6	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.04
20:5 n-3	2.8 ± 0.5	2.2 ± 0.5	3 ± 0.9	3 ± 0.9
22:5 n-3	2.3 ± 0.5	2.8 ± 0.7	2.4 ± 1.0	3.5 ± 1.6
22:6 n-3	8.8 ± 2.3	9.1 ± 2.6	10.7 ± 3.8	12 ± 5.1
∑ ω-3	14.7 ± 3.4	15.1 ± 4.5	16.9 ± 5.9	19.3 ± 7.7
18:2 n-6c	0.7 ± 0.04	0.8 ± 0.03	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1
20:4 n-6*	1.6 ± 0.1	1.1 ± 0.2	1.5 ± 0.1	1.4 ± 0.2
22:4 n-6	0.6 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.2	0.8 ± 0.4
22:5 n-6	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.3
∑ ω-6	3.3 ± 0.4	3.0 ± 0.5	3.5 ± 0.6	3.5 ± 1.0

(*) = ácidos grasos que presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupos, mediante un análisis de funciones discriminantes.

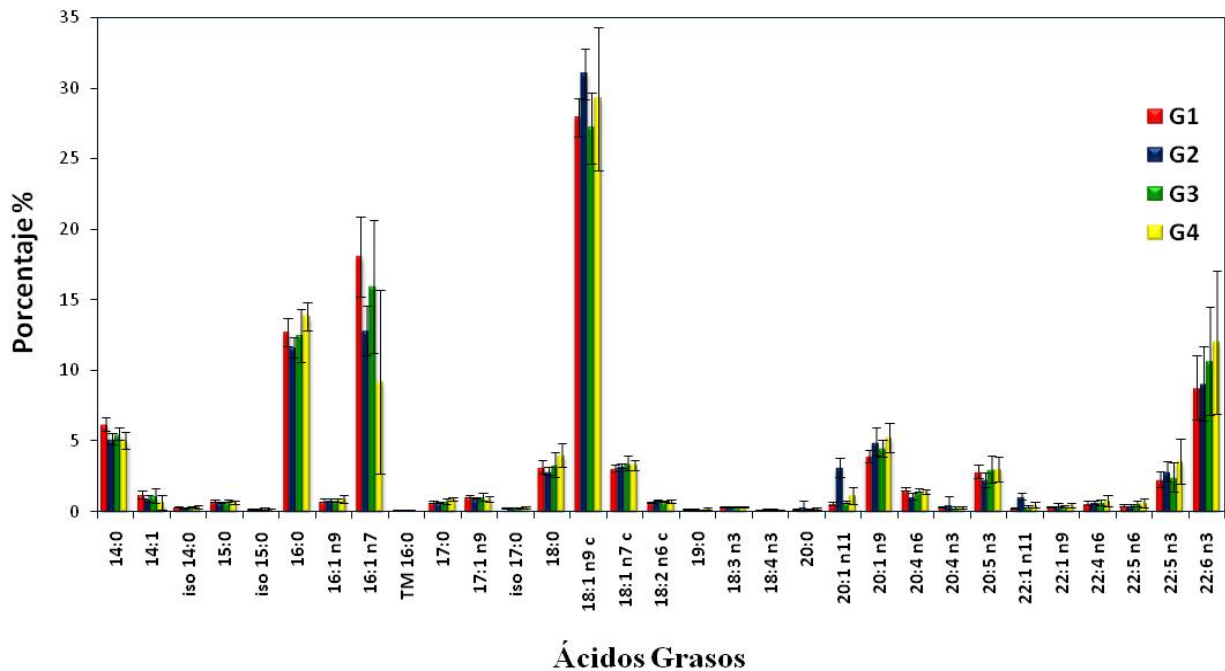


Figura 10. Perfil de ácidos grasos de reserva en grasa de *G. macrorhynchus* en el Golfo de California. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza al 95%.

Se realizó un ACP considerando los 31 ácidos grasos identificados en lípidos neutros de grasa. Aunque la mayoría de los calderones tuvieron valores promedio, los 3 primeros componentes explicaron el 63% de la varianza. El CP1 explicó el 34% de la varianza y sólo separó a un individuo del grupo 4 que presenta la mayor proporción de 17:0, 18:0, 22:5 n-3 y 22:6 n-3 (Fig. 11 y Fig. 12). El CP2 explicó el 19% de la varianza y separó a un individuo del grupo 2. Los AG que contribuyeron de manera significativa a dicha separación son el 20:0, 20:4 n-3 y 22: 1 n-9 (Fig. 11).

El CP3 explicó el 10% de la varianza y separó al grupo 2 del resto de los grupos. Los AG que contribuyeron de manera significativa a esta separación son AGMI de origen zoo-planctónico (20:1n-11 y 22:1n-11) (Fig. 12).

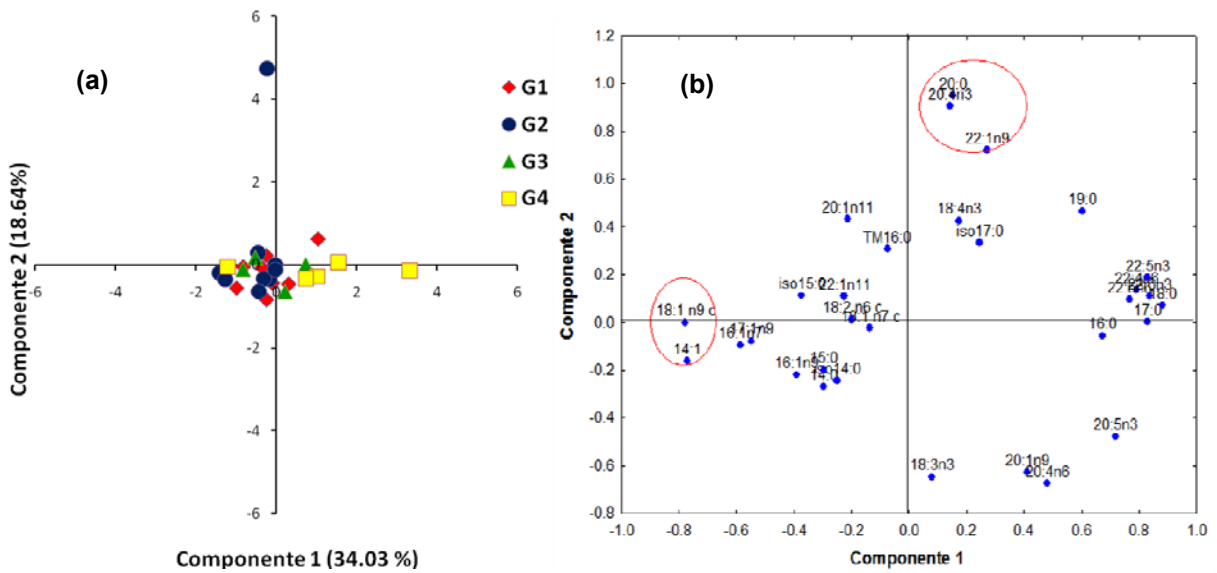


Figura 11. Análisis de componentes principales de los AG de los lípidos de reserva en grasa de grupos de calderones, (a) Valores de AG del CP1 vs CP2; (b) Peso de cada ácido graso en los componentes, los círculos encierran los AG con coeficientes de correlación mayor a 0.7.

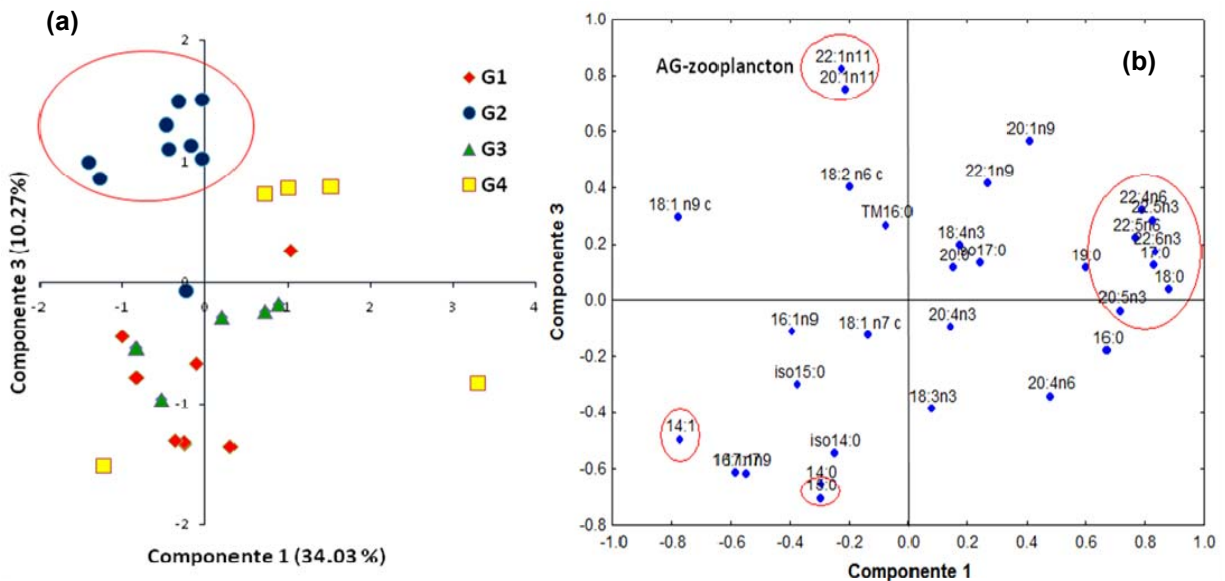


Figura 12. Análisis de componentes principales de los AG de los lípidos de reserva en grasa de grupos de calderones, (a) Valores de AG del CP1 vs CP3; (b) Peso de cada ácido graso en los componentes, los círculos encierran los AG con coeficientes de correlación mayor a 0.7.

Al realizar un AFD utilizando solamente los ácidos grasos reportados como biomarcadores tróficos, se observó una clara separación entre grupos (Lambda de Wilks: 0.00002, $F_{(60,12)} = 7.5683$, $p < 0.0001$) (Tabla 6); hubo una separación significativa ($p < 0.01$) entre los grupos 1 y 2 coincidiendo con lo reportado mediante isótopos estables (Tabla 4, Fig. 13). Los AG que contribuyeron a la separación de manera significativa fueron 14:0, iso 14:0, 15:0, 17:0, 18:4n-3, 20:1 n-11, 22:1 n-11, 22:1 n-9 y 20:4 n-6 (Tabla 3). El grupo 1 se separó por los AG 14:0, 15:0 y 20:4 n-6, el grupo 2 por los AG 20:1 n-11 y 22:1 n-11. El grupo 3 por el 17:0 y 18:4n-3, mientras que el grupo 4 se separó por los AG 20:1 n-9 y 22:1 n-9 (Fig.14). La matriz de clasificación de grupos indicó que todos los individuos estuvieron correctamente clasificados en los grupos correspondientes como fueron avistados (Tabla 5). Dichas diferencias entre los grupos pudieran deberse a distintas rutas tróficas que tienen los calderones como depredadores tope.

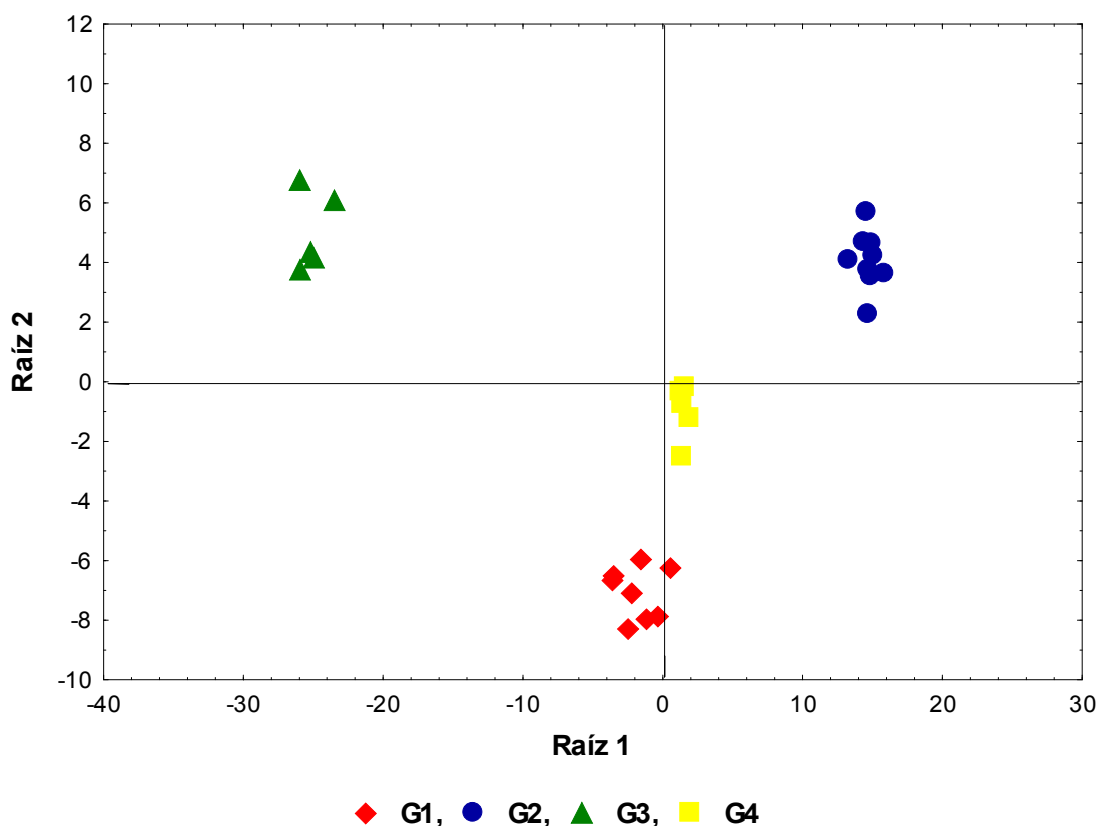


Figura 13. Análisis de funciones discriminantes entre grupos de calderones determinado por biomarcadores tróficos en grasa.

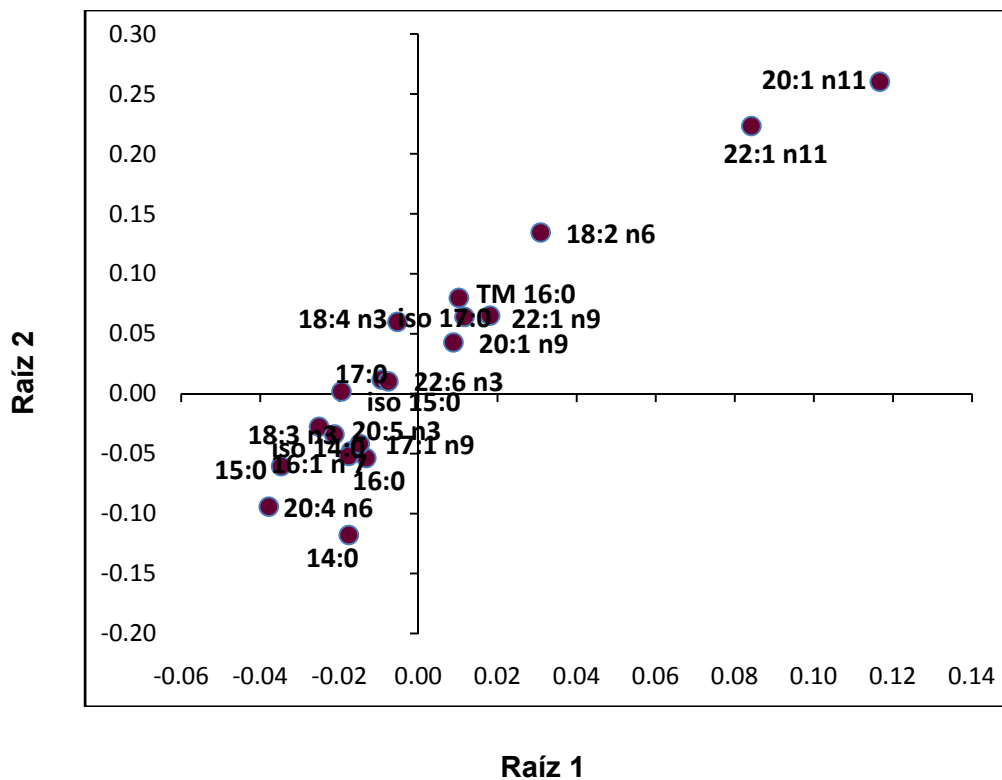


Figura 14. Biomarcadores tróficos (AG) que contribuyeron a la separación de los grupos en el análisis discriminante.

Tabla 4. Valores de probabilidad de diferencia entre grupos de calderones. Se considera diferencia significativa cuando $p < 0.05$.

Grupo	G_1:1	G_2:2	G_3:3	G_4:4
G_1:1		0.008689	0.006255	0.237870
G_2:2	0.008689		0.001138	0.043382
G_3:3	0.006255	0.001138		0.008005
G_4:4	0.237870	0.043382	0.008005	

Tabla 5. Matriz de clasificación de grupos de calderones. Lípidos de reserva en grasa.

	Renglones: Clasificación Observada Columnas: Clasificación calculada				
	Porcentaje correcto	G_1:1 p=0.296	G_2:2 p=0.333	G_3:3 p=0.185	G_4:4 p=0.185
G_1:1	100	8	0	0	0
G_2:2	100	0	9	0	0
G_3:3	100	0	0	5	0
G_4:4	100	0	0	0	5
Total	100	8	9	5	5

Tabla 6. Ácidos grasos considerados como biomarcadores tróficos.

Ácido graso	Origen	Fuente
14:0	Diatomeas	Mourente <i>et al.</i> , 1990
iso 14:0	Bacterias	Parrish <i>et al.</i> , 2009
15:0	Bacterias	Parrish <i>et al.</i> , 2000
iso 15:0	Bacterias	Parrish <i>et al.</i> , 2009
16:1n-7	Diatomeas	Parrish <i>et al.</i> , 2000
TM 16:0	Bacterias	Bergé y Barnathan, 2005
17:0	Bacterias	Parrish <i>et al.</i> , 2000
iso 17:0	Bacterias	Parrish <i>et al.</i> , 2009
18:2 n-6	Plantas vasculares	Copeman <i>et al.</i> , 2009
18:3 n-3	Plantas vasculares	Copeman <i>et al.</i> , 2009
18:4 n-3	Dinoflagelados	Cohen <i>et al.</i> , 1995
20:1 n-11	Zooplancton	Parrish <i>et al.</i> , 2000
20:1 n-9	Zooplancton	Parrish <i>et al.</i> , 2000
20:4 n-6	Fitoplancton	Cohen <i>et al.</i> , 1995
20:5 n-3	Diatomeas	Parrish <i>et al.</i> , 2000
22:1 n-11	Zooplancton	Parrish <i>et al.</i> , 2000
22:1 n-9	Zooplancton	Parrish <i>et al.</i> , 2000
22:6 n-3	Dinoflagelados	Parrish <i>et al.</i> , 2000

En Piel:

Se detectaron 54 ácidos grasos de reserva en piel de calderón de aletas cortas (Tabla 7). El porcentaje más alto fue de los ácidos grasos monoinsaturados (16:1n-7 y 18:1n-9), así como del ácido graso saturado (16:0) en los 4 grupos (Fig. 15).

Tabla 7. Porcentaje de los ácidos grasos con respecto al total de AG de reserva en piel. Se muestra el intervalo de confianza del promedio del porcentaje al 95%.

Ácido graso	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
12:0	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1
13:0	0.2 ± 0.03	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1
14:0	5.4 ± 0.7	4.2 ± 1.5	5.0 ± 0.6	4.7 ± 0.3
15:0	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.03
16:0	12.5 ± 1.0	10.0 ± 3.6	11.8 ± 1.8	12.8 ± 1.4
17:0	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.3	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1
18:0	5.1 ± 0.9	4.2 ± 1.6	4.4 ± 1.0	5.0 ± 1.0
19:0	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.5	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01
20:0	0.2 ± 0.03	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.02	0.2 ± 0.03
21:0	0.1 ± 0.03	0.3 ± 0.3	0.1 ± 0.02	0.1 ± 0.02
22:0	0.1 ± 0.02	0.3 ± 1.0	0.1 ± 0.03	0.1 ± 0.02
23:0	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.03
24:0	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.9	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.1
∑ Saturados	26.0 ± 3.1	22.2 ± 10.4	24.5 ± 4.0	25.2 ± 3.1
iso 13:0	0.1 ± 0.02	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.02
iso 14:0	0.3 ± 0.04	0.4 ± 0.8	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.03
aiso 14:0	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.03	0.1 ± 0.01
iso 15:0	0.2 ± 0.02	0.3 ± 0.3	0.2 ± 0.03	0.2 ± 0.02
iso 16:0	0.5 ± 0.04	0.7 ± 1.7	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1
aiso 16:0	0.1 ± 0.01	1.5 ± 1.8	0.1 ± 0.02	0.1 ± 0.01
TM 16:0	0.1 ± 0.01	0.3 ± 1.8	0.1 ± 0.02	0.1 ± 0.03
iso 17:0	0.2 ± 0.03	0.5 ± 0.3	0.3 ± 0.03	0.4 ± 0.1
∑ Ramificados	1.6 ± 0.2	4.0 ± 7.0	1.9 ± 0.3	1.9 ± 0.3
14:1	0.1 ± 0.02	0.2 ± 1.5	0.1 ± 0.02	0.1 ± 0.02
14:1	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.03	0.1 ± 0.03
14:1	1.0 ± 0.3	1.4 ± 0.8	1.1 ± 0.2	0.8 ± 0.2
15:1 n-5	0.1 ± 0.02	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1
16:1 n-9	0.7 ± 0.1	0.9 ± 3.4	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.2
16:1 n-7	14.2 ± 2.8	10.8 ± 3.9	15.4 ± 1.8	12.2 ± 1.2
16:1 n-5	0.2 ± 0.03	1.4 ± 4.1	0.2 ± 0.02	0.1 ± 0.01

Tabla 7. continuación...

17:1 n-7	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1
18:1 n-9	27.0 ± 1.1	23.6 ± 8.5	27.7 ± 1.0	28.9 ± 2.0
18:1 n-7	3.5 ± 0.3	3.9 ± 8.5	3.6 ± 0.3	3.6 ± 0.1
18:1 n-5	0.2 ± 0.01	0.6 ± 1.3	0.2 ± 0.03	0.2 ± 0.03
20:1 n-11	0.6 ± 0.1	2.0 ± 0.6	0.6 ± 0.1	0.9 ± 0.3
20:1 n-9	3.2 ± 0.9	4.0 ± 1.0	3.4 ± 0.4	3.8 ± 0.8
20:1 n-7	0.2 ± 0.04	0.4 ± 1.4	0.2 ± 0.02	0.2 ± 0.05
22:1 n-11	0.3 ± 0.04	0.7 ± 0.3	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1
22:1 n-9	0.4 ± 0.1	0.7 ± 0.3	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.02
24:1 n-9	1.0 ± 0.5	1.2 ± 2.2	0.7 ± 0.4	0.7 ± 0.3
∑ Mono-Insaturados	53.8 ± 6.4	53.5 ± 38.3	56.3 ± 4.7	54.5 ± 5.6
16:3 n-3	0.1 ± 0.02	0.3 ± 0.3	0.1 ± 0.03	0.1 ± 0.01
18:2 n-6	0.7 ± 0.03	1.2 ± 0.6	0.8 ± 0.01	0.7 ± 0.1
18:3 n-6	0.2 ± 0.02	0.4 ± 0.3	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.02
18:3 n-3	0.3 ± 0.02	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.02
18:4 n-3	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01
20:2 n-6	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1
20:3 n-6	0.2 ± 0.03	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.05
20:3 n-3	0.3 ± 0.04	0.4 ± 0.9	0.2 ± 0.04	0.2 ± 0.04
20:4 n-6	2.8 ± 0.6	2.6 ± 0.9	2.8 ± 1.0	2.7 ± 1.1
20:5 n-6	0.3 ± 0.03	0.6 ± 0.3	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.03
20:5 n-3	3.0 ± 0.7	2.8 ± 0.9	2.9 ± 0.5	2.9 ± 0.6
22:2 n-6	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.4	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.1
22:4 n-6	1.1 ± 0.3	0.7 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.7 ± 0.1
22:5 n-6	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.03	0.4 ± 0.1
22:5 n-3	2.3 ± 0.6	2.7 ± 0.8	1.9 ± 0.5	2.4 ± 0.6
22:6 n-3	6.4 ± 2.6	6.3 ± 2.4	5.5 ± 0.7	6.6 ± 2.4
∑ Poli-Insaturados	18.5 ± 5.3	20.1 ± 8.6	17.1 ± 3.6	18.3 ± 5.4
18:2 n-6	0.7 ± 0.03	1.2 ± 0.6	0.8 ± 0.01	0.7 ± 0.1
18:3 n-3	0.3 ± 0.02	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.02
20:4 n-6	2.8 ± 0.6	2.6 ± 0.9	2.8 ± 1.0	2.7 ± 1.1
20:5 n-3	3.0 ± 0.7	2.8 ± 0.9	2.9 ± 0.5	2.9 ± 0.6
22:6 n-3	6.4 ± 2.6	6.3 ± 2.4	5.5 ± 0.7	6.6 ± 2.4
∑ Esenciales	13.0 ± 4.0	13.0 ± 5.0	12.0 ± 2.0	13.0 ± 4.0
14:1	0.1 ± 0.02	0.2 ± 1.5	0.1 ± 0.02	0.1 ± 0.02
14:1	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.03	0.1 ± 0.03
14:1	1.0 ± 0.3	1.4 ± 0.8	1.1 ± 0.2	0.8 ± 0.2
16:1 n-9	0.7 ± 0.1	0.9 ± 3.4	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.2
16:1 n-5	0.2 ± 0.03	1.4 ± 4.1	0.2 ± 0.02	0.1 ± 0.01

Tabla 7. continuación...

16:3 n-3	0.1 ± 0.02	0.3 ± 0.3	0.1 ± 0.03	0.1 ± 0.01
17:1 n-7	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1
18:0	5.1 ± 0.9	4.2 ± 1.6	4.4 ± 1.0	5.0 ± 1.0
18:1 n-9	27.0 ± 1.1	23.6 ± 8.5	27.7 ± 1.0	28.9 ± 2.0
18:1 n-5	0.2 ± 0.01	0.6 ± 1.3	0.2 ± 0.03	0.2 ± 0.03
21:0	0.1 ± 0.03	0.3 ± 0.3	0.1 ± 0.02	0.1 ± 0.02
22:0	0.1 ± 0.02	0.3 ± 1.0	0.1 ± 0.03	0.1 ± 0.02
23:0	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.03
24:0	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.9	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.1
20:2 n-6	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1
20:3 n-3	0.3 ± 0.04	0.4 ± 0.9	0.2 ± 0.04	0.2 ± 0.04
24:1 n-9	1.0 ± 0.5	1.2 ± 2.2	0.7 ± 0.4	0.7 ± 0.3
∑ De novo	50.2 ± 4.4	47.2 ± 30.3	49.9 ± 5.3	51.7 ± 5.4
16:3 n-3	0.1 ± 0.02	0.3 ± 0.3	0.1 ± 0.03	0.1 ± 0.01
18:3 n-3	0.3 ± 0.02	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.02
18:4 n-3	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01
20:3 n-3	0.3 ± 0.04	0.4 ± 0.9	0.2 ± 0.04	0.2 ± 0.04
20:5 n-3	3.0 ± 0.7	2.8 ± 0.9	2.9 ± 0.5	2.9 ± 0.6
22:5 n-3	2.3 ± 0.6	2.7 ± 0.8	1.9 ± 0.5	2.4 ± 0.6
22:6 n-3	6.4 ± 2.6	6.3 ± 2.4	5.5 ± 0.7	6.6 ± 2.4
∑ ω-3	12.5 ± 4.0	13.1 ± 5.8	11.1 ± 1.9	12.6 ± 3.8
18:2 n-6	0.7 ± 0.03	1.2 ± 0.6	0.8 ± 0.01	0.7 ± 0.1
18:3 n-6	0.2 ± 0.02	0.4 ± 0.3	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.02
20:2 n-6	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1
20:3 n-6	0.2 ± 0.03	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.05
20:4 n-6	2.8 ± 0.6	2.6 ± 0.9	2.8 ± 1.0	2.7 ± 1.1
20:5 n-6	0.3 ± 0.03	0.6 ± 0.3	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.03
22:2 n-6	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.4	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.1
22:4 n-6	1.1 ± 0.3	0.7 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.7 ± 0.1
22:5 n-6	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.03	0.4 ± 0.1
∑ ω-6	6.2 ± 1.3	7.3 ± 3.2	6.2 ± 1.8	5.9 ± 1.6

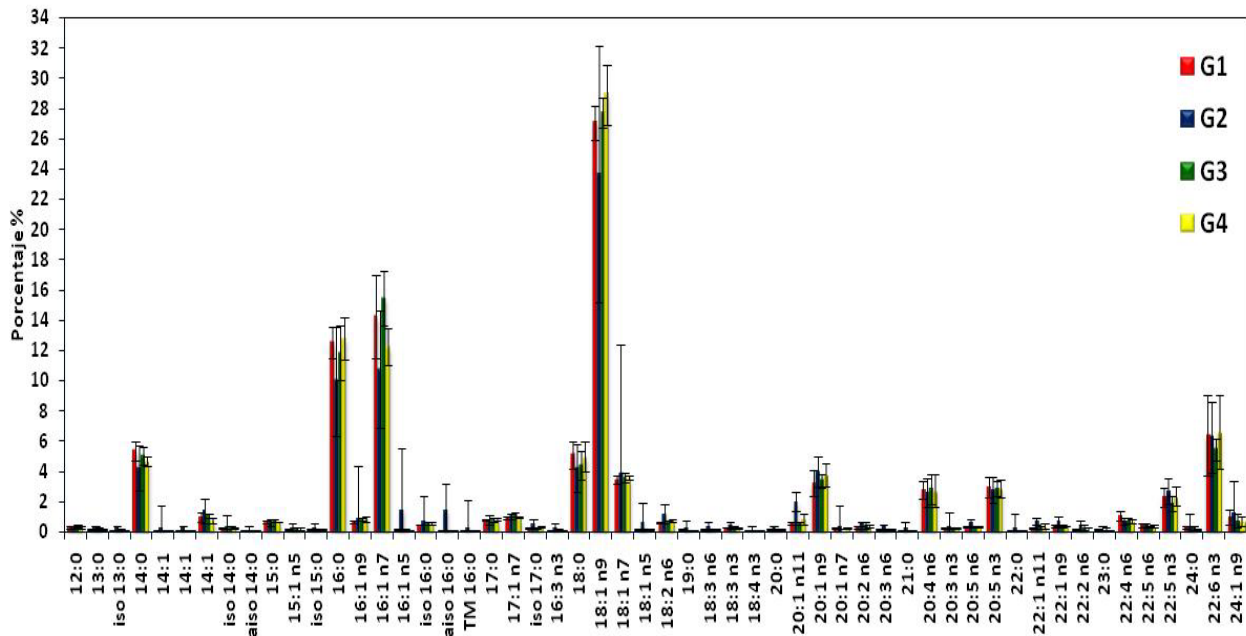


Figura 15. Perfil de ácidos grasos de reserva en piel de *G. macrorhynchus* en el Golfo de California. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza al 95%.

Se realizó un ACP considerando los 54 ácidos grasos identificados en lípidos neutros de piel. Al igual que en la grasa la mayoría de los calderones tuvieron valores promedio. Los 3 primeros componentes explicaron el 80% de la varianza. El CP1 explicó el 62% de la varianza y solamente separó a un individuo del grupo 2, siendo significativos gran parte de los ácidos grasos (Fig. 16). El CP2 explicó el 11% de la varianza y separó a un individuo del grupo 1. Los AG que contribuyeron de manera significativa a dicha separación fueron el 22:5 n-3 y 22: 6 n-3 (Fig. 16).

El CP3 explicó el 6% de la varianza y separó a otro individuo del grupo 1. Los AG que contribuyeron de manera significativa a esta separación fueron los AGPI 20:4n-6 y 22:4n-6 (Fig. 17).

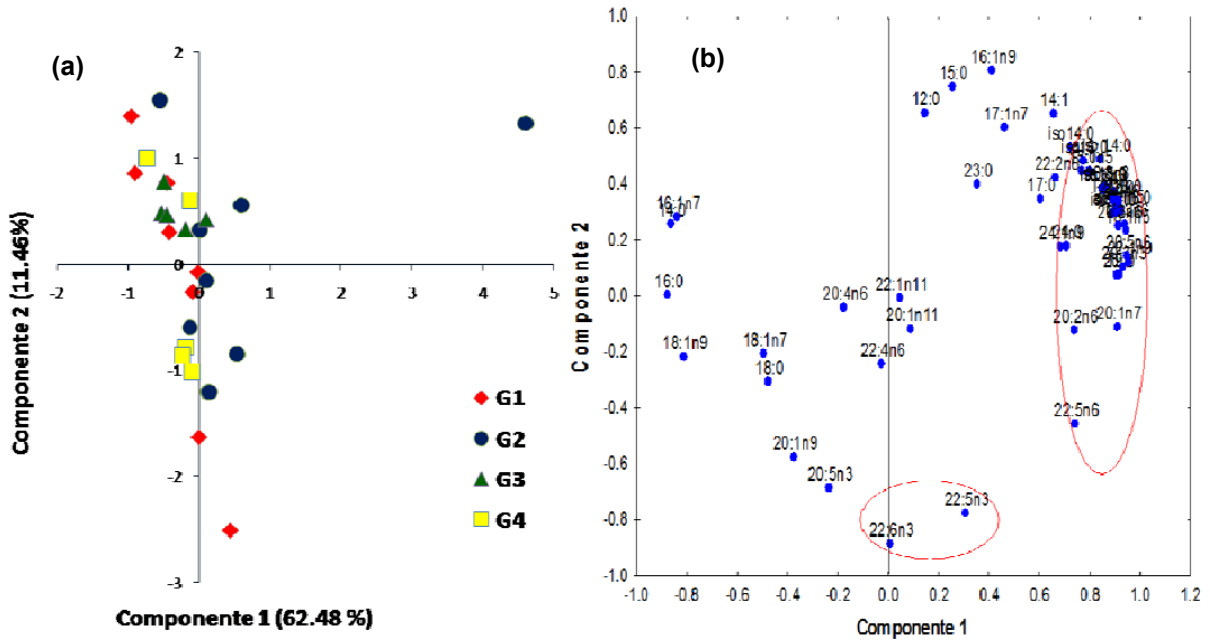


Figura 16. Análisis de componentes principales de los AG de los lípidos de reserva en piel de grupos de calderones, (a) Valores de AG del CP1 vs CP2; (b) Peso de cada ácido graso en los componentes, los círculos encierran los AG con coeficientes de correlación mayor a 0.7.

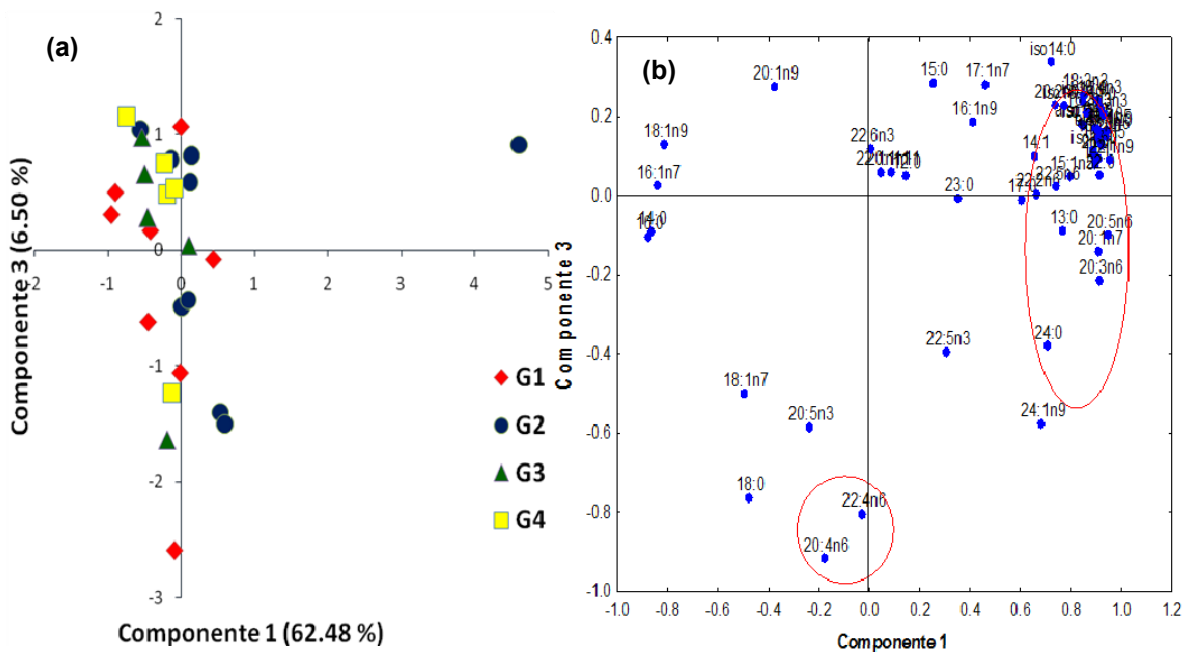


Figura 17. Análisis de componentes principales de los AG de los lípidos de reserva en piel de grupos de calderones, (a) Valores de AG del CP1 vs CP3; (b) Peso de cada ácido graso en los componentes, los círculos encierran los AG con coeficientes de correlación mayor a 0.7.

Al seleccionar los ácidos grasos reportados como biomarcadores tróficos (Tabla 6) y realizar un AFD, se observó una separación entre grupos (Lambda de Wilks: 0.00206, $F_{(48,24)} = 3.5845$, $p < 0.0005$); no hubo una separación significativa entre los grupos 1 y 3 ($p > 0.05$) (Fig.18, Tabla 8). No se encontraron ácidos grasos que contribuyeran de manera significativa en el análisis. La matriz de clasificación de grupos indicó que todos los individuos estuvieron correctamente clasificados en los grupos correspondientes como fueron avistados (Tabla 9).

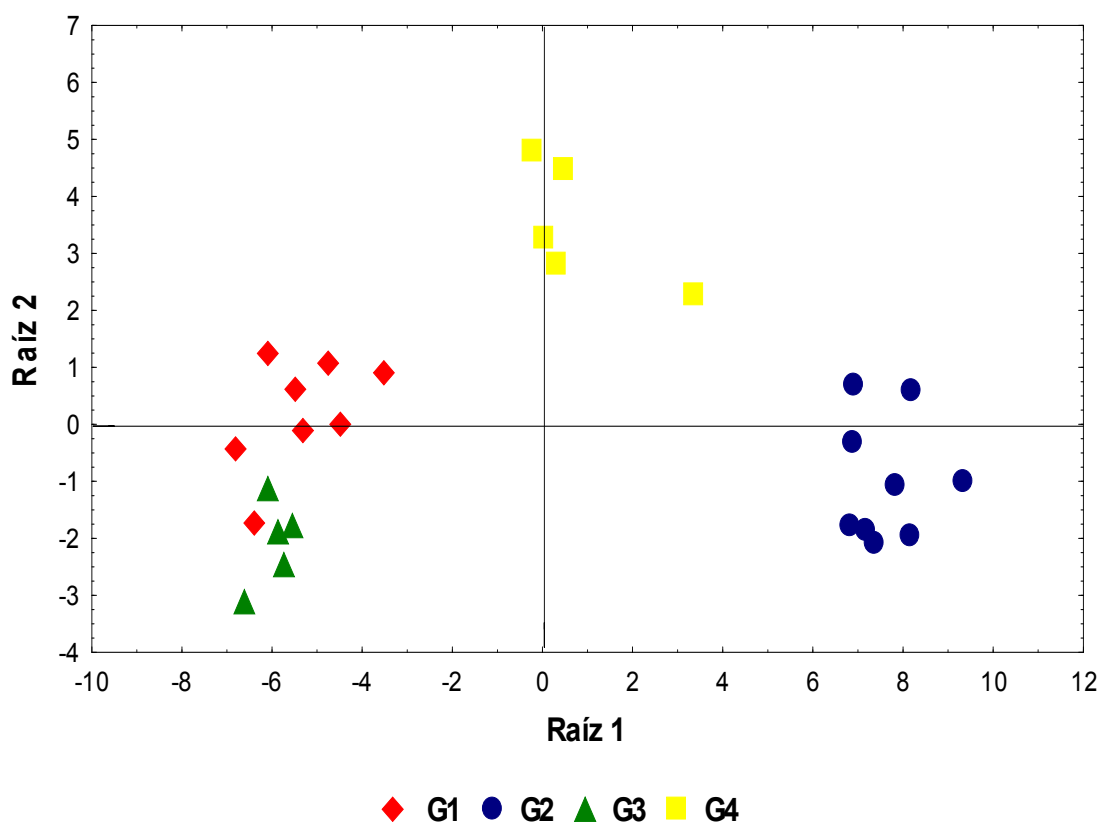


Figura 18. Análisis de funciones discriminantes entre grupos de calderones determinado por biomarcadores tróficos en lípidos de reserva en la piel.

Tabla 8. Valores de probabilidad de diferencia entre grupos de calderones. Se considera diferencia significativa cuando $p < 0.05$.

Grupo	G_1:1	G_2:2	G_3:3	G_4:4
G_1:1		0.000217	0.602101	0.038903
G_2:2	0.000217		0.000520	0.016780
G_3:3	0.602101	0.000520		0.027377
G_4:4	0.038903	0.016780	0.027377	

Tabla 9. Matriz de clasificación de grupos de calderones. Lípidos de reserva en piel.

Renglon: Clasificación Observada					
Columnas: Clasificación calculada					
	Porcentaje correcto	G_1:1 $p=0.296$	G_2:2 $p=0.333$	G_3:3 $p=0.185$	G_4:4 $p=0.185$
G_1:1	100	8	0	0	0
G_2:2	100	0	9	0	0
G_3:3	100	0	0	5	0
G_4:4	100	0	0	0	5
Total	100	8	9	5	5

VIII.2.3. Identificación de Rutas Tróficas mediante Biomarcadores del alimento en Lípidos Neutros

Se sugieren 6 posibles rutas tróficas que tienen como depredador tope al calderón de aletas cortas en el Golfo de California. Las posibles rutas se muestran en la Fig. 19 y los ácidos grasos característicos de las rutas fueron los siguientes: 14:0, iso 14:0, iso 15:0, TM 16:0, iso 17:0, 18:3 n-3, 18:4 n-3, 20:1 n-9, 20:4 n-6, 20:5 n-3, 22:6 n-3, 20:1n-11 y 22:1 n-11. La suma de dichos AG se utilizó como biomarcador y se compararon los grupos utilizando un ANOVA de una vía, dando como resultado 3 rutas tróficas (Tabla 1). Para el grupo 3 se detectó una tendencia hacia la ruta merluza-detritus sin diferencias significativas entre grupos, $F_{(3,23)}=1.0879$, $p=0.37404$

(Fig. 20-A). Para el grupo 2 la ruta detectada fue la de mictófidios-zooplancton con diferencias significativas, $F_{(3,23)} = 38.533$, $p = 0.00001$ (Fig. 20-B). Con respecto a los grupos 1 y 4 la ruta detectada fue la de calamar-sardina con diferencias significativas, $F_{(3,23)} = 8.2343$, $p = 0.00067$ (Fig. 20-C), lo que dio lugar a estas alternativas de alimentación para cada grupo.

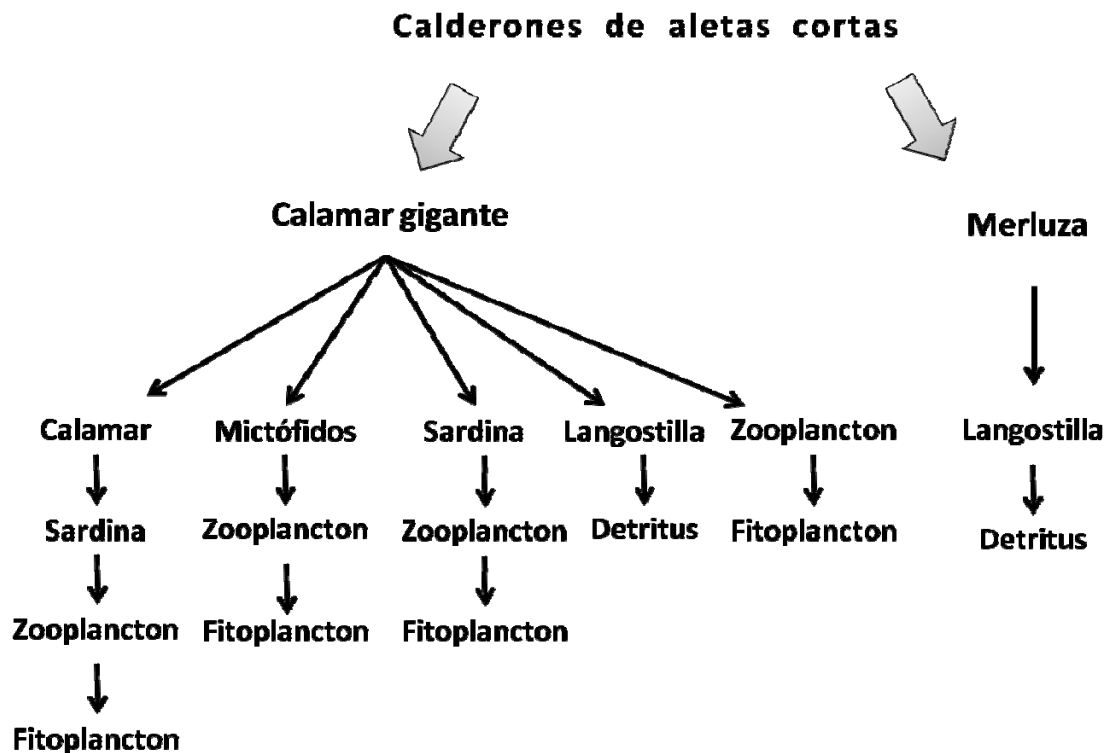


Figura 19. Posibles rutas tróficas de los grupos de calderones.

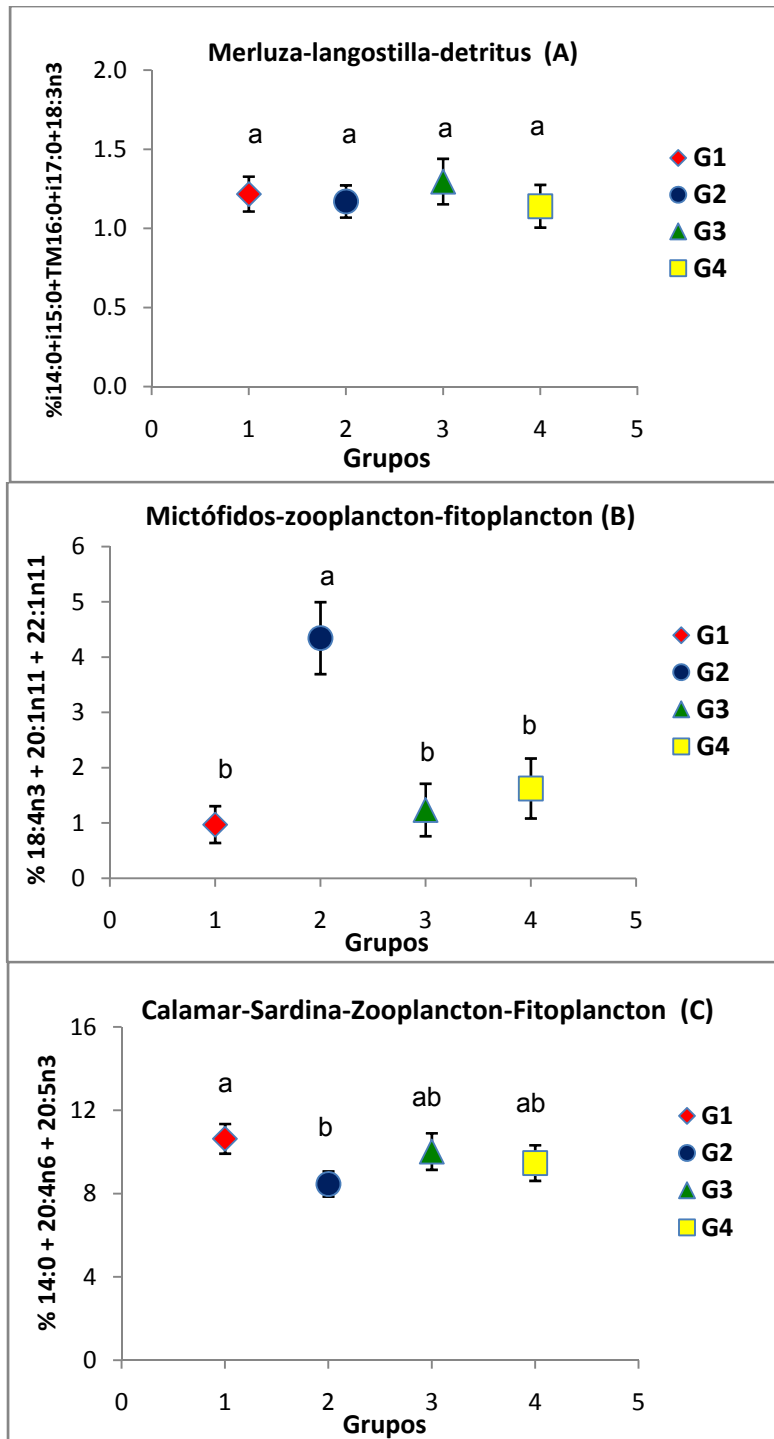


Figura 20. Rutas tróficas de los grupos de calderones usando biomarcadores tróficos. A) Porcentaje de los biomarcadores de la ruta trófica calderón–merluza– langostilla–detritus, B) Porcentaje de los biomarcadores de la ruta trófica Calderón-calamar-mictófidos-zooplancton-fitoplancton y C) Porcentaje de los biomarcadores de la ruta trófica Calderón-calamar-sardina-zooplancton-fitoplancton. ^aValores significativamente mayores; ^{ab}valores intermedios; ^bvalores significativamente menores. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza al 95%.

VIII.2.4. Ácidos Grasos presentes en Lípidos Estructurales (Polares)

En Grasa:

Se detectaron 49 ácidos grasos polares (fosfolípidos estructurales que se utilizan para formar membranas) en grasa de calderón de aletas cortas, el mayor porcentaje estuvo compuesto por los ácidos grasos saturados (16:0 y 18:0), monoinsaturado (18:1n-9), así como los poliinsaturados (20:4n-6, 22:6n-3 y 24:1n-9) de los 4 grupos (Tabla 10, Fig. 21).

Tabla 10. Porcentaje de los ácidos grasos con respecto al total de AG estructurales en grasa. Se muestra el intervalo de confianza del promedio del porcentaje al 95%.

Ácido graso	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
12:0	1.1 ± 0.7	1.8 ± 0.7	0.8 ± 0.5	1.0 ± 0.4
13:0	0.7 ± 0.3	1.5 ± 0.6	0.6 ± 0.5	0.8 ± 0.4
14:0	1.2 ± 0.2	1.7 ± 0.5	1.4 ± 0.7	1.6 ± 0.4
15:0	0.6 ± 0.3	0.9 ± 0.3	0.5 ± 0.2	0.6 ± 0.3
16:0	5.1 ± 1.9	4.8 ± 1.2	6.9 ± 2.5	6.3 ± 1.6
17:0	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.2 ± 0.2	1.3 ± 0.2
18:0	6.9 ± 2.5	4.8 ± 2.4	8.4 ± 3.2	8.3 ± 2.9
19:0	1.6 ± 0.6	1.2 ± 0.3	0.9 ± 0.4	1.1 ± 0.3
20:0	2.1 ± 0.4	1.6 ± 0.3	1.6 ± 0.3	1.9 ± 0.4
21:0	1.1 ± 0.3	1.4 ± 0.3	0.9 ± 0.4	1.2 ± 0.5
22:0	2.0 ± 0.2	1.8 ± 0.3	1.6 ± 0.4	1.6 ± 0.5
23:0	1.7 ± 0.6	1.7 ± 0.3	1.6 ± 0.5	1.5 ± 0.5
24:0	2.5 ± 0.4	2.4 ± 0.4	1.9 ± 0.7	2.5 ± 0.5
∑ Saturados	27.9 ± 8.5	26.6 ± 7.9	28.4 ± 10.6	29.8 ± 8.9
iso 13:0	0.8 ± 0.3	1.6 ± 0.5	0.7 ± 0.6	1.0 ± 0.3
iso 14:0	0.7 ± 0.2	1.2 ± 0.3	0.6 ± 0.3	0.6 ± 0.4
aiso 14:0	0.7 ± 0.2	1.0 ± 0.2	0.5 ± 0.3	0.7 ± 0.3
iso 15:0	0.8 ± 0.3	1.0 ± 0.3	0.6 ± 0.3	0.7 ± 0.3
aiso 15:0	0.7 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.5 ± 0.3	0.6 ± 0.3
iso 16:0	1.3 ± 0.5	1.1 ± 0.3	0.9 ± 0.3	1.3 ± 0.5
aiso 16:0	1.2 ± 0.3	1.1 ± 0.2	0.7 ± 0.3	0.9 ± 0.3
TM 16:0	0.4 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.4 ± 0.4	0.6 ± 0.3
iso 17:0	1.2 ± 0.3	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.3	1.2 ± 0.5
aiso 17:0	0.9 ± 0.3	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.4	0.8 ± 0.4
∑ Ramificados	8.7 ± 2.7	10.0 ± 2.7	6.4 ± 3.6	8.4 ± 3.6

Tabla 10. *continuación...*

14:1	0.8 ± 0.3	1.3 ± 0.5	0.5 ± 0.3	0.9 ± 0.6
15:1 n-5	0.9 ± 0.3	1.1 ± 0.3	0.7 ± 0.2	0.8 ± 0.4
16:1 n-9	1.0 ± 0.3	1.4 ± 0.4	0.7 ± 0.2	1.6 ± 0.6
16:1 n-7	2.5 ± 0.6	1.5 ± 0.6	3.0 ± 1.5	1.5 ± 1.2
17:1 n-7	1.1 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.4	1.2 ± 0.4
18:1 n-9	5.5 ± 2.6	6.2 ± 2.5	10.6 ± 5.2	7.5 ± 3.5
18:1 n-7	1.7 ± 0.7	1.6 ± 0.5	2.0 ± 0.5	1.5 ± 0.3
20:1 n-11	2.0 ± 0.5	1.5 ± 0.3	1.4 ± 0.8	1.5 ± 0.3
20:1 n-9	1.2 ± 0.5	2.8 ± 0.9	2.4 ± 1.3	2.0 ± 0.9
20:1 n-7	1.4 ± 0.8	1.9 ± 1.0	1.8 ± 2.3	1.2 ± 0.6
22:1 n-11	1.6 ± 0.4	2.2 ± 0.7	1.7 ± 0.8	1.9 ± 0.9
22:1 n-9	1.8 ± 0.7	1.9 ± 0.3	2.4 ± 1.6	2.2 ± 0.9
24:1 n-9	6.0 ± 1.0	5.2 ± 1.1	5.6 ± 1.6	5.4 ± 2.0
∑ Mono- Insaturados	27.6 ± 8.8	29.3 ± 9.1	33.7 ± 16.5	29.2 ± 12.3
18:2 n-6	2.9 ± 1.1	1.4 ± 0.2	1.2 ± 0.3	2.1 ± 1.0
18:3 n-6	1.3 ± 0.4	1.2 ± 0.3	0.8 ± 0.6	1.3 ± 0.4
18:3 n-3	1.3 ± 0.5	2.3 ± 1.4	0.8 ± 0.6	1.4 ± 0.9
20:2 n-6	2.4 ± 1.9	2.1 ± 0.5	1.1 ± 0.5	1.5 ± 0.7
20:3 n-6	1.3 ± 0.3	1.9 ± 0.4	1.3 ± 0.6	1.6 ± 0.9
20:4 n-6	5.4 ± 1.2	3.9 ± 1.5	6.2 ± 2.2	5.3 ± 1.8
20:3 n-3	1.5 ± 0.2	1.7 ± 0.4	1.2 ± 0.3	1.4 ± 0.8
20:5 n-3	4.2 ± 1.1	2.5 ± 0.7	4.1 ± 1.1	3.7 ± 1.0
22:2 n-6	1.7 ± 0.4	2.0 ± 0.2	1.4 ± 0.6	1.4 ± 0.4
22:4 n-6	3.3 ± 0.4	3.7 ± 0.9	2.7 ± 0.9	1.9 ± 0.5
22:5 n-6	2.7 ± 1.1	2.5 ± 0.3	2.0 ± 0.7	2.5 ± 0.7
22:5 n-3	3.0 ± 0.5	3.8 ± 1.3	2.8 ± 0.5	3.8 ± 0.4
22:6 n-3	4.7 ± 1.1	5.0 ± 1.2	5.9 ± 1.8	4.6 ± 1.4
∑ Poli- Insaturados	35.8 ± 10.2	34.2 ± 9.4	31.6 ± 10.5	32.6 ± 10.8
18:2 n-6	2.9 ± 1.1	1.4 ± 0.2	1.2 ± 0.3	2.1 ± 1.0
18:3 n-3	1.3 ± 0.5	2.3 ± 1.4	0.8 ± 0.6	1.4 ± 0.9
20:4 n-6	5.4 ± 1.2	3.9 ± 1.5	6.2 ± 2.2	5.3 ± 1.8
20:5 n-3	4.2 ± 1.1	2.5 ± 0.7	4.1 ± 1.1	3.7 ± 1.0
22:6 n-3	4.7 ± 1.1	5.0 ± 1.2	5.9 ± 1.8	4.6 ± 1.4
∑ Esenciales	19.0 ± 5.0	15.0 ± 5.0	18.0 ± 6.0	17.0 ± 6.0
12:0	1.1 ± 0.7	1.8 ± 0.7	0.8 ± 0.5	1.0 ± 0.4
13:0	0.7 ± 0.3	1.5 ± 0.6	0.6 ± 0.5	0.8 ± 0.4
14:1	0.8 ± 0.3	1.3 ± 0.5	0.5 ± 0.3	0.9 ± 0.6
15:1 n-5	0.9 ± 0.3	1.1 ± 0.3	0.7 ± 0.2	0.8 ± 0.4
16:1 n-9	1.0 ± 0.3	1.4 ± 0.4	0.7 ± 0.2	1.6 ± 0.6

Tabla 10. *continuación...*

16:1 n-7	2.5 ± 0.6	1.5 ± 0.6	3.0 ± 1.5	1.5 ± 1.2
17:1 n-7	1.1 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.4	1.2 ± 0.4
20:1 n-11	2.0 ± 0.5	1.5 ± 0.3	1.4 ± 0.8	1.5 ± 0.3
20:1 n-9	1.2 ± 0.5	2.8 ± 0.9	2.4 ± 1.3	2.0 ± 0.9
20:1 n-7	1.4 ± 0.8	1.9 ± 1.0	1.8 ± 2.3	1.2 ± 0.6
22:1 n-11	1.6 ± 0.4	2.2 ± 0.7	1.7 ± 0.8	1.9 ± 0.9
22:1 n-9	1.8 ± 0.7	1.9 ± 0.3	2.4 ± 1.6	2.2 ± 0.9
24:1 n-9	6.0 ± 1.0	5.2 ± 1.1	5.6 ± 1.6	5.4 ± 2.0
22:0	2.0 ± 0.2	1.8 ± 0.3	1.6 ± 0.4	1.6 ± 0.5
23:0	1.7 ± 0.6	1.7 ± 0.3	1.6 ± 0.5	1.5 ± 0.5
24:0	2.5 ± 0.4	2.4 ± 0.4	1.9 ± 0.7	2.5 ± 0.5
20:2 n-6	2.4 ± 1.9	2.1 ± 0.5	1.1 ± 0.5	1.5 ± 0.7
22:2 n-6	1.7 ± 0.4	2.0 ± 0.2	1.4 ± 0.6	1.4 ± 0.4
∑ De novo	36.8 ± 11.1	39.0 ± 10.4	33.1 ± 15.5	34.4 ± 13.4
18:3 n-3	1.3 ± 0.5	2.3 ± 1.4	0.8 ± 0.6	1.4 ± 0.9
20:3 n-3	1.5 ± 0.2	1.7 ± 0.4	1.2 ± 0.3	1.4 ± 0.8
20:5 n-3	4.2 ± 1.1	2.5 ± 0.7	4.1 ± 1.1	3.7 ± 1.0
22:5 n-3	3.0 ± 0.5	3.8 ± 1.3	2.8 ± 0.5	3.8 ± 0.4
22:6 n-3	4.7 ± 1.1	5.0 ± 1.2	5.9 ± 1.8	4.6 ± 1.4
∑ ω-3	14.7 ± 3.4	15.3 ± 5.0	14.9 ± 4.2	14.9 ± 4.4
18:2 n-6	2.9 ± 1.1	1.4 ± 0.2	1.2 ± 0.3	2.1 ± 1.0
18:3 n-6	1.3 ± 0.4	1.2 ± 0.3	0.8 ± 0.6	1.3 ± 0.4
20:2 n-6	2.4 ± 1.9	2.1 ± 0.5	1.1 ± 0.5	1.5 ± 0.7
20:3 n-6	1.3 ± 0.3	1.9 ± 0.4	1.3 ± 0.6	1.6 ± 0.9
20:4 n-6	5.4 ± 1.2	3.9 ± 1.5	6.2 ± 2.2	5.3 ± 1.8
22:2 n-6	1.7 ± 0.4	2.0 ± 0.2	1.4 ± 0.6	1.4 ± 0.4
22:4 n-6	3.3 ± 0.4	3.7 ± 0.9	2.7 ± 0.9	1.9 ± 0.5
22:5 n-6	2.7 ± 1.1	2.5 ± 0.3	2.0 ± 0.7	2.5 ± 0.7
∑ ω-6	21.0 ± 6.8	18.8 ± 4.4	16.7 ± 6.3	17.7 ± 6.4

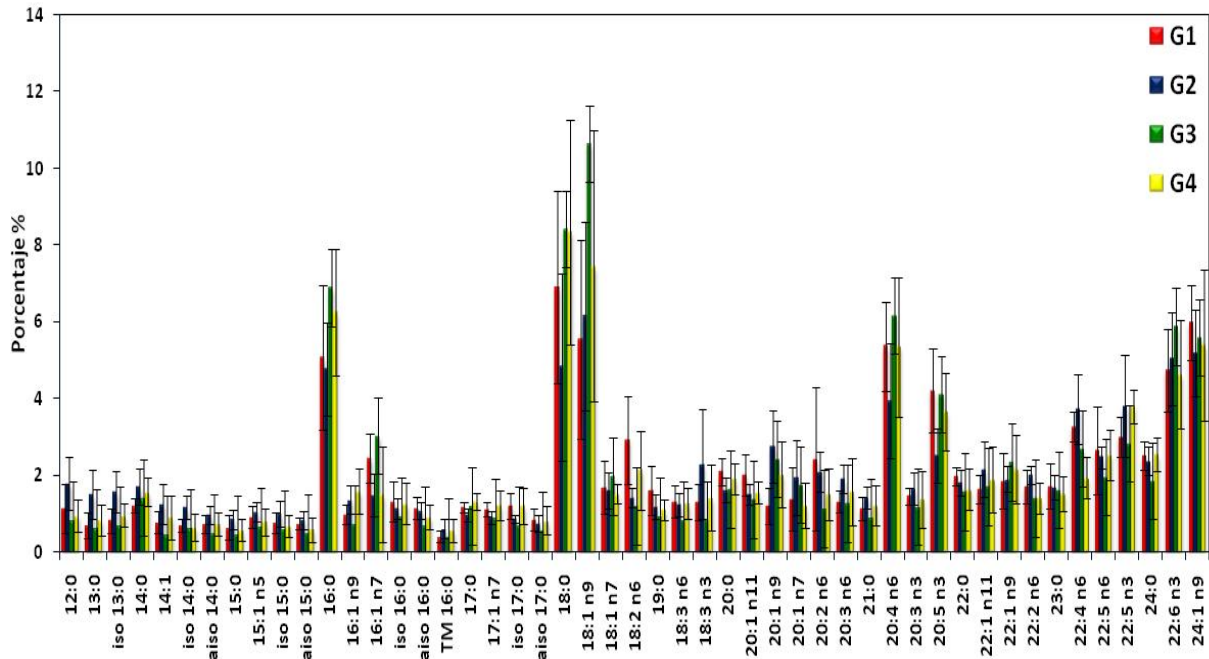


Figura 21. Perfil de ácidos grasos estructurales en grasa de *G. macrorhynchus* en el Golfo de California. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza al 95%.

Mediante un ACP considerando los 49 ácidos grasos identificados en lípidos polares de grasa, los 3 primeros componentes explicaron el 60% de la varianza. El CP1 explicó el 43% de la varianza y separó a un individuo del grupo 1, tres individuos del grupo 2 y un individuo del grupo 3, siendo significativos gran parte de los ácidos grasos (Fig. 22). No se encontró un patrón definido de separación entre los grupos. El CP2 explicó el 10% de la varianza y separó a un individuo del grupo 1. Los AG que contribuyeron de manera significativa a dicha separación fueron el iso17:0, 18:2 n-6 y 20:0 (Fig. 22).

El CP3 explicó el 7% de la varianza y separó a un individuo del grupo 2. Los AG que contribuyeron de manera significativa a esta separación fueron el 18:3 n-3, característico de plantas vasculares, y el 22:1 n-11, característico de zooplancton (Fig. 23).

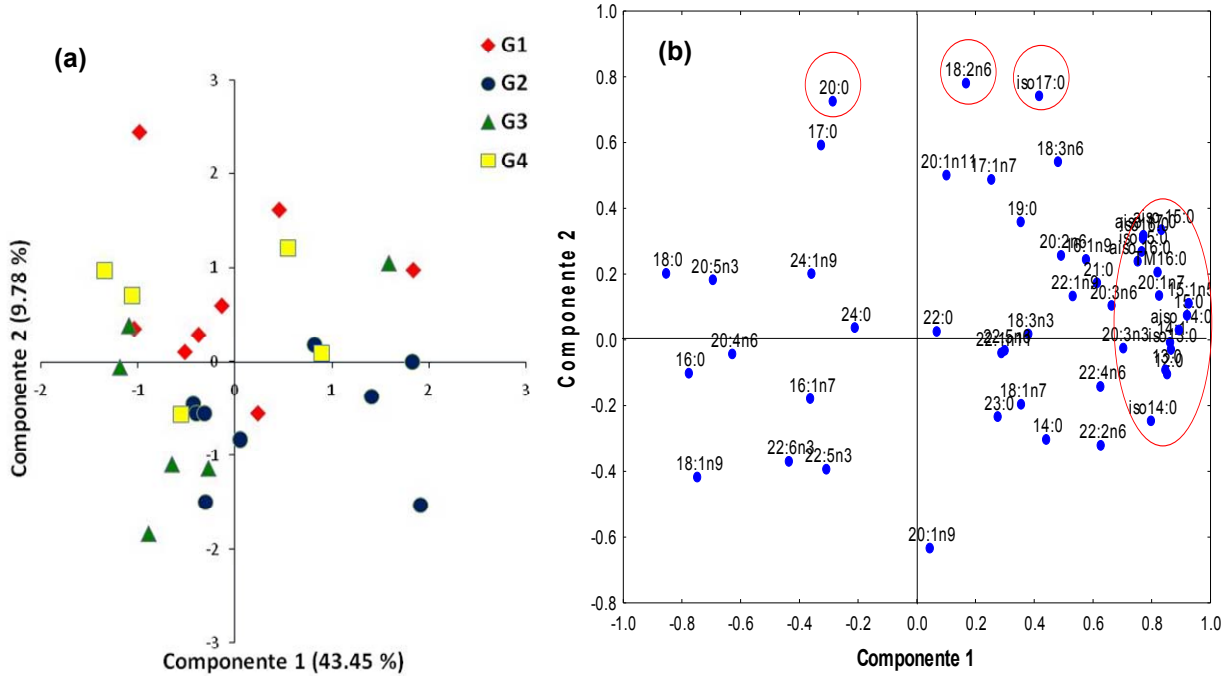


Figura 22. Análisis de componentes principales de los AG de los lípidos polares en grasa de grupos de calderones, (a) Valores de AG del CP1 vs CP2; (b) Peso de cada ácido graso en los componentes, los círculos encierran los AG con coeficientes de correlación mayor a 0.7.

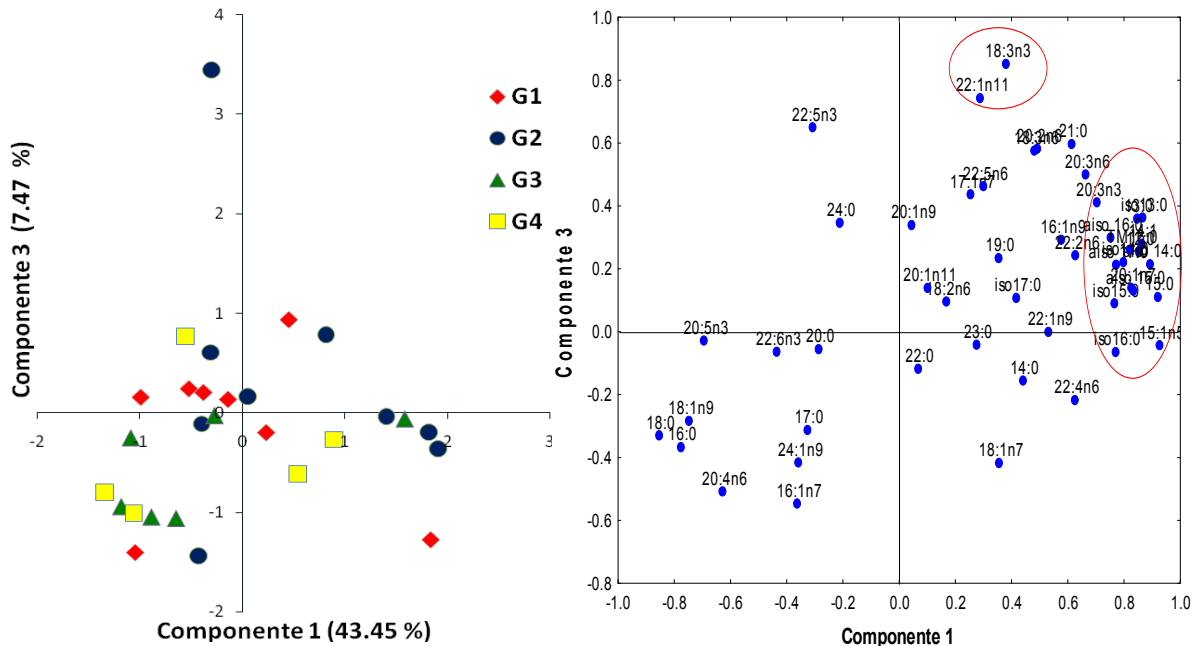


Figura 23. Análisis de componentes principales de los AG de los lípidos polares en grasa de grupos de calderones, (a) Valores de AG del CP1 vs CP3; (b) Peso de cada ácido graso en los componentes, los círculos encierran los AG con coeficientes de correlación mayor a 0.7.

Se seleccionaron los ácidos grasos característicos de fosfolípidos reportados en mamíferos, dado que hasta la fecha no se han reportado ácidos grasos ramificados en las membranas de los mamíferos (Tabla 13), y se realizó un AFD; sin observar una separación significativa entre grupos (Lambda de Wilks: 0.05549, $F_{(42,33)} = 1.3124$ $p < 0.2113$) (Tabla 11, Fig. 24). La matriz de clasificación de grupos indicó que algunos individuos no clasificaron en los grupos correspondientes como fueron avistados, es decir, pertenecían a otro grupo (Tabla 12).

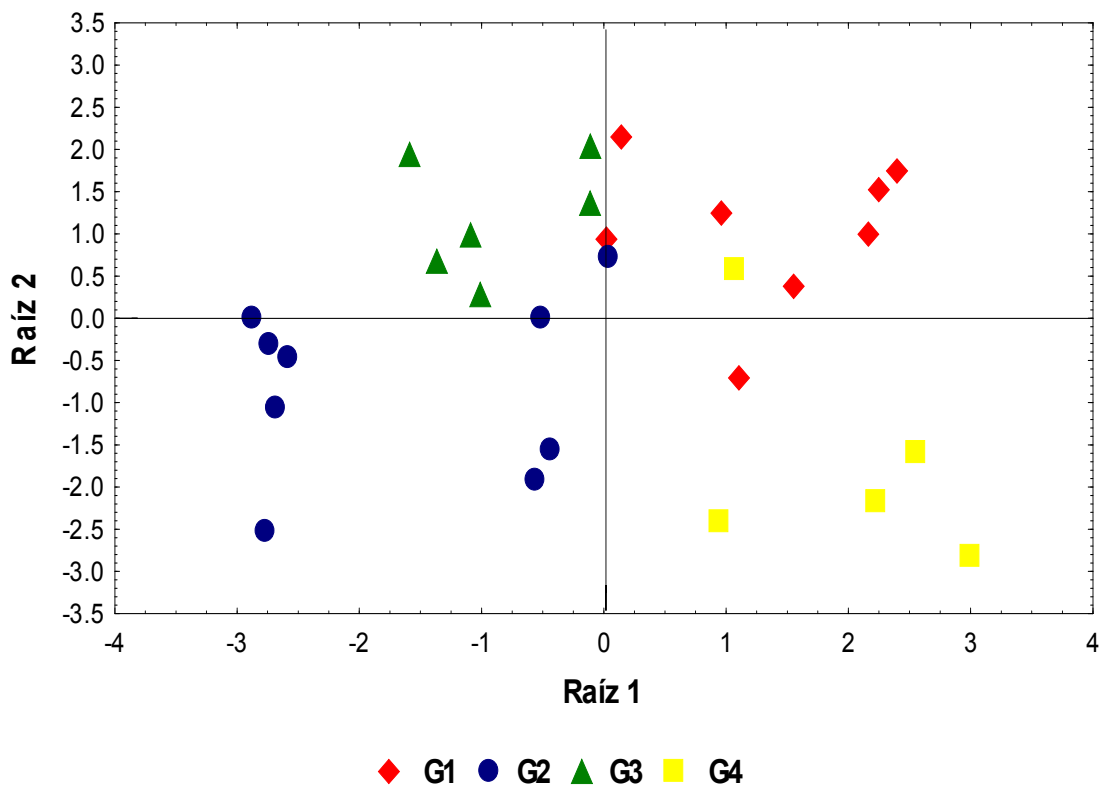


Figura 24. Análisis de funciones discriminantes entre grupos determinado por ácidos grasos comunes en fosfolípidos, identificados en grasa.

Tabla 11. Valores de probabilidad de diferencia entre grupos de calderones. Se considera diferencia significativa cuando $p < 0.05$.

Grupo	G_1:1	G_2:2	G_3:3	G_4:4
G_1:1		0.172030	0.454202	0.493857
G_2:2	0.172030		0.528337	0.214861
G_3:3	0.454202	0.528337		0.280985
G_4:4	0.493857	0.214861	0.280985	

Tabla 12. Matriz de clasificación de grupos de calderones. Lípidos estructurales en grasa.

Renglones: Clasificación Observada Columnas: Clasificación calculada					
	Porcentaje correcto	G_1:1 p=0.286	G_2:2 p=0.321	G_3:3 p=0.214	G_4:4 p=0.179
G_1:1	87.50	7	0	1	0
G_2:2	88.89	0	8	1	0
G_3:3	83.33	0	1	5	0
G_4:4	80	1	0	0	4
Total	85.714	8	9	7	4

Tabla 13. Ácidos grasos característicos de fosfolípidos (Christie, 2003).

Ácido graso
14:0
15:0
16:0
16:1 n11
16:1 n9
17:0
17:1 n9
18:0
18:1 n9 c
18:1 n7 c
18:2 n6 c
20:0
20:4 n6
20:5 n3
22:5 n3
22:6 n3

En Piel:

Se detectaron 40 ácidos grasos estructurales en piel de calderón de aletas cortas, los ácidos grasos más abundantes fueron el 16:0, 18:0, 18:1n-9, 20:4n-6 y 24:1n-9 (Tabla 14), las principales diferencias fueron: los altos porcentajes de los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados del grupo 1 (Fig. 25).

Tabla 14. Porcentaje de los ácidos grasos con respecto al total de AG estructurales en piel. Se muestra el intervalo de confianza del promedio del porcentaje al 95%.

Ácido graso	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
14:0*	2.5 ± 0.5	2.8 ± 0.3	2.8 ± 0.8	2.8 ± 0.7
15:0	0.5 ± 0.2	0.7 ± 0.3	0.6 ± 0.2	0.8 ± 0.4
16:0	15.1 ± 2.1	13.8 ± 1.6	13.6 ± 1.0	15.0 ± 1.3
17:0	1.4 ± 0.2	1.4 ± 0.2	1.7 ± 0.2	1.7 ± 0.4
18:0	14.5 ± 4.2	15.3 ± 1.4	16.6 ± 1.0	16.4 ± 0.4
19:0	0.7 ± 0.2	1.0 ± 0.4	0.7 ± 0.4	0.9 ± 0.9
20:0	1.3 ± 0.2	1.4 ± 0.3	1.4 ± 0.3	1.8 ± 0.8
21:0	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.3
22:0	1.9 ± 0.2	1.5 ± 0.2	1.3 ± 0.4	2.2 ± 1.3
23:0	0.5 ± 0.2	1.1 ± 0.6	0.8 ± 0.3	1.0 ± 0.3
24:0	3.9 ± 1.5	2.6 ± 0.4	3.6 ± 0.7	3.3 ± 1.5
∑ Saturados	42.4 ± 9.6	42.1 ± 5.9	43.4 ± 5.6	46.2 ± 8.4
iso 14:0	traza	traza	traza	traza
iso 15:0	traza	traza	traza	traza
aiso 16:0	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.3	0.6 ± 0.4	0.6 ± 0.5
TM 16:0	traza	traza	traza	traza
iso 17:0	0.4 ± 0.2	0.7 ± 0.3	0.8 ± 0.5	0.4 ± 0.2
aiso 17:0	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.5	0.3 ± 0.4
∑ Ramificados	1.1 ± 0.5	1.6 ± 0.7	1.9 ± 1.3	1.3 ± 1.1
14:1	traza	traza	traza	traza
16:1 n-11	0.4 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.9 ± 0.3	0.8 ± 0.6
16:1 n-9*	2.6 ± 0.5	2.4 ± 0.2	2.4 ± 0.4	1.2 ± 1.0
17:1 n-9	1.1 ± 0.8	1.0 ± 0.4	0.9 ± 0.3	1.5 ± 1.5
18:1 n-9 c	16.2 ± 1.3	16.4 ± 1.0	17.1 ± 1.6	16.3 ± 1.2
18:1 n-7 c	4.3 ± 3.8	3.1 ± 0.3	2.6 ± 0.2	2.5 ± 0.4
20:1 n-13	traza	traza	traza	traza
20:1 n-11	traza	traza	traza	traza
20:1 n-9	traza	traza	traza	traza
22:1 n-13	traza	traza	traza	traza

Tabla 14. *continuación...*

22:1 n-11	traza	traza	traza	traza
22:1 n-9	traza	traza	traza	traza
24:1 n-9	14.9 ± 1.6	13.3 ± 1.5	12.6 ± 2.0	14.7 ± 1.7
∑ Mono-Insaturados	39.5 ± 8.3	36.9 ± 3.4	36.4 ± 4.8	37.0 ± 6.3
18:2 n-6 c	0.9 ± 0.6	1.0 ± 0.2	0.7 ± 0.3	1.0 ± 0.6
20:3 n-6	traza	traza	traza	traza
20:4 n-6*	7.2 ± 2.0	8.0 ± 0.7	9.6 ± 1.1	7.1 ± 1.0
20:4 n-3	traza	traza	traza	traza
20:5 n-6	traza	traza	traza	traza
20:5 n-3	3.2 ± 1.0	4.1 ± 0.5	2.8 ± 1.4	2.1 ± 1.0
22:4 n-6	traza	traza	traza	traza
22:5 n-6	traza	traza	traza	traza
22:5 n-3*	0.7 ± 0.4	2.2 ± 0.4	1.1 ± 0.8	1.2 ± 0.5
22:6 n-3	5.0 ± 2.2	4.1 ± 0.8	4.1 ± 0.9	4.2 ± 2.0
∑ Poli-Insaturados	17.0 ± 6.2	19.4 ± 2.6	18.3 ± 4.4	15.5 ± 5.1
18:2 n-6 c	0.9 ± 0.6	1.0 ± 0.2	0.7 ± 0.3	1.0 ± 0.6
20:4 n-6*	7.2 ± 2.0	8.0 ± 0.7	9.6 ± 1.1	7.1 ± 1.0
20:5 n-3	3.2 ± 1.0	4.1 ± 0.5	2.8 ± 1.4	2.1 ± 1.0
22:6 n-3	5.0 ± 2.2	4.1 ± 0.8	4.1 ± 0.9	4.2 ± 2.0
∑ Esenciales	16.2 ± 5.9	17.2 ± 2.1	17.2 ± 3.6	14.3 ± 4.6
16:1 n-9*	2.6 ± 0.5	2.4 ± 0.2	2.4 ± 0.4	1.2 ± 1.0
21:0	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.3
22:0	1.9 ± 0.2	1.5 ± 0.2	1.3 ± 0.4	2.2 ± 1.3
23:0	0.5 ± 0.2	1.1 ± 0.6	0.8 ± 0.3	1.0 ± 0.3
24:0	3.9 ± 1.5	2.6 ± 0.4	3.6 ± 0.7	3.3 ± 1.5
24:1 n-9	14.9 ± 1.6	13.3 ± 1.5	12.6 ± 2.0	14.7 ± 1.7
∑ De novo	24.0 ± 4.1	21.5 ± 3.1	21.0 ± 4.0	22.8 ± 6.1
20:5 n-3	3.2 ± 1.0	4.1 ± 0.5	2.8 ± 1.4	2.1 ± 1.0
22:5 n-3*	0.7 ± 0.4	2.2 ± 0.4	1.1 ± 0.8	1.2 ± 0.5
22:6 n-3	5.0 ± 2.2	4.1 ± 0.8	4.1 ± 0.9	4.2 ± 2.0
∑ ω-3	8.9 ± 3.6	10.4 ± 1.7	8.0 ± 3.0	7.4 ± 3.6
18:2 n-6 c	0.9 ± 0.6	1.0 ± 0.2	0.7 ± 0.3	1.0 ± 0.6
20:4 n-6*	7.2 ± 2.0	8.0 ± 0.7	9.6 ± 1.1	7.1 ± 1.0
∑ ω-6	8.1 ± 2.6	9.1 ± 0.9	10.4 ± 1.4	8.1 ± 1.6

(*) = ácidos grasos que presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupos, mediante un análisis de funciones discriminantes.

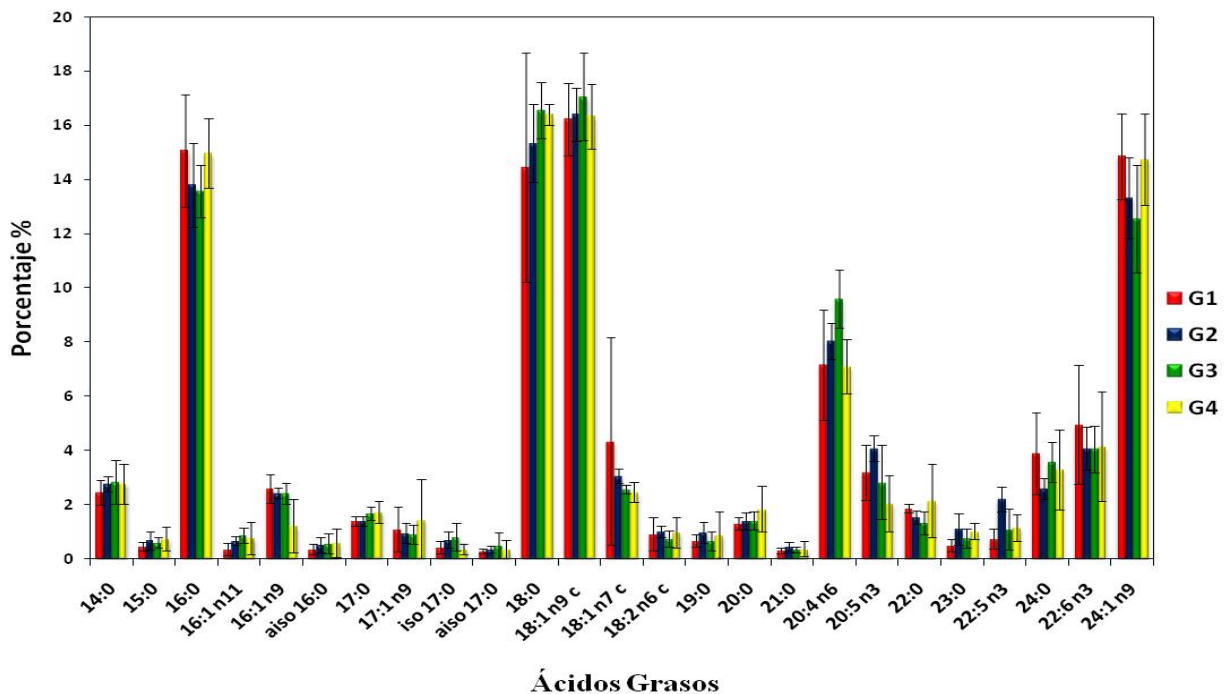


Figura 25. Perfil de ácidos grasos estructurales en piel de *G. macrorhynchus* en el Golfo de California. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza al 95%.

Mediante un ACP considerando los 25 ácidos grasos que presentaron porcentajes mayores al 0.1% e identificados en lípidos polares de piel (Tabla 14), se determinó que los 3 primeros componentes explicaron el 52% de la varianza. La mayoría de los calderones tuvieron valores promedio. El CP1 explicó el 22% de la varianza y separó a un individuo del grupo 2 y un individuo del grupo 4, los AG que contribuyeron a la separación fueron el 15:0, aiso 16:0, 17:0, aiso 17:0 y 21:0 (Fig. 26). El CP2 explicó el 17% de la varianza y separó a un individuo del grupo 1. Los AG que contribuyeron de manera significativa a dicha separación fueron el 18:1 n-7 y 18:2 n-6 (Fig. 26).

El CP3 explicó el 13% de la varianza y hubo una separación de un grupo conformado por tres individuos del grupo 3, dos del grupo 2 y uno del grupo 4 determinada por ácidos grasos ramificados de origen bacteriano (15:0, 17:0, aiso 16:0 y aiso 17:0), así mismo separó dos individuos, uno del grupo 1 y otro del grupo 4, el AG que contribuyó de manera significativa a esta separación fue el 17:1 n-9 (Fig. 27).

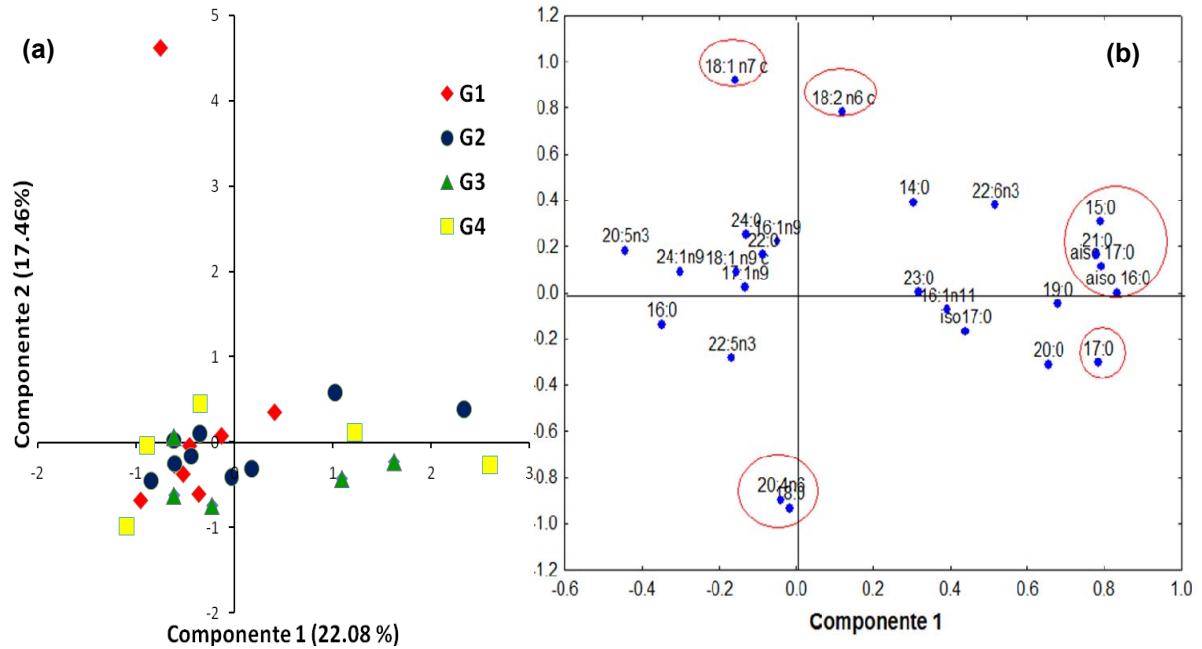


Figura 26. Análisis de componentes principales de los AG de los lípidos polares en piel de grupos de calderones, (a) Valores de AG del CP1 vs CP2; (b) Peso de cada ácido graso en los componentes, los círculos encierran los AG con coeficientes de correlación mayor a 0.7.

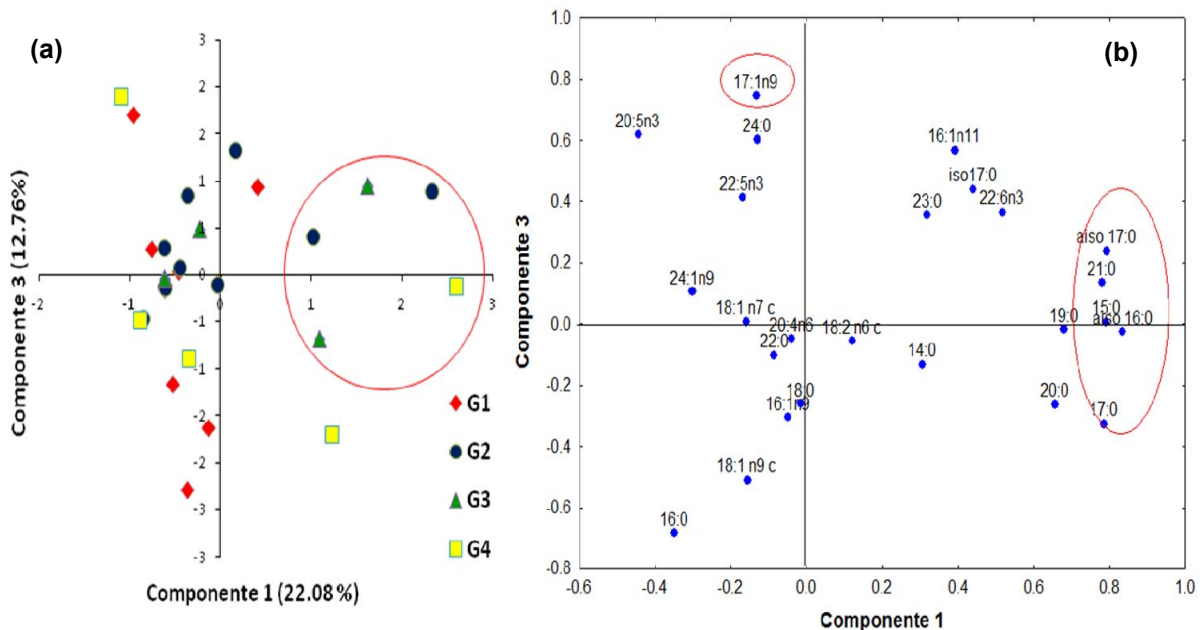


Figura 27. Análisis de componentes principales de los AG de los lípidos polares en piel de grupos de calderones, (a) Valores de AG del CP1 vs CP3; (b) Peso de cada ácido graso en los componentes, los círculos encierran los AG con coeficientes de correlación mayor a 0.7.

VIII.2.5. Identificación de Stocks mediante Fosfolípidos de Piel

Al seleccionar los ácidos grasos característicos de fosfolípidos reportados en mamíferos (Tabla 13) y realizar un AFD, se observó una separación significativa del grupo 1 contra los grupos 2, 3 y 4 (Lambda de Wilks: 0.00311, $F_{(48,24)} = 3.0573$ $p < 0.0018$) (Fig. 28, Tabla 15). Los AG que contribuyeron a la separación de manera significativa fueron 14:0, 16:1 n-9, 20:4 n-6 y 22:5 n-3 (Tabla 14). El grupo 1 se separó por los AG 16:0, 16:1 n-9, 18:1 n-7 y 22:6 n-3. Los grupos 2, 3 y 4 fueron separados por los AG 14:0, 18:0, 16:1 n-11, 20:4 n-6, 20:5 n-3 y 22:5 n-3 (Fig.14). La matriz de clasificación de grupos indicó que todos los individuos estuvieron correctamente clasificados en los grupos correspondientes como fueron avistados (Tabla 16).

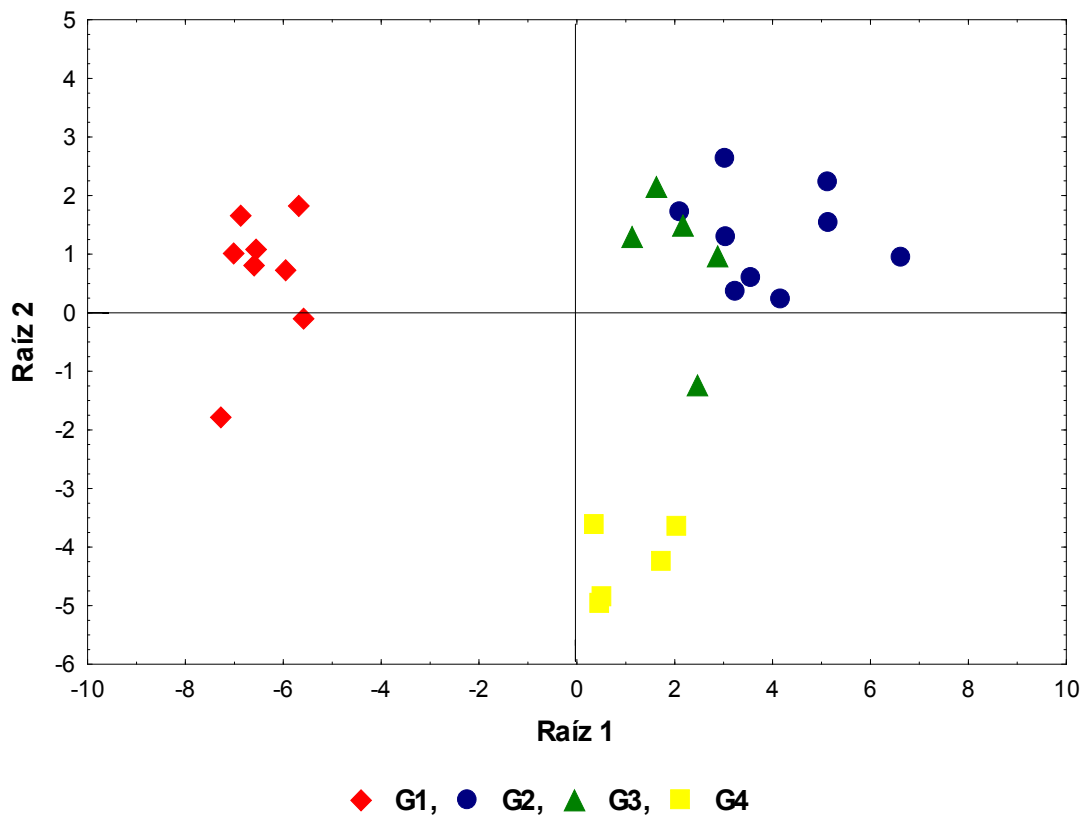


Figura 28. Análisis de funciones discriminantes entre grupos determinado por ácidos grasos presentes en fosfolípidos de la piel.

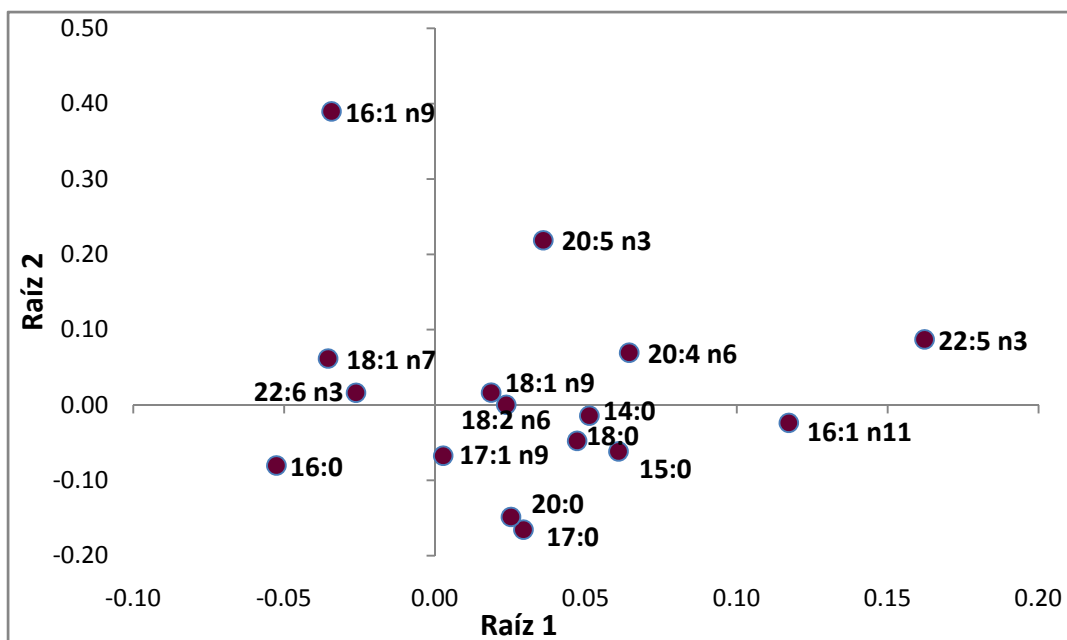


Figura 29. AG de fosfolípidos que contribuyeron a la separación de los grupos en el análisis discriminante.

Tabla 15. Valores de probabilidad de diferencia entre grupos de calderones. Se considera diferencia significativa cuando $p < 0.05$.

Grupo	G_1:1	G_2:2	G_3:3	G_4:4
G_1:1		0.001091	0.012855	0.011767
G_2:2	0.001091		0.582242	0.075201
G_3:3	0.012855	0.582242		0.228902
G_4:4	0.011767	0.075201	0.228902	

Tabla 16. Matriz de clasificación de grupos de calderones. Lípidos estructurales en piel.

Renglones: Clasificación Observada Columnas: Clasificación calculada					
	Porcentaje correcto	G_1:1 $p=0.296$	G_2:2 $p=0.333$	G_3:3 $p=0.185$	G_4:4 $p=0.185$
G_1:1	100	8	0	0	0
G_2:2	100	0	9	0	0
G_3:3	100	0	0	5	0
G_4:4	100	0	0	0	5
Total	100	8	9	5	5

El resultado del análisis de funciones discriminantes sugiere la presencia de 2 stocks de calderones (Fig. 28). Debido a esto se construyó el modelo de funciones de clasificación para cada grupo, sumando el producto de las variables por sus constantes asociadas (a, b, c y d), así como el logaritmo natural de la razón del tamaño de la muestra analizada entre el total de elementos. Así para cada grupo, las funciones fueron de la forma:

$$G1 = -21246.4 + (24598.6 \times (X1)) + (-10529.4 \times (X2)) + (24000.4 \times (X3)) + (7816.4 \times (X4)) + (-4671.6 \times (X5)) + (40617.2 \times (X6)) + (7798.1 \times (X7)) + (-15087 \times (X8)) + (36268 \times (X9)) + (-645.6 \times (X10)) + (1755.8 \times (X11)) + (34425.7 \times (X12)) + (20694.4 \times (X13)) + (17614.9 \times (X14)) + (18045.1 \times (X15)) + (6009.3 \times (X16)) + (\ln 8/27)$$

$$G2 = -23156.3 + (25987.9 \times (X1)) + (-10777 \times (X2)) + (25043.3 \times (X3)) + (8413.7 \times (X4)) + (-5038.7 \times (X5)) + (42220.9 \times (X6)) + (8053.4 \times (X7)) + (-15819.1 \times (X8)) + (37776.8 \times (X9)) + (-689.4 \times (X10)) + (2032.4 \times (X11)) + (35882.1 \times (X12)) + (21816.2 \times (X13)) + (18348.8 \times (X14)) + (18975.5 \times (X15)) + (6105.6 \times (X16)) + (\ln 9/27)$$

$$G3 = -22698.8 + (25845.6 \times (X1)) + (-10719.5 \times (X2)) + (24881.1 \times (X3)) + (8382.9 \times (X4)) + (-4973.8 \times (X5)) + (42007.6 \times (X6)) + (8006.2 \times (X7)) + (-15802.3 \times (X8)) + (37296.7 \times (X9)) + (-692.8 \times (X10)) + (1972.6 \times (X11)) + (35499.1 \times (X12)) + (21769 \times (X13)) + (18126.6 \times (X14)) + (18742.2 \times (X15)) + (5984.5 \times (X16)) + (\ln 5/27)$$

$$G4 = -22430.9 + (25729.2 \times (X1)) + (-10771.5 \times (X2)) + (24761.9 \times (X3)) + (8249.7 \times (X4)) + (-5225.2 \times (X5)) + (41806.4 \times (X6)) + (7991 \times (X7)) + (-15587.4 \times (X8)) + (37188.9 \times (X9)) + (-808.2 \times (X10)) + (2221.8 \times (X11)) + (35242.9 \times (X12)) + (21382.4 \times (X13)) + (17951 \times (X14)) + (18682 \times (X15)) + (5996.4 \times (X16)) + (\ln 5/27)$$

donde:

Xn, corresponden al arcoseno [raíz (% AG)] de los AG: 14:0, 15:0, 16:0, 16:1 n-11, 16:1 n-9, 17:0, 17:1 n-9, 18:0, 18:1 n-9, 18:1 n-7, 18:2 n-6, 20:0, 20:4 n-6, 20:5 n-3, 22:5 n-3 y 22:6 n-3.

VIII.2.6. Comparación de LN en grasa vs LP en piel.

Las diferencias más notables entre los lípidos neutros de la grasa y los lípidos polares de la piel se obtuvieron por los AGMI que fueron más abundantes en grasa, así como los ω -3, en especial el EPA y DHA. Por el contrario, en la piel se encontraron más abundantes los AGS y los ω -6 (Fig. 30), siendo este resultado esperado, ya que en el tejido adiposo se encontraron en mayor porcentaje los biomarcadores y en la piel los AG característicos de fosfolípidos.

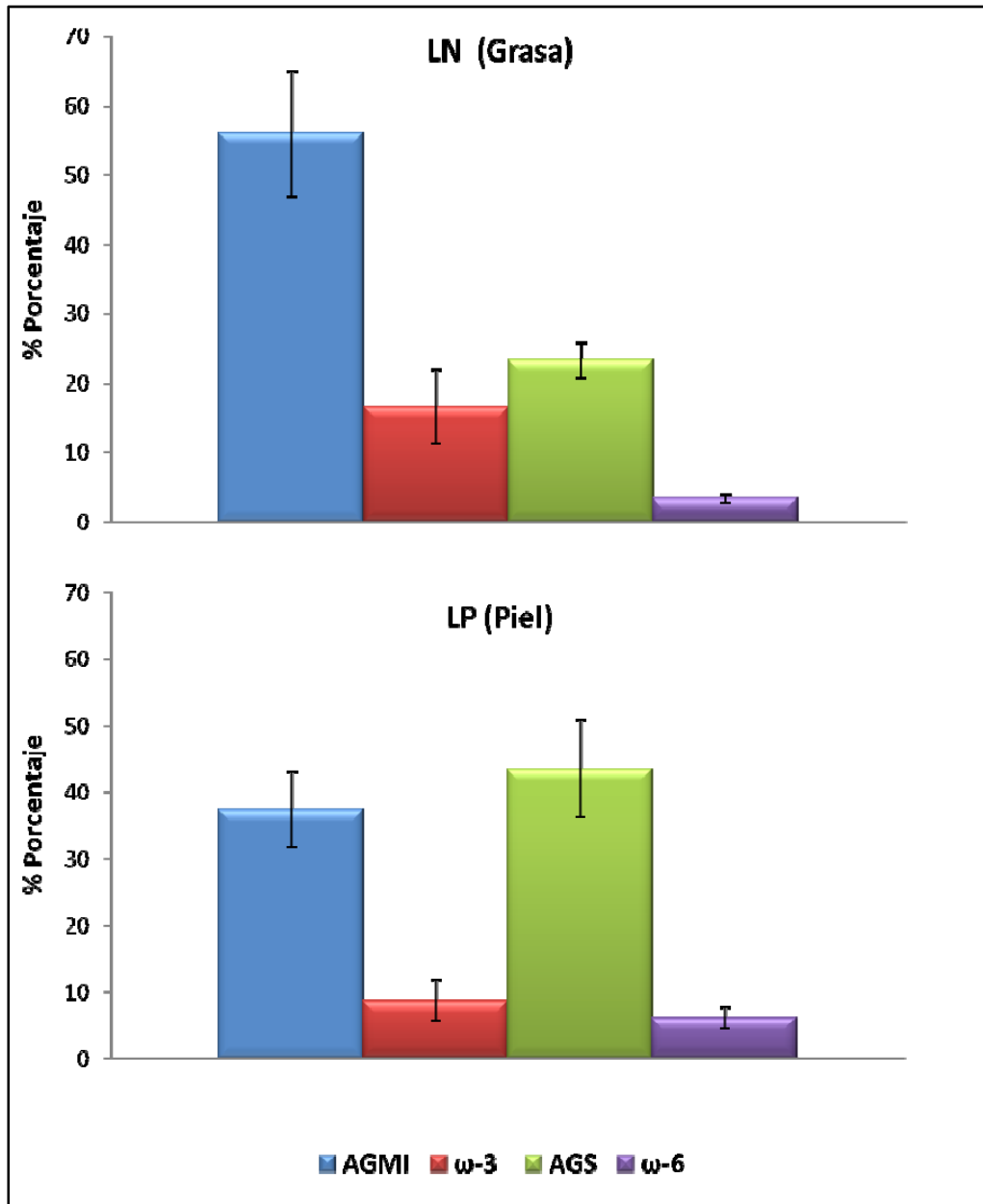


Figura 30. Porcentajes de Lípidos Neutros (Grasa) vs Lípidos Polares (Piel), AGMI=ácidos grasos monoinsaturados; ω-3= ácidos grasos de la familia omega 3; AGS= ácidos grasos saturados y ω-6=ácidos grasos de la familia omega 6. Las líneas verticales representan los intervalos de confianza al 95%.

IX. DISCUSIÓN

IX.1. Organización Histológica de Piel y Grasa Subcutánea

Diversos estudios en cetáceos indican la importancia de caracterizar histológicamente las biopsias, esto debido a que la información obtenida no sólo depende del tejido a analizar, sino también de su posible estratificación y de la distribución de las diferentes clases lipídicas a lo largo de las biopsias (Koopman *et al.*, 2003; Cruz-Vizcaíno, 2005; Ruchonnet *et al.*, 2006; Rueda-Flores, 2007).

La caracterización histológica de la biopsia de piel y grasa del calderón de aletas cortas permitió determinar que existe una ausencia de estratificación de las diferentes clases lipídicas a lo largo de la biopsia, esto coincide con lo reportado por Rueda-Flores (2007) para ballena azul, sin embargo ese estudio reporta que las biopsias tomadas sólo penetraron la capa externa de la grasa. En este estudio esto difiere, ya que la biopsia analizada fue de un individuo varado, por lo que se pudo obtener una biopsia completa desde el músculo hasta la piel. La ausencia de estratificación no es común en odontocetos, ya que se ha reportado en varias especies una clara separación de las diferentes clases lipídicas a lo largo de la grasa. Esto pudiera deberse a que el incremento de la estratificación en la grasa es mayor en especies que habitan en temperaturas frías que las especies de hábitats tropicales o templados (Koopman, 2007).

En el calderón de aletas cortas se encontró una dominancia de triglicéridos y menor porcentaje de fosfolípidos en la caracterización histológica (70 y 30% aproximadamente), sin embargo al analizar los AG en ambos tejidos (piel y grasa), se encontró una mayor proporción de lípidos neutros, más del 80% en comparación a los lípidos polares que representaron menos del 20% en el tejido adiposo. En un análisis similar, en tres regiones corporales de un cachalote varado, Cruz-Vizcaíno (2005) reporta la abundancia de triglicéridos en las regiones cefálicas y media del cuerpo (75.1% y 76.6% respectivamente), contrario a la región caudal, donde encontró una mayor proporción de fosfolípidos. Al parecer esta dominancia de los

triglicéridos (89 a 100 %) no es única de los odontocetos como belugas, delfines comunes, orcas, calderones de aletas largas (Koopman, 2007), sino que también se encuentra en algunos mysticetos como la ballena azul, ballena de aleta y ballena de Sei (Ruchonnet *et al.*, 2006; Rueda-Flores, 2007). Dado que los triglicéridos (lípidos neutros) fueron los más abundantes en las biopsias de calderones, la grasa subcutánea representa un buen tejido para estudiar cambios en la alimentación.

IX.2. Lípidos Neutros

La función principal de los lípidos neutros en la grasa de organismos marinos es la de constituir la reserva energética, conformada en su mayoría por triglicéridos (Bergé y Barnathan, 2005), sirviendo también como aislante térmico, característica de mamíferos marinos como las ballenas y delfines (Ackman, 1989).

Entre los estudios realizados con mamíferos marinos, no existe una certeza fehaciente de que los perfiles de ácidos grasos de las presas son reflejados íntegramente en los tejidos de los depredadores. Esto debido a que existen cambios significativos en los ácidos grasos durante la asimilación, digestión e incorporación al tejido del depredador. Así mismo, éstos son depositados de forma diferencial en los tejidos para cumplir funciones específicas y seleccionados según las necesidades de cada especie (Olsen y Grahl-Nielsen, 2003; Budge *et al.*, 2006).

Respecto a los lípidos neutros de la piel, que representan una fuente de energía para el tejido, se encontraron diferencias significativas entre grupos, excepto entre el grupo 1 y 3 en el AFD (Fig.18). Dichas diferencias pudieran deberse a los requerimientos metabólicos de cada grupo, ya que la piel al ser un tejido más conservativo (Iverson, 2008), está más influenciado por factores ambientales, tales como temperatura, salinidad, etc. (Yunoki *et al.*, 2008).

En el análisis de los lípidos neutros de la grasa en los grupos de calderones se encontró una mayor abundancia de ácidos grasos monoinsaturados (18:1 n-9, 16:1

n-7, 20:1 n-9, 18:1 n-7, 14:1, 17:1 n-9, 16:1 n-9, 20:1 n-11, 22:1 n-11 y 22:1 n-9) seguida de ácidos grasos saturados (16:0, 14:0, 18:0, 17:0, 15:0, 20:0 y 19:0) (Tabla 3), lo que podría indicar que son organismos que no han estado en ayuno debido a que la grasa contribuyó aproximadamente con el 10% del total de calorías consumidas (Budge *et al.*, 2006). Los ácidos grasos poliinsaturados, incluyendo los ácidos grasos esenciales (22:6n-3, 20:5n-3, 20:4n-6, 18:2 n-6 y 18:3 n-3) se encontraron en bajas cantidades con respecto a los de síntesis *de novo*, lo que podría sugerir una acumulación preferencial de estos AG hacia otros tejidos (cerebro), ya que los calamares presentan altas concentraciones de poliinsaturados principalmente docosahexaenoico (DHA) (Cruz-Vizcaíno, 2005).

Como resultado del AFD, las diferencias entre grupos utilizando ácidos grasos de reserva (biomarcadores) en el tejido adiposo, que representan el alimento a largo plazo, confirma la hipótesis que las diferencias entre grupos detectados mediante isotopos estables (Díaz-Gamboa, 2009) se deben a distintos hábitos alimentarios y no a zonas con diferentes aportes de N. La separación del grupo 1 vs 2 (Fig. 13) coincide con lo reportado por Díaz-Gamboa (2009) en cuanto a los niveles tróficos de los calderones (Fig. 1). Por lo tanto se propone que dichas diferencias en los grupos se deben a distintas rutas tróficas.

IX.3. Detección de Rutas Tróficas (biomarcadores)

Las principales características de los ácidos grasos y sus patrones de reserva que los hacen útiles como trazadores tróficos o biomarcadores en las cadenas tróficas son: Primero, los organismos son capaces de biosintetizarlos, es decir, modificar las cadenas de carbono y agregar dobles enlaces, aunque esta característica está limitada bioquímicamente dependiendo del grupo filogenético y de algunas especies (Cook, 1996). Segundo, los ácidos grasos son hidrolizados durante la digestión y generalmente no son degradados, sino que son metabolizados por los tejidos a su forma básica dependiendo de la función del tejido, ya sea como reserva, para formar tejido estructural o transformados en hormonas o mensajeros

secundarios. La consecuencia importante de esta restricción de síntesis en plantas, bacterias y algunos animales ha hecho posible utilizar a los ácidos grasos como herramienta potencial para trazar redes tróficas (Iverson, 2008). Tercero, la grasa es acumulada como reserva en animales (mamíferos marinos) y puede ser movilizada para obtener energía en periodos de tiempo cortos o largos según las demandas energéticas; de esta manera la acumulación de ácidos grasos en el tiempo representa un registro integrado de la ingesta dietética en días, semanas o meses dependiendo del organismo, sus requerimientos energéticos y rangos de reserva (Iverson, 2008).

En las últimas décadas se han usado los ácidos grasos como herramienta eficaz para determinar relaciones tróficas de los organismos en los ecosistemas marinos, así como una técnica potencial para la evaluación cualitativa y cuantitativa de los hábitos alimentarios de los depredadores (Ackman, 1989; Stübing *et al.*, 2003; Iverson *et al.*, 2004; Parrish *et al.*, 2009).

En los grupos de calderones de aletas cortas fue posible detectar algunos biomarcadores y de esta manera deducir sus posibles rutas tróficas, basados en la investigación previa de sus presas potenciales y hábitos alimentarios (Olson y Reilly, 2002; Markaida y Sosa-Nishizaki, 2003; Díaz-Gamboa, 2009; Rodríguez-Valenzuela, 2009).

Es importante mencionar que la principal presa del calderón es el calamar (Díaz-Gamboa, 2009) el cuál puede alimentarse de diversas presas por tener hábitos alimentarios oportunistas (Markaida y Sosa-Nishizaki, 2003). Los ACP mostraron que la mayoría de los calderones tuvieron porcentajes promedio de AG similares. Sin embargo al utilizar biomarcadores tróficos en el AFD fue más eficiente poder detectar diferencias sutiles entre grupos.

En el grupo 2 claramente se identifica la ruta trófica: calderones → calamar → mictófidios → zooplancton → fitoplancton (Fig. 20-B), debido a que se detectan

ácidos grasos monoinsaturados 20:1n-11 y 22:1n-11 que son característicos de zooplancton especialmente de copépodos calanoideos (Parrish *et al.*, 2000; Bergé y Barnathan, 2005) y además éste es el grupo con el menor nivel trófico (Tabla 1). En contraste, el grupo 1 tiene el nivel trófico más alto (Tabla 1) y la ruta determinada fue la de: calderones → calamar gigante → calamar → sardina → zooplancton → fitoplancton (Fig. 20-C), ya que se identifican biomarcadores característicos de fitoplancton, el 20:4n-6 (ARA) (Cohen *et al.*, 1995), y de diatomeas, el 20:5n-3 (EPA) y el 14:0 (Parrish *et al.*, 2000; Mourente *et al.*, 1990; Allan *et al.*, 2009), además de que el EPA ha sido encontrado en abundancia en las sardinias *Sardinops caeruleus* y *Sardinops sagax* (Carreón-Palau *et al.*, 2004; Rodríguez-Valenzuela, 2009), apoyando la idea de dicha ruta.

El segundo grupo con el nivel trófico más alto fue el grupo 3 (Tabla 1) y la ruta posible determinada fue la de: calderones → merluza → langostilla → detritus (Fig. 20-A), debido a la detección de biomarcadores característicos de detritus o actividad bacteriana, como son los ácidos grasos ramificados iso 14:0, iso 15:0, TM 16:0 e iso 17:0 (Parrish *et al.*, 2009; Rodríguez-Valenzuela, 2009). Estos biomarcadores han sido encontrados en la merluza enana (*Merluccius angustimanus*) y en la langostilla (*Pleuromcodoes planipes*) al ser rastreados exitosamente en dos rutas tróficas del lobo marino de California, *Zalophus californianus*, en Bahía Magdalena (Rodríguez-Valenzuela, 2009). Para el grupo 4, que es el tercero con el nivel trófico más alto (Tabla 1), se determinó una ruta trófica similar a la del grupo 1, excepto que esta es un poco más corta que la anterior: calderones → calamar gigante → sardina → zooplancton → fitoplancton (Fig. 20-C) y fue determinada con los mismos biomarcadores que en la ruta trófica del grupo 1.

IX.4. Lípidos Polares

La función principal de los lípidos estructurales (polares) es de formar la estructura lipídica de las membranas celulares (principalmente fosfolípidos y esfingolípidos) (Christie, 1989). Estos han sido utilizados para diferenciar entre poblaciones y/o stocks de distintas zonas geográficas, sobretodo en tejidos estructurales como la piel, músculo y del corazón (Olsen y Grahl-Nielsen, 2003; Grahl-Nielsen, 2004).

Olsen y Grahl-Nielsen (2003) compararon dos poblaciones de ballena Minke previamente establecidas por la Comisión Ballenera Internacional y de esta manera pudieron probar que los ácidos grasos fueron eficaces para diferenciar dichas poblaciones. Los ácidos grasos monoinsaturados y los ω -6 se encontraron en mayor cantidad en la capa más externa de la grasa y se relacionaron con cambios ocurridos a largo plazo y por consiguiente a la separación geográfica de este roccual. En un estudio reciente, Cruz-Vizcaíno (2005) sugiere que existen dos grupos o subpoblaciones de cachalotes concurriendo en el Golfo de California, determinadas mediante ácidos grasos estructurales en biopsias de la aleta caudal de dicha especie.

La finalidad de separar y obtener perfiles de ácidos grasos de reserva y estructurales fue la de poder precisar en qué ácidos grasos existieron diferencias para poder atribuirlos al alimento o a las características propias de los grupos. En el análisis de los ácidos grasos estructurales de la grasa de los calderones, que representan el alimento a corto plazo debido a la irrigación de los vasos sanguíneos en el tejido, se encontraron altas concentraciones de ácidos grasos saturados (16:0 y 18:0), ácidos grasos monoinsaturados (18:1n-9) y ácidos grasos poliinsaturados (20:4n-6, 22:6n-3 y 24:1n-9) en los cuatro grupos.

En el AFD no se encuentran diferencias significativas entre grupos de calderones al considerar sólo los ácidos grasos de fosfolípidos reportados en mamíferos (Christie, 2003). Sin embargo; no se puede afirmar que en un periodo

corto de tiempo no se encuentran diferencias en cuanto a alimentación en los grupos, debido a la falta de un registro de foto-identificación de los calderones de los cuáles se obtuvieron las biopsias. A diferencia de lo encontrado en un estudio reciente con ballena azul, Espino-Pérez (2009), reporta dos grupos claramente diferenciados por el alimento ingerido en dos periodos de tiempo, utilizando estos AG estructurales. Los AG que contribuyeron a la separación significativa de ambos grupos, fueron el 14:0, 16:0, iso 17:0, 16:1n-9, 17:1n-7 y 22:6n-3. El tener muestras del mismo individuo foto-identificado en ambos periodos, confirmó el cambio del alimento reflejado por diferencias de AG en un periodo de alrededor de 3 meses.

IX.5. Identificación de Stocks

En cuanto a los ácidos grasos estructurales de la piel, se encontraron altas concentraciones de ácidos grasos saturados (16:0, 18:0) y ácidos grasos monoinsaturados (18:1n-9, 24:1n-9). Como resultados del AFD al utilizar ácidos grasos de fosfolípidos se encuentran diferencias significativas del grupo 1 contra los grupos 2, 3 y 4 (Fig. 26). Este resultado sugiere la separación de al menos 2 stocks de calderones, debido posiblemente a las distintas características geográficas entre las zonas (central y sur) (Brusca y Findley, 2005) donde provienen estos grupos (Fig. 1). El stock 1 (Grupo 1), fue el encontrado en la zona central y tuvo en mayor abundancia el AG 16:1 n-9, mientras que el stock 2 (Grupos 2, 3 y 4) que pertenece a la zona sur tuvo mayor abundancia del AG 20:4 n-6. Sin embargo, esto no coincide con los niveles tróficos de los diferentes grupos reportados para las mismas muestras de las cuales se analizaron isotopos estables de N y C (Díaz-Gamboa, 2009). Se deduce entonces, que la variación en $\delta^{15}\text{N}$ no está relacionado con zonas con diferentes aportes de nitrógeno.

Coincidiendo con Olsen y Grahl-Nielsen (2003) se encontraron diferencias entre los grupos de calderones de aletas cortas atribuidas a los AG monoinsaturados y ω -6 (16:1n-9 y 20:4n-6), encontrados en dos poblaciones del rorcual Minke. Así mismo, otros AG que contribuyeron de manera significativa a la separación de dichos

stocks en este análisis fueron el 14:0 y 22:5n-3. Los AG estructurales en piel encontrados al distinguir los stocks de calderones coinciden también con los hallados al diferenciar poblaciones de peces de diferentes zonas geográficas, como en el caso de los AG en músculo de dos poblaciones de arenques (*Clupea harengus*) una del mar del Norte y otra del Báltico (Grahl-Nielsen, 2004) y también con AG del corazón de dos poblaciones de macarela (*Scomber scombrus*) una del Atlántico y otra del mar del Norte (Grahl-Nielsen, 2004).

X. CONCLUSIONES

- ❖ La grasa de las biopsias de los calderones no presenta un patrón de estratificación definido, y se compone en un 70% por triglicéridos (lípidos de reserva) y un 30% de fosfolípidos (lípidos estructurales).
- ❖ La separación obtenida entre los grupos de calderones por medio de los AG permiten concluir que las diferencias de $\delta^{15}\text{N}$ previamente encontradas entre los mismos calderones se deben a distintos hábitos alimentarios intraespecíficos y no a la variación en el aporte de N entre las zonas del Golfo.
- ❖ Las diferencias en los AG de reserva en grasa, encontrada entre grupos de calderones, se deben a distintas rutas tróficas, determinadas por biomarcadores tróficos.
- ❖ Se detectaron 2 stocks de calderones, por medio de los ácidos grasos estructurales encontrados en la piel.

XI. RECOMENDACIONES

Se sugiere realizar la caracterización histológica e histoquímica de los tejidos a examinar, debido a que puede existir una estratificación de las diferentes clases lipídicas, además esto puede variar en función de la especie y del sitio de muestreo en el cuerpo del organismo. La caracterización es más objetiva si se realiza en organismos varados, ya que de esta manera se pueden obtener biopsias completas desde el músculo hasta la piel para un mejor análisis histológico.

También es necesario, separar los ácidos grasos en estructurales y de reserva, ya que cada clase lipídica provee diferente tipo de información y resultado. En futuros estudios con cetáceos, es importante analizar ácidos grasos en piel, ya que al ser un tejido más conservativo que la grasa, provee información más confiable en la separación de stocks o poblaciones de distintas zonas geográficas.

Es primordial tener información de las presas potenciales del depredador para un mejor entendimiento del papel que desempeñan los biomarcadores tróficos en las relaciones alimentarias entre especies en el ecosistema.

Se recomienda integrar una base de datos de foto-identificación de calderones para reconocer las poblaciones del Golfo de California en colaboración con otras instituciones que están generando dicha información como la NOAA.

Debido a que los calderones de aletas cortas son fieles al Golfo de California y reflejan cambios en los niveles tróficos como resultado de la disponibilidad de alimento, se sugieren estudios a largo plazo que puedan reflejar cambios del ecosistema provenientes tanto de las cadenas tróficas como de movimientos migratorios.

XII. LITERATURA CITADA

- Ackman, R. G. 1989. *Marine Biogenic Lipids, Fats and Oils*. Vol. I. CRC. Press. USA. 495 pp.
- Aguayo-Lobo, A. 1999. Los cetáceos y sus perspectivas de conservación. *Estud. Oceanol.* 18: 35-43.
- Aguíñiga-García, S., F. Galván-Magaña, N. Silverberg, M. Soto-Jiménez, Y. Torres-Rojas, N. Aguilar-Castro, M. Miranda, H. Arce-Osuna, J. Camalich-Capizo y A. Sánchez. 2007. The scalloped hammerhead shark *Sphyrna lewini* as an indicator of $\delta^{15}\text{N}$ shifts in particulate organic matter from contrasting oceanographic areas. P.107. *En: Abstracts of Climate impacts on oceanic top predators*. La Paz, B.C.S. México. 136 pp.
- Allan, E. L., S. T. Ambrose, N.B. Richoux y P.W. Froneman. 2009. Determining spatial changes in the diet of nearshore suspension-feeders along the South African coastline: Stable isotopes and fatty acid signatures. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 26 pp.
- Álvarez-Borrogo, S. y Lara-Lara, J.R. 1991. The physical environment and primary productivity of the Gulf of California. 555-567. *En: J.P. Dauphin y B. Simoneit (eds). The gulf and peninsular province of the Californias. Amer. Assoc. of Petrol. Geol. Memoir 47.*
- Baird, R., G. Schorr, D. Webster, S. Mahaffy, A. Douglas, A. Gorgone y D. McSweeney. 2006. A survey for odontocete cetaceans off Kaua'i and Ni'ihau, Hawai'i, during October and November 2005: evidence for population structure and site fidelity. NOAA. *Pacific Islands Fisheries Science Center Report*. No. AB133F05SE5197. USA. 17 pp.
- Bergé, J.P. y G. Barnathan. 2005. Fatty Acids from Lipids of Marine Organisms: Molecular Biodiversity, Roles as Biomarkers, Biologically Active Compounds, and Economical Aspects. *Adv Biochem Engin/Biotechnol.* 96: 49–125 pp.
- Boris, C. K. 2003. *Globicephala macrorhynchus*, Short-finned pilot whale. *En: Review On Small Cetaceans: Distribution, Behavior, Migration and Threats. Conservation of Migratory Species (CMS)*. Germany. 1-5.

- Bradshaw, C.J.A., M.A. Hindell, N.J. Best, K.L. Phillips, G. Wilson y P.D. Nichols. 2003. You are what you eat: describing the foraging ecology of southern elephant seals (*Mirounga leonina*) using blubber fatty acids. *Proc. R. Soc. Lond.* 270:1283-1292.
- Brusca, R y L. Findley. *The Sea of Cortez. En: Hendrickx, M., Brusca, R y L. Findley (eds). Pp. 11-24. Listado y distribución de la Macrofauna del Golfo de California, México. Arizona-Sonora Desert Museum. USA.*
- Budge, S. M. y S. Iverson. 2003. Quantitative analysis of fatty acid precursors in marine samples: direct conversion of wax ester alcohols and dimethylacetals to FAMES. *J. Lipid. Res.* 44:1802-1807.
- Budge, S.M., S.J. Iverson & H.N. Koopman. 2006. Studying trophic ecology in marine ecosystems using fatty acids: a primer on analysis and interpretation. *Mar. Mamm. Sci.* 22(4): 759-801.
- Carreón Palau L., J. A. Del Ángel Rodríguez. y M. O. Arjona López. 2007. Determinación de ácidos grasos por Cromatografía de gases espectrometría de masas. *En: Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal. Arredondo Vega B. O. y D. Voltolina (eds). Editorial CIBNOR 97 pp.*
- Carreón Palau L., J. A. Del Ángel Rodríguez, M. T. Rodríguez Valenzuela y E. Ochoa. 2004. Potencialidades del análisis de ácidos grasos como indicador de origen y condición fisiológica de sardina monterrey. Informe técnico ante SIMAC. 26 pp.
- Carrillo, M. y M. Tejedor. 2003. Dinámica Poblacional del Calderón Tropical (*Globicephala macrorhynchus*) en el LIC ES- 7020017. *Sociedad para la Investigación, Divulgación y Conservación de los Cetáceos. Tenerife. Informe 1. 50-79 pp.*
- Case, T.J. y M.L. Cody. 1993. *Island biogeography in the sea of Cortez.* University of California Press. 508 p.
- Christie, W.W. 1989. *Gas chromatography and lipids: a practical guide.* The Oily Press, England. 184 pp.
- Christie, W.W. 2003. *Lipids analysis.* The Oily Press, England. 416 pp.

- Cohen, Z., H. Norman y Y. M. Heimer. 1995. Microalgae as a Source of ω 3 Fatty Acids. *World Rev Nutr Diet*. Vol. 77. 1-31.
- Copeman, L. A., C. Parrish, R. Gregory, R. Jamieson, J. Wells y M. J. Whiticar. 2009. Fatty acids biomarkers in coldwater eelgrass meadows: elevated terrestrial input to the food web of age-0 Atlantic cod *Gadus morhua*. *Marine Ecology Progress Series*. 386:237-251.
- Cook, H.W. 1996. Fatty acid desaturation and chain elongation in eukaryotes. pp. 129–152 *En*: D.E. Vance and J.E Vance (eds). *Biochemistry of Lipids and Membranes*. Elsevier, Amsterdam.
- Cruz-Vizcaíno, M. 2005. Relación del perfil de ácidos grasos del cachalote (*Physeter macrocephalus*) y el calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en el Golfo de California. Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN. La Paz, B.C.S. 75 pp.
- Das, K., C. Beans, L. Holsbeek, G. Mauger, S.D. Berrow, E. Rogan y J. Bouqueneau. 2003. Marine mammals from Northeast Atlantic: relationship between their trophic status as determined by $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ measurements and their trace metal concentrations. *Marine Environmental Research*. 56: 349-365.
- Díaz-Gamboa, R. 2003. Diferenciación entre tursiones *Tursiops truncatus* costeros y oceánicos en el Golfo de California por medio de isótopos estables de carbono y nitrógeno. Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN. La Paz, B.C.S. 62 pp.
- Díaz-Gamboa, R y F. Guerrero-De la Rosa. 2005. Sperm whales and short-finned pilot whales interaction. P.75. *En*: Abstracts of the 16th Biennial Conference on the Biology of Marine Mammals. San Diego, California, USA. 330 pp.
- Díaz-Gamboa, R. 2009. Relaciones tróficas de los cetáceos teutófagos con el calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en el Golfo de California. Tesis de Doctorado, CICIMAR-IPN. La Paz, B.C.S. 103 pp.
- Félix, F. 2004. La investigación de mamíferos marinos en la costa de Ecuador y perspectivas. Fundación Ecuatoriana para el Estudio de Mamíferos Marinos (FEMM), Guayaquil, Ecuador. 17 pp.

- Folch, J., M. Lees y G. H. Sloane-Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226:497–509.
- Folkens, P., R. Reeves, B. Stewart, P. Clapham y J. Powell. 2002. *Guide to marine mammals of the world*. National Audubon Society. Knopf. USA. 527 pp.
- Gendron, D., S. Aguñiga y J. Carriquiry. 2001. $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ in skin biopsy samples: a note on their applicability for examining the relative trophic level in three rorqual species. *J. Cetacean Res. Manage.* 3(1): 41-44.
- Grahl-Nielsen, O. 2004. Fatty acid profiles as natural marks for stock identification. *En: Stock identification methods*. Academic Press. 239-261.
- Guerrero, M., J. Urbán y L. Rojas. 2006. *Las ballenas del Golfo de California*. INE-SEMARNAT. México. 524 pp.
- Hacker, E. 1986. Stomach content analysis of short finned pilot whales (*Globicephala macrohynchus*) and Northern elephant seal (*Mirounga angustirostris*) from the Southern California Bight. Administrative report Lj-86-086. Southwest Fisheries Center. 34 pp.
- Henderson, R.J. y D.R. Tocher. 1992. Thin-layer chromatography. *In Lipid Analysis. A Practical Approach*. R.J. Hamilton y S. Hamilton, IRL Press, Oxford: 65-111.
- Herman, D., D. Burrows, P. Wade, J. Durban, C. Matkin, R. LeDuc, L. Barret y M. Krahn. 2005. Feeding ecology of eastern North Pacific killer whales *Orcinus orca* from fatty acid, stable isotope, and organochlorine analyses of blubber biopsies *Marine Ecology Progress Series*. Vol. 302: 275–291.
- Hernández-García, V. y Martín. 1994. Stomach contents of two short-finned pilot whale (*Globicephala macrohynchus* Gray, 1846) (Cetacea, Delphinidae) off the Canary Islands: A preliminary note. Copenhagen Denmark Ices.
- Ho, J., K. Nagasawa y Il-Hoi Kim. 2007. Sarcotretes longirostris N. Sp. (Copepoda: pennellidae) parasitic on Bluefin drifffish (*Psenes pellucidus*) from the stomachs of short-finned pilot whales caught off Japan. *Journal of Crustacean Biology*, 27(1): 116–120.

- Hobson, K. A. 1993. Trophic relationships among High Arctic Sea-birds: Insights from tissue-dependent stable-isotope models. *Marine Ecology Progress Series*. 95:7-18.
- Hooker, S., S. Iverson, P. Ostrom y S. Smith. 2001. Diet of northern bottlenose whales inferred from fatty-acid and stable-isotope analyses of biopsy samples. *Canadian Journal of Zoology*. 79: 1442-1454.
- International Fund for Animal Welfare. 2007. Short-finned Pilot Whale. *En*: <http://www.ifaw.org/cetacea.htm>.
- Iverson, S., C. Field, D. Bowen y W. Blanchard. 2004. Quantitative fatty acid signature analysis: a new method of estimating predator diets. *Ecological Society of America*. 74(2): 211–235.
- Iverson, S. 2008. Tracing aquatic food webs using fatty acids: from qualitative indicators to quantitative indicators to quantitative determination. 281-307 pp. *En*: M. T. Arts et al. (eds.), *Lipids in Aquatic Ecosystems*.
- Jaquet, N. y D. Gendron. 2002. Distribution and relative abundance of sperm whales in relation to key environmental features, squid landings and the distribution of other cetacean species in the Gulf of California, México. *Marine Biology*. 141:591-601.
- Joensen H, Grahl-Nielsen O., 2001. The redfish species *Sebastes viviparus*, *Sebastes marinus* and *Sebastes mentella* from Faroe Islands have different composition of their tissues and in the skull oil. *Comparative biochemistry and Physiology Part B*, 129, 73-83.
- Koopman, H., S. Iverson y A. Read. 2003. High concentrations of isovaleric acid in the fats of odontocetes: variation and patterns of accumulation in blubber vs. stability in the melon. *J Comp Physiol B*. 173: 247–261.
- Koopman, H. 2007. Phylogenetic, ecological, and ontogenetic factors influencing the biochemical structure of the blubber of odontocetes. *Mar. Biol.* Vol. 151: 277-291.
- Mangels, K. y T. Gerrodette. 1994. Report of cetacean sightings during a marine mammal survey in the eastern Pacific Ocean and the Gulf of California aboard the NOAA ships McArthur and David Starr Jordan July 28 – November 6, 1993.

- NOAA/NMFS *Southwest Fisheries Center Administrative Report*. No. NOAA-TM-NMFS-SWFSC-211. USA. 88 pp.
- Markaida, U. y O. Sosa-Nishizaki. 2003. Food and feeding habits of jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) from the Gulf of California, México. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 83: 507-522.
- Marsh, B.J. & B.D. Weinstein. 1966. Simple charring method for determination of lipids. *J. of Lipid Res.* 7: 574-576.
- Menard, F., M. Potier, A. Lorrain, R. Sabatié, Y. Cherel, E. Romanov y F. Marsac. 2007. Trophic ecology of several tropical top predators: a comparative approach between the Indian and the Atlantic oceans. P.57. *En: Abstracts of Climate impacts on oceanic top predators*. La Paz, B.C.S. México. 136 pp.
- Moore, S. y R. Chieh. 2007. Pilot whales follow internal solitary waves in the south china sea. *Marine Mammal Science*. 23 (1): 193-196.
- Mourente, G., L. M. Lubián y J. M. Odriozola. 1990. Total fatty acids composition as a taxonomic index of some marine microalgae used as food in marine aquaculture. *Hydrobiología*. 203: 147-154.
- Olsen, E. y O. Grahl-Nielsen. 2003. Blubber fatty acids of minke whales: stratification, population identification and relation to diet. *Marine Biology*. 142: 13–24.
- Olson, P. A y S. B. Reilly. 2002. *Pilot whales Globicephala melas y G. macrorhynchus*. *En: W. F. Perrin., B. Wursig y J. G. M. Thewissen (eds.)*. Pp. 898-903. *Encyclopedia of Marine Mammals*. Academic Press, San Diego, U.S.A. 1414 pp.
- Patenaude, N. J y B. N White. 1995. Skin biopsy sampling of beluga whale carcasses: assessment of biopsy darting factors for minimal wounding and effective sample retrieval. *Marine Mammal Science*. 11 (2): 163-171.
- Pardo, M.A. 2009. Condiciones fisicoquímicas y biológicas que modulan la abundancia de cetáceos sobre cuenca Alfonso, Golfo de California. Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN. La Paz, B.C.S. 101 pp.
- Parrish C.C., T.A. Abrajano, S.M. Budge, R.J. Helleur, E.D . Hudson, K. Pulchan y C. Ramos. 2000. Lipid and Phenolic Biomarkers in Marine Ecosystems: Analysis

- and Applications. The Handbook of Environmental Chemistry Vol. 5 Part D *Marine Chemistry*. Cap. 8, 193-223 pp.
- Parrish, C. C., D. Deibel y R. J. Thompson. 2009. Effect of sinking phytoplankton blooms on lipid content and composition in suprabenthic and benthic invertebrates in a cold ocean coastal environment. *Marine Ecology Progress Series*. Vol. 391: 33-51.
- Robles, S. 1985. *Estudio geográfico del estado de Baja California Sur*. Dirección de Cultura. Gobierno del Estado. México. Vol. 1,203 pp.
- Roden, G.I. 1964. Oceanographic aspects of the Gulf of California *En*: T.H. van Andel y G.S. Shore (eds.). *Marine Geology of the Gulf of California*. American Association of Petroleum Geologists Memoirs No. 3: 30-58.
- Rodríguez-Jaramillo, M.C. 2004. Efecto de la temperatura sobre la gametogénesis en el callo de hacha *Atrina maura* (Sowerby, 1835) Bivalvia: Pinnidae. Tesis de Maestría. CICIMAR-IPN, La Paz, B.C.S, México. 74 pp.
- Ruchonnet, D., M. Boutoute, C. Guinet y P. Mayzaud. 2006. Fatty acid composition of Mediterranean fin whale *Balaenoptera physalus* blubber with respect to body heterogeneity and trophic interaction. *Marine Ecology Progress Series*. Vol. 311: 165-174.
- Rueda-Flores, M. 2007. Variabilidad de perfiles de ácidos grasos de Ballena azul, *Balaenoptera musculus*, en el Golfo de California. Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN. La Paz, B.C.S. 67 pp.
- Salvadeo, C.J. 2008. Análisis de la comunidad de Odontocetos y la relación con su Ambiente, en el extremo suroccidental del Golfo de California, México (2003-2006). Tesis de Maestría, CICIMAR-IPN. La Paz, B.C.S. 63 pp.
- Samuel, A.M y G.A.J. Worthy. 2004. Variability in fatty acid composition of bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) blubber as a function of body site, season, and reproductive state. *Can. J. Zool.* 82: 1933-1942.
- Sato N y N. Murata. *Membrane lipids*. *En*: Parker L y A. Glazer (eds). Pp. 251-259. Cyanobacteria, methods in enzymology. Academic Press. USA.

- Smith S. J. Iverson S. J. Bowen W. D. 1997. Fatty acids signature and classification trees: new tools for investigating the foraging ecology of seals. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 54, 1377 –1386.
- Standal, I. B., A. Praël, L. McEvoy, D. Axelson y M. Aursand. 2008. Discrimination of Cod Liver Oil According to Wild/Farmed and Geographical Origins by GC and ^{13}C NMR. *J Am Oil Chem Soc.* 85:105–112.
- Sübing, D., W. Hagen y K. Schmidt. 2003. On the use of lipid biomarkers in marine food web analyses: An experimental case study on the Antarctic krill, *Euphausia superba*. *Limnology and Oceanography*. Vol. 48 (4).1685-1700.
- Todd, S., P. Ostrom, J. Lien y J. Abrajano. 1997. Use of biopsy samples of humpback whale (*Megaptera novaeangliae*) skin for stable isotope $\delta^{13}\text{C}$ determination. *Journal Northwest Atlantic Fishery Science*. 22: 71-76.
- Valdéz-Holguín, J y J. Lara-Lara. 1987. Productividad primaria en el Golfo de California efectos del evento El Niño 1982-1983. *Ciencias Marinas* Vol. 13(2): 34-50.
- Vázquez, M. E. 1997. Distribución espacio-temporal, fidelidad al área y tamaño poblacional del calderón de aletas cortas *Globicephala macrorhynchus* (Gray, 1846) en la Bahía de la Paz, B.C.S., México (1989-1995). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, B.C.S., México. 66 pp.
- Vidal, O., Findley L.T. y S. Leatherwood. 1993. Annotated checklist of the marine mammals of the Gulf of California. *Proc. San Diego Soc. Nat. Hist.* 28:1-11.
- Yunoki, K., H. Ishikawa, Y. Fukui y M. Ohnishi. 2008. Chemical Properties of Epidermal Lipids Especially Sphingolipids of the Antarctic Minke Whale. *Lipids*. 43:151–159.
- Zar, J. H. 1996. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, Inc. USA. 205 pp.

XIII. ANEXOS

ANEXO 1. DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA DE INCLUSIÓN EN PARAFINA

Fijación: Los tejidos se fijaron en solución Davidson para organismos marinos, durante 48 hr. Cambiar a alcohol etílico al 70% transcurridas las 48hr.

Deshidratación

- Alcohol etílico 70% I y II (mínimo una hora c/u)
- Alcohol etílico 80° (1 hora) (larvas y huevos 30 min.)
- Alcohol etílico 90° (1 hora) (larvas y huevos 30 min.)
- Alcohol etílico 96° (1 hora) (larvas y huevos 30 min.)
- Alcohol etílico 100 I y II (1 hora en c/u) (larvas y huevos 30 min.)
- Mezcla de alcohol etílico absoluto-xilol (1:1) 20 minutos. (Tiempo crítico)
- Xilol absoluto (100 %) 5-10 minutos. (Tiempo crítico)

Inclusión en parafina

- Parafina-xilol (1:1) 25 minutos (tiempo crítico, no dejar más tiempo)
- Parafina (Paraplast) I (1 hora)
- Parafina (Paraplast) II (1-2 horas)
- Parafina (Paraplast) III (1-2 horas)
- Parafina (Paraplast) IV (1-2 horas)

ANEXO 2. DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA DE HEMATOXILINA- EOSINA

- 1.-Xilol I,II y III-10 min en cada uno.
- 2.-Alcohol etílico 96%- 2 min
- 3.- Alcohol etílico 70% I y 70% II- 2 min c/u
- 4.-Agua destilada 5 min
- 5.-Hematoxilina de Harris 1 min (dependiendo del tiempo de uso del colorante)
- 6.-Agua corriente 5 min y agua destilada 5 min
- 7.-Alcohol acido- 10-15 segundos
- 8.- Agua destilada 5 min
- 9.- Agua amoniacal-10-15 segundos
- 10.-Agua destilada 5 min
- 11.-Alcohol etílico 50% 2 min
- 12.- Alcohol etílico al 70% 2 min
- 13.- Eosina alcohólica- 3 min (dependiendo del tiempo del colorante)
- 14.- Alcohol 96% I y II, 1-2 min c/u
- 15.- Alcohol 100% I y II, 1 min c/u
- 16.- Xilol I, II, III (sustituto de xileno ó Hemo-De)- 5 min c/u.
- 17.- Montar en resina sintética o Entellan.

ANEXO 3. DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA SUDAN NEGRO PARA GRASAS

Fijación: Cortes por congelación y una postfijación breve de una hora en formol-calcio o material fijado en formol al 10% amortiguado ó postfijación en dicromato de potasio.

Soluciones: Solución de Sudán negro a saturación, en alcohol etílico al 70%

Procedimiento:

- 1.- Colocar los cortes en alcohol al 70%
- 2.- Teñirlos por 30 min. en la solución de Sudán negro filtrarla antes de usar
- 3.-Diferenciar en alcohol al 70%.
- 4.-Contrastar los núcleos con carmalum o rojo rápido nuclear o hematoxilina Harris.
- 5.-Lavar bien en agua corriente.
- 6.-Lavar en agua destilada.
- 7.-Montar en gelatina glicerinada.

Resultados

Esteres de colesterol.	azul a negro.
Triglicérido	azul a negro.
Fosfolípidos	gris.
Mielina	bronce.