

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ecología Marina**

**Análisis metagenómico de la dieta de la foca de puerto (*Phoca
vitulina richardii*, Gray 1864) en México**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Elizabeth Brassea Pérez

Ensenada, Baja California, México
2016

Tesis defendida por
Elizabeth Brassea Pérez

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Gisela Heckel Dziendzielewski
Codirectora de tesis

Dra. Yolanda Schramm Urrutia
Codirectora de tesis

Dra. María Asunción Lago Lestón

Dr. Axayácatl Rocha Olivares

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez



Dra. María Lucila del Carmen Lares Reyes
Coordinadora del Posgrado en Ecología Marina

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Elizabeth Brassea Pérez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ecología Marina.

Análisis metagenómico de la dieta de la foca de puerto (*Phoca vitulina richardii*, gray 1864) en México

Resumen aprobado por:

Dra. Gisela Heckel Dziendzielewski

Codirectora de tesis

Dra. Yolanda Schramm Urrutia

Codirectora de tesis

La secuenciación masiva es una herramienta muy útil en el análisis de la dieta de un depredador, ya que hace posible identificar aquellos taxa que presentan baja o nula detectabilidad por métodos escatológicos tradicionales. En México, la dieta de la foca de puerto (*Phoca vitulina richardii*) ha sido estudiada con base en restos duros desconociéndose la importancia que algunos invertebrados o peces cartilaginosos tienen como presa, ya que no dejan restos identificables en las heces. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio es caracterizar los hábitos alimentarios de la foca de puerto en México a través de metagenómica, así como comparar nuestros resultados con los obtenidos por medio del análisis de restos duros sobre las mismas muestras. Las muestras fueron colectadas en las islas Todos Santos Sur, San Jerónimo, Natividad y San Roque, durante la temporada de muda 2014. La construcción de las librerías se realizó mediante la técnica de dos pasos de PCR, amplificando las regiones 18S ARNr usando oligos para eucariotas y 16S ADNmt con oligos específicos para cordados y cefalópodos, junto a los índices y adaptadores apropiados para la secuenciación. Se utilizaron oligos bloqueadores para evitar sobre amplificar el ADN del depredador. Las librerías fueron secuenciadas en un equipo MiSeq (Illumina) generando 848,411 lecturas. El control de calidad y asignación taxonómica de las secuencias se realizó *in silico* por medio de herramientas bioinformáticas. El gen 16S del ADNmt resultó ser el más informativo en términos de resolución taxonómica. En el presente estudio, se identificaron 49 presas de las cuales 14 correspondieron a invertebrados, mixinos y elasmobranquios. Al comparar el análisis molecular con los restos sólidos se obtuvieron 16 presas en común entre ambos métodos. Las presas de mayor importancia en los 4 sitios fueron el lenguado (*Citharichthys xanthostigma*) y el pez lagarto lucio (*Synodus lucioceps*). El poder de las herramientas de secuenciación masiva amplía el espectro trófico conocido para la foca de puerto en México. El análisis de los metagenomas es una aproximación novedosa para el estudio de la ecología alimentaria de especies clave en un ecosistema altamente productivo y cambiante, como la Corriente de California.

Palabras clave: *Phoca vitulina richardii*, hábitos alimentarios, metagenómica, secuenciación masiva, México

Abstract of the thesis presented by **Elizabeth Brassea Pérez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Marine Ecology

Metagenomic analysis of the diet of harbor seal (*Phoca vitulina richardii*, gray 1864) in Mexico

Abstract approved by:

Dra. Gisela Heckel Dziendzielewski

Thesis codirector

Dra. Yolanda Schramm Urrutia

Thesis codirector

Massive sequencing is a very useful tool for the analysis of predator diets, because it makes possible to identify those *taxa* that have low or no detectability by traditional scatological methods. In Mexico the diet of the harbor seal (*Phoca vitulina richardii*) has been studied based on hard remains, so the importance of invertebrates or cartilaginous fish as a prey is unknown, as they do not leave identifiable remains in feces. Therefore, the aim of this study is characterize the food habits of the harbor seal in Mexico through metagenomics, and compare our results with those obtained by analysis of hard remains on the same samples. The samples were collected on Todos Santos Sur, San Jerónimo, Natividad, and San Roque islands, during the moulting season in 2014. Libraries were constructed following the two-step PCR technique; first amplifying the 18S rRNA region using eukaryote specific primers and 16S mtDNA region using primer specific for chordates and cephalopods with the appropriate indexes and adapters for sequencing. Blocking primers were used to avoid the amplification of predator DNA. The libraries were sequenced on a MiSeq (Illumina) instrument, generating 848,411 reads. The quality control and taxonomic assignment of the sequences was performed *in silico* through bioinformatic tools. The 16S mtDNA gene was the most informative in terms of taxonomic resolution. In the present study, 49 preys were identified, 14 of which were invertebrates, hagfish and elasmobranchs. By comparing the molecular analysis of solid residues with next generation sequencing 16 prey were common to both methods. The most important prey items of harbor seal in the 4 sites of study were Longfin sanddab (*Citharichthys xanhostigma*) and California lizardfish (*Synodus lucioceps*). The power of next generation DNA sequencing extends the trophic spectrum known for the harbor seal in Mexico. Metagenomics is a new approach for the study of the feeding ecology of key species in a highly productive and changing ecosystem, such as the California Current.

Keywords: *Phoca vitulina richardii*, food habits, metagenomic, next generation sequencing, Mexico

Dedicatoria

*A mi familia por ser el
alma, corazón y cuerpo
de todas mis aventuras,
los amo con la vida!*



Agradecimientos

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por apoyarme económicamente durante estos dos años y permitirme cumplir una meta más en mi desarrollo profesional. Gracias también por hacer realidad mi proyecto de tesis a través del proyecto de Ciencia Básica 2012 (No. 179451).

Gracias al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada y al posgrado en Ecología Marina por abrirme sus puertas, por darme la oportunidad de prepararme con una maravillosa planta de profesores y por haber sido un segundo hogar para mí durante mi maestría.

Gisela quiero agradecerle por haberme recibido sin cita previa y por haberme aceptado como estudiante sin conocerme, no me imagino haciendo otra tesis que no sea ésta y se lo debo todo a usted. Gracias por ser una pieza clave en uno de los proyectos más bonitos de mi vida, gracias por enseñarme tanto, por exigirnos tanto como usted da, por ser un ejemplo, por darme el apoyo de la fundación Heckel-Schramm y sobre todo gracias por sus consejos. Quiero decirle que después de llevar su clase me di cuenta que hay unos zapatos muy grandes que llenar si quiero convertirme en una investigadora como usted, la quiero y la admiro mucho.

Yoli muchas gracias por poner en mis manos esta tesis, 10 veces dudé si iba dar el ancho y 11 veces usted me dijo, ánimo, sí sale, y cuanta razón tenía. Muchas gracias por dar todo por sus estudiantes, gracias por dedicarnos tanto tiempo, por hacer los primeros PCR conmigo, por estar siempre ahí para sus estudiantes y por cambalachear reactivos para que salgan las tesis. Gracias por ser un ejemplo a seguir y por ser tan intrépida en campo, así ya me sentía acompañada😊. Yo sé que difícilmente volveré a tener a tres chicas superpoderosas de directoras pero valió la pena cada etapa, muchas pero muchas gracias por todo su apoyo, la quiero mucho.

A mi tercera codirectora, Asunción, no sé cómo agradecerle por lo mucho que me ha ayudado a crecer en estos dos años, fueron un millón de lecturas, un billón de dudas pero un trillón de gracias. Muchas gracias por todo el tiempo extra dedicado, por salir corriendo tarde en fin de semana porque se me acabó la polimerasa, por tenerme paciencia durante las 18 horas más largas de mi vida y por exigirme igual que a mis compañeros, sin duda eso incentivó mucho las ganas que le puse a su materia. Me siento muy feliz de haber sido su estudiante y tesista, no desaprovecharé nada de lo que usted me enseñó; la adoro y le deseo lo mejor hoy y siempre.

Dr. Axayácatl, gracias por su tiempo y dedicación en esta tesis, gracias por acompañarnos en esta aventura de la secuenciación masiva y, sobre todo, gracias por hacerme preguntas que me pusieron a leer más sobre mi tema y ayudaron a enriquecer este trabajo.

Clarisa, muchas gracias por sus acertados comentarios que ayudaron a enriquecer este trabajo, gracias por sus excelentes clases, la paciencia y sobre todo gracias por agarrar la pelota de nudos, miedos y dudas que un día entró a su salón y convertirla en una estudiante que poco a poco va aprendiendo a hablar el idioma molecular.

Dora y David, ustedes creen que la parte más difícil es escribir mis discusiones pero no, la parte más difícil de mi tesis es agradecerles a ustedes, en primer lugar porque lo hago con una sola mano, en segundo lugar porque cada vez que lo intento dejo de ver. Esta etapa de mi vida sin duda fue todo un reto por extrañarlos tanto, de verdad que en mejores brazos no pude haber nacido y quiero que sepan que todo lo que hago es para ustedes, todos los días pinto una sonrisa en mi cara y doy gracias a Dios por tenerlos. Gracias por todo su amor y toda su dedicación.

A mis hermanos Edson y Renée, mil gracias por llenar mi corazón de alegría con su voz cuando estoy tan lejos y extrañándolos tanto, tanto. Gracias por creer en mí, por motivarme, por llenarme de bullying en lugar de besos cuando voy a Hermosillo. Les escribo con algunas lagrimillas en los ojos pero con una sonrisa de oreja a oreja porque pronto los veré. La vida nos hizo amigos, Dios nos hizo hermanos, los amo mucho. Hicka-bicka-boo!

Gracias a mi familia por ser un apoyo constante en mi maestría, gracias por todas sus bendiciones que me dieron fuerza en los momentos más rudos de mi maestría. Gracias, tío Jesús Brassea, por estar pendiente de mí estos dos años, por abrirme las puertas de su casa y por todo el cariño.

Dra. Elena Solana, muchas gracias por haberme enseñado tanto, pero sobre todo gracias por ser la mamá de los pollitos en el posgrado, gracias por motivarnos, por asesorarnos y por aguantarnos con todas nuestras dudas. Gracias por los minions al final de los exámenes, ya de perdida te sacan una sonrisa después del susto. Gracias por ser como es, tan bella por fuera como por dentro!.

Jenny y Dante muchas gracias por el tiempo dedicado y el conocimiento compartido durante el desarrollo de mi tesis.

Gracias a todas las foquitas, lobo fino y marsopa por enseñarme todo lo que sé de focas en campo y por llenarme el corazón de alegría, sin ustedes sería pura ñoñez. Gracias compañeros de aventuras Maricela <3, Denise <3, Claudia, Eva, Lupita, Alejandro, Edgar y Gustavo por tener un corazón tan grande y no dejar que me faltará nada cuando llegué enfermar. Yo creo que ese 2% de corazón extra lo gané al conocerlos a ustedes, me han llenado de dicha y experiencias y no les cambio ni un pelito o aleta.

Gracias Amayrani, Zury, Naye, Leo, Vence, Jaime, Isabel, Violeta, Karina, Scarlet, Luly y Felipe por ser tan maravillosas personas en mi vida, por ustedes la frase “la medida del amor, es

amar sin medida” tiene sentido y no importa si estamos lejos o cerca ustedes siempre están en mi corazón y mente.

Por último y no menos importante, por ser el personaje estelar en la novela de mi vida, amigo y cómplice, Francisco Brassea Escalante, le agradezco en palabras de un gran hombre a otro, “[...] El hombre aún lleva impresa en su estructura corpórea la huella indeleble de su humilde origen” Charles Darwin. Así yo llevo la huella de su fuerza y coraje en mi sangre y apellido D.E.P.



Tabla de contenido

Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	v
Agradecimientos.....	vi
Lista de figuras.....	xii
Lista de tablas.....	xv
1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	3
1.1.1 Características de la foca de puerto (<i>Phoca vitulina richardii</i> , Gray 1864).....	3
1.1.2 Distribución, abundancia y hábitat de <i>P. v. richardii</i>	4
1.1.3 Temporadas de reproducción y muda.....	6
1.1.4 Hábitos alimentarios de la foca de puerto.....	7
1.1.5 Métodos implementados en la identificación de la dieta en pinnípedos.....	9
1.2 Justificación.....	12
1.3 Hipótesis.....	13
1.4 Objetivos.....	13
1.4.1 Objetivo General.....	13
1.4.2 Objetivos Particulares.....	13
2. Metodología.....	14
2.1 Área de estudio.....	14
2.2 Muestras fecales de <i>Phoca vitulina richardii</i>	15
2.3 Análisis molecular.....	16
2.3.1 Método de extracción de ADN por kit.....	17
2.3.2 Método de extracción de ADN por sales (“Salting-out”).....	17
2.3.3 Selección de productos de extracción.....	18
2.4 Construcción de librerías en dos pasos de PCR para secuenciación masiva.....	18

2.5 Purificación, normalización y cuantificación de librerías.....	22
2.6 Secuenciación de las librerías en el equipo MiSeq®	23
2.7 Implementación de herramientas bioinformáticas	24
2.7.1 Obtención de archivos	24
2.7.2 Filtrado de secuencias.....	24
2.7.3 Limpieza de secuencias.....	26
2.7.4 Elección y filtrado de una base de datos	27
2.7.5 BLAST local e identificación de presas	28
2.7.6 Presas identificadas por métodos convencionales y moleculares.....	29
2.7.7 Análisis estadísticos	29
3. Resultados	34
3.1 Selección de muestras	34
3.2 Amplificación de productos de extracción	34
3.3 Normalización y cuantificación de librerías	35
3.4 Secuenciación masiva	36
3.5 Riqueza de presas (S)	38
3.5.1 Isla Todos Santos Sur	39
3.5.2 Isla San Jerónimo	43
3.5.3 Isla Natividad.....	48
3.5.4 Isla San Roque	54
3.5.5 Dieta de la foca de puerto a lo largo de su distribución en México	60
4. Discusión	64
4.1 Análisis de muestras fecales	64
4.2 Formación y secuenciación de librerías	65
4.3 Asignación taxonómica por amplicón.....	68

4.4 Presencia-Ausencia de presas.....	69
4.5 Hábitos alimentarios de la foca de puerto	71
4.5.1 Análisis de restos sólidos y secuenciación masiva.....	71
4.5.2 Presas de la foca de puerto (<i>P. vitulina richardii</i>) en México	74
4.5.3 Amplitud trófica de la foca de puerto.....	78
4.6 Alimento de las presas y parásitos.....	79
5. Conclusiones.....	81
Literatura citada	83
Anexos.....	96

Lista de figuras

Figura		Página
1	Individuo de foca de puerto (<i>Phoca vitulina richardii</i>) en Isla Todos Santos Sur, Ensenada, Baja California, México (Foto de E. Brassea).....	4
2	Sitios de colecta de heces de la foca de puerto en México (temporada de muda 2014).....	14
3	Método de PCR en dos pasos para la secuenciación de amplicones utilizando la plataforma de Illumina® para el equipo MiSeq.....	19
4	Índices utilizados para la realización del segundo paso de PCR. La letra F hace referencia a los primers sentido (“forward” 5’-3’); la letra R representa los primers antisentido (“reverse” 3’-5’).....	21
5	Selección de secuencias por valor de calidad. (1) Ejemplo del valor de calidad promedio de las secuencias de una muestra dada utilizando el Software FastQC. (2-3) Lecturas filtradas y reducidas correspondientes a los oligos sentido y antisentido respectivamente. (pb) Pares de bases.....	25
6	Registro de secuencias contenidas en GenBank® de 1982 a 2016.....	27
7	Confirmación visual de los productos del segundo paso de PCR (5 µl) correspondientes a muestras fecales de <i>P. v. richardii</i> . Gel de agarosa al 2% (120 V, 90 min).....	35
8	Concentraciones de ADN obtenidas a través de la cuantificación por fluorescencia.....	36
9	Lecturas obtenidas por cada muestra fecal colectadas dentro de los sitios: islas Todos Santos Sur (TS), San Jerónimo (SJ), Natividad (N) y San Roque (SR). El eje X corresponde a las etiquetas de cada muestra, ej. (TS) clave del sitio, (1) muestra número 1.....	37
10	Curva de acumulación de especies observadas (línea continua) y estimadas (línea punteada) para la dieta de la foca de puerto en Isla Todos Santos Sur. El eje de las abscisas indica el número de muestras utilizadas para este análisis.....	40
11	Proporción de los principales grupos consumidos por la foca de puerto en Isla Todos Santos Sur, Baja California, México.....	41
12	Especies identificadas dentro de la dieta de la foca de puerto en Isla Todos Santos Sur, Baja California, México. (A) Indica el número de presas identificadas por Durazo-Rodríguez (2015) (n=42) que no se comparten con el presente estudio. (B) Indica las presas identificadas de forma exclusiva con el análisis metagenómico (n=4). (C) Indica el número de presas que ambos métodos comparten. (D) Representa la riqueza de presas identificadas a partir de restos sólidos y metagenómica por	43

	muestras en común. (E) Localización geográfica de Isla Todos Santos Sur.....	
13	Proporción de frecuencia de ocurrencia (%FO) de las presas de la foca de puerto identificadas a través de restos duros y metagenómica, en la Isla Todos Santos Sur, Baja California, México. (A) Indica la frecuencia con la que ocurren los taxa presa identificados a través de ambos métodos (n=4). (B) Indica la frecuencia con la que ocurren los taxa presa identificados a partir de remanentes sólidos (n=42) y herramientas metagenómicas (n=4).....	44
14	Curva de acumulación de especies observadas (línea sólida) y estimadas (línea punteada) para la dieta de la foca de puerto en Isla San Jerónimo. El eje de las abscisas indica el número de muestras utilizadas para este análisis.....	45
15	Proporción de los principales grupos consumidos por la foca de puerto en Isla San Jerónimo, Baja California, México.....	46
16	Especies identificadas dentro de la dieta de la foca de puerto en Isla San Jerónimo, Baja California, México. (A) Indica el número de presas identificadas por Durazo-Rodríguez (2015) (n=72) que no se comparten con el presente estudio. (B) Indica las presas identificadas de forma exclusiva con el análisis metagenómico (n=4). (C) Indica el número de presas que ambos métodos comparten. (D) Representa la riqueza de presas identificadas a partir de restos sólidos y metagenómica por muestras en común. (E) Localización geográfica de Isla San Jerónimo.....	48
17	Proporción de frecuencia de ocurrencia (%FO) de las presas de la foca de puerto identificadas a través de restos duros y metagenómica, en la Isla San Jerónimo, Baja California, México. (A) Indica la frecuencia con la que ocurren los taxa presa identificados a través de ambos métodos (n=4). (B) Indica la frecuencia con la que ocurren los taxa presa identificados a partir de remanentes sólidos (n=72) y análisis metagenómico (n=4).....	49
18	Curva de acumulación de especies observadas (línea continua) y estimadas (línea punteada) para la dieta de la foca de puerto en Isla Natividad. El eje de las abscisas indica el número de muestras utilizadas para este análisis.....	50
19	Proporción de los principales grupos consumidos por la foca de puerto en Isla Natividad, Baja California Sur, México.....	51
20	Especies identificadas dentro de la dieta de la foca de puerto en Isla Natividad, Baja California Sur, México. (A) Indica el número de presas identificadas por Durazo-Rodríguez (2015) (n=53) que no se comparten con el presente estudio. (B) Indica las presas identificadas de forma exclusiva con el análisis metagenómico (n=4). (C) Indica el número de presas que ambos métodos comparten. (D) Representa la riqueza de presas identificadas a partir de restos sólidos y metagenómica por muestras en común. (E) Localización geográfica de Isla Natividad.....	53
21	Proporción de frecuencia de ocurrencia (%FO) de las presas de la foca de puerto identificadas a través de restos duros y metagenómica, en Isla Natividad, Baja California Sur, México. (A) Indica la frecuencia con la que ocurren los taxa presa	54

	identificados a través de ambos métodos (n=4). (B) Indica la frecuencia con la que ocurren los taxa presa identificados a partir de remanentes sólidos (n=53) y análisis metagenómico (n=4).....	
22	Cu48rva de acumulación de especies observadas (línea sólida) y estimadas (línea punt50eada) para la dieta de la foca de puerto en Isla San Roque. El eje de las abscisa51s indica el número de muestras utilizadas para este análisis.....	55
23	Proporció52n de los principales grupos consumidos por la foca de puerto en Isla San Roque, Baja California Sur, México.....	56
24	Especies identificadas dentro de la dieta de la foca de puerto en Isla San Roque, Baja California Sur, México. (A) Indica el número de presas identificadas por Durazo-Rodríguez (2015) (n=44) que no se comparten con el presente estudio. (B) Indica las presas identificadas de forma exclusiva con el análisis metagenómico (n=4). (C) Indica el número de presas que ambos métodos comparten. (D) Representa la riqueza de presas identificadas a partir de restos sólidos y metagenómica por muestras en común. (E) Localización geográfica de Isla San Roque.....	59
25	Proporción de frecuencia de ocurrencia (%FO) de las presas de la foca de puerto identificadas a través de restos duros y metagenómica, en Isla San Roque, Baja California Sur, México. (A) Indica la frecuencia con la que ocurren los taxa presa identificados a través de ambos métodos (n=4). (B) Indica la frecuencia con la que ocurren los taxa presa identificados a partir de remanentes sólidos (n=43, temporada de premuda) y análisis metagenómico (n=4).....	60
26	Frecuencia de ocurrencia de los distintos tipos de presa que conforman la dieta de la foca de puerto en México.....	61
27	Traslapo de la dieta de la foca de puerto en cuatro sitios de estudio en México, según el número de especies compartidas entre ellos. (TS) Isla Todos Santos Sur; (N) Isla Natividad; (SR) Isla San Roque; (SJ) Isla San Jerónimo.....	62
28	Curva de acumulación de especies observadas (línea sólida) y estimadas (línea punteada) para la dieta de la foca de puerto en México. El eje de las abscisas indica el número de muestras utilizadas para este análisis.....	63

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Islas y fechas en que se realizaron las colectas de heces de <i>P. v. richardii</i>	16
2	Primers utilizados dentro del primer paso de PCR punto final. En verde se destaca la secuencia correspondiente al locus de interés (región 16S ADNmt y región 18S ARNr).....	20
3	Primers “forward” y “reverse” utilizados para el indexado de las muestras durante el segundo paso de PCR. En azul se resalta la secuencia correspondiente al índice o código de la muestra.....	21
4	Ordenamiento de datos para la agrupación de secuencias por locus. Ejemplo dado para la muestra uno de Isla Todos Santos Sur (TS1).....	26
5	Riqueza de presas (S) de la foca de puerto en Isla Todos Santos Sur (TS).....	39
6	Riqueza de presas (S) de la foca de puerto en Isla San Jerónimo (SJ).....	45
7	Riqueza de presas (S) de la foca de puerto en Isla Natividad (N).....	50
8	Riqueza de presas (S) de la foca de puerto en Isla San Roque (SR).....	55
9	Espectro alimentario de la foca de puerto en México obtenido a través de metagenómica. La numeración representa a los siguientes grupos taxonómicos: (1) Cephalopoda; (2) Crustacea; (3) Elasmobranchii; (4) Myxinidae; (5) Cnidaria; (6) Bivalvia.....	64

1. Introducción

El estudio de la dieta de un organismo de alto nivel trófico brinda información sobre su papel en la estructura y estabilidad de un ecosistema (Bowen, 1997). El flujo de energía en una comunidad puede inferirse a través de las interacciones alimentarias entre los organismos que lo habitan (De Ruiter *et al.*, 2005). La importancia del estudio de las relaciones tróficas se debe a que la distribución, abundancia y comportamiento de las especies se ven influenciadas por sus interacciones interespecíficas (MacArthur, 1995). Como depredador de alto nivel trófico (Mearns *et al.*, 1981), la foca de puerto (*Phoca vitulina richardii*) juega un papel importante en la ecología del ecosistema en que habita. Por otra parte, al ser residente de sus colonias (Bigg, 1969; Thompson, 1993), esta subespecie puede considerarse un indicador local de la presencia de sus presas.

El presente estudio se integra al esfuerzo de conservación de la foca de puerto (*Phoca vitulina richardii*) en México. La determinación de los hábitos alimentarios de una especie forma parte de la información biológica base para la conservación de la misma. Además, nos brinda información acerca de la susceptibilidad de un organismo ante un disturbio (Angermeier, 1995; Shultz *et al.*, 2005), su papel en un ecosistema (MacArthur, 1995), su posición trófica (Mearns *et al.*, 1981), sus interacciones (competencia) al explotar un recurso (Bowen, 1997) y puede resultar ser una medida indirecta de la presencia en el tiempo y el espacio de las especies de interés comercial de las cuales se alimenta (Scheffer y Sperry, 1931). Al ser un depredador tope con altos requerimientos energéticos (Bonner, 1979; Olesiuk, 1993; Oxman, 1995) la determinación de la dieta de la foca de puerto es clave en la evaluación del impacto que esta subespecie ejerce en un hábitat determinado.

En México, la estrategia alimentaria de la foca de puerto es considerada especialista (Durazo-Rodríguez, 2015), y se alimenta principalmente de peces óseos y cefalópodos (Elorriaga-Verplancken *et al.*, 2013; Alamán-de-Regules, 2014; Durazo-Rodríguez, 2015). Estos autores utilizaron métodos escatológicos tradicionales basados en la identificación de estructuras duras en heces para conocer su dieta.

Existen diferentes métodos utilizados en la determinación de la dieta de pinnípedos. Algunos de estos métodos emplean técnicas directas como el análisis de contenidos estomacales; en otros estudios se aplican técnicas indirectas como los análisis moleculares y de restos de presas en heces (Bowen e Iverson, 2013). El análisis de remanentes sólidos en heces para la identificación de presas de fócidos y

otáridos subestima la abundancia de las presas consumidas ya que no todas las estructuras duras son recuperadas luego de la digestión del alimento; de igual forma se subestima la abundancia de presas con estructuras frágiles y presas de cuerpo blando (Bowen, 2000). Los resultados obtenidos a partir de esta técnica se encuentran limitados a especies presa que cuentan con estructuras duras de longitud mayor a 0.5 mm (Dellinger y Trillmich, 1998), por lo que la ingesta de algunos invertebrados y peces cartilagosos no se puede registrar. Por lo anterior, es importante integrar técnicas moleculares al estudio de la dieta de la foca de puerto, que permitan complementar el conocimiento sobre el espectro alimentario de esta especie en toda su distribución, y en nuestro país en particular.

Una aproximación más amplia en la identificación de la dieta de mamíferos marinos se obtiene a través del análisis del ADN de las presas contenido en las heces del depredador (Bowen e Iverson, 2013). El surgimiento de técnicas de secuenciación de ADN de siguiente generación ha permitido el desarrollo de la secuenciación masiva de alta eficiencia y rendimiento. La metagenómica constituye una disciplina novedosa que utiliza dichas herramientas para analizar el material genético correspondiente a distintos taxa de forma conjunta (Xu, 2006). Esta disciplina consiste en la aplicación de tecnologías genómicas, como la secuenciación masiva y herramientas bioinformáticas destinadas a la determinación de los miembros de una comunidad a través del ADN obtenido directamente del ambiente de estudio (Thomas *et al.*, 2012).

La temporada de muda de *P. v. richardii* ofrece una oportunidad en la colecta de muestras de heces de esta especie, ya que es la temporada del año en que hay una mayor cantidad de individuos en tierra (Tapia-Harris, 2015). De esta forma es posible obtener un mayor número de muestras fecales para el estudio de su dieta (Boily, 1995; Daniel *et al.*, 2003).

El objetivo del presente estudio fue determinar los hábitos alimentarios de la subespecie *P. v. richardii* durante la temporada de muda a lo largo de su distribución en México por medio de metagenómica, y compararlo con los resultados del método tradicional de identificación de restos duros en las mismas muestras. Esta innovación en el estudio de la dieta de la foca de puerto en México permitirá dar a conocer por vez primera aquellas especies presa que hasta ahora no era posible identificar por medio del análisis de restos duros en heces.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Características de la foca de puerto (*Phoca vitulina richardii*, Gray 1864)

Gray (1864) clasifica a la foca de puerto dentro de la Clase Mammalia, Orden Carnivora, Suborden Pinnipedia y Familia Phocidae. Algunos caracteres que distinguen a esta familia de los otáridos (lobos marinos) son: ausencia de pabellón auditivo externo, cuerpo alargado, locomoción en tierra por ondulaciones del cuerpo e incapacidad de plegar las aletas posteriores por debajo del cuerpo (Berta *et al.*, 2015).

La especie *Phoca vitulina* exhibe una variación en el color del pelaje y un patrón de manchas, marcas y anillos. La coloración es de tonos amarillos, marrones (temporada de muda) y grises, con presencia de manchas claras u oscuras distribuidas uniformemente sobre el dorso del cuerpo y en menor medida hacia el vientre (King, 1983; Jefferson *et al.*, 1993; Daniel *et al.*, 2003; Tapia-Harris, 2015). Este patrón de coloración no difiere entre machos y hembras (King, 1983).

La foca de puerto no muestra un dimorfismo sexual marcado, a diferencia de otras especies de pinnípedos (Elton, 1927); sin embargo, los machos presentan mayores tallas y peso que las hembras (Burns, 2002) (Figura 1). Los machos adultos alcanzan tallas de 1.9 m con un peso que oscila entre los 70-170 kg, mientras que las hembras adultas llegan a medir 1.7 m y pesar de 60 a 130 kg. Las crías al nacer presentan tallas entre los 70-100 cm y pesan aproximadamente de 8 a 12 kg (Burns, 2002).



Figura 1. Individuo de foca de puerto (*Phoca vitulina richardii*) en Isla Todos Santos Sur, Ensenada, Baja California, México (Foto de E. Brassea).

1.1.2 Distribución, abundancia y hábitat de *P. v. richardii*

En general, los pinnípedos tienden a habitar zonas de alta productividad debido a la abundancia de presas (Lipps y Mitchell, 1976). El sistema de la corriente de California constituye uno de los ecosistemas más productivos en el mundo con una alta diversidad de especies y una gran importancia comercial por las pesquerías que sostiene. Lo anterior es debido a la influencia de los eventos de surgencias que ocurren en esta área (Gruber *et al.*, 2012).

La foca de puerto (*Phoca vitulina*, Linnaeus 1758) es el pinnípedo de mayor distribución en el mundo, encontrándose en las costas y complejos insulares del océano Pacífico y del océano Atlántico del hemisferio norte. Existen tres subespecies: *P. v. richardii* (Gray, 1864), *P. v. mellonae* y *P. v. vitulina* (Linnaeus, 1758) (Committee on Taxonomy, 2016).

P. v. richardii se distribuye desde la costa oriental del océano Pacífico, a partir de Hokkaido, Japón (44° N), hasta la costa occidental del mismo, desde las Islas Aleutianas, Golfo de Alaska (57° N), hasta la

Isla Asunción, México (27° N), como su distribución más sureña (Perrin *et al.*, 2002; Lubinsky *et al.*, en prensa). Sin embargo, se han reportado avistamientos aislados dentro del Golfo de California en Los Islotes, Baja California Sur, México (King, 1983; Gallo-Reynoso y Aurióles-Gamboa, 1984). A pesar de contar con una amplia distribución hacia el noreste del océano Pacífico, en México su distribución se considera marginal debido a su reducida ocupación dentro del territorio nacional (Torres, 1995).

La mayor parte de los esfuerzos de investigación realizados en México sobre esta subespecie se han enfocado a la determinación de su distribución y estado poblacional (Anthony, 1925; Bartholomew y Hubbs 1952; Brownell *et al.* 1974; Gallo-Reynoso y Aurióles-Gamboa, 1984; Serrano-Padilla, 1989; Padilla-Villavicencio, 1990; Loya-Salinas *et al.*, 1992; Torres *et al.*, 1995; Maravilla-Chávez y Lowry, 1996; Lubinsky *et al.*, en prensa).

Las colonias reproductivas de esta subespecie se encuentran distribuidas desde las Islas Coronado, Tijuana, Baja California, hasta Bahía Asunción, Mulegé, Baja California Sur (Lubinsky *et al.*, en prensa). Como parte de las colonias reproductivas se destacan 9 islas o complejos insulares: Islas Coronado, Islas Todos Santos, Isla San Martín, Isla San Jerónimo, Isla Cedros, Islas San Benito, Isla Natividad, Isla San Roque e Isla Asunción (Padilla-Villavicencio, 1990; Lubinsky *et al.*, en prensa).

La abundancia total de la subespecie se ha estimado en 330,619 individuos (DFO, 2010; Allen y Angliss, 2013; Carreta *et al.*, 2014; Kobayashi *et al.*, 2014; Lubinsky *et al.*, en prensa). En México, se encuentra solamente el 1.46% de esta población, es decir, alrededor de 4,862 individuos (Lubinsky *et al.*, en prensa).

La foca de puerto habita en aguas frías y templadas dentro de sitios con resguardo del oleaje, principalmente durante la temporada reproductiva (Montgomery *et al.*, 2007; Lubinsky *et al.*, en prensa). En México, esta subespecie muestra preferencias sobre áreas con sustratos rocosos; sin embargo, esta condición puede variar a lo largo de su distribución (Stewart y Yochem 1994; Lubinsky *et al.*, en prensa). Arias del Razo y colaboradores (2016) encontraron que la foca de puerto en México cuenta con distinta preferencia de hábitat durante invierno y verano. Esta subespecie puede encontrarse dentro de sitios de fácil acceso u óptimos para la alimentación durante la temporada de crianza y temporada no reproductiva, respectivamente.

La foca de puerto presenta filopatría, es decir, tiene una tendencia a la permanencia en su lugar de nacimiento (Härkönen y Harding, 2001). Se ha reportado en otras especies de pinnípedos que esta

tendencia se encuentra relacionada con la fidelidad al sitio de alimentación, principalmente durante la temporada reproductiva y la lactancia (Robson *et al.*, 2004; Hoffman *et al.*, 2006). Aunado a lo anterior, la foca de puerto tiene un radio de dispersión de 30-50 km en aguas contiguas a su colonia (Thompson, 1993; Härkönen y Harding, 2001); sin embargo, existen casos aislados de individuos que se han alejado hasta 550 km de su colonia (Brown y Mate, 1983). Este último patrón de movimiento es comúnmente observado en individuos juveniles (Lowry *et al.*, 2001).

1.1.3 Temporadas de reproducción y muda

La foca de puerto presenta un ciclo reproductivo anual donde la temporada de nacimientos da inicio durante el invierno (febrero), aunque esta temporalidad varía regionalmente a lo largo de su distribución (Bigg, 1969; Bigg, 1981; Temte *et al.*, 1991). En México los nacimientos de *P. v. richardii* tienen lugar durante el período de enero a abril, mientras que la cópula ocurre a partir del mes de febrero (Padilla-Villavicencio, 1990; Loya-Salinas *et al.*, 1992; Fernández-Martín *et al.*, 2016).

La muda, al igual que la reproducción, es un evento biológico recurrente de gran precisión para esta especie (Temte, 1991). Este evento tiene por objetivo generar una nueva capa de piel y pelo por pérdida y subsecuente sustitución de la capa de pelo anterior (Stewart, 2002). El período de inicio y término de este evento varía de acuerdo a la localización geográfica de las poblaciones. En general tiene lugar durante la temporada de primavera a otoño (National Audubon Society, 2005). Fernández-Martín y colaboradores (2016) estimaron, con base en observaciones en el año 2012, que en el estero de Punta Banda (Baja California, México) la temporada de muda inició a finales de abril (25 de abril) y culminó a mediados de julio (13 de julio), ocurriendo la máxima proporción de individuos en muda a mediados de junio (10 de junio). Tapia-Harris (2015) reportó que para la isla Todos Santos Sur, en 2014 la etapa de muda ocurrió del 18 de abril al 10 de julio; mientras que en la isla San Roque el inicio de la muda tuvo lugar el 25 de febrero, culminando el 25 de junio.

Se ha observado que durante la temporada de muda el número de focas en tierra de las distintas categorías de edad y sexo es mayor que durante otras temporadas (Stewart y Yochem, 1994; Bonnes *et al.*, 2006; Fernández-Martín *et al.*, 2016). Lo anterior responde a una necesidad fisiológica (Boily, 1995) y contribuye a una mayor probabilidad de coleccionar heces para el estudio de sus hábitos alimentarios.

El estudio de la dieta durante la muda es clave en el conocimiento de la ecofisiología de los organismos. Williams *et al.* (2007) encontraron que en otáridos la demanda energética, así como un aumento en la tasa metabólica, muestran un máximo durante la temporada de muda. Por lo tanto, esta temporada tiene fuertes implicaciones sobre los requerimientos energéticos y la dieta de estos organismos.

1.1.4 Hábitos alimentarios de la foca de puerto

La actividad alimentaria de los depredadores tope en los ecosistemas, brinda una perspectiva sobre el control “arriba-abajo” de estos consumidores hacia las poblaciones de sus presas (Estes *et al.*, 2001; Ripple y Beschta, 2004). Zavala-González (2000) reportó que los miembros del Suborden Pinnipedia son considerados consumidores terciarios, alimentándose principalmente de especies de invertebrados y peces (Kenyon, 1959; Rice, 1968).

Durazo-Rodríguez (2015) encontró que la *P. v. richardii* en México cuenta con un nivel trófico de 4.7, el cual sitúa a esta subespecie como un depredador terciario. La posición trófica de la foca de puerto fue calculada por medio del índice de nivel trófico descrito por Christensen y Pauly (1992); el intervalo de este índice es de 1 a 5, donde 1 equivale a la posición que ocupan los productores primarios en la red trófica y 5 corresponde a los depredadores tope.

De igual forma, se conoce que los pinnípedos juegan un papel importante en la estructuración de la comunidad de sus especies presa (Power y Gregoire, 1978), así como en la modificación de los hábitats bentónicos (Oliver *et al.*, 1985).

Existen diversos trabajos realizados sobre la dieta de la subespecie *P. v. richardii* a lo largo de su distribución en el Pacífico nororiental (Scheffer y Sperry, 1931; Brown y Mate, 1983; Torok, 1994; Brown *et al.*, 2002; Herreman *et al.*, 2009). La dieta de la foca de puerto es predominantemente bentónica, alimentándose tanto de invertebrados, como de peces, incluyendo especies pelágicas de forma ocasional (Harvey, 1988).

Los esfuerzos de investigación sobre los hábitos alimentarios de esta especie realizados en localidades de Canadá y Estados Unidos se encuentran sesgados hacia el estudio de especies presa de interés comercial (Familia Salmonidae) (Stanley y Shaffer, 1995) y generalmente son realizados en escalas espacio-temporales limitadas. Scheffer y Sperry (1931) encontraron especies de invertebrados dentro de la dieta de la *P. v. richardii* analizando el contenido estomacal de 100 individuos varados. Los autores comentan que si bien los invertebrados forman parte de la dieta de la foca de puerto, su ingesta es mínima y posiblemente de carácter incidental. En México se ha encontrado que dentro de la dieta de la *P. v. richardii* las especies de cefalópodos son de importancia al igual que los peces óseos (Alamán-de-Regules, 2014; Durazo-Rodríguez, 2015).

El análisis de la dieta de la foca de puerto en México se encuentra limitado a pocos estudios, los cuales representan las colonias localizadas en el Estero Punta Banda, Islas Todos Santos, Isla San Jerónimo e Isla Natividad en Baja California; así como Isla San Roque en Baja California Sur (Elorriaga-Verplancken *et al.*, 2013; Alamán-de-Regules, 2014; Durazo-Rodríguez, 2015).

Elorriaga-Verplancken y colaboradores (2013) reportaron que la foca de puerto en Isla Natividad, B. C. S., es un depredador generalista, de nivel trófico 4.9, y se alimenta principalmente de peces óseos y especies bénticas-demersales. Alamán-de-Regules (2014) encontró que la estrategia alimentaria de este pinnípedo en el Estero Punta Banda e Isla Todos Santos Sur, B. C. es especialista temporal, de nivel trófico 4.61, siendo un depredador principalmente ictiófago de presas bentónicas. Finalmente, Durazo-Rodríguez (2015) identificó las presas de *P. v. richardii* a lo largo de su distribución en México. La autora reconoce a dicha especie como un depredador especialista, de nivel trófico 4.7, y consumidor de peces óseos y cefalópodos bentónicos en las islas Todos Santos Sur, San Jerónimo, Natividad y San Roque. Este último trabajo constituye la base del presente estudio donde se analizaron las mismas muestras bajo distinta metodología.

El estudio de la dieta de la foca de puerto en México puede contribuir a la clarificación sobre el papel que desempeña esta especie en las costas mexicanas. De igual forma permitirá enriquecer el acervo de información biológica básica de esta especie en el país.

Algunas de las especies presa reportadas dentro de la dieta de la subespecie *P. v. richardii* se presentan en el Anexo 1.

Se ha reportado que los hábitos alimentarios de la foca de puerto cambian a través de las distintas temporadas inherentes a su historia de vida; así como a lo largo de su distribución (Tollit *et al.*, 1998; Perrin *et al.*, 2002; Grigg *et al.*, 2009). Estas diferencias tienen lugar debido a la influencia de factores bióticos y abióticos que afectan la disponibilidad (Grigg *et al.*, 2009) y selectividad de sus especies presa (Harvey, 1988).

En los trabajos realizados en México, se ha encontrado que hay diferencias espaciales en cuanto a las presas preferidas de la foca de puerto (Alamán-de-Regules, 2014; Durazo-Rodríguez, 2015). Arafah-Dalmau (2014) encontró que existen diferencias latitudinales significativas en la macrofauna bentónica de sitios protegidos correspondientes a las islas Todos Santos, San Martín y San Jerónimo. Debido a este gradiente latitudinal en términos de la comunidad de especies bentónicas, la dieta de la foca de puerto en México puede ser diferente entre colonias.

La foca de puerto es considerada una especie oportunista en términos de sus hábitos alimentarios (Härkönen, 1987; Harvey, 1988). Una pequeña proporción de sus presas tiende a dominar la dieta; sin embargo, su alimentación fluctúa con base en la abundancia de las especies presa en el ambiente circundante (Brown y Mate, 1983; Tollit *et al.*, 1998).

1.1.5 Métodos implementados en la identificación de la dieta en pinnípedos

La diversidad de la dieta de pinnípedos es sensible al método utilizado para determinarla, ya que cada uno de estos conlleva un sesgo relacionado a la detección de cierto tipo de presas (Arim y Naya, 2003).

Durante finales del siglo XIX e inicios del siglo XX fueron publicados estudios minuciosos sobre la dieta de pinnípedos, con énfasis en fócidos y otáridos. La mayor parte de estos estudios identifican sólo parte de la dieta y no el espectro alimentario del depredador, es decir, no contemplan la totalidad de especies presa que los pinnípedos consumen. Estas investigaciones comúnmente se realizaban por medio del estudio del contenido estomacal de individuos muertos o sacrificados (Dyche, 1899; Scheffer y Sperry, 1931).

La comisión de pesca en Estados Unidos (United States Fish Commission, 1901) reporta que fue necesario sacrificar 18 individuos de lobo marino de Steller (*Eumetopias jubatus*, Schreber 1776) y 24 individuos de lobo marino de California (*Zalophus californianus*, Lesson 1828) para el estudio de sus contenidos estomacales durante la identificación de la dieta de estas especies. Scheffer y Sperry (1931) trabajaron en conjunto con cazadores de *P. v. richardii*, logrando coleccionar 100 estómagos para la identificación de la dieta de la foca de puerto en Washington, Estados Unidos.

En la actualidad, existen diversos métodos para determinar la dieta de un organismo. Bowen e Iverson (2013) llevaron a cabo una recopilación sobre los métodos comúnmente utilizados para la determinación de la dieta en mamíferos marinos. Dentro de estos métodos se destaca, por la frecuencia de su uso, el análisis de restos no digeridos en heces, por ser de carácter no invasivo y útil en términos de resolución taxonómica.

Elorriaga-Verplancken y colaboradores (2013) identificaron el 93.61% de las estructuras duras recuperadas a partir de 11 muestras fecales; estas estructuras correspondieron a 11 presas de la foca de puerto en Isla Natividad, B. C. S., México. Alamán-de-Regules (2014) reportó 21 presas de la foca en el Estero Punta Banda e Isla Todos Santos Sur, Ensenada, B. C., identificadas a través del análisis de 1,299 restos sólidos contenidos en 233 heces (el autor reconoce la identidad taxonómica del ~99% de las estructuras recuperadas). Con el mismo método, Durazo-Rodríguez (2015) identificó 44 especies presa de este pinnípedo durante la temporada de muda y premuda en México. La autora recuperó 10,954 estructuras duras (n=249 muestras de heces), las cuales fueron identificadas en el 98.18% de los casos. Durazo-Rodríguez (2015) menciona haber encontrado remanentes de crustáceos; sin embargo, no fue posible su identificación.

Cottrell *et al.* (1996) pusieron a prueba la efectividad de este método en términos de la recuperación de estructuras duras utilizadas en la identificación de la dieta de la foca de puerto, mostrando que cuenta con una eficiencia de hasta el 54% de recuperación de otolitos de peces teleósteos. Los autores encontraron que existen diferencias significativas en la recuperación de otolitos entre las especies de peces que fueron parte de la dieta en cautiverio. Como ya se mencionó, dentro de la dieta de la foca de puerto existen presas de cuerpo blando, las cuales no pueden ser detectadas a través de este método (Scheffer y Sperry 1931). A la par, se ha encontrado que la diversidad de la dieta identificada en heces es menor a la determinada por contenido estomacal, debido a la degradación de las estructuras de las presas durante la digestión (Scheffer y Sperry, 1931; Arim y Naya, 2003; Sheffield y Grebmeier, 2009; Rivera,

2011). Estos resultados muestran que bajo este método, la identificación de la dieta se encuentra limitada a presas que presentan estructuras duras con variación interespecífica, y a la proporción en que sus restos son recuperados.

Dentro de estudios más recientes, Bowen e Iverson (2013) llevaron a cabo una recopilación sobre los métodos comúnmente utilizados para la determinación de la dieta en mamíferos marinos. Los autores encontraron que la implementación de técnicas moleculares (por ej. ADN de presas en muestras fecales) genera resultados con mayor exactitud en términos de resolución taxonómica de las especies presa que componen la dieta de un organismo.

Deagle *et al.* (2009) encontraron que existe una diferencia significativa entre las proporciones e identidad de especies presa identificadas a través de métodos convencionales, y métodos de secuenciación masiva metagenómicos para el lobo fino de Australia (*Arctocephalus pusillus pusillus*, Schreber 1775). Los autores concluyen que la aplicación de métodos de secuenciación masiva basados en la estrategia metagenómica expandirá el alcance de muchos estudios ecológicos-moleculares, en particular, estudios relacionados con interacciones tróficas.

La metagenómica es frecuentemente aplicada cuando se tienen muestras heterogéneas de ciertas comunidades de interés que se desean identificar (Wooley *et al.*, 2010). Esta estrategia emplea métodos de secuenciación masiva y bioinformática que permiten obtener la identidad taxonómica de fragmentos de ADN correspondientes a la dieta de un depredador (Deagle *et al.*, 2009). Esta herramienta ha sido utilizada en *Phoca vitulina* para la identificación de familias de herpesvirus en organismos sujetos a rehabilitación (Bodewes *et al.*, 2015). Muy recientemente Deagle y colaboradores (2013) estudiaron la dieta de *P. v. richardii* en cautiverio y encontraron que es posible identificar el ADN de presas en heces utilizando herramientas de secuenciación masiva (por medio de tecnología Ion Torrent PGMTM). Los autores también reportan que las proporciones de las secuencias obtenidas son diferentes a la proporción de las presas ingeridas (en términos de masa), por lo tanto, a través de esta metodología no es posible cuantificar el alimento consumido.

1.2 Justificación

La conservación de ecosistemas marinos requiere de estudios interdisciplinarios que permitan resolver problemas biológicos específicos. Gracias a la sensibilidad de sus poblaciones, los pinnípedos pueden ser utilizados como bioindicadores de cambios en el ambiente o degradación de un hábitat (Trites, 1997; Moore, 2008). Estos disturbios pueden ser estudiados a través del monitoreo de los hábitos alimentarios, comportamiento y abundancia de las poblaciones de pinnípedos (Bengston y Laws, 1985; Trillmich y Ono, 1991).

Identificar el espectro alimentario de la foca de puerto es importante, ya que consume presas de interés comercial (Durazo-Rodríguez, 2015), compite con la pesca regional (Scheffer y Sperry, 1931), posee un alto nivel trófico (Mearns *et al.*, 1981; Pablo, 2009; Elorriaga-Verplancken *et al.*, 2013; Alamán-de-Regules, 2014; Durazo-Rodríguez, 2015) y muestra sensibilidad a los cambios en el entorno que habita (Trillmich *et al.*, 1991; Trites, 1997).

La alimentación de la foca de puerto en México hasta ahora ha sido caracterizada a partir de la identificación de restos duros. Este tipo de análisis podría estar subestimando elementos de la dieta que pudiesen ser de importancia para la foca de puerto (Dehn *et al.*, 2007). Aunado a lo anterior, la información sobre la dieta de esta subespecie en México es muy reciente (se conoce a partir de 2013) en contraste con otros países. El análisis de la composición de la dieta de *P. v. richardii* por métodos metagenómicos permite identificar un mayor número de especies presa, en comparación con los análisis de contenidos estomacales y restos duros en heces. Esta herramienta molecular constituye un método de carácter no invasivo y novedoso en el estudio de los hábitos alimentarios de la foca de puerto en nuestro país. Por lo anterior, el presente estudio permitirá aumentar el conocimiento sobre las especies presa que consume la subespecie *P. v. richardii* en México.

Debido a que las focas de puerto permanecen todo el año en sus colonias reproductivas, son excelentes indicadoras de la abundancia regional de sus especies presa (Härkönen y Harding, 2001). Por lo tanto, *P. v. richardii* es clave en el diseño de estrategias de gestión ambiental a escala regional. Aunado a lo anterior, la foca de puerto es considerada prioridad para la conservación en México (SEMARNAT, 2000) y se encuentra sujeta a protección especial (NOM-059-SEMARNAT-2010).

1.3 Hipótesis

-  Por medio de la metagenómica se detectan más presas en la dieta de la foca de puerto que por medio de la identificación de restos sólidos en heces.
-  Existen diferencias en las especies de presas consumidas por la foca de puerto en las distintas colonias muestreadas.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

-  Caracterizar la dieta de la foca de puerto en México por medio de aproximaciones metagenómicas durante la temporada de muda

1.4.2 Objetivos Particulares

-  Identificar las especies presa de la *P. v. richardii* mediante metagenómica de amplicones.
-  Comparar los datos obtenidos por metagenómica con resultados previos de las mismas muestras analizadas por medio de la identificación de estructuras duras en heces.
-  Comparar la dieta entre las colonias de focas en las islas Todos Santos Sur, San Jerónimo, Natividad y San Roque.

2. Metodología

2.1 Área de estudio

El área de estudio comprende cuatro de las principales colonias reproductivas de la foca de puerto en México: Isla Todos Santos Sur, Isla San Jerónimo, Isla Natividad e Isla San Roque (Figura 2).

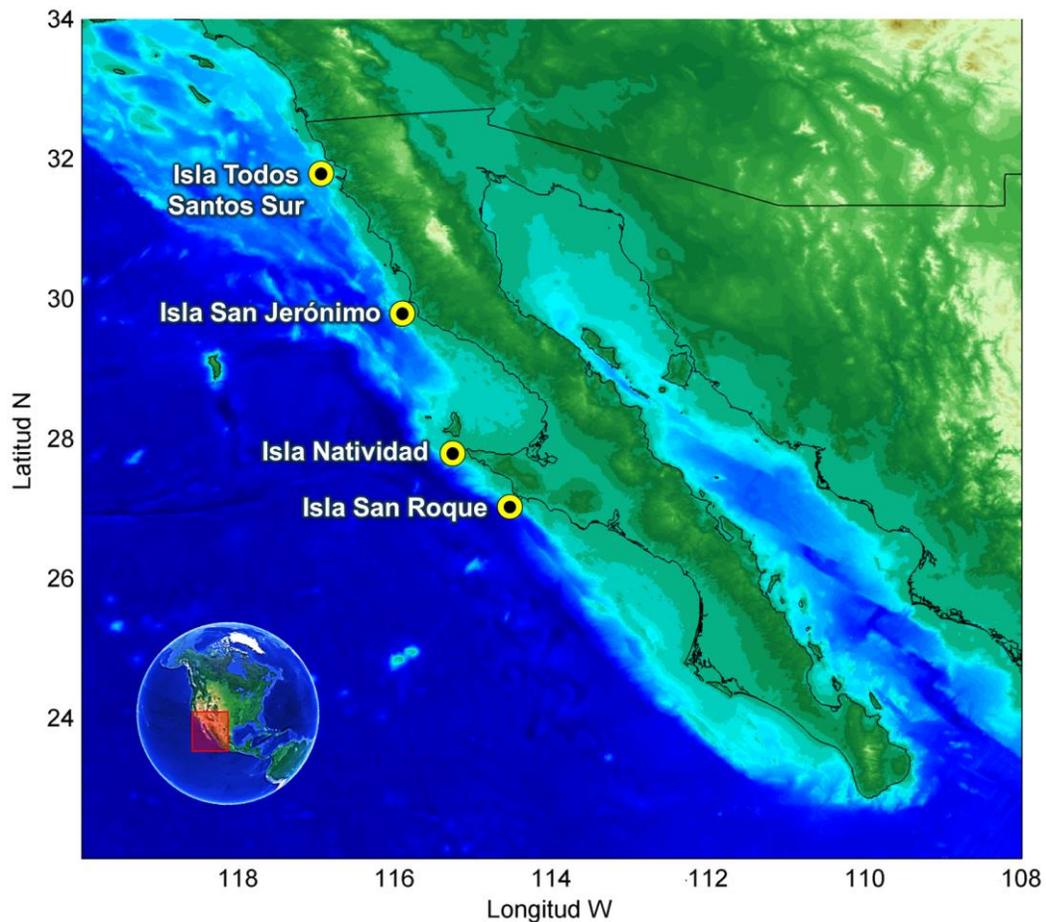


Figura 2. Sitios de colecta de heces de la foca de puerto en México (temporada de muda 2014).

La Isla Todos Santos Sur se localiza frente a las costas de la ciudad de Ensenada, Baja California, a 18 km del continente (Samaniego *et al.*, 2007). Se localiza entre los $31^{\circ}48'7''$ N y $116^{\circ}47'29''$ W. Se reconoce por su importancia como área de reproducción y ruta migratoria de mamíferos marinos (Arriaga-Cabrera *et al.*, 1998). Las aguas aledañas a esta isla presentan una alta productividad primaria (Olivos-Ortiz *et al.*,

2012) y un relieve submarino heterogéneo (Lankford, 1997). La Isla Todos Santos cuenta con playas donde predomina el sustrato rocoso y canto rodado (Arias del Razo *et al.*, 2016; Lubinsky *et al.*, en prensa).

La Isla San Jerónimo se localiza frente a las costas de la Bahía El Rosario, Municipio de Ensenada, Baja California (29°47'29" N, 115°47'32" W). Su distancia más próxima a la costa es de 9.7 km (Samaniego *et al.*, 2007) y se reconoce como un área de alta productividad primaria y secundaria, con surgencias permanentes de alta intensidad, marea semidiurna y profundidad de 0 a 200 m (CONABIO-CONANP-TNC-PRONATURA, 2007). Su costa está compuesta por playas rocosas, playas de arena y canto rodado (Lubinsky *et al.*, en prensa), y tiene una plataforma continental somera (Arias del Razo *et al.*, 2016).

La Isla Natividad se localiza frente a las costas de Punta Eugenia, Municipio de Mulegé, Baja California Sur, a 9.3 km del continente (Samaniego *et al.* 2007) (27° 52' 43.9674"N, 115° 11' 22.3434"W). Esta isla presenta combinaciones de sustrato de playas con arena y grava, o bien, de roca y cantos rodados (Arias del Razo *et al.*, 2016; Lubinsky *et al.*, en prensa). Forma parte de la Reserva de la Biosfera El Vizcaíno, y se encuentra en una zona con profundidades que van de los 0 a los 200 m con surgencias permanentes de alta intensidad (CONABIO-CONANP-TNC-PRONATURA, 2007). Otro aspecto de importancia es que este sitio llegó a presentar los bancos más ricos de abulón y langosta de Norteamérica (INE, 2000).

La Isla San Roque se localiza frente a la Bahía de Asunción, Municipio de Mulegé, Baja California Sur, a 1.9 km de la costa (Samaniego *et al.*, 2007) (27° 8' 50.5314" N, 114° 22' 36.516" W). Se considera de importancia, ya que forma parte de la Reserva de la Biosfera El Vizcaíno y cuenta con una zona núcleo de 440 ha. Conforman el hábitat de reproducción y desarrollo de fauna marina (INE, 2000; Samaniego *et al.*, 2007).

2.2 Muestras fecales de *Phoca vitulina richardii*

La colecta de muestras se realizó durante la temporada de muda del año 2014. Se eligió esta temporada por ser aquélla en que la mayor cantidad de individuos permanece más tiempo en tierra debido a sus necesidades térmicas (Feltz *et al.*, 1966), lo cual aumenta la probabilidad de colectar muestras fecales. Se obtuvieron un total de 80 muestras, 20 por colonia, las cuales fueron colectadas en fresco (≥ 200 mg). Las fechas de colecta se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Islas y fechas en que se realizaron las colectas de muestras de heces de *P. v. richardii*.

Localidad	Fecha	No. de muestras
Islas Todos Santos	31-mayo-2014	3
	02-junio-2014	17
Isla San Jerónimo	31-mayo-2014	20
Isla Natividad	02-junio-2014	20
Isla San Roque	07-abril-2014	18
	09-abril-2014	2

Las muestras fueron almacenadas en tubos Eppendorf y preservadas en RNAlater® (aproximadamente 1 ml) para evitar la degradación del ADN contenido en éstas. Posteriormente las muestras fueron homogenizadas manualmente con el fin de redistribuir el ADN contenido en las heces de forma más equitativa (Deagle *et al.*, 2005; Deagle *et al.*, 2009; Thomas, 2015). Las muestras fueron transportadas al laboratorio para su almacenamiento dentro de un ultracongelador a -76°C. El tiempo en que fueron preservadas las muestras varió entre islas desde unas cuantas horas (Natividad y San Jerónimo) a días posteriores al momento de la colecta (Todos Santos Sur y San Roque).

2.3 Análisis molecular

Las muestras fueron centrifugadas a 20,000 x g por 3 minutos con el fin de precipitar la matriz fecal en un pellet y decantar el RNAlater® sobrenadante. Se determinó el peso húmedo del pellet de cada muestra y se procedió a la extracción del ADN total contenido en las heces colectadas para cada sitio de estudio.

Debido a las diferencias en términos de tiempos de preservación y degradación del material génico de las muestras, se llevaron a cabo dos protocolos de extracción.

2.3.1 Método de extracción de ADN por kit

Se utilizó el kit de extracción QIAamp DNA Stool Mini Kit de QIAGEN (Maryland, E.U.A.) (Anexo 2) para las muestras cuya preservación fue inmediata a su colecta. Para ello se siguió el protocolo del fabricante para el aislamiento y detección del ADN de patógenos en heces. La temperatura y tiempo de incubación de las muestras fueron estandarizadas a 50°C por 5 y 10 minutos durante la primera y segunda incubación respectivamente. Los productos de extracción fueron confirmados a través de una electroforesis en gel de agarosa (1.5%), por 60 minutos a 60 V. La cuantificación del ADN extraído se llevó a cabo de forma visual utilizando como referencia las concentraciones de ADN reportadas por Abadía-Cardoso (2006). Con base en la concentración de ADN (ng/μl) obtenido se realizó una alícuota de cada muestra a una concentración aproximada de 20 ng/μl para su posterior amplificación vía reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

2.3.2 Método de extracción de ADN por sales (“Salting-out”)

Se llevó a cabo a través de una modificación al protocolo descrito por Aljanabi y Martinez (1997) (Anexo 3), aplicándose sobre aquellas muestras cuyo tiempo de preservación fue tardío (2-7 días) y pudiesen presentar mayor degradación en términos del contenido de ADN. La incubación de las muestras se realizó a una temperatura de 50°C durante 30 minutos. Al igual que en el protocolo anterior, los productos de extracción fueron confirmados a través de una electroforesis en gel de agarosa (1.5%), por 60 minutos a 60 V. La cuantificación del ADN extraído se llevó a cabo de forma visual utilizando como referencia las concentraciones de ADN reportadas por Abadía-Cardoso (2006). Ya que se trata de un método que no elimina del todo compuestos orgánicos e iónicos, este protocolo requiere de un tratamiento posterior a la extracción. Por lo anterior, se empleó el kit de purificación de PCR QIAquick de QIAGEN (Maryland, E.U.A.). Se tomaron alícuotas de cada muestra a una concentración aproximada de 20 ng/μl para su posterior amplificación por medio de PCR.

2.3.3 Selección de productos de extracción

Antes de proceder a la formación de las librerías de ADN se evaluó la viabilidad de las muestras, en términos de su contenido de ADN de presas, mediante la amplificación de los productos de extracción obtenidos. Para ello se utilizó el par de primers Cyb-6 (Citocromo b) (Enríquez-Paredes, 2016; datos no publicados) correspondiente a peces teleósteos (Familia Sciaenidae):

CB6_F 5'- TGAAGCAACCGCAACCAGTCC-3' y CB6_R 5'-AGCGGAGAATGGCGTAGGCG-3'

La confirmación visual de los productos de amplificación se hizo a través de la técnica de electroforesis (gel de agarosa al 1.5%) con apoyo de un fotodocumentador (transiluminador UV de BIO-RAD®). Se tomaron los positivos de esta prueba como criterio de selección de muestras. Fueron seleccionadas 4 muestras fecales por isla, dando un total de 16 muestras fecales. Estas muestras corresponden a individuos diferentes en cada sitio de estudio.

2.4 Construcción de librerías en dos pasos de PCR para secuenciación masiva

La amplificación de los productos de extracción se realizó mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final en dos pasos (Anexo 4). El primer paso consistió en la amplificación de la región genómica de interés junto a un adaptador de secuenciación de la plataforma Illumina® (San Diego, E.U.A.), el cual permite llevar a cabo el segundo paso de PCR. El segundo paso tuvo por objetivo añadir los adaptadores P5/P7 de la plataforma MiSeq® Illumina® y la secuencia correspondiente al código de la muestra (índices).

Durante esta segunda amplificación, el oligo correspondiente a los adaptadores P5/P7 e índices se unió a la secuencia complementaria del primer de secuenciación permitiendo la realización de este segundo paso de PCR. Los adaptadores P5 y P7 cumplen la función de hacer compatible el producto final de la amplificación con los oligos fijados en la celda de flujo utilizada durante la secuenciación por síntesis en el equipo MiSeq® (Figura 3).

¹Dr. Luis Enríquez Paredes
Universidad Autónoma de Baja California

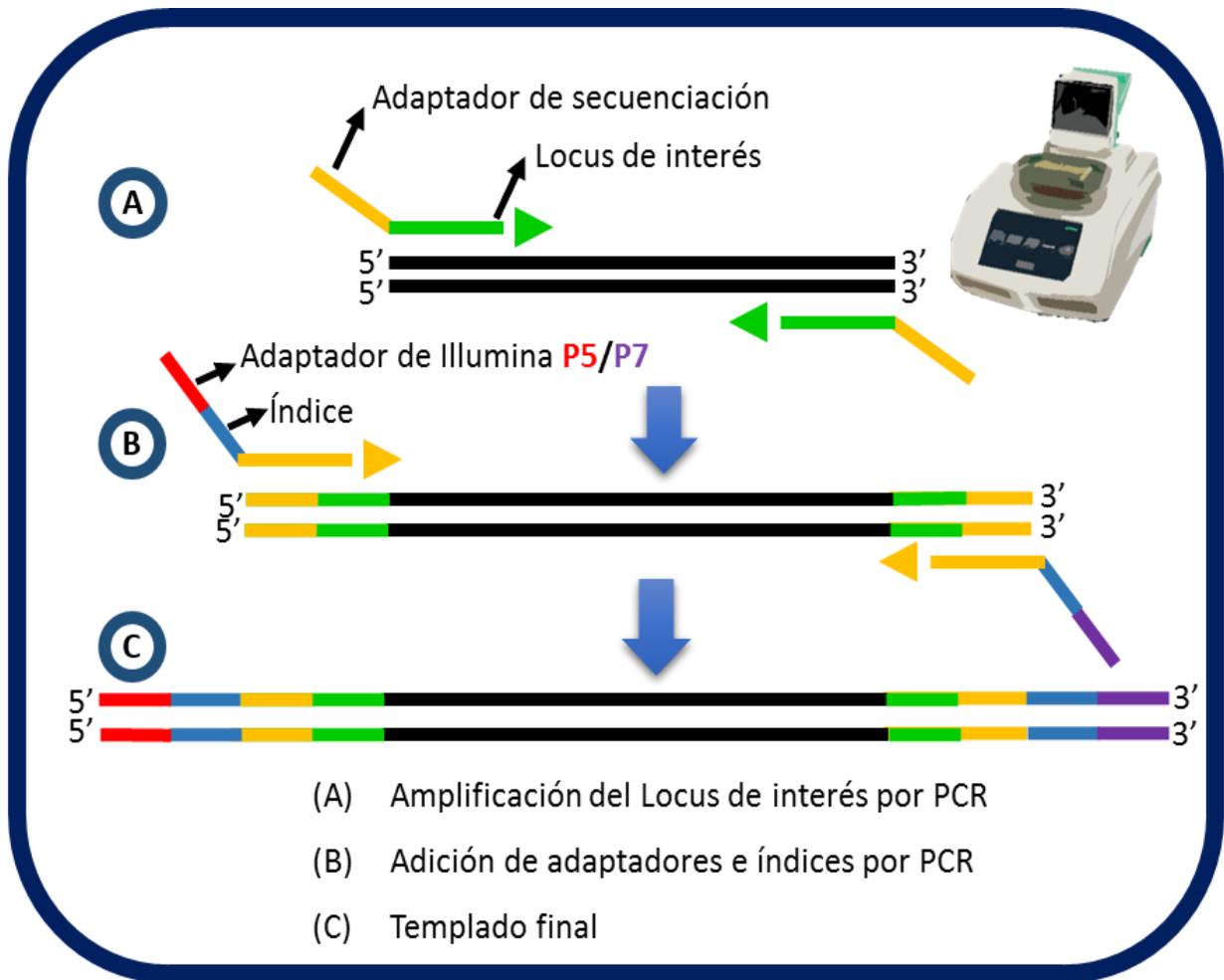


Figura 3. Método de PCR en dos pasos para la secuenciación de amplicones utilizando la plataforma de Illumina® para el equipo MiSeq.

Para la identificación de las presas fueron seleccionados tres loci correspondientes a cordados, cefalópodos y eucariotas. Los amplicones correspondientes a cordados y cefalópodos muestran homología con la región 16S del ADN mitocondrial (16S ADNmt) (Deagle *et al.*, 2009). El amplicón referente a organismos eucariotas se encuentra disponible dentro del Earth Microbiome Project (Gilbert *et al.*, 2014) y es homólogo a la región 18S del ARN ribosomal (18S ARNr). Los oligos o “primers” fueron sintetizados por SIGMA® (Toluca, México). Los detalles se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Primers utilizados dentro del primer paso de PCR punto final. En verde se destaca la secuencia correspondiente al locus de interés (región 16S ADNmt y región 18S ARNr).

Locus	Amplicón	Secuencia del primer (5'-3')	Pares de bases
16S ADNmt	Chordata	<i>Chord F</i> TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCGAGAAGACCCTRTGGAGCT	~188
	Chordata	<i>Chord R</i> GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCTNGGTCGCCCCAAC	~189
	Cephalopoda	<i>Ceph F</i> TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGACGAGAAGACCCTAWTGAGCT	~313
	Cephalopoda	<i>Ceph R</i> GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAAATTACGCTGTTATCCCT	~314
18S ARNr	Eukaryota	<i>Illumina_Euk_1391f</i> TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTACACACCGCCCGTC	~233
	Eukaryota	<i>Illumina_EukBr</i> GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTGATCCTTCTGCAGGTTACCTA C	~234

Para evitar sobre-amplificar el material génico de la foca de puerto durante el primer paso de PCR se utilizaron primers específicos que bloquean estas secuencias (Vestheim y Jarman 2008; Gilbert *et al.*, 2014). El primer bloqueador utilizado junto al amplicón de cordados cuenta con 32 pares de bases y ha sido probado en estudios recientes sobre la dieta de *P. v. richardii* en cautiverio (5'-ATGGAGCTTTAATTAACACTCAACAGAGCA-C3-3') (Deagle *et al.*, 2013). El primer bloqueador utilizado junto al amplicón de organismos eucariotas cuenta con 32 pares de bases y reduce la amplificación de secuencias correspondientes a mamíferos (5'-GCCCCGTCGCTACTACCGATTGG-ideoxyl-ideoxyl-ideoxyl-ideoxy-ideoxy-TTAGTGAGGCCCT-C3-3') (Gilbert *et al.*, 2014). Los grupos 2'-deoxiinosina (didesoxinucleótidos ddNTP), así como el espacio 3C (extremo 3') inhiben la extensión y consecuente amplificación del ADN del depredador.

Con la finalidad de reconocer cada muestra por sitio se utilizaron los índices de Nextera XT de la plataforma Illumina® (Oligonucleotide sequences® 2016 Illumina®, Inc.), siguiendo la estrategia de construcción de lecturas pareadas "paired-end". Por lo anterior, los 3 amplicones cuentan con el mismo índice dentro de cada muestra (Figura 4).

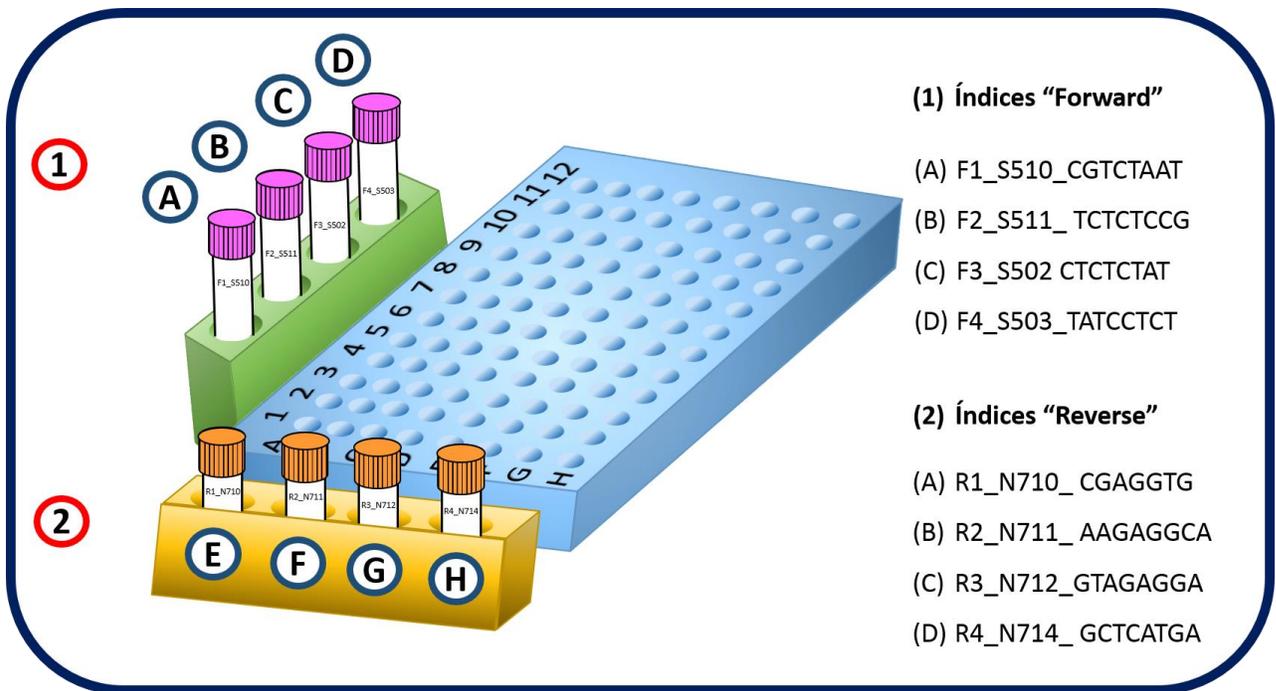


Figura 4. Índices utilizados para la realización del segundo paso de PCR. La letra F hace referencia a los primers sentido ("forward" 5'-3'); la letra R representa los primers antisentido ("reverse" 3'-5').

En la Tabla 3 se presentan los detalles de los primers utilizados para llevar a cabo el segundo paso de PCR, éstos incluyen los adaptadores P5 y P7 de Illumina® junto a un índice y fueron sintetizados por SIGMA® (Toluca, México).

Tabla 3. Primers "forward" y "reverse" utilizados para el indexado de las muestras durante el segundo paso de PCR. En azul se resalta la secuencia correspondiente al índice o código de la muestra.

Primer	Clave	Secuencia
Forward	S510	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC CGTCTAATTCGT CGGCAGCGTC
Forward	S511	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC TCTCTCCGTCGT CGGCAGCGTC
Forward	S502	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC CTCTCTATTCGT CGGCAGCGTC
Forward	S503	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC TATCCTCTTCGT CGGCAGCGTC
Reverse	N710	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT CAGCCTCGT TCTCGTGGGCTCGG
Reverse	N711	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TGCTCTTGT TCTCGTGGGCTCGG
Reverse	N712	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TCCTCTACGT TCTCGTGGGCTCGG
Reverse	N714	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TCATGAGC TCTCGTGGGCTCGG

La confirmación visual de los productos de amplificación se hizo a través de la técnica de electroforesis (gel de agarosa al 2%) con apoyo de un fotodocumentador.

2.5 Purificación, normalización y cuantificación de librerías

Se utilizó una placa de normalización del kit SequalPrep™ (96) (Invitrogen™, Carlsbad, California, E.U.A.) para realizar la limpieza y normalización de los productos del segundo paso de PCR, llevándolos a proporciones equimolares (1-2 ng/μl). Para lo anterior se agregaron 10 μl del producto de PCR correspondiente a cada amplicón por muestra. Posteriormente se añadió el mismo volumen de Binding Buffer, se mezcló 6 veces con la pipeta y se dejó incubar a temperatura ambiente por una hora. Este paso permite la unión del ADN a las paredes de los pocillos en la placa, por lo que es importante no tocar esta área durante el seguimiento del protocolo. Luego de la incubación se retiró el líquido de los pocillos. Cada pozo fue lavado con 50 μl de Wash Buffer mezclando 6 veces y descartando el sobrenadante. Finalmente se eluyeron las muestras agregando 20 μl de Elution Buffer; cada muestra fue mezclada 6 veces dejándolas incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego de la incubación, las muestras se cargaron en una nueva placa para PCR de 96 pocillos.

Se cuantificó la cantidad de ADN en el 12.5% de las muestras de forma aleatoria. De igual forma, se formaron tres metamuestras correspondientes a los tres amplicones de interés en tubos tipo Eppendorf (1.5 ml). Para ello se agregó 10 μl de cada muestra por amplicón (160 μl en total). A partir de lo anterior se formó una metamuestra general con aproximaciones equimolares de cada amplicón; para ello se agregaron 20 μl de cada metamuestra dentro de un tubo tipo Eppendorf de 1.5 ml (60 μl en total). Se procedió a cuantificar por fluorescencia utilizando el equipo Qubit® 3.0 de Invitrogen™. Para esto se prepararon las muestras junto a dos estándares siguiendo el protocolo descrito para el kit Qubit® dsDNA BR Assay de Molecular Probes® (Invitrogen™). La cuantificación se realizó con el fin de probar si efectivamente las muestras fueron normalizadas y conocer la concentración final de las metamuestras. Finalmente la metamuestra general fue llevada a una concentración de 2000 pM utilizando agua desionizada (H₂O dde) y la siguiente relación de concentraciones:

$$[\text{nM}] = \frac{\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}}{660 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times \text{No. de pares de bases del amplicón}} \times 10^6 \quad (1)$$

$$1 \text{ nM} = 1000 \text{ pM} \quad (2)$$

La metamuestra correspondiente al amplicón de eucariotas se añadió en mayor concentración (2-3 nM) a la metamuestra general con respecto a los otros amplicones. Lo anterior debido a que este

amplicón detecta una mayor riqueza de especies y, por tanto, requiere un mayor número de lecturas para representar la totalidad de identidades taxonómicas que contiene.

2.6 Secuenciación de las librerías en el equipo MiSeq®

Se llevó a cabo la desnaturalización del ADN contenido en la metamuestra general utilizando el kit MiSeq® Reagent V2 de 300 ciclos de Illumina®. Este paso es necesario para llevar a cabo la separación de la doble cadena de ADN en cadenas simples. Se añadieron 10 µl de la metamuestra general (2000 pM) y 10 µl de hidróxido de sodio NaOH (0.2 N) a un tubo Eppendorf (1.5 ml), mezclando brevemente. Posteriormente, se incubó la muestra por 5 minutos a temperatura ambiente (18 °C). Luego de incubar se incorporó la muestra junto a 1.980 ml de Buffer MiSeq V2 Hyb dentro de un tubo Falcon (15 ml), mezclando brevemente (2000 µl de muestra a 10 pM).

Se utilizó la librería PhiX como control de la secuenciación por síntesis comúnmente empleada por equipos de la plataforma de Illumina®. Para desnaturalizar esta librería se agregaron 2 µl de PhiX, 5 µl de NaOH y 3 µl H₂O dde dentro de un tubo tipo Eppendorf (1.5 ml). La solución se homogenizó brevemente y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 990 µl de Buffer MiSeq V2 Hyb a un tubo falcón (15 ml) junto con la solución de PhiX (1000 µl de muestra a 20 pM).

Se formaron diluciones (8 pM) de cada librería en tubos Eppendorf (1.5 ml) independientes utilizando el Buffer MiSeq V2 Hyb. Finalmente se preparó la solución de trabajo incorporando 950 µl de la metamuestra diluída (8 pM) y 50 µl de la dilución de PhiX (8 pM). Se cargaron 600 µl de solución de trabajo dentro del cartucho de MiSeq Reagent Kits v2 para dar inicio a la secuenciación dentro del equipo MiSeq de Illumina® (Anexo 5).

La secuenciación de la metamuestra se realizó a través del equipo MiSeq® de Illumina®. Para ello se utilizaron los reactivos del kit MiSeq® Reagent V2 de 300 ciclos junto a una celda de flujo nano “nano flow cell” (con capacidad para generar 1 millón de lecturas). El sistema MiSeq® utiliza la estrategia de secuenciación por síntesis (SBS) y constituye un método eficaz en términos de tiempo de manejo (~14 horas).

Para programar el equipo MiSeq® se proporcionó al sistema un documento con extensión .plt denominado hoja de muestra o “sample sheet” con la información base para el reconocimiento de los índices de cada muestra. La “sample sheet” fue diseñada con ayuda del software Illumina® Experiment Manager 1.11.0. Finalmente se cargaron 600 µl de la librería total al cartucho de reactivos y se procedió a iniciar la corrida. La longitud esperada de cada fragmento es de 150 pares de bases (pb) sin alinear.

2.7 Implementación de herramientas bioinformáticas

2.7.1 Obtención de archivos

Las secuencias fueron descargadas de la nube BaseSpace™ como archivos con extensión .fastq. Este tipo de formato permite ver el valor de calidad asignado a cada nucleótido de cada secuencia. El valor de calidad “Quality Score” (Q) se define como una propiedad relacionada logarítmicamente con las probabilidades (P) de error que surgen durante la detección de un nucleótido en la secuenciación.

$$Q = - 10 \log_{10} P \quad (3)$$

Por lo anterior, un Q valor de 20 representa la probabilidad de que una base sea mal asignada de cada 100, lo cual nos da una precisión de asignación del 99%.

Los archivos obtenidos de la secuenciación han pasado por un primer filtro de calidad llevado a cabo por el equipo de secuenciación. Las secuencias contenidas en cada archivo fueron demultiplexadas de forma automática por el equipo MiSeq®. Este paso se realizó con base en el índice de cada secuencia, el cual corresponde con cada muestra por sitio.

2.7.2 Filtrado de secuencias

Se utilizó el valor de calidad como criterio para filtrar y eliminar aquellas secuencias que no cumplen con este principio (Q<25%) (software FastQC). El kit de secuenciación utilizado (MiSeq® Reagent

V2 de 300 ciclos) genera lecturas de 151 pares de bases (pb) por cada extremo bajo la estrategia “paired-end” formando fragmentos de 300 pb en total. Las secuencias se procesaron por oligos sentido y antisentido de manera independiente para eludir artefactos o resultados no fidedignos ya que algunos de los casos se obtuvieron amplicones mayores a 300 pb.

Para este análisis las secuencias sentido y antisentido fueron reducidas en longitud utilizando el lenguaje de programación Perl (BioLinux) (Figura 5).

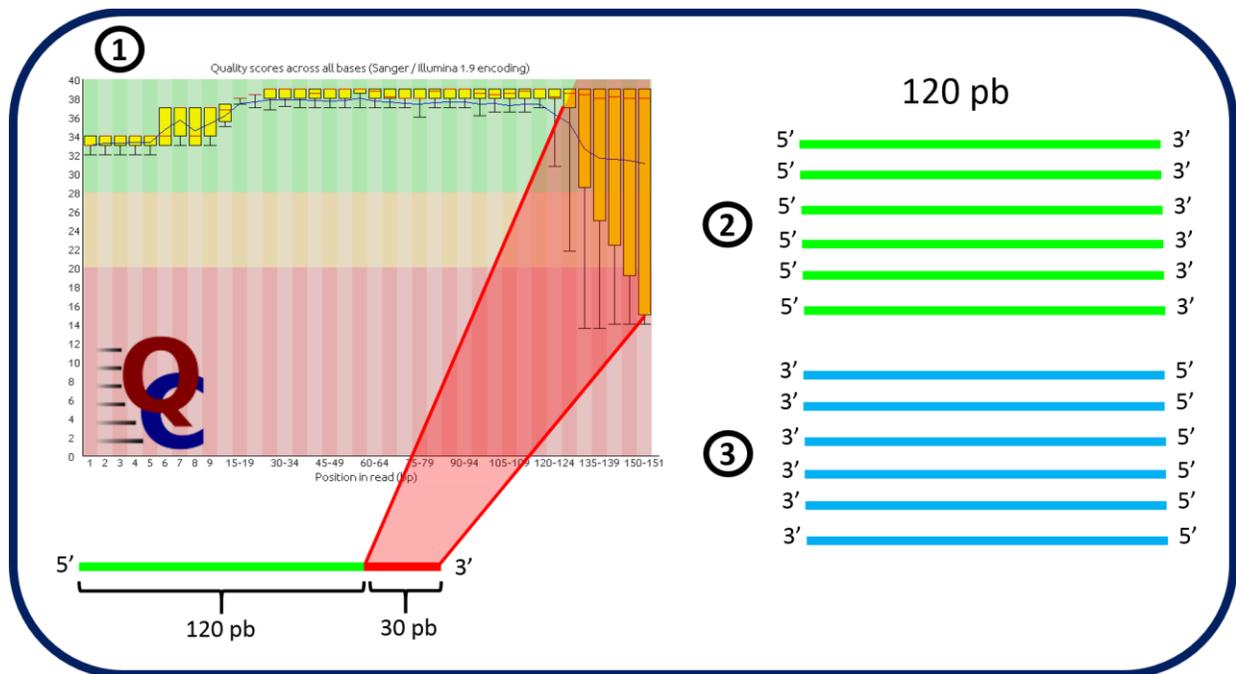


Figura 5. Selección de secuencias por valor de calidad. (1) Ejemplo del valor de calidad promedio de las secuencias de una muestra dada utilizando el Software FastQC. (2-3) Lecturas filtradas y reducidas correspondientes a los oligos sentido y antisentido respectivamente. (pb) Pares de bases.

A manera de controlar las secuencias fueron alineadas (unión de oligos sentido y antisentido) utilizando QIIME, este recurso funciona como conector en el análisis de secuencias (“pipeline”). QIIME es operable desde la terminal del sistema operativo de Bio-Linux y se basa en el lenguaje nativo de programación de Python 2. Para la alineación se utilizó el método “fastq-join” (Aronesty, 2011). Este método emplea un algoritmo basado en distancias cuadráticas para asignar valores de calidad de anclaje a cada alineación.

Las secuencias obtenidas de ambas estrategias fueron comparadas para constatar que los resultados obtenidos corresponden a las mismas presas.

Los archivos filtrados (“single-end” y “paired-end”) fueron modificados a formato FASTA utilizando QIIME. A partir de este paso se aplicó el mismo procesamiento de datos a las secuencias alineadas y no alineadas de forma independiente. El número de secuencias obtenidas por archivo fue calculado con ayuda del lenguaje de programación BASH (BioLinux).

2.7.3 Limpieza de secuencias

Las secuencias filtradas fueron demultiplexadas por amplicón con el fin de evaluar de forma independiente los resultados obtenidos por locus de interés. En la Tabla 4 pueden apreciarse los fragmentos correspondientes a los amplicones de interés y sus posibles combinaciones para el caso de los oligos degenerados:

Tabla 4. Ordenamiento de datos para la agrupación de secuencias por locus. Ejemplo dado para la muestra uno de Isla Todos Santos Sur (TS1).

	Muestra	Sentido	Secuencia del amplicón	Grupo taxonómico
Secuencias alineadas Paired-end	TS1	Forward	CGAGAAGACCCTATGGAGCT	Chordata
	TS1	Forward	CGAGAAGACCCTGTGGAGCT	Chordata
	TS1	Forward	GACGAGAAGACCCTAATGAGCT	Cephalopoda
	TS1	Forward	GACGAGAAGACCCTATTGAGCT	Cephalopoda
	TS1	Forward	GTACACACCGCCCGTC	Eukaryota
Secuencias no alineadas Single-end	TS1	Forward	CGAGAAGACCCTATGGAGCT	Chordata
	TS1	Forward	CGAGAAGACCCTGTGGAGCT	Chordata
	TS1	Reverse	CCTAGGTCGCCCAAC	Chordata
	TS1	Reverse	CCTGGTCGCCCAAC	Chordata
	TS1	Reverse	CCTGGGTCGCCCAAC	Chordata
	TS1	Reverse	CCTCGGTCGCCCAAC	Chordata
	TS1	Forward	GACGAGAAGACCCTAATGAGCT	Cephalopoda
	TS1	Forward	GACGAGAAGACCCTATTGAGCT	Cephalopoda
	TS1	Reverse	AAATTACGCTGTTATCCCT	Cephalopoda
	TS1	Forward	GTACACACCGCCCGTC	Eukaryota
	TS1	Reverse	TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC	Eukaryota

Los archivos generados para cada amplicón fueron depurados de lecturas repetidas. Para ello se colapsaron las secuencias redundantes y se concatenaron los archivos correspondientes al mismo amplicón. Por lo tanto se generaron 6 archivos con extensión .fasta para cada muestra por sitio bajo la

estrategia “single-end”. Los archivos generados corresponden a los 3 grandes grupos de interés: Chordata, Cephalopoda y Eukaryota (para ambos sentidos). Para el caso de las secuencias alineadas se generaron 3 archivos con extensión .fasta para cada muestra por sitio.

Los análisis anteriores se llevaron a cabo utilizando el lenguaje de programación BASH y Perl (BioLinux).

2.7.4 Elección y filtrado de una base de datos

Se tomó como referencia la base de datos NT (Nucleotide) de NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), la cual cuenta con la información génica contenida en GenBank®. Esta base de datos comparte información con las organizaciones European Molecular Biology Laboratory (EMBL) y DNA Data Bank of Japan (DDBJ), por lo que GenBank® es una de las bases más completas de nucleótidos a nivel mundial (Figura 6).

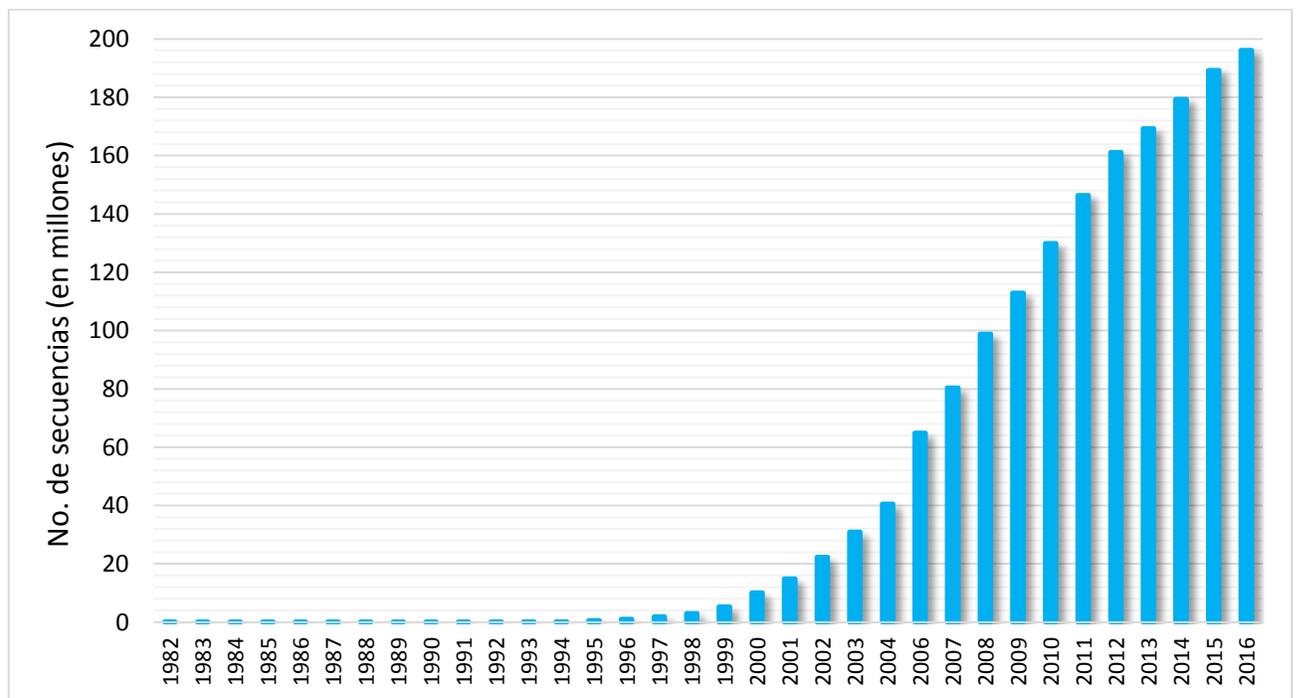


Figura 6. Registro de secuencias contenidas en GenBank® de 1982 a 2016.

Dentro de la base NT existen 37,688,485 secuencias, algunas son redundantes y corresponden a distintos genes de diversos taxa. La base NT se encuentra disponible en: <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/FASTA/> y fue descargada desde la línea de comandos en BioLinux.

Se extrajeron las secuencias correspondientes a los genes 16S mitocondrial y 18S ribosomal de todos los taxa contenidos dentro de la base NT. Se generaron dos bases de datos independientes relativas a cada gen; para ello se utilizó el lenguaje de programación BASH. Las bases fueron formateadas usando los comandos del paquete Blast+ de NCBI. Este último paso es necesario para formar archivos contra los que se pueda contrastar de forma masiva un archivo FASTA ("BLAST"). Lo anterior para llegar a la identificación de las secuencias de interés.

2.7.5 BLAST local e identificación de presas

Se llevó a cabo un "BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)" local usando los comandos del paquete Blast+ de NCBI. Cada archivo fue comparado con las bases de datos generadas almacenando en tablas la información resultante. La identidad taxonómica de las secuencias se realizó de forma manual identificando cada GI con su asignación taxonómica en NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). El GI corresponde a un tipo de identificador de secuencias el cual se forma por una serie de dígitos que se asignan consecutivamente a cada registro de secuencia en NCBI. Con el fin de optimizar el cómputo se excluyeron durante el "BLAST" aquellas secuencias que alinearon menos de 100 pares de bases (Boyer *et al.*, 2012). De igual forma fueron omitidas aquellas coincidencias con un porcentaje de identidad menor al 96%. El valor de identidad asignado se estableció luego de analizar un estudio previo sobre la dieta de la foca de puerto a través de herramientas de secuenciación masiva (Deagle *et al.*, 2013).

Se determinó el número de secuencias por identidad taxonómica con el fin de evaluar su proporción dentro de cada archivo generado. En el Anexo 6 se resume de forma gráfica el procesamiento de los datos anteriormente descrito.

2.7.6 Presas identificadas por métodos convencionales y moleculares

Las presas obtenidas a través de la secuenciación masiva fueron comparadas con las presas identificadas a partir de remanentes sólidos en heces por Durazo-Rodríguez (2015). Para ello, se analizaron las mismas muestras a través de ambos métodos. Se tomaron en cuenta el total de presas encontradas por ambos métodos durante la temporada de muda (premuda para Isla San Roque). De igual forma se consideraron las presas identificadas para cada sitio.

2.7.7 Análisis estadísticos

2.7.7.1 Lecturas obtenidas por muestra

Para comparar el número de lecturas generadas por muestra durante la secuenciación se utilizó la prueba Chi² de Pearson (X^2) por tablas de contingencia (prueba no paramétrica) con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$. Para ello se utilizaron únicamente las lecturas que pasaron los filtros de calidad dentro de cada muestra por sitio. El análisis fue realizado en la plataforma R 3.1.3 (R Core Team, 2015) mediante el comando *chisq.test*. El valor del estadístico X^2 se obtiene de la ecuación:

$$X^2 = \sum_i^p \sum_j^q \frac{(f_o - f_e)^2}{f_e} \quad (4)$$

Donde f_o y f_e corresponde a las frecuencias observadas y esperadas respectivamente, con $p-1$ y $q-1$ grados de libertad (p = No. de renglones, q = No. de columnas). La frecuencia esperada se obtiene de la siguiente función:

$$f_e = \frac{f_{mi} * f_{mj}}{N} \quad (5)$$

Donde f_{mi} y f_{mj} son las frecuencias marginales de los datos y N el número total de elementos dentro de la tabla.

2.7.7.2 Riqueza de presas de la foca de puerto en México

Con el fin de conocer si la riqueza de presas (S) es distinta entre los sitios de estudio y entre individuos de la misma colonia se realizó la prueba X^2 de Pearson ($\alpha=0.05$) por tablas de contingencia. Se utilizaron los datos correspondientes al número de especies identificadas por muestra y por sitio. El análisis fue realizado con ayuda de la plataforma R 3.1.3 (R Core Team, 2015) y la función *chisq.test*.

La riqueza de presas observada por sitios fue contrastada con la riqueza esperada utilizando el estadístico de Chao2 (Chao, 1984). Los resultados fueron representados de forma gráfica mediante curvas de rarefacción. La rarefacción es un método de interpolación no paramétrico comúnmente empleado en la comparación de la riqueza presente en distintos sitios (Gotelli y Colwell, 2011). Asimismo este estadístico es considerado el estimador menos sesgado para muestras pequeñas (Colwell y Coddington, 1994). La prueba de Chao fue realizada con ayuda del software EstimateS 9.1.0 (Colwell, 2013) de acuerdo a la expresión:

$$\text{Chao2} = S + \frac{L^2}{2 * M} \quad (6)$$

Donde L se refiere al número de presas únicas dentro de una muestra, S corresponde a la riqueza y M al número de presas que se observan únicamente dentro de dos muestras.

2.7.7.3 Análisis sobre la incidencia de las presas de la foca de puerto

La composición de la dieta y la importancia de cada presa dentro de la misma fueron evaluadas a través del porcentaje de frecuencia de ocurrencia (%FO). El %FO es la proporción de la frecuencia relativa con que aparece una presa dentro de la dieta de un depredador (Hynes, 1950). A esta proporción se le

asocia una probabilidad de ocurrencia del taxón dentro de una muestra. Una de las ventajas en la aplicación del %FO para el estudio de la dieta a través de métodos moleculares es que se basa en la presencia y ausencia de las especies presa y no en su abundancia. El porcentaje de frecuencia de ocurrencia se calculó de la siguiente forma (García-Rodríguez y De la Cruz- Agüero, 2011):

$$\%FO = \frac{\sum_{k=1}^U O_{ij}}{U} \times 100 \quad (7)$$

Donde O_{ij} representa la presencia ($O_{ij}=1$) de un taxón i en una muestra fecal j ; U corresponde al número de muestras fecales analizadas para un sitio. A partir de la %FO se categorizó el alimento consumido como incidental (25% de ocurrencia en las muestras), secundario (75%) o preferencial (100%).

Para comparar la frecuencia de ocurrencia de las presas consumidas en cada sitio se utilizó la prueba χ^2 de Pearson ($\alpha=0.05$) por tablas de contingencia. Los datos fueron ordenados con base al %FO total por sitio (4 muestras por sitio), considerando el total de presas identificadas como parte de la dieta de la foca de puerto en México. Se asignó un valor de %FO=0 a las presas no observadas dentro de alguno de los sitios.

De igual forma se utilizó esta prueba para determinar la importancia del tipo de alimento que compone la dieta de la foca de puerto. Para ello se generaron dos categorías del alimento: vertebrados e invertebrados. Se calculó la frecuencia de ocurrencia de cada categoría por sitio para su comparación. Ambos análisis fueron realizados en R 3.1.3 (R Core Team, 2015).

Se recopiló información referente al nivel trófico, talla y ambiente de las especies presas identificadas a través de las herramientas bioinformáticas. Los datos fueron obtenidos de las bases: FishBase (Froese y Pauly, 2016), CephBase (Wood, 2016), EOL (Wilson, 2016) y SeaLifeBase (Palomares y Pauly, 2016).

2.7.7.4 Similitud del espectro trófico

El traslape de la dieta en los cuatro sitios se determinó con base en el índice de Jaccard (I_j). Este índice nos muestra la similitud en el tipo de alimento consumido en cada colonia. Se basa en la relación que existe entre las presas compartidas y las presas exclusivas de cada sitio. El índice de Jaccard resulta de la expresión (Moreno, 2001):

$$I_j = \frac{c}{a+b+c} \quad (9)$$

Donde:

a= número de especies exclusivas del sitio A

b= número de especies exclusivas del sitio B

c= número de especies presentes en ambos sitios A y B

El intervalo de valores dado para este índice es: $0 < I_j < 1$, donde $I_j=1$ nos indica que los sitios guardan la misma composición de presas e $I_j=0$ nos muestra que no hay presas compartidas entre los sitios. El análisis fue realizado con ayuda del software EstimateS 9.1.0 (Colwell, 2013).

2.7.7.5 Comparación de la dieta obtenida a través de la metagenómica y análisis de remanentes sólidos en heces

Las presas identificadas dentro del presente estudio fueron comparadas con las presas reportadas por Durazo-Rodríguez (2015) en las mismas muestras. Se determinó la frecuencia de ocurrencia (%FO) de cada taxón a partir de matrices de presencia y ausencia para cada muestra en ambos estudios. Lo anterior con el fin de evaluar si la incidencia de una presa dentro de la dieta es semejante o disímil entre los métodos de análisis.

El traslape de la dieta entre ambos trabajos fue representado de forma gráfica utilizando diagramas de Venn de acuerdo a la teoría de conjuntos. Los gráficos fueron realizados en la plataforma R 3.1.3 (R Core Team, 2015).

La riqueza de presas registrada por ambos métodos para cada sitio de estudio fue contrastada utilizando la prueba X^2 de Pearson ($\alpha=0.05$) por tablas de contingencia. Se utilizaron los datos correspondientes al número de especies identificadas en cada sitio por ambos métodos (restos duros y amplicones). El análisis fue realizado con R 3.1.3 (R Core Team, 2015) y la función *chisq.test*.

3. Resultados

3.1 Selección de muestras

Se obtuvieron 80 muestras fecales de la foca de puerto en cuatro islas en México (20 muestras por sitio). Del total, únicamente 23 muestras contenían material génico íntegro para su análisis. A partir de los productos de extracción fue posible confirmar la presencia de ADN de presas correspondientes a peces teleósteos de la Familia Sciaenidae. Con base en el criterio anterior, fueron seleccionadas cuatro muestras por isla (16 en total).

Los productos de extracción con mayor concentración de ADN corresponden a los sitios Isla San Jerónimo e Isla Natividad ($25 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 2.12$). Las muestras de las islas Todos Santos Sur y San Roque mostraron bajas concentraciones de ADN dentro de los productos de extracción ($6.75 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 1.76$). Estas últimas concentraciones son suficientes para llevar a cabo la amplificación mediante el protocolo de PCR en dos pasos.

Las muestras seleccionadas a las que se hará referencia en el contenido de este documento se etiquetaron con base en el sitio de colecta, por ejemplo, Isla Todos Santos Sur (TS) y al número de muestra que le corresponde (TS1: muestra número 1 de Isla Todos Santos Sur). En el caso de Isla San Roque se utilizaron las muestras correspondientes a la premuda (Durazo-Rodríguez, 2015), por lo que su etiqueta se distingue con una “b” luego del número de muestra (por ejemplo: SR6b).

3.2 Amplificación de productos de extracción

Se logró amplificar las regiones de ADN 16S mitocondrial y ARN 18S ribosomal relativas a los tres grandes grupos de interés: Chordata, Cephalopoda y Eukaryota. Las muestras TS39 y SR16b no amplificaron ADN de cefalópodos dentro de acuerdo a la confirmación visual (gel de agarosa 2%) (Figura 7).

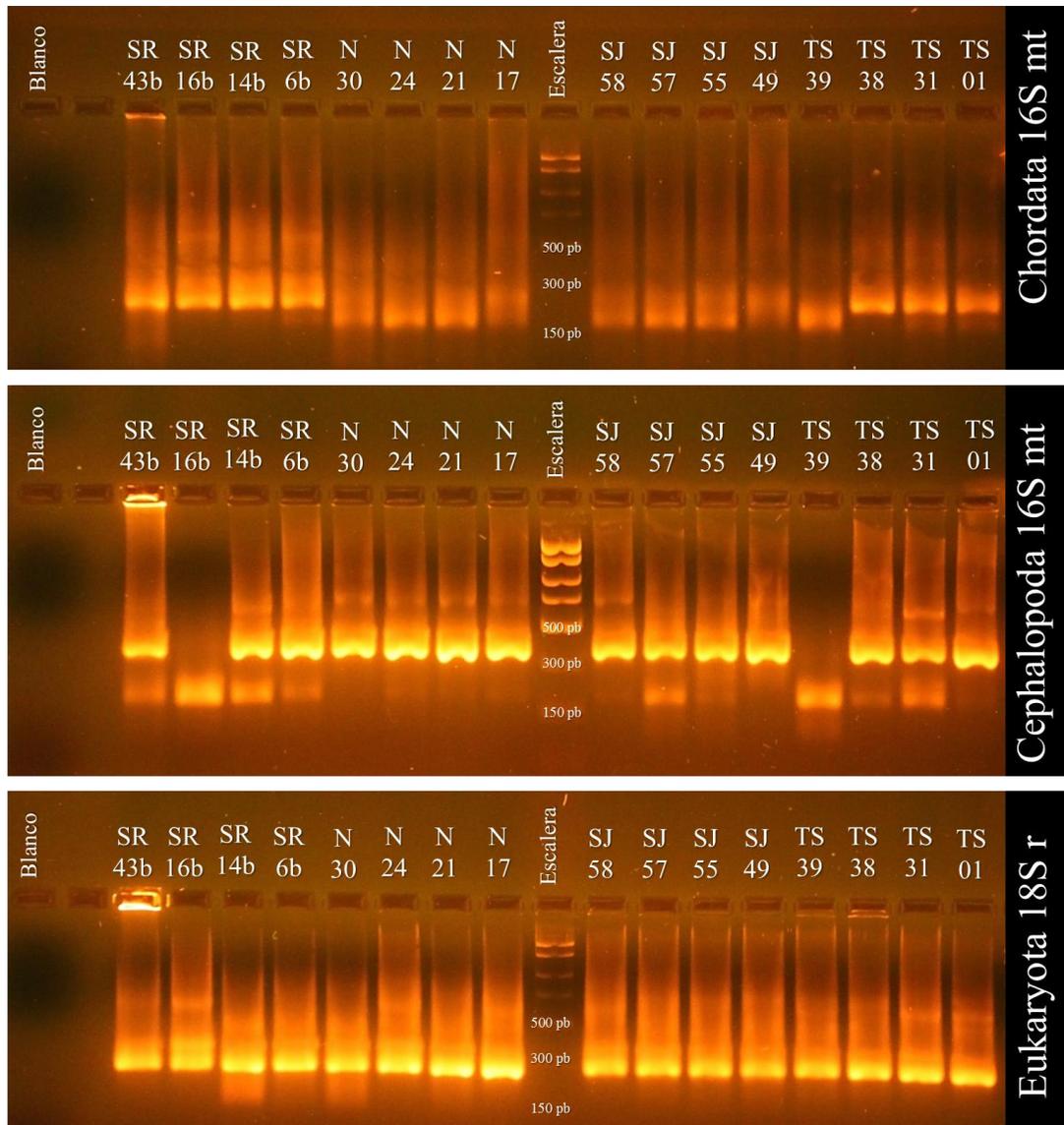


Figura 7. Confirmación visual de los productos del segundo paso de PCR (5 μ l) correspondientes a muestras fecales de *P. v. richardii*. Gel de agarosa al 2% (120 V, 90 min).

3.3 Normalización y cuantificación de librerías

Los productos de PCR fueron normalizados a una concentración aproximada de $0.55 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 0.14$. Las concentraciones obtenidas se encuentran por debajo de las esperadas al utilizar el kit SequalPrep™. Lo anterior no compromete los resultados obtenidos, ya que la preparación de la solución de trabajo requiere de concentraciones de un orden de magnitud menor (μM). La concentración de ADN de las

metamuestras no es constante entre amplicones. La metamuestra de Eukaryota fue sobrerrepresentada dentro de la metamuestra general, ya que este amplicón logra detectar un mayor número de identidades taxonómicas con respecto a los otros loci de interés (Figura 8).

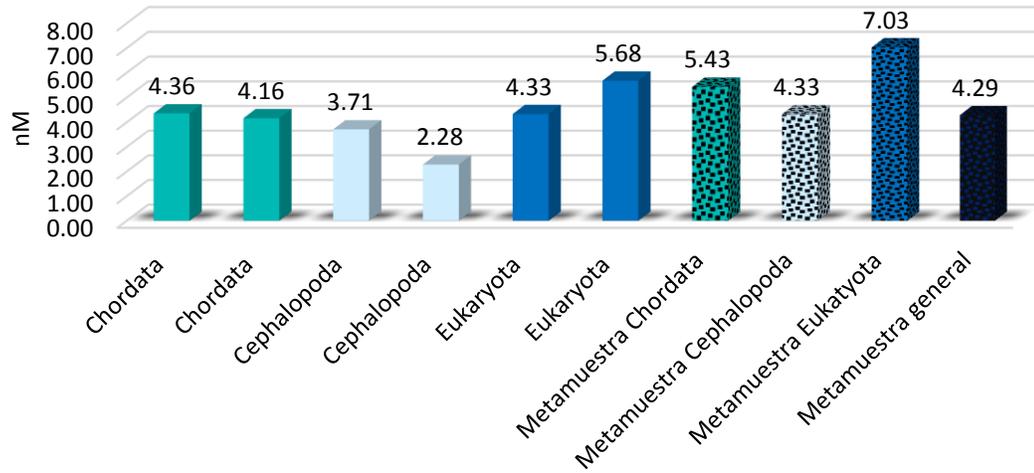


Figura 8. Concentraciones de ADN obtenidas a través de la cuantificación por fluorescencia.

Se obtuvo una librería (8 pM) a partir de 48 productos de PCR, éstos corresponden a las 16 muestras amplificadas para cada locus.

3.4 Secuenciación masiva

La secuenciación de las muestras llegó a término después de 22 horas, generando 1,340 archivos (514 MB). Luego de 318 ciclos se generaron 16 archivos con extensión .fastq (161.37 MB) correspondientes a cada muestra por sitio. Se obtuvo un total de 931,872 lecturas, logrando un rendimiento del 93.2% de la capacidad de la celda de flujo.

El 91.4% de los resultados (848,411 lecturas) cumplió con los requerimientos del control de calidad realizado por la plataforma de Illumina® Base Space ($Q \geq 30\%$). Un valor de calidad $\geq 30\%$ se refiere a que existe una probabilidad del 0.001% de asignar de forma equívoca un nucleótido dentro de cada 1000. Se logró indexar el 85.7% de las secuencias obtenidas luego de este primer control de calidad.

Durante los ciclos 150-175 se observó que las secuencias generadas contaban con valores de calidad menores al 25%. Por lo anterior, la proporción de secuencias que no logró pasar el primer control de calidad se generó durante la etapa media de la secuenciación.

Al demultiplexar las secuencias por muestra, las islas que presentaron más lecturas fueron Todos Santos Sur y San Roque (Figura 9).

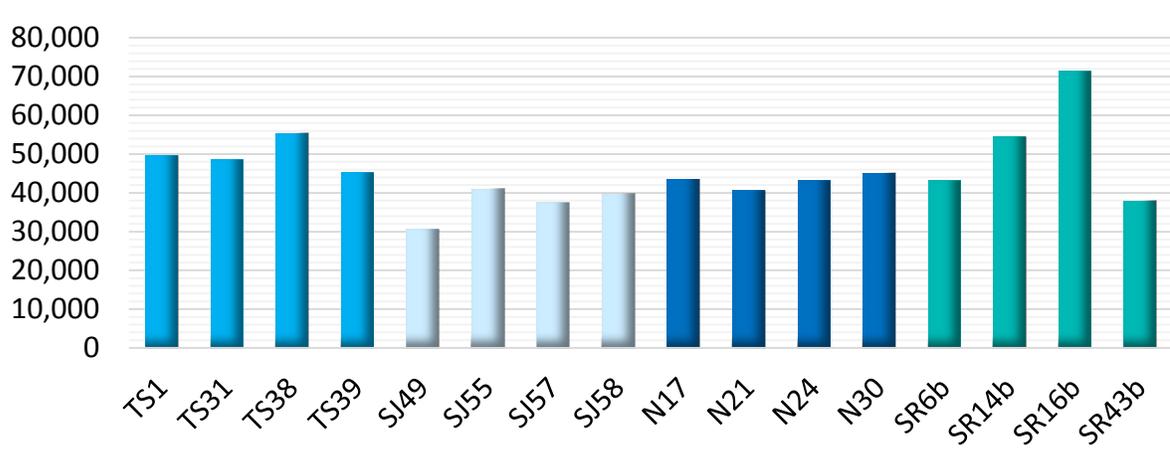


Figura 9. Lecturas obtenidas por cada muestra fecal colectadas dentro de los sitios: islas Todos Santos Sur (TS), San Jerónimo (SJ), Natividad (N) y San Roque (SR). El eje X corresponde a las etiquetas de cada muestra, ej. (TS) clave del sitio, (1) muestra número 1.

El 52.82% de los datos obtenidos corresponden a lecturas sentido (5'-3'), mientras que el 47.18% son lecturas antisentido (3'-5'). En todos los sitios, las secuencias sentido relativas al amplicón de cordados fueron sintetizadas en mayor proporción con respecto a los otros loci (a excepción de la Isla Natividad). En contraste, las secuencias antisentido del amplicón de eucariotas se encontraron en mayor proporción dentro de las muestras. No se encontraron diferencias significativas entre las lecturas obtenidas para cada sitio de estudio ($X^2= 44$, $p=0.39$).

La longitud promedio de las lecturas fue de 151 pares de bases (pb), este resultado se observó tanto para las lecturas sentido como antisentido. Se obtuvieron valores bajos de calidad ($Q<25\%$) en el extremo 3' de algunas secuencias, por lo que fueron cortadas las últimas 30 bases de cada secuencia. Por lo anterior, el análisis de la dieta se realizó con lecturas de 120 pb, analizando de forma independiente las lecturas sentido y antisentido. Sólo en el 13.55% de las secuencias lograron alinearse las lecturas pareadas (sentido y antisentido). Las identidades taxonómicas obtenidas a partir de este resultado fueron contrastadas con el análisis de las secuencias sentido y antisentido de forma independiente a manera de

control. Las presas identificadas a través de las secuencias alineadas coinciden con el 45.83% de las presas en Isla Todos Santos Sur (TS), el 45.15% en Isla San Jerónimo (SJ), el 14.28% en Isla Natividad (N) y el 31.03% en Isla San Roque (SR). Como resultado de este control las secuencias correspondientes a las presas tuvieron un valor de identidad del 99% aproximadamente. La longitud promedio de alineación de las secuencias durante el BLAST fue de 189.1 pb (± 54.45) en TS, 218.5 pb (± 62.15) en SJ, 109 pb (± 2.65) en N y 150.89 pb (± 30.37) en SR. A partir de las secuencias alineadas se identificaron 25 presas, las cuales corresponden al 51.02% de las presas observadas en el análisis de las secuencias sentido y antisentido.

3.5 Riqueza de presas (S)

Se analizaron 727,020 lecturas para la identificación de la dieta de la foca de puerto. Se encontraron 267,794 secuencias únicas las cuales fueron contrastadas con las bases de datos locales al momento de hacer el BLAST. A partir de estas secuencias se obtuvo la identidad taxonómica de 49 presas dentro de la dieta de la foca de puerto en México. Estas presas corresponden a 30 familias de peces teleósteos, elasmobranquios, moluscos, crustáceos y cnidarios.

La región 16S mitocondrial (16S ADNmt) aportó mayor información al presente estudio en términos de riqueza de presas identificadas para la dieta de la foca de puerto. Dentro de esta región se identificaron 32 presas correspondientes al marcador de cordados y 26 presas para el marcador de cefalópodos (incluyendo algunos peces). A diferencia de lo anterior, utilizando la región V9 del gen que codifica para la subunidad 18S del ARN ribosomal (18S ARNr), se lograron identificar 15 presas relativas al amplicón de eucariotas.

En general, la región 18S ARNr mostró un mayor número de inespecificidades al momento de llevar a cabo la identificación de las presas. Un gran número de identidades taxonómicas fueron asignadas durante el BLAST local utilizando esta región. Los grupos identificados correspondían en mayor proporción a microorganismos e invertebrados relacionados con el posible alimento de las presas de focas, es decir, posibles presas de presas (poliquetos, nudibranquios, ofiuros, entre otros). Por otro lado, las especies de peces identificadas a través del locus 18S ARNr mostraban coherencia con las presas de foca que se identificaron por medio de la región 16S ADNmt, pero sólo a nivel familia. Este problema no se detectó en la identificación a nivel de género y especie del grupo correspondiente a invertebrados.

3.5.1 Isla Todos Santos Sur

Se identificaron 24 presas a partir de cuatro muestras fecales de la foca de puerto (Anexo 7). De acuerdo a la prueba χ^2 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la riqueza de presas observada para cada una de las muestras ($\chi^2=3.16$, $p=0.37$). Los detalles de la riqueza de presas obtenida se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Riqueza de presas (S) de la foca de puerto en Isla Todos Santos Sur (TS).

Muestras	(S) por muestra	(S) por sitio
TS1	17	24
TS31	12	
TS38	10	
TS39	9	

La riqueza de presas observada es menor a la estimada por el estadístico Chao2 en la Isla Todos Santos Sur durante la temporada de muda. Ambas estimaciones no alcanzan la asíntota dentro de las curvas acumulativas de especies. Estos resultados sugieren aumentar el número de muestras fecales para esta colonia (Figura 10).

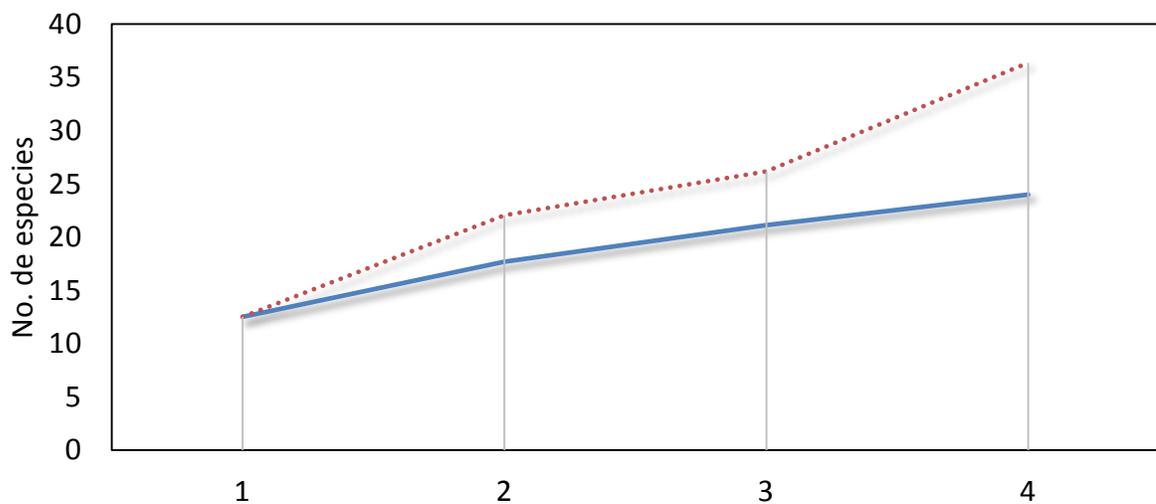


Figura 10. Curva de acumulación de especies observadas (línea continua) y estimadas (línea punteada) para la dieta de la foca de puerto en Isla Todos Santos Sur. El eje de las abscisas indica el número de muestras utilizadas para este análisis.

Las presas con mayor incidencia dentro de las muestras fueron *Chilara taylori* (congriperla moteada), *Citharichthys xanthostigma* (lenguado alón) y *Synodus lucioceps* (lagarto lucio). Las familias Paralichthyidae, Octopodidae, Hexagrammidae, Sciaenidae, y Pleuronectidae representaron el 64.64% de la dieta para este sitio. En promedio, las presas de la foca de puerto en Isla Todos Santos Sur presentan un nivel trófico de 3.54 ± 0.58 y una talla de 33.33 ± 20.23 cm.

Con base en la incidencia de cada presa se observó que existe una preferencia alimentaria por consumir especies de hábitos demersales (63%) y pelágicos (25%). Lo anterior sugiere una conducta alimentaria dirigida a la detección de presas de poco movimiento asociadas a algún tipo de fondo. El 63% de las presas consumidas por la foca de puerto en Isla Todos Santos Sur corresponde a peces teleósteos (n=4) (Figura 11).

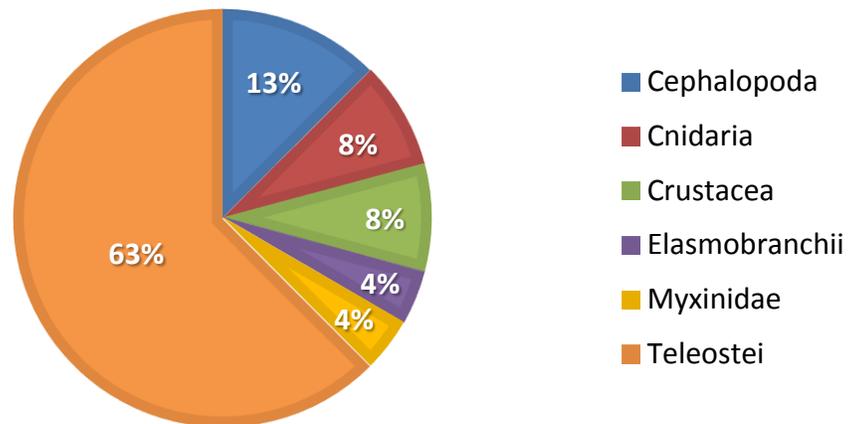


Figura 11. Proporción de los principales grupos consumidos por la foca de puerto en Isla Todos Santos Sur, Baja California, México.

Dentro de los invertebrados, el género *Octopus* tuvo mayor incidencia dentro de las muestras fecales de la foca de puerto. Los grupos Cnidaria y Crustacea se encontraron igualmente representados dentro de las muestras. En general, los invertebrados representaron el 29% de la dieta de la foca de puerto en Isla Todos Santos Sur.

El 24% de la dieta corresponde a presas que por la naturaleza de sus tejidos no son detectables o identificables a través del tamizado y recuperación de estructuras duras en heces. Las especies *Chrysaora fuscescens* (ortiga del Pacífico), *Soestia zonaria* (salpa), *Raja inornata* (raya de California), Infraorden Brachyura (cangrejo) y *Eptatretus stoutii* (mixínido del Pacífico) fueron identificadas por primera vez en este estudio.

3.5.1.1 Comparación entre métodos de identificación de presas en Isla Todos Santos Sur

Tanto el análisis de remanentes sólidos como la identificación de ADN de presas en heces mostraron que la foca de puerto se alimenta en mayor frecuencia de especies de peces teleósteos, más que de los invertebrados. En cuanto a las presas ícticas, ambos métodos coinciden en la importancia de *Synodus lucioceps* y miembros del género *Citharichthys* dentro de la dieta de la foca de puerto. Tanto en el método por identificación de restos duros como por metagenómica, el género *Octopus* es considerado la especie de invertebrado más recurrente dentro de las muestras y, por ende, de mayor importancia dentro de la dieta.

La riqueza de presas identificadas por muestra fue distinta entre ambos métodos (Anexo 8). En todos los casos se registró un mayor número de presas por medio de la identificación del ADN contenido en heces. Se encontraron diferencias entre la identidad taxonómica de algunas especies asignadas por ambos métodos. Un ejemplo de lo anterior es la especie *Citharichthys sordidus* reportada por Durazo-Rodríguez (2015) la cual se identificó como *Citharichthys xanthostigma* por medio de la presencia de su ADN en las muestras. Asimismo, dentro del análisis de restos sólidos no fue posible asignar el epíteto específico al género *Octopus*. A través de herramientas de secuenciación masiva fue posible identificar las especies *Octopus californicus* y *Octopus rubescens* como parte de la dieta de *P. v. richardii* en Isla Todos Santos Sur.

La muestra TS39 mostró resultados negativos a cefalópodos en la confirmación visual de los productos de extracción vistos en un gel de agarosa (2%) utilizando un fotodocumentador. Sin embargo, tras la secuenciación se obtuvo información correspondiente a un miembro de este grupo (*Octopus rubescens*). Al contrario, las muestras TS31 y TS38 fueron positivas ante la prueba visual, mas no se encontró evidencia de cefalópodos dentro de la dieta por medio de análisis moleculares. Cabe destacar que dentro de estas dos últimas muestras Durazo-Rodríguez (2015) recuperó estructuras duras relativas a este grupo (picos de calamar y pulpo). Dentro de las muestras TS1 Y TS39 el calamar de California (*Doryteuthis opalescens*) fue detectado únicamente a través del análisis de restos sólidos.

Al considerar la totalidad de las muestras, la riqueza de presas identificadas en Isla Todos Santos Sur es la misma a través de restos duros (n=42) y el análisis metagenómico (n=4). La diferencia en la dieta entre ambos métodos se encuentra en las identidades taxonómicas identificadas (especies diferentes) y no en su número (Figura 12).

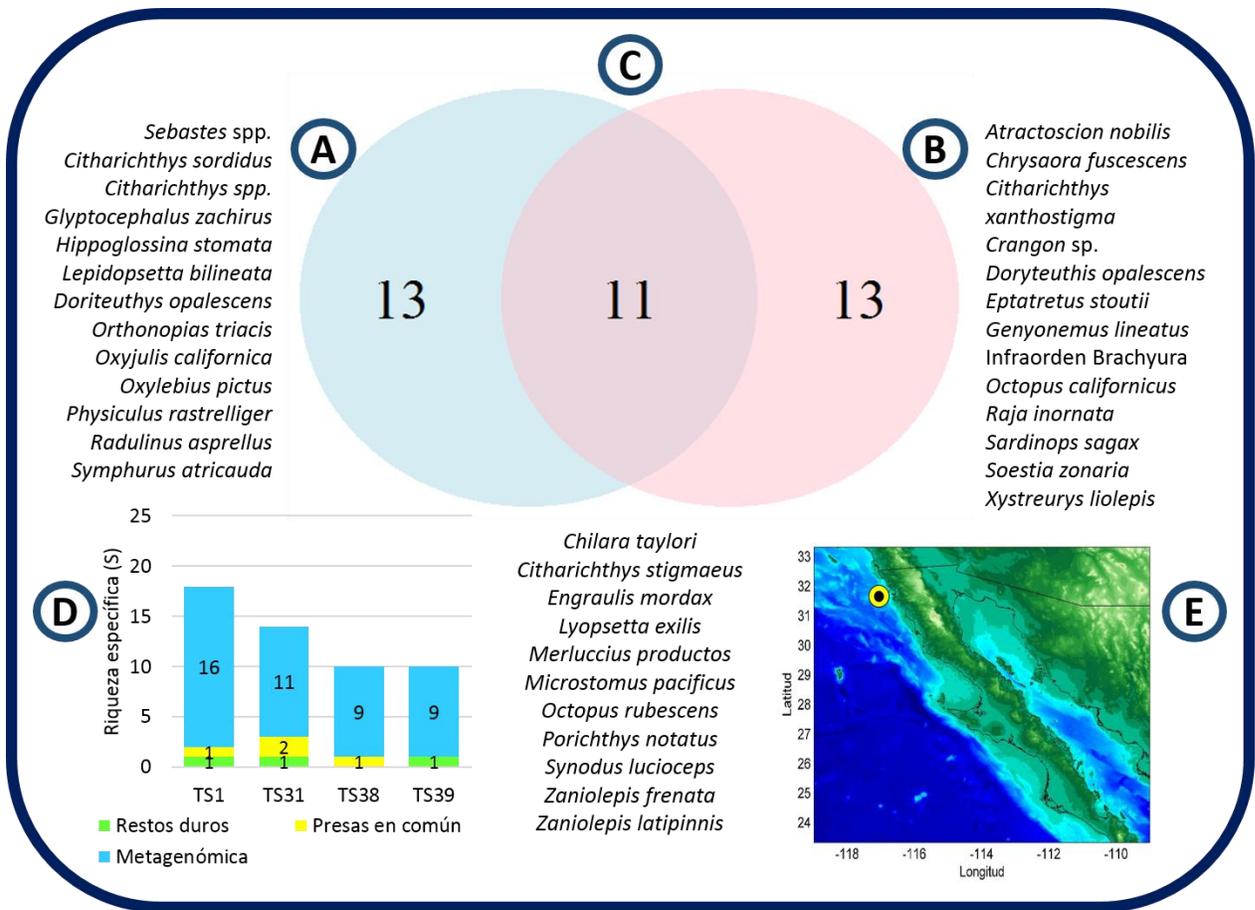


Figura 12. Especies identificadas dentro de la dieta de la foca de puerto en Isla Todos Santos Sur, Baja California, México. (A) Indica el número de presas identificadas por Durazo-Rodríguez (2015) (n=42) que no se comparten con el presente estudio. (B) Indica las presas identificadas de forma exclusiva con el análisis metagenómico (n=4). (C) Indica el número de presas que ambos métodos comparten. (D) Representa la riqueza de presas identificadas a partir de restos sólidos y metagenómica por muestras en común. (E) Localización geográfica de Isla Todos Santos Sur.

Al comparar la frecuencia de ocurrencia de las presas identificadas por ambos métodos se observó que con el mismo tamaño de muestra (n=4), las especies de importancia son *S. lucioceps* (lagarto lucio), *M. pacificus* (platija escurridiza) y *O. rubescens* (pulpo rojo del Pacífico) (Figura 13-A). La proporción de presas de importancia dentro de la dieta cambia al incluir la totalidad de muestras analizadas por cada método (n=42 por remanentes sólidos, n=4 por análisis metagenómico; Figura 13-B). Al ampliar este tamaño de muestra se destaca la importancia de una especie más (*C. taylori*) dentro de la dieta. Por lo anterior, la incidencia e importancia de cada presa depende del tamaño de muestra y el método implementado para identificarla.

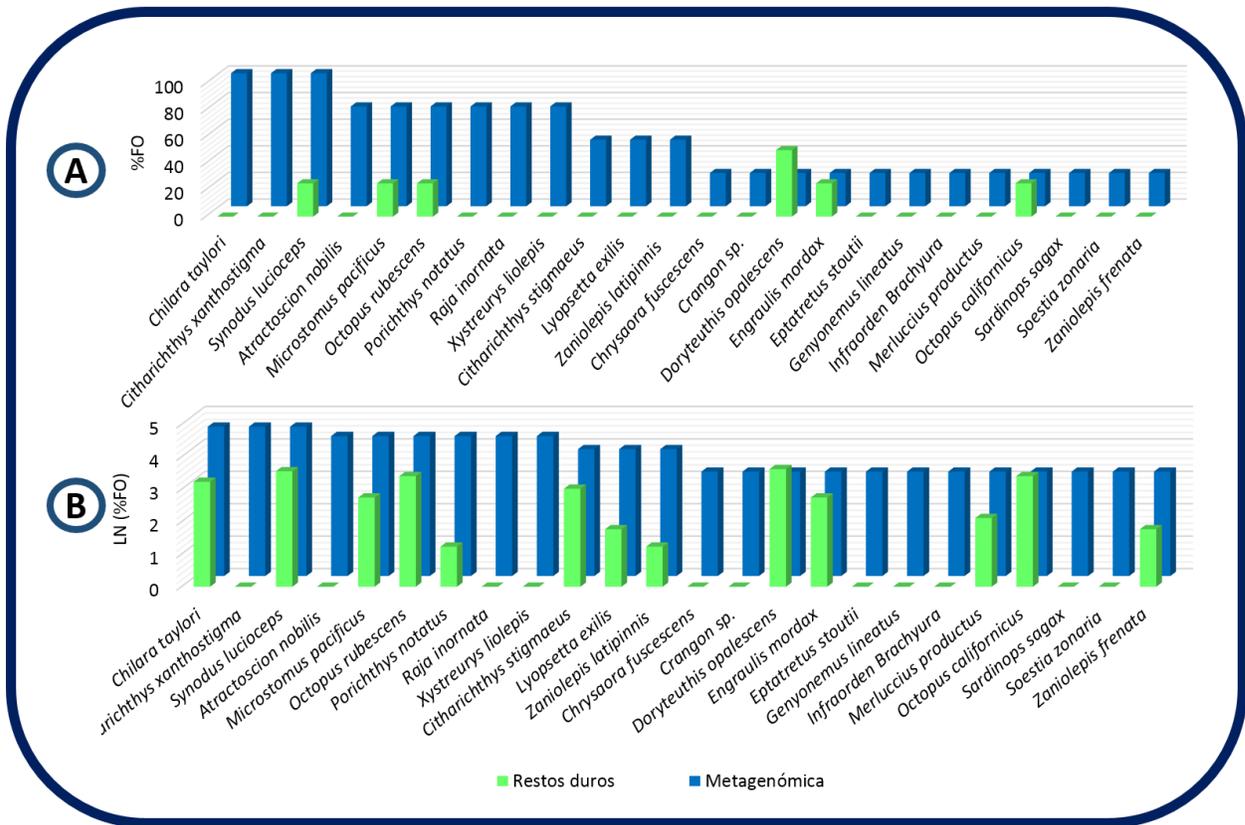


Figura 13. Proporción de frecuencia de ocurrencia (%FO) de las presas de la foca de puerto identificadas a través de restos duros y metagenómica, en la Isla Todos Santos Sur, Baja California, México. (A) Indica la frecuencia con la que ocurren los taxa presa identificados a través de ambos métodos (n=4). (B) Indica la frecuencia con la que ocurren los taxa presa identificados a partir de remanentes sólidos (n=42) y herramientas metagenómicas (n=4).

La importancia de las especies *C. xanthostigma*, *Atractoscion nobilis* (corvina blanca), *Raja inornata* (raya de California) y *Xystreureys liolepis* (lenguado cola de abanico) dentro de la dieta de la foca de puerto está siendo subestimada por el método de tamizado de heces debido a su falta de detección. Su frecuencia de ocurrencia en las heces indica que su ingesta puede ser considerada como alimento secundario, o bien, preferencial ya que se les observa en 100% y 75% de las muestras analizadas.

3.5.2 Isla San Jerónimo

Se identificaron 26 presas a partir de cuatro muestras fecales de la foca de puerto (Anexo 9). De acuerdo a la prueba χ^2 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la riqueza de presas observada para cada una de las muestras ($\chi^2=0.963$, $p=0.81$, Tabla 6).

Tabla 6. Riqueza de presas (S) de la foca de puerto en Isla San Jerónimo (SJ).

Muestras	(S) por muestra	(S) por sitio
SJ49	14	26
SJ55	11	
SJ57	16	
SJ58	13	

La riqueza de presas observada es menor a la estimada por el estadístico Chao2 en la Isla San Jerónimo durante la temporada de muda. Ambas estimaciones no alcanzan la asíntota dentro de las curvas acumulativas de especies. Estos resultados sugieren aumentar el número de muestras fecales para esta colonia (Figura 14).

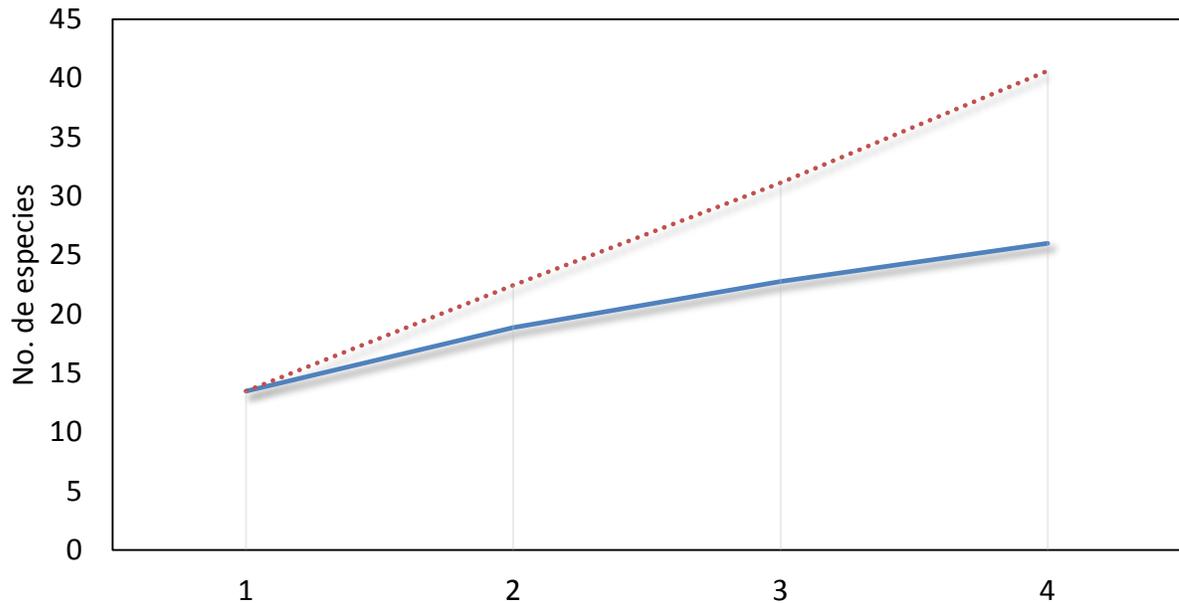


Figura 14. Curva de acumulación de especies observadas (línea sólida) y estimadas (línea punteada) para la dieta de la foca de puerto en Isla San Jerónimo. El eje de las abscisas indica el número de muestras utilizadas para este análisis.

Las presas con mayor incidencia dentro de las muestras fueron *Atractoscion nobilis* (corvina blanca), *Citharichthys xanthostigma* (lenguado alón), *Citharichthys stigmaeus* (lenguado pecoso), *Porichthys notatus* (sapo cabezón) y *Synodus lucioceps* (lagarto lucio). Las familias Ophidiidae, Sciaenidae, Paralichthyidae y Pleuronectidae representaron el 45% de la dieta para este sitio. En promedio, las presas de la foca de puerto en Isla San Jerónimo presentan un nivel trófico de 3.69 ± 0.57 y una talla de 37.08 ± 18.83 cm (Anexo 10).

Con base en la incidencia de cada presa se observó que existe una preferencia alimentaria por consumir especies de hábitos demersales (69%) y pelágicos (15%). Por lo anterior, la foca de puerto en Isla San Jerónimo se especializa más en el consumo de especies asociadas al fondo que especies de nado más rápido que habitan la columna de agua.

El 77% de las presas consumidas por la foca de puerto en Isla San Jerónimo corresponde a peces teleósteos (n=4) (Figura 15).

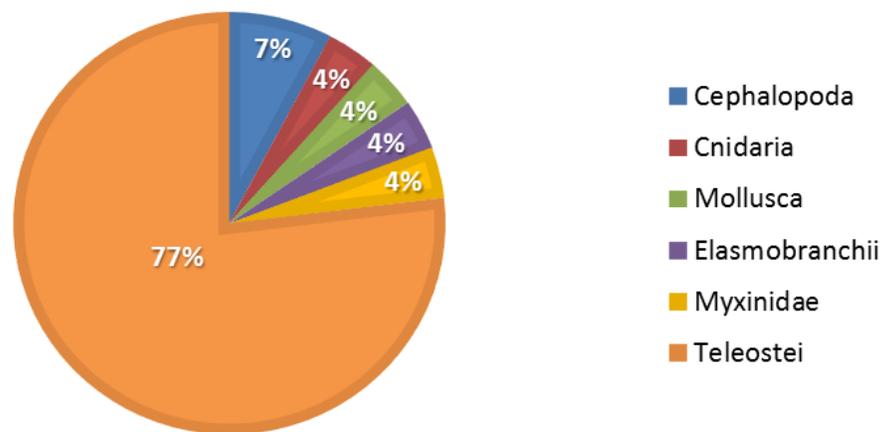


Figura 15. Proporción de los principales grupos consumidos por la foca de puerto en Isla San Jerónimo, Baja California, México.

Dentro de los invertebrados las especies de cefalópodos *Octopus rubescens* (pulpo rojo del Pacífico) y *Doryteuthis opalescens* (calamar de California) tuvieron mayor incidencia. Los grupos Cnidaria y Mollusca se encontraron igualmente representados dentro de las muestras. En general los invertebrados representaron el 15% de la dieta de la foca de puerto en Isla San Jerónimo.

El 16% de la dieta correspondió a presas que por la naturaleza de sus tejidos no son detectables o identificables a través de estructuras duras en heces, pero sí por métodos moleculares. Éstas fueron *Chrysaora fuscescens* (ortiga del Pacífico), *Raja inornata* (raya de California), Fam. Veneridae (bivalvo) y *Eptatretus stoutii* (mixínido del Pacífico).

Se identificaron las especies *Icelinus cavifrons* e *Icelinus quadriseriatus* (charrascos) como posibles presas de consumo incidental, o bien, como posible alimento de las presas de la foca de puerto debido a su baja frecuencia de ocurrencia en las muestras y talla reducida (8.9 cm).

3.5.2.1 Comparación entre métodos de identificación de presas en Isla San Jerónimo

Ambos métodos mostraron que la foca de puerto se alimenta en mayor frecuencia de especies de peces teleósteos en contraste con otros tipos de presas. En ambos análisis se destaca la importancia del pez lagarto lucio (*Synodus lucioceps*) dentro de la dieta de la foca de puerto en Isla San Jerónimo.

Las especies *Octopus rubescens* (pulpo rojo del Pacífico) y *Doryteuthis opalescens* (calamar de California) fueron detectadas en el 75% de las muestras por medio del análisis metagenómico. Asimismo, el pulpo rojo del Pacífico y el calamar de California fueron detectados en el 50% y 75% de las muestras tamizadas respectivamente. En ambos métodos el pulpo y el calamar son considerados las especies de invertebrados más recurrentes dentro de las muestras y, por ende, de mayor importancia dentro de la dieta.

La riqueza de presas identificadas por muestra fue distinta entre ambos métodos. En todos los casos se registró un mayor número de presas por medio de herramientas metagenómicas (Anexo 10). Al igual que en la Isla Todos Santos Sur, en Isla San Jerónimo se encontraron inconsistencias durante la identificación de las presas al comparar el epíteto específico asignado por cada método. Esta diferencia fue observada dentro de las especies de lenguado y pulpo identificadas.

La muestra SJ58 mostró resultados positivos a cefalópodos en la comprobación visual en gel de agarosa (2%) utilizando un fotodocumentador; sin embargo, tras la secuenciación no se obtuvo información correspondiente a miembros de este grupo. Estos resultados son congruentes con los registros de picos de cefalópodos dentro de las muestras. Únicamente la muestra SJ55 difería entre métodos de identificación. Lo anterior debido a que el calamar de California no fue detectado a través de estructuras duras, pero sí por la presencia de ADN remanente en las heces.

Las especies *Lepidopsetta bilineata* y *Cymatogaster aggregata* fueron identificadas únicamente por medio del análisis de restos duros en heces.

En general, la riqueza de presas identificadas en Isla San Jerónimo es la misma a través de restos duros (n=72) y metagenómica (n=4). La diferencia en la dieta entre ambos métodos se encuentra en la identidad taxonómica de las presas y no en el número de especies registradas (Figura 16).

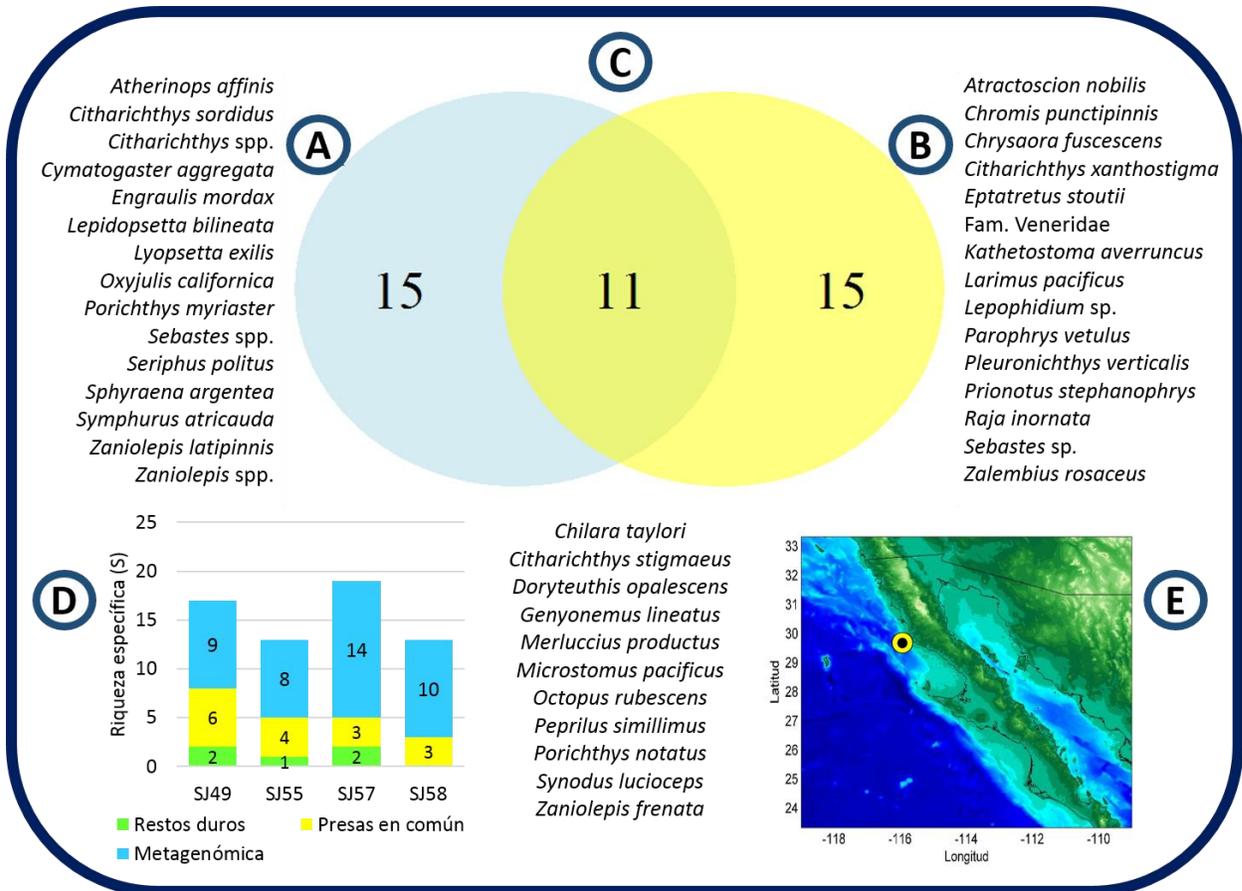


Figura 16. Especies identificadas dentro de la dieta de la foca de puerto en Isla San Jerónimo, Baja California, México. (A) Indica el número de presas identificadas por Durazo-Rodríguez (2015) (n=72) que no se comparten con el presente estudio. (B) Indica las presas identificadas de forma exclusiva con el análisis metagenómico (n=4). (C) Indica el número de presas que ambos métodos comparten. (D) Representa la riqueza de presas identificadas a partir de restos sólidos y metagenómica por muestras en común. (E) Localización geográfica de Isla San Jerónimo.

Como se observa en la figura anterior, no fue posible detectar las especies de peces *Lepidopsetta bilineata* (lenguado del Pacífico) y *Cymatogaster aggregata* (perca) con métodos moleculares, aunque éstas fueron identificadas a través del análisis de restos duros.

Al comparar la frecuencia de ocurrencia de las presas identificadas por ambos métodos se observó que bajo el mismo tamaño de muestra, las especies de importancia son *C. stigmaeus* (lenguado pecos), *P. notatus* (sapo cabezón), *S. lucioceps* (lagarto lucio), *C. taylori* (congriperla moteada), *D. opalescens* (calamar de California) y *O. rubescens* (pulpo rojo del Pacífico). La proporción de presas de importancia dentro de la dieta cambia al incluir la totalidad de muestras analizadas por el método de tamizado de heces. Al ampliar el tamaño de muestra se destaca la importancia de *P. notatus* y *G. lineatus* (corvineta blanca) dentro de la dieta (Figura 17).

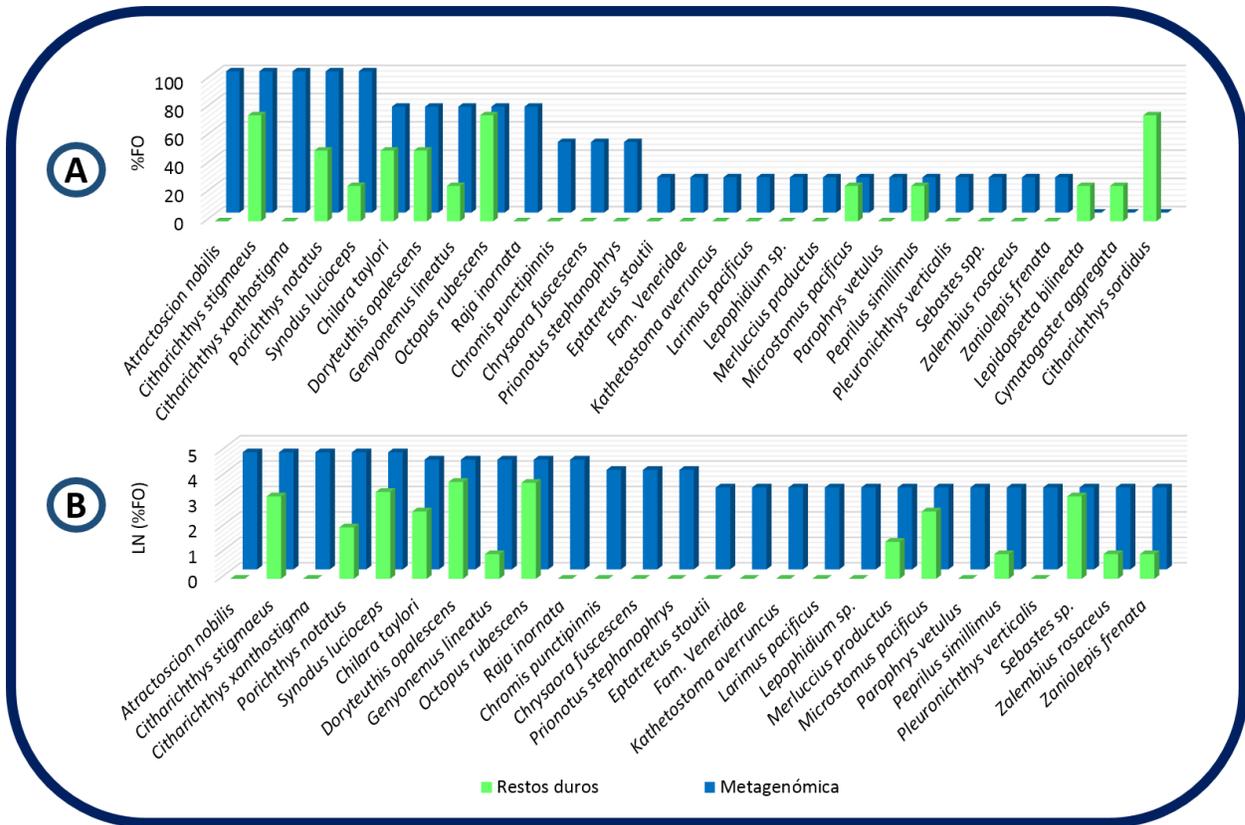


Figura 17. Proporción de frecuencia de ocurrencia (%FO) de las presas de la foca de puerto identificadas a través de restos duros y metagenómica, en la Isla San Jerónimo, Baja California, México. (A) Indica la frecuencia con la que ocurren los taxa presa identificados a través de ambos métodos (n=4). (B) Indica la frecuencia con la que ocurren los taxa presa identificados a partir de remanentes sólidos (n=72) y análisis metagenómico (n=4).

La importancia de las especies *A. nobilis*, *C. xanhostigma* y *R. inornata* no es apreciada bajo el método de análisis de estructuras duras debido a la dificultad de su identificación o detección. Su incidencia dentro de las muestras nos habla de la frecuencia en que estas especies son consumidas por lo que su ingesta puede ser considerada como alimento secundario, o bien, preferencial.

3.5.3 Isla Natividad

Se identificaron 21 presas a partir de cuatro muestras fecales de la foca de puerto (Anexo 11). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la riqueza de presas observada entre las muestras ($X^2=15.216$, $p=0.002$, Tabla 7).

Tabla 7. Riqueza de presas (S) de la foca de puerto en Isla Natividad (N).

Muestras	(S) por muestra	(S) por sitio
N17	19	21
N21	7	
N24	8	
N30	3	

En la Isla Natividad, la riqueza de presas observada es menor a la estimada por el estadístico Chao2 durante la temporada de muda. Ambas estimaciones no alcanzan la asíntota dentro de la curva acumulativa de especies. Estos resultados sugieren aumentar el número de muestras fecales para esta colonia (Figura 18).

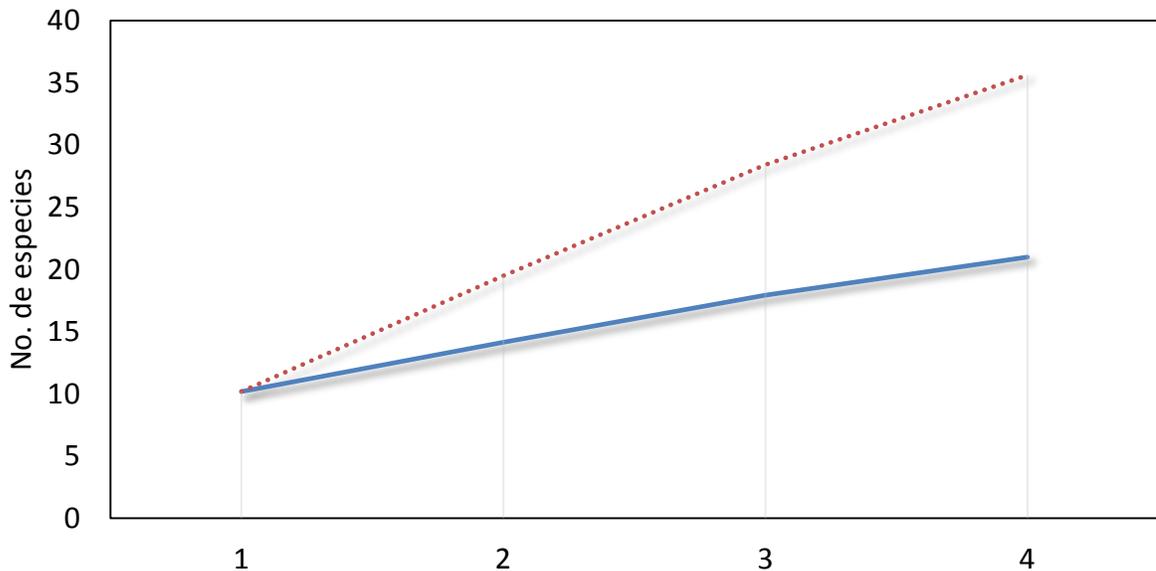


Figura 18. Curva de acumulación de especies observadas (línea continua) y estimadas (línea punteada) para la dieta de la foca de puerto en Isla Natividad. El eje de las abscisas indica el número de muestras utilizadas para este análisis.

Al igual que en Isla Todos Santos Sur, las presas con mayor incidencia dentro de las muestras fueron *C. taylori* (congriperla moteada), *C. xanthostigma* (lenguado alón) y *S. lucioceps* (lagarto lucio). Las familias Paralicthyidae (30.77%), Pleuronectidae (23.07%), Batrachoididae y Hexagrammidae representaron el 84.62% de la dieta para este sitio. En promedio, las presas de la foca de puerto en Isla Natividad presentan un nivel trófico de 3.68 ± 0.50 y una talla de 38.33 ± 16.94 cm.

Con base en la incidencia de cada presa se observó que existe una preferencia alimentaria por consumir especies de hábitos demersales (81%). Lo anterior sugiere una conducta alimentaria dirigida a la detección de presas de poco movimiento asociadas a algún tipo de fondo.

El 85% de las presas consumidas por la foca de puerto en Isla Natividad corresponde a peces teleósteos (n=4) (Figura 19).

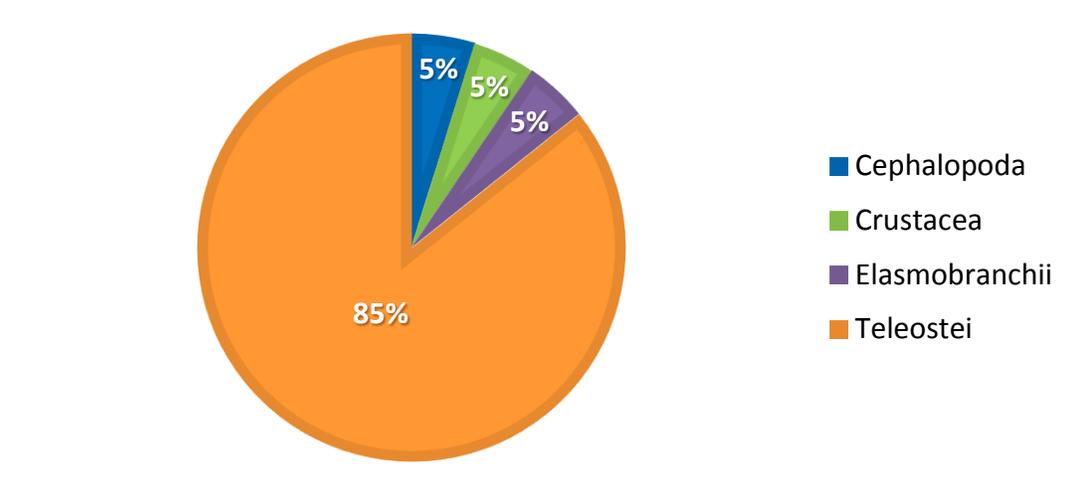


Figura 19. Proporción de los principales grupos consumidos por la foca de puerto en Isla Natividad, Baja California Sur, México.

La frecuencia de ocurrencia de invertebrados dentro de la dieta fue igual, por lo que no se destaca ningún taxón en términos de consumo. En total, los invertebrados representaron el 10% de la dieta de la foca de puerto en Isla Natividad.

El consumo de peces cartilaginosos y crustáceos representa el 10% de la dieta. Por la naturaleza de sus tejidos estas presas no son detectables o identificables a través del tamizado y recuperación de estructuras duras en heces. El hallazgo de las especies *R. inornata* (raya de California) *Hemisquilla californiensis* (camarón mantis) contribuye al conocimiento de la dieta *P. v. richardii* en Isla Natividad, ya que amplía el espectro trófico conocido para este pinnípedo.

Se identificó a la especie *Icelinus cavifrons* (charrasco cabeza bacha) como posible presa de consumo incidental, o bien, como posible alimento de las presas de la foca de puerto debido a su baja frecuencia de ocurrencia en las muestras y talla reducida (8.9 cm).

3.5.3.1 Comparación entre métodos de identificación de presas en Isla Natividad

Tanto el análisis de remanentes sólidos como la identificación de ADN de presas en heces mostraron que la foca de puerto se alimenta en mayor frecuencia de especies de peces teleósteos sobre los invertebrados. En cuanto a las presas ícticas, ambos métodos coinciden en la importancia de *Synodus lucioceps* y miembros del género *Citharichthys* dentro de la dieta de la foca de puerto. El género *Octopus* no fue detectado a través del análisis de restos sólidos en heces. Asimismo, este género tiene la misma frecuencia que *Hemisquilla californiensis* al analizar las muestras por medio de herramientas metagenómicas. La importancia de un grupo sobre otro dentro de la dieta no puede estimarse bajo los métodos implementados para la identificación de presas.

La riqueza de presas identificadas por muestra fue distinta entre ambos métodos (Anexo 12). En todos los casos se registró un mayor número de presas por medio de la identificación del ADN contenido en heces (a excepción de N24). Al igual que en otras islas se encontraron inconsistencias durante la identificación de las presas al comparar el epíteto específico asignado por cada método. Esta diferencia fue observada dentro del género *Citharichthys*.

Dentro de la muestra N21 no se registraron estructuras duras; sin embargo, fue posible identificar 7 presas por medio de herramientas moleculares. Por medio de la metagenómica, se lograron identificar especies presa de cuerpo blando o susceptible a la digestión, las cuales no es posible identificar a través de métodos convencionales. Por lo tanto, el presente estudio complementa los esfuerzos previos sobre la dieta de este pinnípedo en Isla Natividad. Las especies *Leptocottus armatus*, *Ophidion scrippsae*, *Oxyjulis californica*, *Porichthys myriaster* y *Porichthys notatus* fueron detectadas únicamente por medio de estructuras duras en heces.

La riqueza de presas identificadas en Isla Natividad es distinta a través de métodos convencionales (n=53) y metagenómica (n=4) (Figura 20).

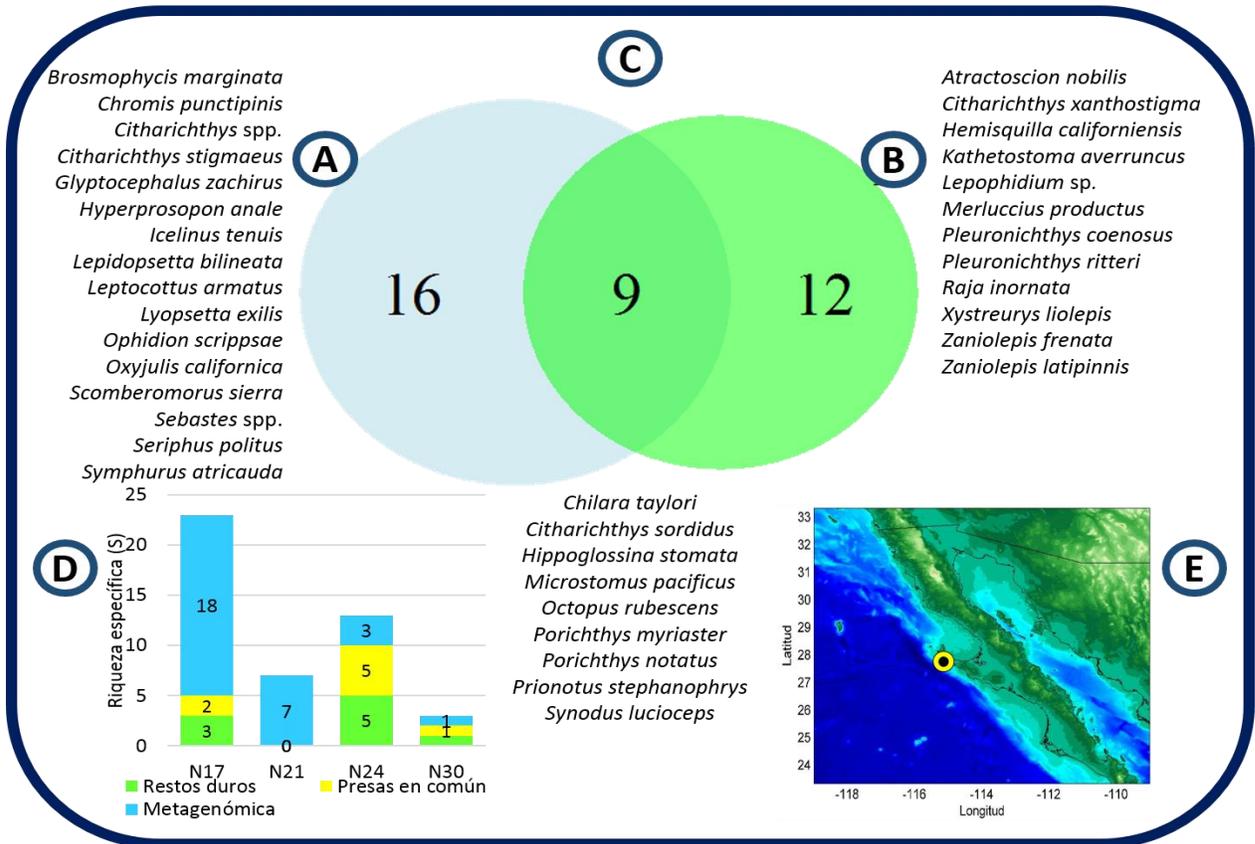


Figura 20. Especies identificadas dentro de la dieta de la foca de puerto en Isla Natividad, Baja California Sur, México. (A) Indica el número de presas identificadas por Durazo-Rodríguez (2015) (n=53) que no se comparten con el presente estudio. (B) Indica las presas identificadas de forma exclusiva con el análisis metagenómico (n=4). (C) Indica el número de presas que ambos métodos comparten. (D) Representa la riqueza de presas identificadas a partir de restos sólidos y metagenómica por muestras en común. (E) Localización geográfica de Isla Natividad.

Al comparar la frecuencia de ocurrencia de las presas identificadas por ambos métodos se observó que con el mismo tamaño de muestra, las especies de importancia son *S. lucioceps* (lagarto lucio), *C. taylori* (congriperla moteada), *Prionotus stephanophrys* (rubio volador) y *P. notatus* (sapo cabezón). La proporción de presas de importancia dentro de la dieta cambia al incluir la totalidad de muestras analizadas por cada método (Figura 21). Al ampliar este tamaño de muestra se observa una disminución en la frecuencia en que *P. stephanophrys* ocurren en el total de muestras. Por lo anterior, la importancia de algunas especies como presas potenciales es distinta entre métodos de identificación y es sensible al tamaño de muestra.

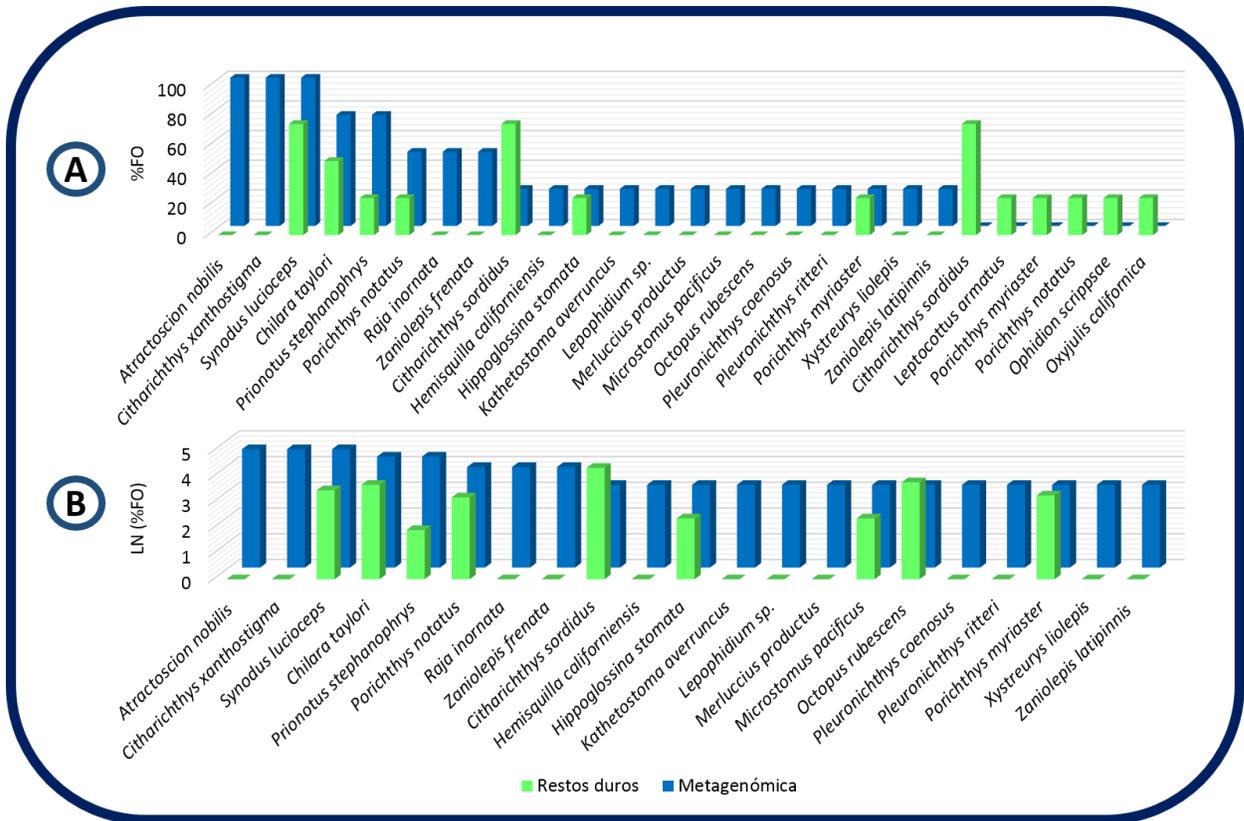


Figura 21. Proporción de frecuencia de ocurrencia (%FO) de las presas de la foca de puerto identificadas a través de restos duros y metagenómica, en Isla Natividad, Baja California Sur, México. (A) Indica la frecuencia con la que ocurren los taxa presa identificados a través de ambos métodos (n=4). (B) Indica la frecuencia con la que ocurren los taxa presa identificados a partir de remanentes sólidos (n=53) y análisis metagenómico (n=4).

La importancia de las presas *A. nobilis* (corvina blanca), *C. xanthostigma*, *Atractoscion nobilis* (corvina blanca), *R. inornata* y *Zaniolepis frenata* (cepillo espina corta) está siendo subestimada por el método de tamizado de heces debido a la falta de detección de las mismas, o bien a la dificultad de su identificación. Su incidencia dentro de las muestras nos habla de la frecuencia en que estas especies son consumidas por lo que su ingesta puede ser considerada como alimento preferencial (*A. nobilis* y *C. xanthostigma*) o secundario (*R. inornata* y *Zaniolepis frenata*).

3.5.4 Isla San Roque

Se identificaron 29 presas a partir de cuatro muestras fecales de la foca de puerto (Anexo 13). De acuerdo a la prueba χ^2 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la riqueza de presas observada para cada una de las muestras ($\chi^2=0.174$, $p=0.98$, Tabla 8).

Tabla 8. Riqueza de presas (S) de la foca de puerto en Isla San Roque (SR).

Muestras	(S) por muestra	(S) por sitio
SR6b	15	29
SR14b	15	
SR16b	17	
SR43b	16	

En Isla San Roque la riqueza de presas observada es menor a la estimada por el estadístico Chao2 durante la temporada de muda. Ambas estimaciones no alcanzan la asíntota dentro de las curvas acumulativas de especies. Estos resultados indican que debe aumentarse el esfuerzo de colecta para esta colonia (Figura 22).

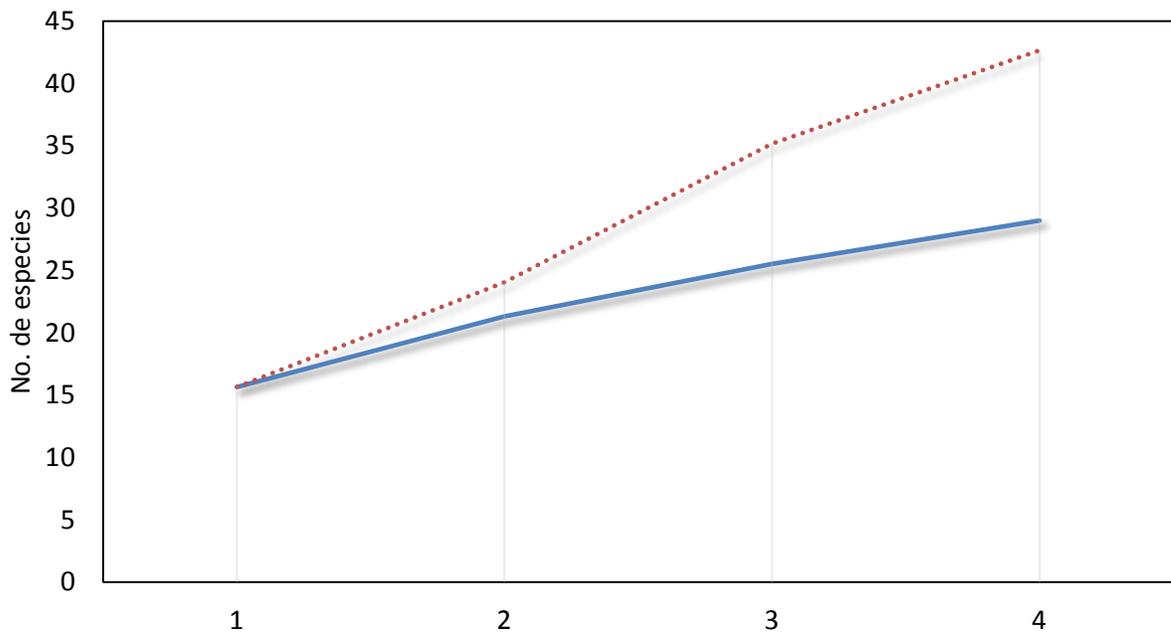


Figura 22. Curva de acumulación de especies observadas (línea sólida) y estimadas (línea punteada) para la dieta de la foca de puerto en Isla San Roque. El eje de las abscisas indica el número de muestras utilizadas para este análisis.

Las presas con mayor incidencia dentro de las muestras fueron *Chilara taylori* (congriperla moteada) *Citharichthys sordidus* (lenguado arenero del Pacífico), *Citharichthys xanthostigma* (lenguado alón), *Hippoglossina stomata* (lenguado bocón), *Pleuroncodes planipes* (langostilla roja), *Raja inornata* (raya de California), *Sardinops sagax* (sardina Monterrey) y *Synodus lucioceps* (lagarto lucio). Las familias Ophidiidae, Sciaenidae, Paralichthyidae y Pleuronectidae representaron el 45% de la dieta para este sitio. En promedio, las presas de la foca de puerto en Isla San Roque presentan un nivel trófico de 3.53 ± 0.59 y una talla de 36.69 ± 29.45 cm.

Con base en la incidencia de cada presa se observó que existe una preferencia alimentaria por consumir especies de hábitos demersales (71%). Por lo anterior, la foca de puerto se especializa más en el consumo de especies asociadas al fondo que especies de nado más rápido que habitan la columna de agua.

El 76% de las presas consumidas por la foca de puerto en Isla San Roque corresponde a peces teleósteos (n=4) (Figura 23).

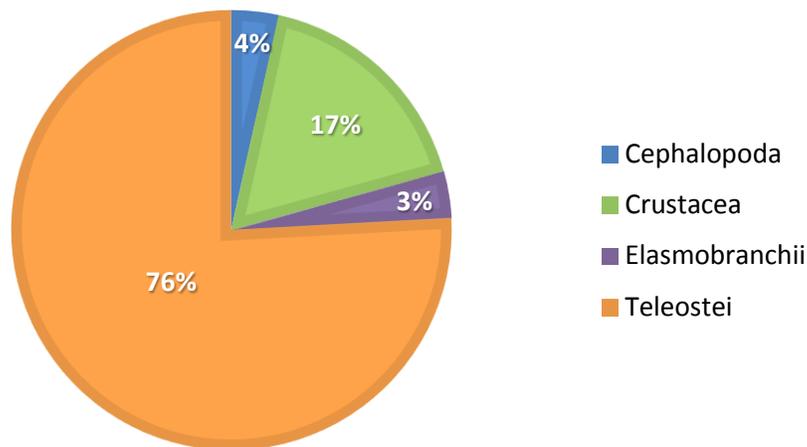


Figura 23. Proporción de los principales grupos consumidos por la foca de puerto en Isla San Roque, Baja California Sur, México.

La frecuencia de ocurrencia de invertebrados dentro de la dieta fue igual, por lo que no se destaca un género sobre otro en términos de consumo. En total, los invertebrados representaron el 21% de la dieta de la foca de puerto en Isla San Roque.

El 20% de la dieta corresponde a presas que por la naturaleza de sus tejidos no son detectables o identificables a través del tamizado y recuperación de estructuras duras en heces. Los taxa *Pleuroncodes planipes* (langostilla roja), *Raja inornata* (raya de California), *Hemisquilla californiensis* (camarón mantis),

Sicyonia laevigata (camarón roca), *Crangon* sp. (camarón), Infraorden Brachyura (cangrejo) y *Penaeus vannamei* (camarón blanco) son presas únicamente identificables a través de métodos moleculares. Por lo anterior, el presente estudio logró ampliar el conocimiento sobre el espectro trófico de la foca de puerto en Isla San Roque al implementar herramientas metagenómicas para el análisis de la dieta.

Se identificaron las especies *Icelinus cavifrons* (charrasco cabeza bacha) y *Triphoturus mexicanus* (linternilla) como posibles presas de consumo incidental, o bien, como posible alimento de las presas de la foca de puerto debido a su baja frecuencia de ocurrencia en las muestras y talla reducida (7-8 cm).

3.5.4.1 Comparación entre métodos de identificación de presas en Isla San Roque

Ambos métodos mostraron que la foca de puerto se alimenta en mayor frecuencia de especies de peces teleósteos en contraste con otros tipos de presas. El lagarto lucio (*Synodus lucioceps*) y el lenguado arenoso del Pacífico (*Citharichthys sordidus*) fueron las únicas especies de importancia común entre ambos métodos.

La especie *Octopus rubescens* (pulpo rojo del Pacífico) fue detectada en el 25% de las muestras por medio de herramientas metagenómicas (muestra SR6b). Asimismo, el pulpo rojo del Pacífico fue detectado en el 25% de las muestras tamizadas (muestra SR43b). La incidencia de las especies de cefalópodos dentro de las muestras no es constante entre los métodos implementados para estudiar la dieta. Por medio del análisis de restos sólidos el género *Octopus* es considerado el invertebrado de mayor recurrencia dentro de las muestras y, por ende, de mayor importancia dentro de la dieta. Sin embargo, al identificar las presas por su ADN obtuvimos que la especie *Hemisquilla californiensis* (camarón mantis) presenta una mayor incidencia dentro de las muestras con respecto al pulpo. Por lo anterior, la recuperación de estructuras duras en heces podría estar subestimando la importancia de otras especies de invertebrados dentro de la dieta de la foca de puerto.

La riqueza de presas identificadas por muestra fue distinta entre ambos métodos (Anexo 14). En todos los casos se registró un mayor número de presas por medio de herramientas metagenómicas. Se encontraron inconsistencias durante la identificación de las presas al comparar el epíteto específico asignado por cada método. Se logró clarificar el epíteto específico para especies de los géneros *Sebastes*,

Zaniolepis, *Octopus* y *Citharichthys* que no había sido posible asignar mediante la identificación de sus restos duros en las heces.

No fue posible detectar las especies de peces *Porichthys notatus* (sapo cabezón) y *Symphurus atricaudus* (lengua californiana) con métodos moleculares (muestras SR16B y SR43b). La muestra SR43 mostró resultados positivos a cefalópodos en la comprobación visual a través de un gel de agarosa (2%) utilizando un fotodocumentador; sin embargo, tras la secuenciación no se obtuvo información correspondiente a miembros de este grupo. Estos resultados no concuerdan con los registros de picos de cefalópodos dentro de las muestras. De igual forma, la muestra SR6b difería entre métodos de identificación. Lo anterior debido a que el pulpo rojo del Pacífico no fue detectado a través de estructuras duras pero sí por la presencia de ADN remanente en las heces. Dentro de la muestra SR14b no se registraron estructuras duras; sin embargo, fue posible identificar 15 presas por medio de herramientas metagenómicas.

En general, la riqueza de presas identificadas en Isla San Roque es distinta a través de restos duros (n=44) y metagenómica (n=4) (Figura 24).

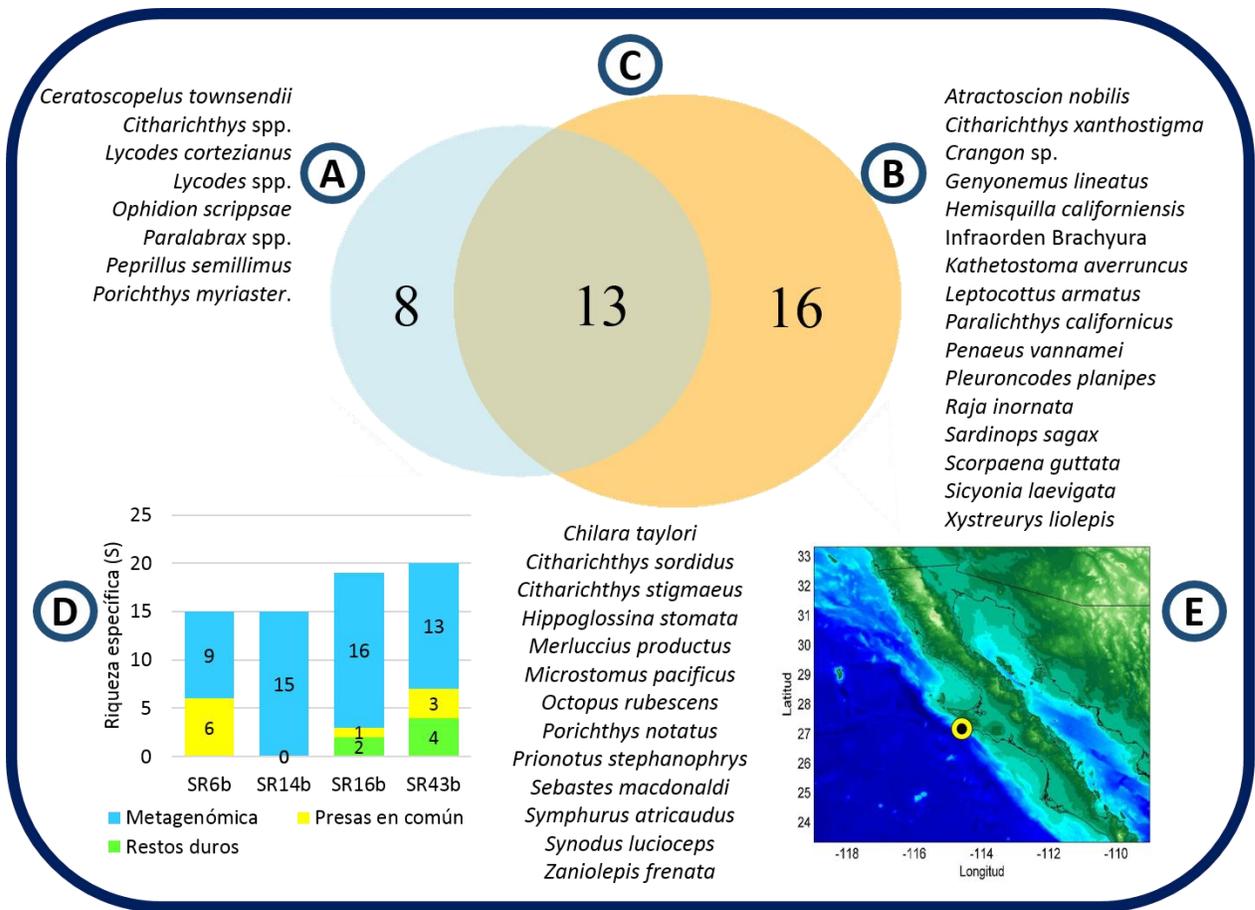


Figura 24. Especies identificadas dentro de la dieta de la foca de puerto en Isla San Roque, Baja California Sur, México. (A) Indica el número de presas identificadas por Durazo-Rodríguez (2015) ($n=44$) que no se comparten con el presente estudio. (B) Indica las presas identificadas de forma exclusiva con el análisis metagenómico ($n=4$). (C) Indica el número de presas que ambos métodos comparten. (D) Representa la riqueza de presas identificadas a partir de restos sólidos y metagenómica por muestras en común. (E) Localización geográfica de Isla San Roque.

Al comparar la frecuencia de ocurrencia de las presas identificadas por ambos métodos se observó que con el mismo tamaño de muestra, las especies de importancia son *C. taylori* (congriperla moteada), *C. sordidus* (lenguado arenero del Pacífico), *Hippoglossina stomata* (lenguado bocón) y *S. lucioiceps* (lagarto lucio). La proporción de presas de importancia dentro de la dieta cambia al incluir la totalidad de muestras analizadas por el método de tamizado de heces (Figura 14). Al ampliar el tamaño de muestra la importancia de *C. taylori* y *S. lucioiceps* aumenta en términos de su frecuencia de ocurrencia (Figura 25).

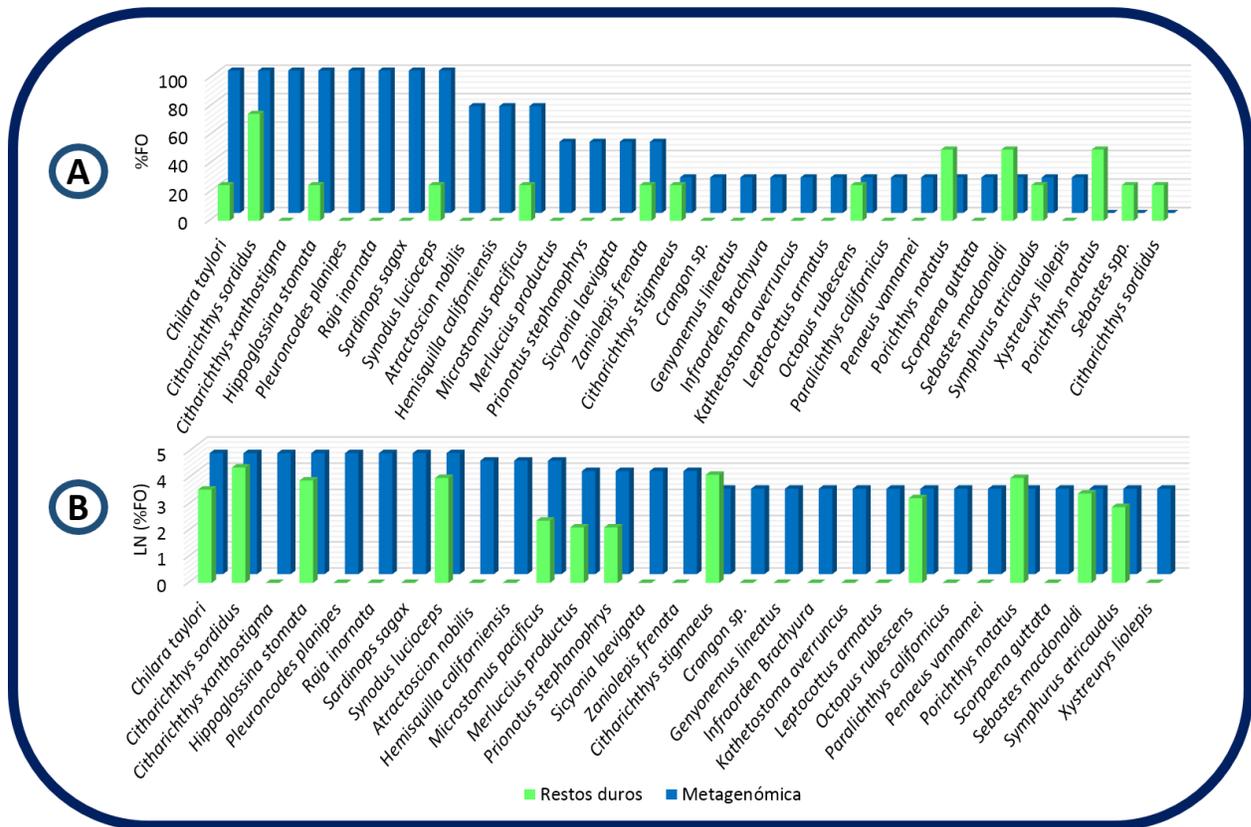


Figura 25. Proporción de frecuencia de ocurrencia (%FO) de las presas de la foca de puerto identificadas a través de restos duros y metagenómica, en Isla San Roque, Baja California Sur, México. (A) Indica la frecuencia con la que ocurren los taxa presa identificados a través de ambos métodos (n=4). (B) Indica la frecuencia con la que ocurren los taxa presa identificados a partir de remanentes sólidos (n=43, temporada de premuda) y análisis metagenómico (n=4).

La importancia de las especies *C. xanthostigma*, *R. inornata* y *Sardinops sagax* (sardina Monterrey) no es detectada con el método de análisis de estructuras duras debido a la dificultad de su identificación o detección. Su incidencia dentro de las muestras nos habla de la frecuencia en que estas especies son consumidas, por lo que su ingesta puede ser considerada como alimento secundario, o bien, preferencial. De igual forma los invertebrados *Pleuroncodes planipes* (langostilla roja) y *Hemisquilla californiensis* (camarón mantis) cuentan con una alta incidencia dentro de las muestras, incluso mayor que la especie de pulpo *Octopus rubescens*. Lo anterior sustenta la importancia de estas presas dentro de la dieta, las cuales sólo pueden ser identificadas a través de métodos moleculares.

3.5.5 Dieta de la foca de puerto a lo largo de su distribución en México

La foca de puerto en México se alimenta preferencialmente de presas de hábitos demersales, con niveles tróficos altos (3.61 ± 0.09) y talla promedio de 36.36 ± 2.14 cm. Las presas correspondientes a peces teleósteos son consumidas en mayor frecuencia que los invertebrados; sin embargo, la incidencia de cada grupo varía entre los sitios de estudio. En las islas Todos Santos Sur y San Roque los invertebrados aparecen con mayor frecuencia dentro de las muestras que en las Islas Natividad y San Jerónimo. Estas diferencias en el consumo de peces óseos e invertebrados entre islas no son estadísticamente significativas ($\chi^2=2.719$, $p=0.46$) (Figura 26).

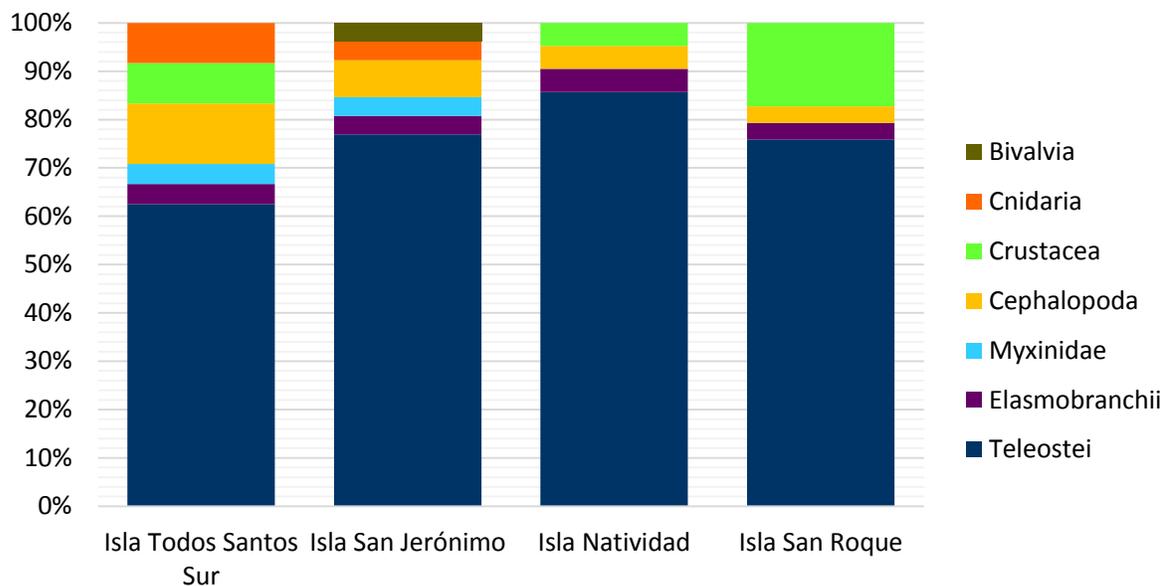


Figura 26. Frecuencia de ocurrencia de los distintos tipos de presa que conforman la dieta de la foca de puerto en México.

La foca de puerto se alimenta en general de los mismos grupos (lenguados, pulpos, congriperlas) a lo largo de su distribución en México. Su dieta dentro de los sitios de estudio se diferencia por las identidades taxonómicas que la componen, es decir, en todos los sitios se encontró que se alimentan de lenguados mas no necesariamente de las mismas especies de lenguado. La dieta de este pinnípedo es variada a lo largo de su distribución, y consume especies de distintos hábitats en distintas frecuencias.

Durante la temporada de muda 2014, se identificaron 9 presas en común entre las cuatro colonias muestreadas. Isla Todos Santos Sur comparte el 83.33% de su dieta con el resto de las islas. Únicamente 4 presas de la foca de puerto se registraron de forma exclusiva para Isla Todos Santos Sur. Isla San Jerónimo

comparte el 69.23% de su dieta con las demás islas y sólo 8 presas fueron registradas exclusivamente en este sitio. El 85.71% de las presas registradas para Isla Natividad fueron observadas dentro de los otros sitios de estudio. Sólo 3 de las presas identificadas para la foca de puerto son consumidas exclusivamente en esta última isla. Finalmente, Isla San Roque comparte el 72.41% de su dieta con el resto de los sitios, el alimento restante corresponde a 8 presas exclusivas de esta isla. Se observó que para las islas San Jerónimo y San Roque no se registraron presas en común de carácter exclusivo para estos sitios (Figura 27).

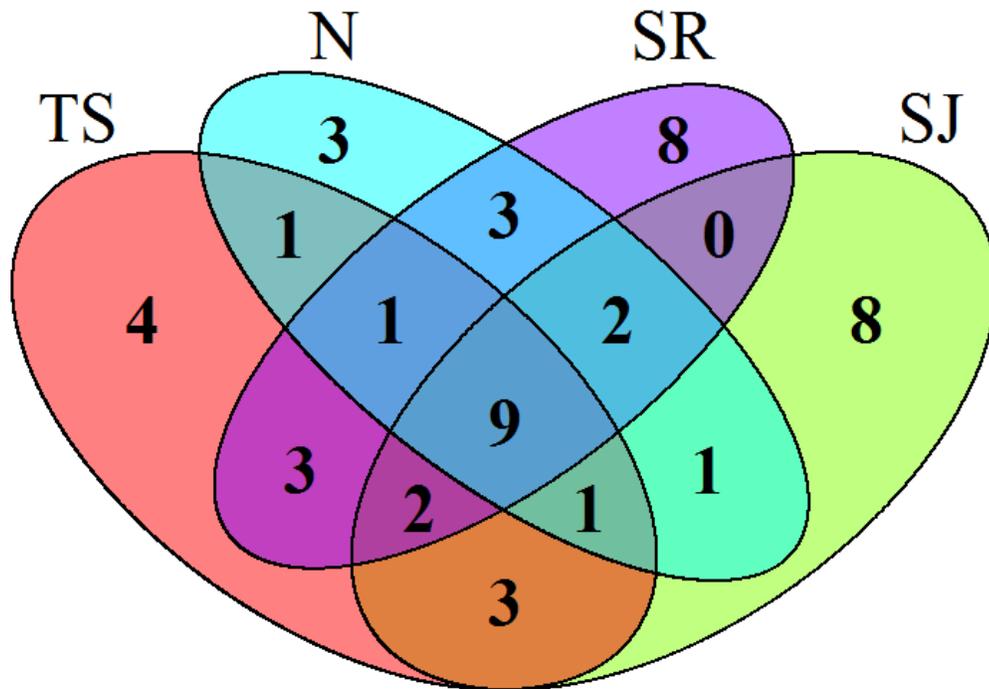


Figura 27.Traslape de la dieta de la foca de puerto en cuatro sitios de estudio en México, según el número de especies compartidas entre ellos. (TS) Isla Todos Santos Sur; (N) Isla Natividad; (SR) Isla San Roque; (SJ) Isla San Jerónimo.

Se encontró que no existen diferencias significativas entre la riqueza de especies observada dentro de cada sitio de estudio ($X^2=1.36$, $p=0.71$). Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de ocurrencia (%FO) de cada presa entre los sitios de estudio ($X^2=3809$, $p=0.0004$). Por lo anterior, la dieta de la foca de puerto en México difiere entre sitios en términos de la frecuencia con que una especie es consumida en comparación con otras.

Los resultados obtenidos a través del índice de Jaccard indican que las islas Todos Santos Sur y San Jerónimo tienen un 43% de similitud en la dieta. La misma proporción se observa entre Isla Todos Santos

Sur e Isla Natividad. Asimismo, las islas Natividad y San Roque tienen un 47% de similitud en las presas consumidas por la foca de puerto en ambos sitios.

En México la riqueza de presas observada es menor a la estimada por el estadístico Chao2 durante la temporada de muda. Ambas estimaciones no llegan a la asíntota dentro de la curva acumulativa de especies. Estos resultados indican que debe aumentarse el número de muestras para obtener un espectro alimentario más completo de cada colonia (Figura 28).

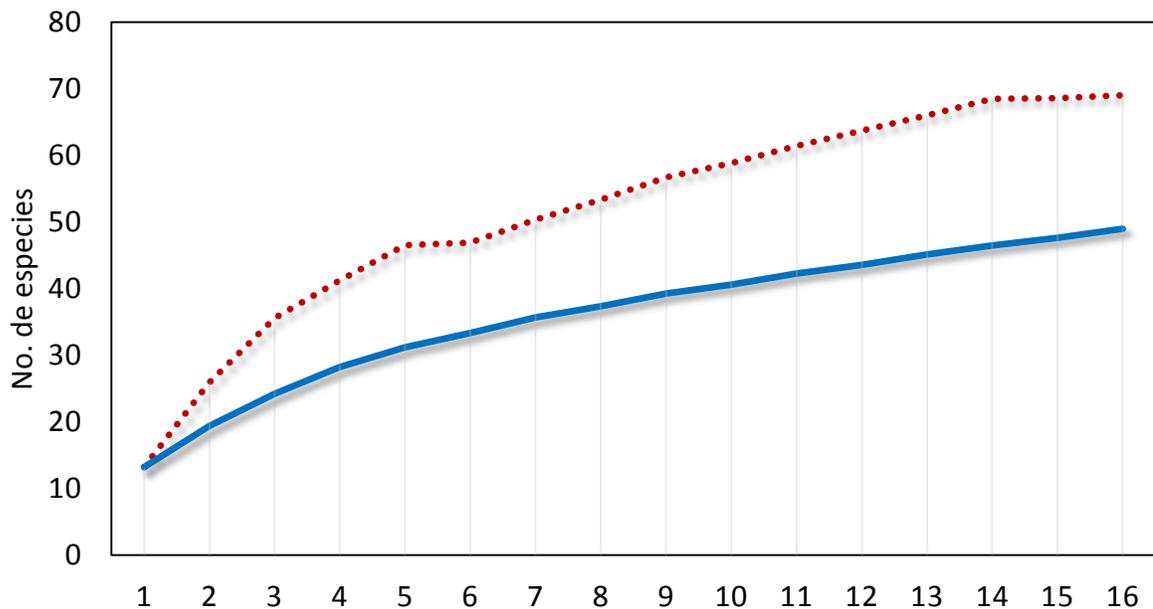


Figura 28. Curva de acumulación de especies observadas (línea sólida) y estimadas (línea punteada) para la dieta de la foca de puerto en México. El eje de las abscisas indica el número de muestras utilizadas para este análisis.

3.5.5.1 Comparación entre métodos y espectro alimentario de la foca de puerto en México

Como resultado ambos métodos coinciden en la identificación de 15 presas correspondientes a peces óseos y cefalópodos. Durazo-Rodríguez (2015) identificó 22 especies presa ($n=16$) de la foca de puerto en México durante la temporada de muda 2014. Sobre las mismas muestras se identificaron 49 presas a través de herramientas de secuenciación masiva. El 28.57% de la dieta identificada a partir del análisis molecular no es compartida con el análisis de restos sólidos ya que corresponde a presas de cuerpo blando que no son detectadas por este último método.

Considerando la totalidad de muestras colectadas para el análisis de restos sólidos, se identificaron 44 presas de la foca de puerto en México durante la temporada de muda de 2014 (Durazo-Rodríguez, 2015). Este trabajo se realizó a través de la identificación de otolitos y picos de cefalópodos con un esfuerzo de colecta de 249 muestras fecales durante la temporada de muda, incluyendo la premuda en el caso de Isla San Roque. Como se mencionó anteriormente, se logró identificar 49 presas de este pinnípedo en México durante la misma temporada (n=16). Ambos métodos comparten la identidad taxonómica de 21 presas correspondientes a peces óseos y cefalópodos. Dentro del total de presas identificadas por ambos métodos, 28 presas (38.9%) fueron detectadas únicamente por medio de herramientas metagenómicas. El 50% de las presas no compartidas corresponde a peces cartilagosos, mixinos e invertebrados. Los detalles de estas especies se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9. Invertebrados y presas de cuerpo blando identificadas a través de metagenómica. La numeración representa a los siguientes grupos taxonómicos: (1) Cephalopoda; (2) Crustacea; (3) Elasmobranchii; (4) Myxinidae; (5) Cnidaria; (6) Bivalvia.

	Especie	Nombre común	Familia
1	<i>Octopus rubescens</i>	Pulpo rojo del Pacífico	Octopodidae
	<i>Doryteuthis opalescens</i>	Calamar de California	Loliginidae
	<i>Octopus californicus</i>	Pulpo ojo grande de California	Octopodidae
2	<i>Hemisquilla californiensis</i>	Camarón mantis	Hemisquillidae
	<i>Pleuroncodes planipes</i>	Langostilla roja	Munididae
	<i>Crangon</i> sp.	Camarón	Crangonidae
	Infraorden Brachyura	Cangrejo	Infraorden Brachyura
	<i>Sicyonia laevigata</i>	Camarón roca	Sicyoniidae
	<i>Penaeus vannamei</i>	Camarón blanco	Penaeidae
3	<i>Raja inornata</i>	Raya de California	Rajidae
4	<i>Eptatretus stoutii</i>	Mixínido del Pacífico	Myxinidae
5	<i>Chrysaora fuscescens</i>	Ortiga del Pacífico	Pelagiidae
	<i>Soestia zonaria</i>	Salpa	Salpidae
6	Fam. Veneridae	Almeja	Veneridae

4. Discusión

4.1 Análisis de muestras fecales

La extracción de ADN de presas a partir de heces de un depredador es realizable a través del uso de kits comerciales con pocas modificaciones a los protocolos prescritos. La concentración del ADN extraído en el presente estudio pudo ser afectada por factores inherentes a la naturaleza de la muestra o a la metodología utilizada en el análisis. Algunos factores que pudiesen haber intervenido durante el procesamiento de las muestras se desarrollan a continuación.

El tiempo de preservación de las muestras difirió entre los sitios de estudio (2-7 días en TS y SR) observándose una menor proporción de productos de amplificación en las islas Todos Santos Sur y San Roque. Deagle y colaboradores (2005) encontraron que el ADN de presas contenido en heces no es detectado tras la amplificación cuando las heces fueron preservadas de 2 a 5 días posteriores a su colecta. Debido a esta diferencia en los tiempos de colecta, las muestras de TS y SR fueron procesadas utilizando el método de extracción por sales. Este método permitió recuperar la información génica contenida en las muestras que presentaron mayor degradación, éstas muestras presentaron menor concentración de ADN ($6.75 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 1.76$) a la de las muestras preservadas inmediatamente después de su colecta ($25 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 2.12$). Dentro del estudio de la dieta, el tiempo de preservación de las muestras no es trivial, ya que se conoce que el ADN de las presas contenido en heces tiene una mayor probabilidad de presentar degradación con respecto al ADN del depredador, debido al proceso de digestión al que fue expuesto (Deagle *et al.*, 2006). Esto produce un sesgo en la concentración del material génico de presas que podemos recuperar a partir de muestras fecales.

El ADN extraído de heces se encuentra enriquecido en ADN del depredador con respecto al de las presas (Deagle *et al.*, 2006). La abundancia de secuencias del ADN de un depredador puede enmascarar la información correspondiente a las presas subestimando su extracción y detectabilidad, afectando sobre todo a las presas menos representadas (Deagle *et al.*, 2005; Vestheim y Jarman, 2008). El uso de oligos bloqueadores permite inhibir la amplificación por PCR del ADN del depredador para lograr obtener una mayor detección de ADN proveniente del alimento (Vestheim y Jarman, 2008; Deagle *et al.*, 2009; Deagle *et al.*, 2013; Thomas *et al.*, 2015). A pesar de que en el presente estudio se implementó esta estrategia, el

ADN de la foca de puerto representó el 22.85%, 16.17% y 0% de las secuencias obtenidas a través del marcadores de cordados, cefalópodos y eucariotas respectivamente.

En el caso del marcador para cordados, el porcentaje de secuencias correspondientes a la foca de puerto es más alto que el reportado en estudios recientes (5.8%) utilizando el mismo marcador y bloqueador (Deagle *et al.*, 2013). La aplicación del oligo bloqueador se optimizó siguiendo las recomendaciones de los autores que previamente habían aplicado esta estrategia (Deagle *et al.*, 2009; Deagle *et al.*, 2013). Por lo anterior, la concentración del oligo bloqueador dentro de cada reacción de PCR fue suficiente y existen otros factores que pudiesen estar promoviendo la presencia del ADN de la foca de puerto en las secuencias obtenidas. Estos factores pueden relacionarse al estado de degradación diferencial del ADN de las presas respecto al depredador, ya que se observó que los porcentajes más altos de incidencia del ADN de la foca de puerto se obtuvieron dentro de las muestras de las islas Todos Santos Sur y San Roque (muestras de preservación tardía).

El amplicón correspondiente a cefalópodos fue capaz de detectar el 71.87% de las presas ícticas identificadas por medio del marcador de cordados, por lo que se considera inespecífico. Asimismo, a partir de este marcador se amplificaron secuencias de ADN de la foca de puerto, por lo que se debería evaluar la necesidad de utilizar un oligo bloqueador en combinación con este marcador, o bien, confirmar si estos resultados son artefactos de productos de PCR incompletos.

El marcador de organismos eucariotas parece ser más efectivo en términos de su bloqueador de ADN de mamíferos; sin embargo, la nula detectabilidad de secuencias respectivas a la foca de puerto se debe a que dentro de la base de datos local generada para el gen 18S no existe información con respecto a este pinnípedo. Lo anterior impide comparar la efectividad de los oligos bloqueadores utilizados en el presente estudio.

4.2 Formación y secuenciación de librerías

Existen distintas técnicas útiles para la preparación de librerías compatibles con la plataforma Illumina® del equipo MiSeq® (Kozich *et al.*, 2013; Thomas *et al.*, 2015; O'Donnell *et al.*, 2016). El objetivo principal de preparar una librería es unir adaptadores y un identificador a las secuencias blanco de un

estudio. En general las librerías se obtienen luego de realizar el protocolo prescrito para un kit (Thomas *et al.*, 2015); sin embargo, existen dos estrategias que ofrecen una alternativa de menor costo para este fin. Kozich y colaboradores (2013) generaron sus librerías a partir de un solo paso de PCR donde se utiliza un oligo extenso (68 pb) que amplifica la región de interés junto a los adaptadores e índices.

En el presente estudio se aplicó la estrategia de dos pasos de PCR, la cual permite analizar varios loci a la vez y ofrece la ventaja de tener un bajo costo, se obtienen un mayor número de lecturas, se identifican un mayor número de unidades taxonómicas operacionales (OTU's) y no muestra variación en la abundancia de los taxa identificados entre réplicas de una misma muestra, en contraste con la técnica de un solo paso de PCR (O'Donnell *et al.*, 2016).

La formación de librerías a través de dos pasos de PCR constituye una novedad en el estudio de la dieta de pinnípedos, permitiendo un mayor número de combinaciones de los índices y, por ende, el manejo de un mayor número de muestras (Illumina, 2011; Herbold *et al.*, 2015). Esta técnica incrementa la temperatura de alineación y especificidad de los oligos, aminorando los problemas asociados a los oligos extensos, por ejemplo, la formación de horquillas, dímeros y quimeras durante la amplificación (Illumina, 2014).

Los productos de PCR fueron normalizados utilizando el kit SequalPrep™ (96) (Invitrogen™) el cual se distingue de otros métodos de normalización (cuantificación directa y QIAxcel de QIAGEN) por promover la generación de un mayor número de lecturas por amplicón (Harris *et al.*, 2010). A pesar de que la concentración promedio de cada muestra fue menor (0.55 ± 0.14 ng/ μ l) a la concentración final que se establece en el protocolo de este kit (1-2 ng/ μ l), la capacidad de la celda de flujo se mantuvo, por poco, bajo los límites de saturación.

Durante la formación de la solución de trabajo se generó una metamuestra a partir de 48 muestras, a cada una de éstas le correspondieron aproximadamente 20,833 lecturas de acuerdo a la capacidad de la celda de flujo utilizada. El número de lecturas por muestra se encuentra dentro de los estándares recomendados para la identificación de comunidades bacterianas en muestras ambientales (15,000-100,000 lecturas) (Illumina, 2014). La riqueza de OTU's obtenida en el presente estudio es mucho menor a la derivada de comunidades bacterianas, por lo que se puede asumir que la profundidad de secuenciación fue suficiente para cubrir la riqueza de identidades taxonómicas presentes en las muestras fecales de la foca de puerto.

Se obtuvieron proporciones semejantes de las secuencias sentido ($X^2=90$, $p=0.48$) y antisentido ($X^2=96$, $p=0.42$) correspondientes a cada marcador, por lo que el haber agregado en mayor concentración la metamuestra del amplicón de eucariotas no parece haber afectado la representatividad de los otros loci.

Durante los ciclos 150-175 la calidad de las secuencias generadas decayó (<25%). Lo anterior se asocia a una falla o a un aumento de la velocidad de elongación de las secuencias, esto conlleva a una interferencia y reducción de la señal de los “clusters” conforme incrementa la longitud de la secuencia. Esta reducción en la señal aumenta la razón de error en la asignación de nucleótidos y, por ende, promueve la asignación de valores bajos de calidad en el extremo 3’ de las lecturas generadas (Dohm *et al.*, 2008; Schirmer *et al.*, 2015). La velocidad de elongación pudo ser disímil entre los templados debido a la presencia de fragmentos de menor longitud (inespecificidades) dentro de las librerías generadas para cada locus. Los fragmentos cortos requieren menos tiempo de elongación por lo que son amplificados con mayor eficiencia que los fragmentos más largos (Head *et al.*, 2014). El efecto de los fragmentos cortos dentro de la secuenciación puede apreciarse para las muestras de las islas Todos Santos Sur y San Roque. Las muestras de TS y SR se encontraban mayormente degradadas, por lo que contienen un mayor número de copias de fragmentos de menor tamaño. Lo anterior se traduce en la obtención de un mayor número de lecturas para estos sitios en contraste con las islas San Jerónimo y Natividad.

El 50.7% de las secuencias obtenidas mostraron valores bajos de calidad ($Q<25\%$) en el extremo 3’ (30 nucleótidos). Estos resultados son descartados por el algoritmo empleado para alinear las secuencias sentido y antisentido; sólo el 13.55% de las lecturas logró pasar este filtro. Los resultados del presente estudio se obtuvieron a través del análisis de las secuencias sentido y antisentido de manera independiente y fueron comparados con los obtenidos a través de las secuencias pareadas a manera de control. El 100% de las presas identificadas mediante este control corresponden a las presas identificadas en las lecturas sentido y antisentido. La proporción de presas sin identificar por el control se explica por la cantidad de información perdida durante la alineación de las lecturas sentido y antisentido.

4.3 Asignación taxonómica por amplicón

La mayor proporción de la dieta fue identificada a partir de las secuencias correspondientes al amplicón de cordados (65.30%). La eficiencia en la identificación de presas se debe a que este amplicón es de menor tamaño (~155 pb, Deagle *et al.*, 2009) con respecto a los otros loci. Asimismo, la dieta de la foca de puerto es principalmente piscívora, esta información ha sido observada en distintos sitios a lo largo de su distribución en el Pacífico Norte (Scheffer y Sperry, 1931; Wilke, 1954; Pitcher, 1980; Brown y Mate, 1982; Torok, 1994; Browne *et al.*, 2002; Herreman *et al.*, 2009; Elorriaga *et al.*, 2013; Alamán de Regules, 2014; Durazo-Rodríguez, 2015), por lo que es congruente encontrar más presas por medio de este marcador.

Por medio del amplicón de cefalópodos fue posible identificar 26 presas, de las cuales sólo 3 corresponden a este grupo (*Octopus rubescens*, *Octopus californicus* y *Doryteuthis opalescens*). Selograron identificar 22 especies de peces en común entre las regiones 16S ADNmt específicas para cefalópodos y cordados. Algunas muestras mostraron productos de amplificación para el amplicón de cefalópodos, sin embargo, dentro de las secuencias no se logró identificar a miembros de este grupo. Al ser un oligo inespecífico los productos de amplificación obtenidos para estas muestras reflejaron el consumo de especies ícticas (como el lagarto lucio) y no solo a miembros de la clase Cephalopoda.

El amplicón de la subunidad 18S de ARN ribosomal fue diseñado para identificar cualquier organismo eucariota con énfasis en linajes de microorganismos (Gilbert *et al.*, 2014). La información que brinda este amplicón sobre diversos taxa es extensa en comparación con los otros loci, sin embargo su eficiencia varía entre grupos taxonómicos (Meyer *et al.*, 2010). Se observó que esta región identifica invertebrados marinos a nivel de género y especie con distribución dentro del área de estudio. Sin embargo, en el caso de las presas ícticas los géneros identificados corresponden a presas sin distribución en México, pero pertenecientes a las mismas familias identificadas por medio del amplicón de cordados. Estos resultados han sido observados en otros estudios donde se utiliza la subunidad pequeña de ARNr, identificando grupos a nivel orden o familia (Hillis y Dixon, 1991; Meyer *et al.*, 2010). Dentro de las bases de datos existen menos secuencias relativas a la subunidad 18S ARNr para metazoarios en contraste con la información existente para otros loci. Esto puede afectar la asignación de la identidad taxonómica de grandes grupos dentro de clados más específicos.

Otro factor importante que pudo haber influenciado las identificaciones asignadas por el amplicón 18S ARNr es el tamaño del fragmento alineado durante el BLAST. Varios estudios reportan que la cobertura de este amplicón es de 381-650 pb (Hadziavdic *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014), por lo que el tamaño de fragmento utilizado en el presente estudio (120 pb) puede no ser suficiente para resolver la identidad taxonómica de ciertos grupos. Este problema no se observó para los amplicones de cordados y cefalópodos, ya que el locus 16S mitocondrial tiene una cobertura mínima de 100 pb para una correcta identificación (Boyer *et al.*, 2012).

4.4 Presencia-Ausencia de presas

El estudio de la dieta a través de herramientas de secuenciación masiva se encuentra limitado por elementos que afectan la proporción de las presas dentro de las secuencias (Deagle *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2015). Este problema hace imprecisa la asignación de valores de abundancia para las especies identificadas con base en el número de lecturas obtenidas tras la secuenciación. Se han llevado a cabo distintos ensayos con el fin de determinar las proporciones de las presas en las secuencias junto a factores de corrección que permitan asignar estos valores de abundancia (Thomas *et al.*, 2015). Los factores de corrección generados a la fecha se enfocan en especies comerciales (Deagle *et al.*, 2013; Thomas *et al.*, 2014; Thomas *et al.*, 2015) y su aplicación en muestras silvestres debe tomarse con reserva.

La eficiencia del método de extracción es distinta entre grupos taxonómicos habiendo preferencia de algunos grupos sobre otros (Mtambo *et al.*, 2006; Simister *et al.*, 2011). Algunos compuestos presentes en los invertebrados marinos (mucopolisacáridos, proteínas polifenólicas y pigmentos) pueden inhibir la extracción de ADN de los miembros de este grupo (Winnepenninckx *et al.*, 1993). El método de extracción por sales se utiliza frecuentemente para aislar ADN de plantas ya que ayuda a eliminar paredes de polisacáridos y componentes polifenólicos (ej. pigmentos) (Kumar *et al.*, 2007). Dentro de las muestras extraídas por el método de sales (TS y SR) se encontraron más especies de invertebrados, en comparación con las muestras extraídas por medio de QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) (SJ y N). Aunado a lo anterior, la proporción de lípidos en las presas afecta su digestibilidad y, por tanto, la proporción de ADN que se puede extraer de las mismas (Thomas, 2015). La efectividad de un método sobre otro puede deberse a la forma en que cada uno elimina los compuestos inhibidores de la extracción.

La amplificación de los productos de extracción puede ser preferencial para algunos grupos taxonómicos dentro de muestras ambientales. De igual forma, las proporciones de las secuencias de las presas varían en función de la proporción de tejido consumido. Si una presa es consumida en proporciones altas, las secuencias obtenidas para esta presa son menores y viceversa (Thomas *et al.*, 2015). Esto sucede debido a que la abundancia de un templado aumenta la probabilidad de que este se una a otro (reverso complementario) generando una auto-hibridación (“self-annealing”) (Zourob, 2010; Thomas *et al.*, 2015). Por lo anterior, es posible que al estudiar la dieta a través de herramientas de secuenciación masiva se esté subestimando la representatividad de las presas que son consumidas en mayor proporción.

Las quimeras, artefactos producidos durante la amplificación del ADN, pueden generar falsos positivos en la detección de unidades taxonómicas operacionales (OTU) (Haas *et al.*, 2011). Este problema puede llevar a la sobreestimación de la riqueza identificada. La temperatura de alineación durante el PCR (Illumina, 2014), así como la proporción de similitud durante el BLAST pueden reducir el efecto de estos artefactos (Deagle *et al.*, 2013). Thomas y colaboradores (2015) utilizan el algoritmo USEARCH (Edgar, 2010) para la detección y eliminación de artefactos como quimeras y un porcentaje de identidad del 90% durante el BLAST. En el presente estudio no se llevó a cabo un proceso *in silico* para eliminar quimeras, sin embargo, el porcentaje de identidad mínimo utilizado durante el BLAST fue del 98%. Lo anterior con el fin de disminuir el sesgo que estos artefactos pueden producir sobre la identificación de OTUs.

El uso de amplicones para identificar la dieta conlleva a sesgos intrínsecos a la región genómica de interés, la selección o diseño del oligo y las combinaciones de amplicones o de oligos sentido y antisentido necesarias para llevar a cabo la reacción de PCR. Se ha observado que existen diferencias entre las lecturas (sentido y antisentido) obtenidas para distintas presas (Deagle *et al.*, 2013). Al analizar las secuencias sin alinear del presente estudio, para los amplicones de cordados y cefalópodos se observó que una mayor proporción de secuencias sentido cumplieron con los controles de calidad. Por el contrario, para el amplicón de eucariotas una mayor proporción de secuencias antisentido cumplió con dichos controles. Lo anterior se observó para cada muestra de cada sitio. También se observó que las secuencias antisentido brindaban más información acerca de las identidades taxonómicas del marcador de cefalópodos, mientras que se presentó el caso contrario para el marcador de cordados. Esta diferencia en la riqueza identificada por cada oligo se debe a la posición en que fueron diseñados dentro de la región genómica de interés (Deagle *et al.*, 2009). Los oligos diseñados dentro de la región variable pueden estar ofreciendo mayor resolución taxonómica que aquellos que se encuentran dentro de la región conservada.

Finalmente, el espectro alimentario identificado a través de herramientas bioinformáticas depende de la información taxonómica contenida en la base de datos local utilizada. Thomas y colaboradores (2015), al igual que en el presente estudio, utilizaron el equipo MiSeq® (Illumina) y herramientas bioinformáticas para identificar las presas consumidas por *P. v. richardii*. Para conocer el impacto que tiene la foca sobre las poblaciones de salmón y otras especies comerciales, los autores utilizaron muestras fecales colectadas en sitios de descanso en la Columbia Británica, Canadá, y las compararon con muestras fecales obtenidas de focas en cautiverio (con dieta conocida). Thomas y colaboradores (2015) lograron identificar 13 presas (n=10, muestras fecales) correspondientes a peces óseos y un calamar. La riqueza de presas identificadas a partir de muestras ambientales fue limitada durante el BLAST a una base de datos local que contenía las secuencias de 18 presas de interés. Este sesgo en la dieta consumida por organismos silvestres no se observa en el presente estudio (49 presas, n=16), ya que el objetivo fue identificar la totalidad de identidades taxonómicas consumidas y no sólo aquellas que tienen un valor comercial.

Con el fin de eludir estos sesgos en la abundancia de las presas, en el presente estudio se analizó la dieta por medio de matrices de presencia-ausencia contemplando únicamente la riqueza de presas identificada para cada sitio. En los Anexos 15-18 se encuentra la proporción de secuencias que obtenida para cada presa.

4.5 Hábitos alimentarios de la foca de puerto

4.5.1 Análisis de restos sólidos y secuenciación masiva

En la Isla Todos Santos Sur las presas de mayor ocurrencia dentro de las muestras fueron *Chilara taylori* (congriperla moteada), *Citharichthys xanthostigma* (lenguado alón) y *Synodus lucioiceps* (lagarto lucio). La importancia de *S. lucioiceps* y el género *Citharichthys* (*C. sordidus*) corresponde con las observaciones realizadas por Durazo-Rodríguez (2015) sobre las mismas muestras. Alamán-de-Regules (2014) encontró que para el mes de mayo (muda 2013), las especies *S. lucioiceps* y *C. taylori* son consideradas de importancia dentro de la dieta de la foca de puerto en TS. La especie *Citharichthys*

sordidus (lenguado arenoso del Pacífico), identificada a través de restos sólidos, fue reconocida como *Citharichthys xanthostigma* dentro del análisis metagenómico. La diferencia en la resolución taxonómica de cada método depende de la cantidad de información disponible en catálogos o bases para cada ítem presa. Los otolitos presentan una variación intraespecífica y una variación entre miembros de la misma familia (Nolf, 1993) por lo que es común asignar de forma equívoca el epíteto específico de un ítem presa, sobre todo al tratarse de estructuras cálcicas que ya sufrieron un proceso de digestión. Tal es el caso de las especies *L. armatus* (restos sólidos) y *M. pacificus* (metagenómica), las cuales pertenecen a distintas familias, sin embargo, sus otolitos son semejantes.

Alamán-de-Regules (2014) y Durazo-Rodríguez (2015) coinciden en que los miembros del género *Sebastes* (rocotes) fueron las presas de mayor importancia dentro de la dieta de la foca de puerto en TS (temporada de muda). Los rocotes no fueron detectados en los restos sólidos o en el ADN de las 4 muestras de heces analizadas en este sitio. Asimismo, la frecuencia de ocurrencia de los rocotes en SJ y SR fue baja considerando ambos métodos (n=4). Las diferencias observadas entre el presente estudio y trabajos previos, en términos de la importancia de los rocotes en la dieta, puede deberse al esfuerzo de muestreo aplicado en el análisis molecular. Por lo anterior se recomienda aumentar el tamaño de muestra en análisis metagenómicos con el fin de detectar una mayor riqueza de presas.

Las especies *Atractoscion nobilis* (corvina blanca), *Citharichthys stigmaeus* (lenguado pecoso), *Citharichthys xanthostigma* (lenguado alón), *Porichthys notatus* (sapo cabezón) y *Synodus lucioceps* (lagarto lucio) fueron las presas de mayor incidencia en Isla San Jerónimo. La importancia de *S. lucioceps* corresponde con las observaciones realizadas por Durazo-Rodríguez (2015) sobre las mismas muestras. De igual forma, la autora destaca la importancia de los cefalópodos (*Doryteuthis opalescens* y *Octopus* spp.) y el género *Sebastes* dentro de la dieta de la foca de puerto para este sitio (n=72). Considerando únicamente los invertebrados presentes en la dieta, identificados por ambos métodos, las presas más recurrentes son el pulpo y el calamar. La detección de estas presas varía entre métodos, para el caso de Isla San Jerónimo el análisis molecular demostró ser más eficiente en la detección de cefalópodos. Esta diferencia puede asociarse a que los picos de calamar pueden permanecer en el tracto digestivo hasta 7 días posteriores a la ingesta (Tollit *et al.*, 1997). De igual forma, se ha observado que la foca de puerto regurgita la mayor parte de estas estructuras, por lo que no pasan a través del tracto intestinal (Pitcher, 1980).

En Isla Natividad las presas de mayor incidencia dentro de las muestras fueron *Atractoscion nobilis* (corvina blanca), *Citharichthys xanthostigma* (lenguado alón), y *Synodus lucioceps* (lagarto lucío). La importancia de *S. lucioceps* y el género *Citharichthys* corresponde con las observaciones realizadas por Durazo-Rodríguez (2015) sobre las mismas muestras. La autora identificó a *Citharichthys sordidus* como la presa de mayor importancia (IIMP=45.83%) dentro de la dieta para este sitio. El análisis metagenómico demostró que hay muestras que comparten el consumo de las presas *C. sordidus* y *C. xanthostigma*, ocurriendo en mayor frecuencia el lenguado alón. La muestra N24 contenía 111 otolitos de *C. sordidus* (Durazo-Rodríguez, 2015); al analizar las secuencias de esta muestra únicamente se registró la presencia de *C. xanthostigma*. Esta última especie de lenguado no fue identificada a lo largo del estudio de Durazo-Rodríguez (2015). Por lo anterior, el análisis de restos sólidos puede sobrestimar la importancia de una presa debido a posibles errores en la identificación. A su vez, si ambos métodos difieren en la asignación taxonómica de algunas especies se podría estar subestimando el número de presas que ambos métodos comparten.

Las especies *Chilara taylori* (congriperla moteada) *Citharichthys sordidus* (lenguado arenoso del Pacífico), *Citharichthys xanthostigma* (lenguado alón), *Hippoglossina stomata* (lenguado bocón), *Pleuroncodes planipes* (langostilla roja), *Raja inornata* (raya de California), *Sardinops sagax* (sardina Monterrey) y *Synodus lucioceps* (lagarto lucío) ocurrieron dentro de las cuatro muestras analizadas para la Isla San Roque (FO=100%, n=4). La importancia de *C. sordidus*, *S. lucioceps* y *C. taylori* corresponde con las observaciones realizadas por Durazo-Rodríguez (2015) sobre las mismas muestras. El género *Octopus* es considerado la especie de invertebrado más recurrente dentro de las muestras al examinar restos sólidos. Por otra parte, este género tiene menor incidencia en las muestras que *Hemisquilla californiensis* al analizar las muestras por medio de análisis metagenómicos. La importancia de un grupo sobre otro no puede estimarse bajo los métodos implementados en este trabajo para la identificación de la dieta.

La frecuencia de ocurrencia e importancia de las especies presa dentro de la dieta no es constante en términos temporales (Durazo-Rodríguez, 2015). La dieta caracterizada a partir del presente estudio no refleja el espectro trófico anual de la foca de puerto. Por lo anterior, se recomienda ampliar la escala temporal del estudio de los hábitos alimentarios de este pinnípedo en México a través de métodos escatológicos no invasivos (restos sólidos y análisis moleculares).

4.5.2 Presas de la foca de puerto (*P. vitulina richardii*) en México

La foca de puerto es considerada un depredador de hábitos demersales y neríticos (Antonelis y Fiscus, 1980). En la Isla Natividad, Baja California Sur, México, se ha reportado que los hábitos alimentarios de esta especie son bentónico-demersales (Elorriaga-Verplancken *et al.*, 2013). De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, la foca de puerto en México se alimenta principalmente de especies demersales (71% de su dieta), las cuales corresponden en mayor proporción a peces teleósteos (75.25%).

La talla promedio de las presas fue de 36.4 ± 2.14 cm, estos datos fueron obtenidos a través de la información en línea existente sobre las presas (Froese y Pauly, 2016; Palomares y Pauly, 2016; Wilson, 2016; Wood, 2016). La talla preferencial de las presas consumidas por la foca de puerto se ha estimado en 15-18 cm (Brown, 1981; Harvey, 1988). Esta última aproximación es obtenida a través de la relación lineal existente entre la longitud del otolito y la talla del pez. Se requiere de un análisis más profundo sobre esta relación de longitud para poder determinar la talla de las presas que consume la foca de puerto en México.

La mayor parte de las presas de la foca de puerto tienen un nivel trófico alto (3.61 ± 0.09) (Froese y Pauly, 2016; Palomares y Pauly, 2016). Estos resultados son similares a los obtenidos por Elorriaga y colaboradores (2013) en Isla Natividad (3.5-4.5). Los autores identifican a la foca de puerto como un consumidor secundario-terciario (nivel trófico = 4.9). La foca de puerto se encuentra en la parte superior de la cadena trófica (Mearns *et al.*, 1981; Pablo, 2009; Elorriaga-Verplancken *et al.*, 2013), esto la convierte en una especie clave en la dinámica del sistema en términos del control que ejerce sobre las poblaciones de sus presas.

De acuerdo al índice de Jaccard, los sitios que guardan una mayor similitud en términos de la dieta son las islas Natividad y San Roque. Ambas islas se sitúan al sur de la distribución de la foca de puerto, siendo las más cercanas dentro de este estudio. Ambos sitios son particulares debido a la confluencia de las corrientes de California y Norecuatorial (De la Cruz-Agüero, 2000), lo cual se traduce en un ambiente dinámico que ofrece una diversidad de hábitats para especies marinas (De la Cruz-Agüero *et al.*, 1994). Lo anterior se relaciona a los resultados obtenidos sobre la presencia de especies características de aguas templadas-frías (ej. *Genyonemus lineatus*) y tropicales (ej. *Pleuroncodes planipes*) (Danemann y De La Cruz-Agüero, 1993).

En el presente estudio, el 28.57% (14 spp.) de la dieta de la foca de puerto en México correspondió a presas que por la naturaleza de sus tejidos sólo pueden ser detectadas o identificadas a través de análisis moleculares. El consumo de cnidarios por la foca de puerto ha sido reportado en estudios de contenido estomacal (Scheffer y Sperry, 1931; Fraser, 1939); este tipo de estudios permite identificar una mayor riqueza de presas, en contraste con el análisis de restos sólidos, ya que es posible recuperar especies de cuerpo blando para su identificación. La medusa *Chrysaora fuscescens* (ortiga del Pacífico) se identificó como parte de la dieta de la foca de puerto en las islas TS y SJ. Esta especie ha mostrado un incremento en su biomasa los últimos años, afectando la abundancia de algunas especies presa de pinnípedos tales como *Clupea pallasii* (arenque del Pacífico), *Engraulis mordax* (anchoveta norteña) y *Sardinops sagax* (sardina Monterrey) (Brodeur *et al.*, 2014). Los autores encontraron que la presencia de esta medusa en California se asocia a una migración lejos de la costa de las especies de peces sobre los que depreda. El consumo de esta presa no había sido reportado antes para la foca de puerto, sin embargo, el consumo de otra especie de la misma familia (*Pelagia colorata*, Pelagiidae) ha sido observado en Bahía Monterrey, California (Langstroth *et al.*, 2000). La ingesta de *C. fuscescens* puede interpretarse como oportunista, ya que coincide con la temporada de mayor incidencia de esta especie en el medio (junio) (Brodeur *et al.*, 2014).

La especie *Soestia zonaria* (salpa) esta presente durante todo el año a lo largo de la península de Baja California (Hereu *et al.*, 2006). Esta especie fue identificada como presa de la foca de puerto en Isla Todos Santos Sur. Al ser una especie común en aguas tropicales, su presencia dentro de la dieta coincide con el aumento de la temperatura superficial en junio de 2014 (International Research Institute, 2016). La ausencia de esta especie en los sitios más sureños puede deberse a que no fue consumida.

La importancia de los cefalópodos dentro de la dieta de la *P. v. richardii* ha sido discutida en distintos trabajos (Scheffer y Sperry, 1931; Torok, 1994; Elorriaga-Verplancken *et al.*, 2013; Alamán-de-Regules, 2014; Durazo-Rodríguez, 2015). En México los estudios realizados a partir de restos sólidos consideran al calamar de California (*Doryteuthis opalescens*) una de las principales presas de la foca de puerto durante la muda (Alamán-de-Regules, 2014; Durazo-Rodríguez, 2015). Los autores atribuyen su importancia debido a su abundancia durante la temporada reproductiva (hasta 100,000 toneladas) (Harley *et al.*, 2001), alcanzando su máximo de mayo a junio (Spratt, 1979). Su importancia sobre los miembros del género *Octopus* puede estar sobrestimándose debido al sesgo en la recuperación de sus restos, ya que los picos de *D. opalescens* son más pequeños y quizá se retengan menos tiempo en el estómago del depredador. A través de herramientas metagenómicas es posible detectar, además de los cefalópodos,

otras especies de invertebrados que ocurren con mayor frecuencia. Por lo anterior, se deben realizar más estudios con ambos métodos que permitan evaluar la contribución de cada grupo a la dieta de este pinnípedo.

Las presas *Eptatretus stoutii* (mixínido del Pacífico) y *Raja inornata* (raja de California) se caracterizan por tener un esqueleto cartilaginoso (Solomón *et al.*, 2013), lo que dificulta su detección a través del análisis de restos sólidos en heces. La foca de puerto es considerada el principal depredador de *E. stoutii* en California (Oxman, 1995; Ferholm, 1998); sin embargo, esta presa se observó con poca incidencia dentro de las muestras analizadas en el presente estudio. La importancia de esta presa dentro de la dieta de la foca de puerto debe ser evaluada a mayor profundidad, ya que se trata de un recurso pesquero abundante en las costas de Baja California (Flores-Olivares *et al.*, 2009).

El género *Raja* ha sido reportado dentro de la dieta de *P. v. richardii* en las costas de Washington, E.U.A. (Luxa y Acevedo-Gutiérrez, 2013). A diferencia del mixínido del Pacífico, la especie *R. inornata* se registró en el 75% de las muestras analizadas. A pesar de que su abundancia en la dieta se desconoce, su incidencia en los sitios de estudio la clasifica como alimento de consumo preferencial.

Scheffer y Sperry (1931) identificaron restos de la almeja *Yoldia myalis* al analizar el contenido estomacal de 100 focas de puerto. Dentro del presente estudio se registró una especie de bivalvo, sin embargo, sólo fue posible identificarlo a nivel familia (Fam. Veneridae); debido a su baja incidencia puede tratarse de una presa de consumo incidental. No existe mucha información acerca del consumo de bivalvos en la foca de puerto (Antonelis y Fiscus, 1980), esto puede deberse a que los restos recuperados en heces son escasamente identificables.

La presencia de crustáceos dentro de la dieta ha sido observada en California y Washington, representando en la mayor parte de los casos la menor proporción dentro de la dieta (Scheffer y Sperry, 1931; Antonelis y Fiscus, 1980; Gible, 2011; Lance *et al.*, 2012). Scheffer y Sperry (1931) identificaron las especies de camarón *Crangon franciscorum* y *Penaeus stylirostris* como las más prominentes dentro de 14 estómagos. De igual forma, los autores identificaron a miembros del Infraorden Brachyura como especies de consumo secundario debido a su baja abundancia en contraste con otros ítems presa. Dentro del presente estudio fue posible identificar 6 presas pertenecientes a este grupo: Infraorden Brachyura (cangrejo), *Hemisquilla californiensis* (camarón mantis), *Crangon* spp. (camarón), *Penaeus vannamei* (camarón blanco), *Pleuroncodes planipes* (langostilla roja) y *Sicyonia laevigata* (camarón roca). La alta frecuencia de ocurrencia de *H. californiensis* y *P. planipes* las destaca sobre las otras especies de

crustáceos. La presencia de estas especies puede estar relacionada al aumento en la temperatura superficial del mar (International Research Intitute, 2016) durante la temporada de muda 2014, así como a la influencia de la Corriente Ecuatorial del Norte presente en la zona.

Nuestro estudio confirma la presencia de la langostilla roja dentro de la dieta de la foca de puerto. Durazo-Rodríguez (2015) menciona haber observado un enjambre de esta especie en la Isla San Jerónimo durante la colecta, sin embargo, por medio del análisis molecular la langostilla no fue identificada en este sitio. *H. californiensis* tuvo mayor incidencia en isla San Roque, donde se observó que su importancia dentro de la dieta es mayor a la de los miembros de la clase cefalópoda. Este estomatópodo es común en aguas templadas y subtropicales de California y México, congregándose durante la primavera para reproducirse (Basch y Engle, 1993); esta congregación coincide con la temporada de muda de la foca de puerto (colecta de heces). Por lo anterior, su presencia en la dieta puede deberse a un aumento en su disponibilidad. A pesar de que esta especie se congrega dentro de madrigueras y su abundancia es imperceptible (Basch y Engle, 1993), la foca de puerto cuenta con vibrisas muy inervadas que le permiten detectar presas correspondientes a la infauna (Dehnhardt *et al.*, 2001; Adam y Berta, 2002).

Algunas de las limitantes de estudiar la dieta en pinnípedos a través de restos sólidos se asocian al consumo de presas con estructuras duras susceptibles a la digestión (Harvey, 1988; Bowen y Iverson, 2013), o bien, a la ingesta de la porción muscular de la presa sin consumir la cabeza (Gallo-Reynoso, 1989; Elbroch, 2006). En el primer caso, las presas con otolitos frágiles (ej. *Engraulis mordax* y *Sardinops sagax*) son subestimadas dentro de la dieta por el sesgo presente en su detección (Harvey, 1988). Lo anterior promueve que estas presas sean detectadas de manera preferencial por métodos moleculares. En el presente estudio fue posible identificar tanto a la anchoveta norteña como a la sardina Monterrey. Ambas especies han sido reportadas dentro de la dieta de la foca de puerto (Elorriaga-Verplancken *et al.*, 2013; Gible y Harvey, 2015). Se destaca *E. mordax* como la segunda presa preferencial de la foca de puerto en la Bahía de San Francisco, California (Gible y Harvey, 2015). Ambas especies sostienen grandes pesquerías (Whitehead, 1985) sujetas a sus fluctuaciones de abundancia, las cuales varían en varios órdenes de magnitud. La predominancia de una especie sobre la otra se encuentra en función de los regímenes fríos (*E. mordax*) y cálidos (*S. sagax*) (Lecomte *et al.*, 2004). La mayor incidencia de *S. sagax* dentro de las muestras analizadas al sur de la distribución de la foca de puerto corresponde con la predominancia de esta especie en aguas subtropicales (Lecomte *et al.*, 2004).

En el segundo caso, las presas de mayor talla (ej. *Atractoscion nobilis* y *Paralichthys californicus*) son desgarradas y consumidas en superficie (Trumble, 1995), de tal forma que sus estructuras duras (otolitos y vértebras) no se encuentran representadas en las heces. En este estudio, en cambio se identificaron la corvina blanca y el lenguado de California por medio de análisis moleculares. Al ser presas de gran talla (hasta 1 m) (Froese y Pauly, 2016), la ausencia de estas presas dentro del análisis de restos sólidos podría relacionarse al consumo parcial de sus tejidos en superficie. Arias del Razo (2016) estudió la interacción de la foca de puerto con las pesquerías locales. El autor reporta que para la Isla San Jerónimo la foca de puerto compite con las pesquerías por la corvina blanca. La pesquería de *A. nobilis* decayó en los 60's (Vojkovich y Crooke, 2001); sin embargo, Allen y colaboradores (2007) afirman que este recurso se encuentra en recuperación debido a su crecimiento poblacional.

4.5.3 Amplitud trófica de la foca de puerto

Alamán-de-Regules (2014) y Durazo-Rodríguez (2015) han encontrado que hay diferencias espaciales en cuanto a las presas de consumo preferencial de la foca de puerto en México. Arafeh-Dalmau (2014) encontró que existen diferencias latitudinales significativas en la macrofauna bentónica de sitios protegidos del oleaje correspondientes a las islas Todos Santos, San Martín y San Jerónimo. Este gradiente latitudinal en términos de la comunidad de especies bentónicas puede estar marcando la diferencia en consumo de invertebrados entre los sitios analizados. Como ya se mencionó, el consumo de invertebrados en las islas Todos Santos Sur y San Roque es mayor que en las islas San Jerónimo y Natividad. En el presente estudio se observó que los lenguados son un grupo recurrente dentro de la dieta de la foca de puerto. A pesar de que en las cuatro islas se consumen en mayor frecuencia las mismas especies de lenguado (*Citharichthys* spp., Fam. Paralichthyidae), en Isla San Jerónimo se aprovechan otros lenguados (ej. *Pleuronichthys verticalis* y *Peprilus simillimus*) que no son observados en los otros sitios.

De igual forma se han observado diferencias estacionales y anuales en las presas de importancia consumidas por la foca de puerto. Browne y colaboradores (2002) atribuyen esta variación al incremento en la abundancia de ciertas presas en respuesta a su ciclo reproductivo, entre otros factores. Es importante considerar que el incremento efímero de la abundancia de una presa no necesariamente se refleja en el alto consumo de ésta por la foca de puerto (Thomas *et al.*, 2011).

De acuerdo a nuestros resultados, la foca de puerto en México se alimenta de una amplia variedad de organismos. La amplitud de la dieta registrada se asocia a la eficiencia de cada individuo en la búsqueda del alimento. Bukhtiyarov y colaboradores (1984) reportaron que las focas de mayor edad se alimentan principalmente de presas bentónicas a mayor profundidad en contraste con los juveniles. Este hecho explica la variación de la dieta entre individuos y se sustenta en las limitaciones al buceo de los individuos más jóvenes (Jørgensen *et al.*, 2001). La riqueza en la dieta observada también puede deberse a la gran flexibilidad que presenta *P. v. richardii* en su dieta. Se ha documentado que la foca de puerto aumenta la ingesta de presas con bajo valor nutricional como respuesta a condiciones desfavorables del alimento (Trumble *et al.*, 2003).

4.6 Alimento de las presas y parásitos

A través del amplicón de eucariotas se obtuvo información acerca de la trama trófica presente en las heces de la foca de puerto. Se registraron ofiuras, pequeños crustáceos, diatomeas, dinoflagelados (*Pseudo-nitzschia australis* y *Protoperidinium*), poliquetos, nemertinos, criptofitas, *Sargassum* sp., ostrácodos, octocorales, euglenas, *Euphausia pacifica*, anémonas, copépodos y rodofitas. Estas especies fueron consideradas como parte del alimento de las presas de la foca de puerto.

La especie *Pseudo-nitzschia australis* produce una fuerte neurotoxina llamada ácido domoico. Esta toxina se acumula en organismos que se alimentan de la materia suspendida en el agua tales como eufáusidos, bivalvos, sardinas y anchovetas (García-Mendoza *et al.*, 2009). Ya que es bioacumulable, esta toxina puede ser transferida a niveles tróficos altos causando mortandades masivas de aves y mamíferos marinos (Scholin *et al.*, 2000; Trainer *et al.*, 2000). Esta especie de dinoflagelado fue detectada en Isla San Jerónimo a través del análisis metagenómico, desconociéndose el impacto que su presencia pudo tener.

De igual forma, a través del amplicón de eucariotas se identificaron nemátodos, céstodos, tremátodos, acantocéfalos (*Corynosoma strumosum*) que son parásitos de la foca de puerto. Asimismo, los organismos *Anilocra* sp., *Kudoa carcharhini* y *Hysterothylacium aduncum* fueron identificados como parásitos de las presas de la foca de puerto. La presencia de *Corynosoma strumosum* ha sido reportada para las tres subespecies de *Phoca vitulina* en el mundo (Felix, 2013).

Debido a la presencia de parásitos y de *Pseudo-nitzschia australis*, se recomienda realizar estudios relativos a la salud del ecosistema utilizando especies indicadoras como la foca de puerto (Trillmich *et al.*, 1991; Trites, 1997).

5. Conclusiones

-  Fue posible identificar las presas que componen la dieta de la foca de puerto implementando herramientas de secuenciación masiva y bioinformática, durante la temporada de muda del año 2014 en México, por lo que es un método útil en el análisis de muestras ambientales.
-  Los genes analizados (16S ADNmt y 18S ARNr) para amplificar el ADN de las presas ampliaron el espectro trófico hasta ahora conocido para la foca de puerto en México.
-  A través de la región 16S ADN mitocondrial fue posible identificar un mayor número de presas de la foca de puerto, éstas correspondieron principalmente a peces óseos, cefalópodos, crustáceos, mixinos y elasmobranquios.
-  Se identificó una mayor riqueza de presas a través del análisis metagenómico, en contraste con los resultados obtenidos en estudios previos donde se analizó la dieta a partir de restos sólidos de presas en heces.
-  Se confirmó la presencia de las presas identificadas a partir del análisis de estructuras duras dentro de las 16 muestras analizadas por métodos moleculares.
-  Cerca de la mitad de las especies presa identificadas por análisis metagenómico son compartidas con los resultados de estudios previos donde la dieta fue identificada por medio del análisis de estructuras duras con un tamaño de muestra 10 veces mayor.
-  La dieta de la foca de puerto en México difiere entre las áreas de estudio en términos de la frecuencia con que cada ítem presa es consumido en comparación con el resto de la dieta.
-  Las islas Todos Santos Sur y San Roque se distinguen de los otros sitios de estudio debido a la mayor incidencia de invertebrados que componen la dieta.
-  En general, las especies identificadas a través del análisis metagenómico corresponden en mayor proporción a peces óseos, seguido de cefalópodos y crustáceos.
-  Por medio de la metagenómica, se lograron identificar especies presa de cuerpo blando o susceptible a la digestión, las cuales no son posibles de identificar a través del análisis de

estructuras duras, por lo que el presente estudio complementa los esfuerzos previos realizados sobre la dieta de este pinnípedo en México.



Las especies *Citharichthys xanthostigma* y *Synodus lucioceps* fueron las especies de mayor importancia dentro de la dieta de la foca de puerto en México, ya que fueron las únicas presas cuya presencia se registró en las 16 muestras analizadas.



El sitio de estudio con mayor riqueza de presas corresponde a Isla San Roque, donde la incidencia de invertebrados representa aproximadamente una cuarta parte de la dieta identificada para este sitio.



Isla Natividad e Isla San Roque fueron los sitios con mayor similitud en términos de los recursos que son aprovechados por la foca de puerto.



Es necesario ampliar el tamaño de muestra utilizado para analizar la dieta de *P. v. richardii* en México por medio de herramientas de secuenciación masiva, ya que las curvas de acumulación de especies no alcanzaron la asíntota en ninguno de los sitios de estudio.

Literatura citada

- Abadía-Cardoso, A. 2006. Variabilidad genética del elefante marino del norte, *Mirounga angustirostris* en Isla Guadalupe, Islas San Benito e Isla de Cedros, México. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 60 pp.
- Adam, P. J., Berta, A. 2002. Evolution of prey capture strategies and diet in the Pinnipedimorpha (Mammalia, Carnivora). *Oryctos*, 4, 83-107.
- Alamán-de-Regules, R. 2014. Hábitos alimentarios de la foca de puerto, *Phoca vitulina richardsi*, en la Bahía Todos Santos, Baja California, México. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma de Baja California. 79 pp.
- Aljanabi, S. M., Martinez, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25(22), 4692-4693.
- Allen, L. G., Pondella, D. J., Shane, M. A. 2007. Fisheries independent assessment of a returning fishery: Abundance of juvenile white seabass (*Atractoscion nobilis*) in the shallow nearshore waters of the Southern California Bight, 1995–2005. *Fisheries Research*, 88(1), 24-32.
- Angermeier, P. L. 1995. Ecological attributes of extinction-prone species: loss of freshwater fishes of Virginia. *Conservation Biology*, 143-158.
- Anthony, A.W. 1925. Expedition to Guadalupe Island, Mexico in 1922: Birds and mammals. *Proceedings of the California Academy of Sciences*, 14(13), 277-320.
- Antonelis, G. A., Fiscus, C. H. 1980. The pinnipeds of the California current. *CalCOFI Report*, 21, 68-78.
- Arafeh-Dalmau, N. 2014. Análisis de la biota bentónica asociada a bosques de *Macrocystis pyrifera* en ambientes insulares expuestos y protegidos de la península de Baja California. Trabajo fin de Grado de Ciencias del Mar. Universidad de Vigo. 25 pp.
- Arias del Razo, 2016. Factores que determinan la preferencia de hábitat de los pinnípedos en las islas del Pacífico de Baja California. Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 95 pp.
- Arias del Razo, A., Heckel, G., Schramm, Y. and Pardo, M. 2016. Terrestrial habitat preferences and segregation of four pinniped species on the islands off the western coast of the Baja California Peninsula, Mexico. *Marine Mammal Science*. doi: 10.1111/mms.12339
- Arim, M., Naya, D. E. 2003. Pinniped diets inferred from scats: analysis of biases in prey occurrence. *Canadian Journal of Zoology*, 81(1), 67-73.
- Aronesty, E. 2011. Command-line tools for processing biological sequencing data, expression analysis, Durham, N. C. Consultado el 5 de agosto de 2016, de: <https://github.com/ExpressionAnalysis/ea-utils/blob/wiki/FastqJoin.md>
- Arriaga-Cabrera, L., Vázquez-Domínguez, E., González-Cano, J., Jiménez-Rosenberg, R., Muñoz-López, E., Aguilar-Sierra, V. (Eds.). 1998. Regiones marinas prioritarias de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.

- Aurioles-Gamboa, D., Fox, C., Sinsel, F., Tanos, G. 1984. Prey of sea lions (*Zalophus californianus*) in the bay of La Paz, Baja California Sur, México. *Journal of Mammalogy*, 65, 519-121.
- Bartholomew, G. A. Jr., Hubbs, C. L. 1952. Winter population of pinnipeds about Guadalupe, San Benito and Cedros islands, Baja California. *Journal of Mammalogy*, 33(2), 161-171.
- Basch, L. V., Engle, J. M. 1993. Biogeography of *Hemisquilla ensigera californiensis* (Crustacea: Stomatopoda) with emphasis on Southern California bight populations. En: Third California Islands symposium, Santa Barbara Museum of Natural History, Santa Barbara, August, 211–220 pp.
- Bengtson, J. L., Laws, R. M. 1985. Trends in crabeater seal age at maturity: an insight into Antarctic marine interactions. En: W. R. Siegfried, P. R. Condy and R. M. Laws (Eds.). *Antarctic nutrient cycles and food webs*. Springer, Berlin. pp. 669-675.
- Berta, A., Sumich, J. L., Kovacs K. M. 2015. *Marine Mammals: Evolutionary Biology* (3rd. Ed.). Academic Press, San Diego, California, EE.UU.
- Bigg, M.A. 1969. Clines in the pupping season of the harbor seal, *Phoca vitulina*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 26, 449-455.
- Bigg, M.A. 1981. Harbour Seal *Phoca vitulina* and *P. largha*. En: S. H. Ridgway, and R. J. Harrison (Eds.). *Handbook of Marine Mammals Seals*. Academic Press, London. pp. 1-27.
- Bjørge, A., Bekkby, T., Bakkestuen, V., Framstad, E. 2002. Interactions between harbour seals, *Phoca vitulina*, and fisheries in complex coastal waters explored by combined Geographic Information System (GIS) and energetics modelling. *ICES Journal of Marine Science*, 59, 29-42.
- Bodewes, R., Contreras, G. J. S., García, A. R., Hapsari, R., van de Bildt, M. W., Kuiken, T., Osterhaus, A. D. 2015. Identification of DNA sequences that imply a novel gammaherpesvirus in seals. *Journal of General Virology*, 96(5), 1109-1114.
- Boily, P. 1995. Theoretical heat flux in water and habitat selection of phocid seals and beluga whales during the annual molt. *Journal of Theoretical Biology*, 172(3), 235-244.
- Bonner, W. N. 1979. Harbour (common) seal. En: *Food and agriculture organization of the United Nations, Rome* (Eds.). *Mammals in the seas*. FAO Fisheries Series. Roma, Italia. pp. 58-62.
- Bonnes, D. J., Bowen, W. D., Buhleier, B. M., Marshall, G. J. 2006. Mating tactics and mating system of an aquatic mating pinniped: The harbor seal, *Phoca vitulina*. *Behaviour Ecology and Sociobiology*, 61, 119-130.
- Bowen, W. D. 1997. Role of marine mammals in aquatic ecosystems. *Marine Ecology Progress Series*, 158:267-274.
- Bowen, W. D., S. J. Iverson. 2013. Methods of estimating marine mammal diets: A review of validation experiments and sources of bias and uncertainty. *Marine Mammal Science*, 29:719-754.
- Boyer, S., Brown, S. D., Collins, R. A., Cruickshank, R. H., Lefort, M. C., Malumbres-Olarte, J., Wratten, S. D. 2012. Sliding window analyses for optimal selection of mini-barcodes, and application to 454-pyrosequencing for specimen identification from degraded DNA. *PLoS One*, 7(5), e38215.

- Brodeur, R. D., Barceló, C., Robinson, K. L., Daly, E. A., Ruzicka, J. J. 2014. Spatial overlap between forage fishes and the large medusa *Chrysaora fuscescens* in the northern California Current region. *Marine Ecology Progress Series*, 510,167-181.
- Brown, R. F. 1981. Abundance, movements and feeding habits of the harbor seal, *Phoca vitulina*, at Netarts Bay, Oregon. Master thesis in science. Oregon State University, U.S.A. 69 pp.
- Brown, R. F., Mate, B. R. 1983. Abundance, movements, and feeding habits of harbor seals, *Phoca vitulina*, at Netarts and Tillamook Bays, Oregon. *Fishery Bulletin*, 81(2), 291-301.
- Brown, R., Wright, B., Riemer, S., J. Laake. 2003. Trends in abundance and current status of harbor seals in Oregon: 1977-2003. *Marine Mammal Science*, 21(4), 655-670.
- Browne, P., Laake, J. L., DeLong, R. L. 2002. Improving pinniped diet analyses through identification of multiple skeletal structures in fecal samples. *Fishery Bulletin*, 100(3), 423-433.
- Brownell, R., De Long, R. L., Schreiber, R. W. 1974. Pinniped populations at Islas de Guadalupe, San Benito, Cedros and Natividad, Baja California, in 1968. *Journal of Mammalogy*, 55(2), 469-472.
- Bukhtiyarov, Y. A., Frost, K. J., Lowry, L. F. 1984. New information on foods of the spotted seal, *Phoca largha*, in the Bering Sea in spring. *Soviet-American cooperative research on marine mammals*, 1, 55-59.
- Burns, J. J. 2009. Harbor seal and spotted seal *Phoca vitulina* and *P. largha*. En: W. F. Perrin, B. Würsig, J. G. M. Thewissen (Eds.). En: *Encyclopedia of Marine Mammals*. Academic Press. San Diego, USA pp. 533-542.
- Chao, A. 1984. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics*, 11, 256-270.
- Christensen, V., Pauly, D. 1992. ECOPATH II: Software for balancing steady-state ecosystem models and calculating network characteristics. *Ecological Modeling*, 61,169-185.
- Colwell, R. K. 2013. Estimates (statistical estimation of species richness and shared species from samples), version v. 9.1.0. Consultado el 15 de septiembre de 2016, de: <http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates>.
- Colwell, R. K., Coddington, J. A. 1994. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 345, 101-118.
- Committee on Taxonomy. 2016. List of marine mammal species and subspecies. Consultado el 1 de junio de 2016, de: www.marinemammalscience.org.
- CONABIO-CONANP-TNC-PRONATURA (Eds.). 2007. Análisis de vacíos y omisiones en conservación de la biodiversidad marina de México: océanos, costas e islas. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, The Nature Conservancy, Programa México y Pronatura, A.C. México, Distrito Federal. Consultado el 7 de febrero de 2015, de: <http://www.biodiversidad.gob.mx/pais/pdf/LibroGapMarino.pdf>
- Cottrell, P. E., Miller, E. H., Trites, A. W. 1996. Assessing the use of hard parts in faeces to identify harbour seal prey: results of captive-feeding trials. *Canadian Journal of Zoology*, 74(5), 875-880.

- Danemann, G. D., De La Cruz-Agüero, J. 1993. Ictiofauna de Laguna San Ignacio, Baja California Sur, México. *Ciencias Marinas*, 19(3), 333-341.
- Daniel, R.G., Jemison, L. A., Pendleton, G.W., Crowley, S.M. 2003. Molting phenology of harbor seal on Tugidak Island, Alaska. *Marine Mammal Science*, 19(1), 128-140.
- De La Cruz-Agüero, J. 2000. Origen y distribución de la ictiofauna de la Laguna de San Ignacio, Baja California Sur, México. *Ciencia Ergo Sum*, 7(2), 157-165.
- De La Cruz-Agüero, J. F., Galvám-Magaña, Abitia-Cárdenas, L. A., Rodríguez-Romero, J., Gutiérrez-Sánchez. 1994. Lista sistemática de los peces marinos de bahía Magdalena, Baja California Sur, México. *Ciencias Marinas*, 20 (1), 17-31.
- De Ruiter, P. C., Wolters, V., Moore, J. C., Winemiller, K. O. 2005. Food web ecology: playing Jenga and beyond. *Science*, 309 (5731), 68-71.
- Deagle, B. E., Eveson, J. P., Jarman, S. N. 2006. Quantification of damage in DNA recovered from highly degraded samples—a case study on DNA in faeces. *Frontiers in Zoology*, 3(1), 1.
- Deagle, B. E., Kirkwood, R., Jarman, S. N. 2009. Analysis of Australian fur seal diet by pyrosequencing prey DNA in faeces. *Molecular Ecology*, 18(9), 2022-2038.
- Deagle, B. E., Thomas, A. C., Shaffer, A. K., Trites, A. W., Jarman, S. N. 2013. Quantifying sequence proportions in a DNA-based diet study using Ion Torrent amplicon sequencing: which counts count? *Molecular Ecology Resources*, 13(4), 620-633.
- Deagle, B. E., Tollit, D. J., Jarman, S. N., Hindell, M. A., Trites, A. W., Gales, N. J. 2005. Molecular scatology as a tool to study diet: analysis of prey DNA in scats from captive Steller sea lions. *Molecular Ecology*, 14(6), 1831-1842.
- Dehn, L. A., Sheffield, G. G., Follmann, E. H., Duffy, L. K., Thomas, D. L., O'Hara, T. M., 2007. Feeding ecology of phocid seals and some walrus in the Alaskan and Canadian Arctic as determined by stomach contents and stable isotope analysis. *Polar Biology*, 30(2), 167-181.
- Dehnhardt, G., Hyvarinen, H., Palviainen, A., Klauer, G. 1999. Structure and innervation of the vibrissal follicle-sinus complex in the Australian water rat, *Hydromys chrysogaster*. *The Journal of Comparative Neurology*, 411, 5 50-562.
- Dellinger, T., Trillmich, F. 1987. Estimating diet composition from scat analysis in otariid seals (Otariidae): is it reliable? *Canadian Journal of Zoology*, (66), 1865-1870.
- Dohm, J. C., Lottaz, C., Borodina, T., Himmelbauer, H. 2008. Substantial biases in ultra-short read data sets from high-throughput DNA sequencing. *Nucleic Acids Research*, 36, e105.
- Durazo-Rodríguez, R. P. 2015. Variación espacio-temporal de los hábitos alimentarios de la foca de puerto (*Phoca vitulina richardii*) en México. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma de Baja California, México. 108 pp.
- Dyche, L. L. 1899. Notes on the food habits of California sea lions (*Zalophus californianus*, Lesson 1828). *Kansas Academy of Sciences*, 179-182.

- Edgar, R. C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26,2460-2461.
- Elbroch, M. 2006. *Animal skulls: a guide to North American Species*. Stackpole Books. Mechanicsburg, Pensilvania, U.S.A.
- Elorriaga-Verplancken, F. R., Morales-Luna, L., Moreno-Sánchez, X., Mendoza-Salas, I. 2013. Inferences on the diet of the eastern Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardii*) at the southern end of its distribution: stable isotopes and scat analyses. *Aquatic Mammals*, 39(4), 415-421.
- Elton, C. 1927. *Animal Ecology*. Sidgwick and Jackson, London.
- Estes, J. A., Crooks, K., Holt, R. 2001. Predators, ecological role of. En: Levin, S.A. (Ed.), *Encyclopedia of Biodiversity*. Academic Press, San Diego, California. pp. 857-878.
- Felix, J. 2013. *Reported incidences of parasitic infections in marine mammals from 1892 to 1978*. Zea Books Lincoln, Nebraska.
- Feltz, E. T., Fay, F. H. (1966). Thermal requirements in vitro of epidermal cells from seals. *Cryobiology*, 3, 261-264.
- Fernández-Martín, E. M., Schramm, Y., Heckel, G., García-Aguilar, M. C. 2016. Temporalidad de los nacimientos y de la muda de la foca de puerto, *Phoca vitulina richardii*, en el estero de Punta Banda, Baja California, México. *Ciencias Marinas*. 42(3), 195-208.
- Fernholm, B. 1998. Hagfish systematics. En: Jørgensen, J. M., Lomholt, J. P., Weber, R. E., Malte, H. (Eds.), *The biology of hagfishes*. Springer, Netherlands. pp. 33-44.
- Flores-Olivares, J., Chávez-Vargas, O., Del Carmen Jiménez-Quiroz, M. 2009. Capturas de *Eptatretus stoutii* frente a la costa noroccidental de Baja California, México, 2006-2008. *Ciencia Pesquera*, 17(2), 52.
- Fraser, C. M., 1939. Hydroids as a food supply. *Transactions of the Royal Society, Canada*, 5(27): 259-264.
- Froese, R., Pauly. 2016. FishBase. Consultado el 1 de agosto de 2016, de: <http://www.fishbase.org>.
- Gallo-Reynoso, J. P. 1989. El bonito (*Euthynnus lineatus*) (Scombridae) como alimento por toninas (*Tursiops truncatus gillii*) (Delphinidae) y por lobo marino (*Zalophus californicus*: Otariidae). *Anales Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Zoología*, 60,125-127.
- Gallo-Reynoso, J. P., Aurióles-Gamboa, D. 1984. Distribución y estado actual de la población de foca común (*Phoca vitulina richardsi* (Gray, 1864)), en la Península de Baja California, México. *Anales del Instituto de Biología UNAM Serie Zoología*, 55(2), 323-332.
- García-Mendoza, E., Rivas, D., Olivos-Ortiz, A., Almazán-Becerril, A., Castañeda-Vega, C., Pena-Manjarrez, J. L. 2009. A toxic Pseudo-nitzschia bloom in Todos Santos Bay, northwestern Baja California, Mexico. *Harmful Algae*, 8(3), 493-503.
- Gibble, C. M. 2011. *Food habits of harbor seals (Phoca vitulina richardii) in San Francisco Bay, Ca*. Tesis de maestría. San José State University. San José, California. 61 pp.

- Gibble, C. M., Harvey, J. T. 2015. Food habits of harbor seals (*Phoca vitulina richardii*) as an indicator of invasive species in San Francisco Bay, California. *Marine Mammal Science*, 31(3), 1014-1034.
- Gilbert, J. A., Jansson, J. K., Knight, R. 2014. The Earth Microbiome project: successes and aspirations. *BMC biology*, 12(1). 69 p.
- Gotelli, N. J., Colwell, R. K. 2011. Estimating species richness. En: *Biological Diversity: Frontiers in Measurement and Assessment*. Oxford University Press, 12, 39-54.
- Grigg, E. K., Klimley, A. P., Allen, S. G., Green, D. E., Elliott-Fisk, D. L., Markowitz, H. 2009. Spatial and seasonal relationships between Pacific harbor seals (*Phoca vitulina richardii*) and their prey, at multiple scales. *Fishery Bulletin*, 107(3), 359-372.
- Gruber, N., Hauri, C., Lachkar, Z., Loher, D., Frölicher, T. L., Plattner, G. K. 2012. Rapid progression of ocean acidification in the California Current System. *Science*, 337(6091), 220-223.
- Hadziavdic, K., Lekang, K., Lanzen, A., Jonassen, I., Thompson, E. M., Troedsson, C. 2014. Characterization of the 18S rRNA gene for designing universal eukaryote specific primers. *PLoS One*, 9(2), e87624.
- Härkönen, T. 1987. Seasonal and regional variations in the feeding habits of the harbour seal, *Phoca vitulina*, in the Skagerrak and the Kattegat. *Journal of Zoology*, 213(3), 535-543.
- Härkönen, T., Harding, K. C. 2001. Spatial structure of harbour seal populations and the implication thereof. *Canadian Journal of Zoology*, 79, 2115-2127.
- Harley, S. J., Myers, R. A., Dunn, A. 2001. Is catch-per-unit-effort proportional to abundance? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 58, 1760–1772.
- Harvey, J. T. 1988. Population dynamics, annual food consumption, movements and dive behavior of harbor seals, *Phoca vitulina richardsi* in Oregon. Ph.D. dissertation. Oregon State University. Corvallis, Oregon, United States. 177 pp.
- Haas, B. J., Gevers, D., Earl, A. M., Feldgarden, M., Ward, D. V., Giannoukos, G., Ciulla, D., Tabbaa, D., Highlander, S. K., Sodergren, E., Methé, B., DeSantis, T. Z., The Human Microbiome Consortium, Petrosino, J. F., Knight, R., Birren, B. W. 2011. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome research*, 21(3), 494-504.
- Head, S. R., Komori, H. K., LaMere, S. A., Whisenant, T., Van Nieuwerburgh, F., Salomon, D. R., Ordoukhanian, P. 2014. Library construction for next-generation sequencing: overviews and challenges. *Biotechniques*, 56(2), 61.
- Herbold, C. W., Pelikan, C., Kuzyk, O., Hausmann, B., Angel, R., Berry, D., Loy, A. 2015. A flexible and economical barcoding approach for highly multiplexed amplicon sequencing of diverse target genes. *Frontiers in microbiology*, 6.
- Hereu, C. M., Lavaniegos, B. E., Gaxiola-Castro, G., Ohman, M. D. 2006. Composition and potential grazing impact of salp assemblages off Baja California during the 1997–1999 El Niño and La Niña. *Marine Ecology Progress Series*, 318, 123-140.

- Herreman, J. K., Blundell, G. M., Ben-David, M. 2009. Evidence of bottom-up control of diet driven by top-down processes in a declining harbor seal *Phoca vitulina richardsi* population. *Marine Ecology Progress Series*, 374, 287-300.
- Hillis, D. M., Dixon, M. T. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology*, 411-453.
- Hoffman, J. I., Matson, C. W., Amos, W., Loughlin, T. R., Bickham, J. W. 2006. Deep genetic subdivision within a continuously distributed and highly vagile marine mammal, the Steller's sea lion (*Eumetopias jubatus*). *Molecular Ecology*, 15(10), 2821-2832.
- Hynes, H.B. 1950. The food of fresh-water sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* and *Pygosteus pungitius*), with a review of methods used in studies of the food of fishes. *Journal of Animal Ecology*, 19, 36-58.
- Illumina. 2011. Overview of tailed amplicon sequencing approach with MiSeq: Two step amplicon
Consultado el 11 de octubre de 2016, de:
<https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=56a8dc7d60614ba0678b4579&assetKey=AS%3A322523781107716%401453907069868>.
- Illumina. 2014. Illumina 16S Metagenomic Sequencing Protocol. Consultado el 11 de octubre de 2016, de:
http://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/applications/microbiology/microbial-sequencing-methods/faq_16S_2014-09-16.pdf
- Instituto Nacional de Ecología (INE). 2000. Programa de Manejo Reserva de la Biosfera El Vizcaíno, SEDESOL, México. Consultado el 10 de agosto de 2015, de:
http://www.conanp.gob.mx/que_hacemos/pdf/programas_manejo/vizcaino.pdf
- International Research Intitute. 2016. IRI ENSO Forecast. Consultado el 10 de octubre de 2016, de:
<http://iri.columbia.edu/our-expertise/climate/forecasts/enso/2014-January-quick-look/>
- Jefferson, T. A., Leatherwood, S., and Webber, M. A. 1993. *Marine mammals of the world. Food and Agriculture Organization.*
- Jørgensen, C., Lydersen, C., Brix, O., Kovacs, K. M. 2001. Diving development in nursing harbour seal pups. *Journal of Experimental Biology*, 204(22), 3993-4004.
- Kenyon, K.W. 1959. A 15 foot man eater from San Miguel Island, California. *California Fish and Game*, 45, 58-59.
- King, J. 1983. *Seals of the World.* British Museum and Cornell University Press, London.
- Kocher, T. D., Wilson, A. C. 1991. Sequence evolution of mitochondrial DNA in human and chimpanzees: control region and protein-coding region. En: S. Ozawa, and T. Honjo (Eds.), *Evolution of life: fossils, molecules and culture.* Springer-Verlag, Tokyo, Japón. pp. 391-413.
- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K., & Schloss, P. D. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied and environmental microbiology*, 79(17), 5112-5120.

- Kumar, R., Singh, P. J., Nagpure, N. S., Kushwaha, B., Srivastava, S. K., Lakra, W. S. 2007. A non-invasive technique for rapid extraction of DNA from fish scales. *Indian Journal of Experimental Biology*, 45(11), 992.
- Lance, M.M., Chang, W.Y., Jefferies, S.J., Pearson, S., Acevedo-Gutiérrez, A. 2012. Harbor seal diet in northern Puget Sound: implications for the recovery of depressed fish stocks. *Marine Ecology Progress Series*, 464:257-271.
- Langstroth, L., Langstroth, L., Newberry, A. T. 2000. *A living bay: the underwater world of Monterey Bay*. University of California Press, U.S.A.
- Lankford, R. R. 1977. Coastal lagoons of Mexico: Their origin and classification. En: M. Wiley (Ed.). *Estuarine processes, circulation, sediments and transfer of materials in the estuary*. Academic Press, Inc., New York. pp. 182-215.
- Lecomte, F., Grant, W. S., Dodson, J. J., Rodríguez-Sánchez, R., Bowen, B. W. 2004. Living with uncertainty: genetic imprints of climate shifts in East Pacific anchovy (*Engraulis mordax*) and sardine (*Sardinops sagax*). *Molecular Ecology*, 13(8), 2169-2182.
- Lipps, J. H., Mitchell, E. 1976. Trophic model for the adaptive radiations and extinctions of pelagic marine mammals. *Paleobiology*, 2, 147-155.
- Lowry, L. F., Frost, K. J., Hoep, J. M., DeLong, R. A. 2001. Movements of satellite-tagged subadult and adult harbor seals in Prince William Sound, Alaska. *Marine Mammal Science*, 17(4), 835-861.
- Loya-Salinas, D. H., Palacios, E., González, S. 1992. Abundancia estacional de la foca de bahía (*Phoca vitulina richardsi* Gray 1864) en el Estero de Punta Banda (B. C., México). *Ciencias Marinas*, 18(3), 57-70.
- Lubinsky, D., Schramm, Y., Heckel, G. En prensa. The Pacific harbor seal's (*Phoca vitulina richardsi*) breeding colonies in Mexico: abundance and distribution. *Aquatic Mammals*.
- Luxa, K., Acevedo-Gutiérrez, A. 2013. Food habits of harbor seals (*Phoca vitulina*) in two estuaries in the central Salish Sea. *Aquatic Mammals*, 39(1), 10.
- MacArthur, R. 1955. Fluctuations of animal populations and a measure of community stability. *Ecology*, 36(3), 533-536.
- Maravilla-Chávez, M., Lowry, M. 1996. Censos de pinnípedos en islas de la costa occidental de la Península de Baja California, México (Julio/Agosto, 1992). *Ciencia Pesquera*, 13, 73-77.
- Mearns, A. J., Young, D. R., Olson, R., Schafer, H. A. (1981). Trophic structure and the cesium-potassium ratio in pelagic ecosystems. *California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports*, 22, 99-110.
- Meyer, A., Todt, C., Mikkelsen, N. T., Lieb, B. 2010. Fast evolving 18S rRNA sequences from Solenogastres (Mollusca) resist standard PCR amplification and give new insights into mollusk substitution rate heterogeneity. *BMC evolutionary biology*, 10(1), 1.
- Moore, S. E. 2008. Marine mammals as ecosystem sentinels. *Journal of Mammalogy*, 89(3), 534-540.

- Moreno, C. E. 2001. Métodos para medir la biodiversidad. (1ra ed.). Zaragoza, España.
- Mtambo J, van Bortel W, Madder M, Roelants P, Backeljau T. 2006. Comparison of preservation methods of *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari: Ixodidae) for reliable DNA amplification by PCR. *Experimental and Applied Acarology*, 38, 189-199
- National Audubon Society. 2005. Guía de los mamíferos marinos del mundo. Editorial Omega, Málaga, España.
- Nikolsky, G. V. 1963. The Ecology of Fishes. Academic Press, New York.
- Nolf, D. 1993. A survey of perciform otoliths and their interest for phylogenetic analysis, with an iconographic synopsis of the Percoidei. *Bulletin of marine science*, 52(1), 220-239.
- O'Donnell, J. L., Kelly, R. P., Lowell, N. C., Port, J. A. (2016). Indexed PCR primers induce template-specific bias in large-scale DNA sequencing studies. *PloS one*, 11(3), e0148698.
- Olesiuk, P. F. 1993. Annual prey consumption by harbor seals (*Phoca vitulina*) in the Strait of Georgia, British Columbia. *Fishery Bulletin*, 91, 491-515.
- Oliver, J. S., Kvitek, R. G., Slattery, P. N. 1985. Walrus feeding disturbance: scavenging habits and recolonization of the Bering Sea benthos. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 91, 233-246.
- Olivos-Ortiz, A., Torres-Orozco, E., Gaviño-Rodríguez, J. H., Calva-Chávez, M. A., Pelayo-Martínez, G. 2012. Variación espaciotemporal de nutrientes inorgánicos y su relación con la hidrografía en la región central del Pacífico mexicano durante 2010. *Geos*, 32(1), 1-8.
- Oxman, D. S. 1995 Seasonal abundance, movements, and food habits of harbour seals (*Phoca vitulina*) in Elkhorn Slough, California. Ph.D. dissertation. California State University, California. 126 pp.
- Oxman, D. S. 1995. Seasonal abundance, movements, and food habits of harbor seals (*Phoca vitulina richardsi*). Ph.D. dissertation. California State University, Stanislaus. 126 pp.
- Pablo, R. N. 2009. Amplitud, nivel y superposición trófica de los pinnípedos de Islas San Benito, B.C., México. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas – Instituto Politécnico Nacional. La Paz, Baja California Sur, México. 90 pp.
- Padilla-Villavicencio, A.M. 1990. Aspectos biológicos de la foca común (*Phoca vitulina richardsi*, (Gray 1864)) en la costa occidental de Baja California (Carnivora: Phocidae). Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 88 pp.
- Palomares, M. L. D., Pauly, D. 2016. SeaLifeBase. Consultado el 01 de agosto de 2016, de: <http://www.sealifebase.org>
- Perrin, W.F., Würsig, B. Thewissen, J.G.M. 2002. Encyclopedia of Marine Mammals. Academic Press. California, E.U.A.
- Peters, K. J., Ophelkeller, K., Bott, N. J., Deagle, B. E., Jarman, S. N., Goldsworthy, S. D. 2014. Fine-scale diet of the Australian sea lion (*Neophoca cinerea*) using DNA-based analysis of faeces. *Marine Ecology*, 1-21.

- Pitcher, K. W. 1980. Stomach contents and feces as indicators of harbor seal, *Phoca vitulina*, foods in the gulf of Alaska. *Fishery Bulletin*, 78(3), 797-798.
- Power, G., Gregoire, J. 1978. Predation by freshwater seals on the fish community of Lower Seal Lake, Quebec. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 35,844-850.
- R Core Team. 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Consultado el 15 de septiembre de 2016, de: <http://www.R-project.org>.
- Rice, D.W. 1968. Stomach contents and feeding behavior of killer whales in the eastern North Pacific Ocean. *Norsk Hvalfangst-Tidende*, 2, 35-38.
- Ripple, W. J., Beschta, R. L. 2004. Wolves and the ecology of fear: can predation risk structure ecosystems? *BioScience*, 54(8), 755-766.
- Rivera, C. 2011. Efecto del tamaño corporal en la diversidad de presas de los Pinnípedos. Tesis de Licenciatura. Universidad de la República. Uruguay. 32 pp.
- Robson, B. W., Goebel, M. E., Baker, J. D., Ream, R. R., Loughlin, T. R., Francis, R. C., Antonelis, G. A., Costa, D. P. 2004. Separation of foraging habitat among breeding sites of a colonial marine predator, the northern fur seal (*Callorhinus ursinus*). *Canadian Journal of Zoology*, 82, 20–29.
- Samaniego, A. Peralta, A., Aguirre, A. (Eds.). 2007. Vertebrados del Pacífico de Baja California: Guía de campo. Grupo de Ecología y Conservación de Islas A. C. Ensenada.
- Scheffer, T. H., Sperry, C. C. 1931. Food habits of the Pacific harbor seal, *Phoca richardii*. *Journal of Mammalogy*, 12(3), 214-226.
- Schirmer, M., Ijaz, U. Z., D'Amore, R., Hall, N., Sloan, W. T., Quince, C. 2015. Insight into biases and sequencing errors for amplicon sequencing with the Illumina MiSeq platform. *Nucleic Acids Research*, gku1341.
- Scholín, C. A., Gulland, F., Doucette, G. J., Benson, S., Busman, M., Chavez, F., Cordaro, J., Delong, E. F., Vogelaere, A. D., Harvey, J., Haulena, M., Lefebvre, K., Lipscomb, T., Loscutoff, S., Lowenstine, L. J., Marin III, R., Miller, P.E., McLellan, W. A., Moeller, P.D.R., Powell, C. L., Rowles, T., Silvagni, P., Silver, M. W., Spraker, T., Trainer, V.L., Dolah, F. M. V. 2000. Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom. *Nature*, 403, 80-84.
- SEMARNAT. 2000. Ley general de vida silvestre título VI-capítulo I-artículo 61. Acuerdo por el cual se da a conocer la lista de especies prioritarias para la conservación, con el fin de promover el desarrollo de proyectos para su conservación y recuperación, y con ello la de ecosistemas, hábitat y especies con los que se encuentran asociadas. *Diario Oficial de la Federación*, 3 de julio de 2000. México.
- SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación*, 30 de diciembre de 2010. México.
- Serrano-Padilla, A. V. 1989. Revisión bibliográfica del estado actual y distribución de las poblaciones de pinnípedos en México. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara. 116 pp.

- Sheffield, G., Grebmeier, J. M. 2009. Pacific walrus (*Odobenus rosmarus divergens*): differential prey digestion and diet. *Marine Mammal Science*, 25(4), 761-777.
- Shultz, S., Bradbury, R. B., Evans, K. L., Gregory, R. D., Blackburn, T. M. 2005. Brain size and resource specialization predict long-term population trends in British birds. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 272(1578), 2305-2311.
- Simister, R. L., Schmitt, S., Taylor, M. W. 2011. Evaluating methods for the preservation and extraction of DNA and RNA for analysis of microbial communities in marine sponges. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 397(1), 38-43.
- Solomón, E. P., Martín, L. R., Solomón, D. W. E. P., Berg, L. R., Martín, D. W. (2013). *Biología*. McGraw-Hill Interamericana, D. F., México.
- Spratt, J. D. 1979. Age and growth of the market squid, *Loligo opalescens* Berry, from statoliths. *California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Report*, 20, 58-64.
- Stanley, W. T., Shaffer, K. E. 1995. Harbor seal (*Phoca vitulina*) predation on seined salmonids in the lower Klamath River, California. *Marine Mammal Science*, 11(3), 376-385.
- StatSoft, I. 2005. STATISTICA (data analysis software system), versión 7.0. Consultado el 15 de septiembre de 2016, de: www.statsoft.com.
- Stewart, B. S., Yochem, P. K. 1994. Ecology of harbor seals in the Southern California Bight. En: W. L. Halvorson, and G. J. Maender (Eds.), *The Fourth California Islands Symposium: Update on the Status of Resources*. Santa Barbara Museum of Natural History, Santa Barbara, C.A. pp. 123-134
- Tapia-Harris, C. 2015. Cronología y secuencia de la muda de la foca común (*Phoca vitulina richardii*) en dos islas en la costa oeste de la península de Baja California, México. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. 65 pp.
- Temte, J. L. 1991. Precise birth timing in captive harbor seals (*Phoca vitulina*) and California sea lions (*Zalophus californianus*). *Marine Mammal Science*. 7(2), 145-156.
- Temte, J. L., Bigg, M. A., Wiig, O. 1991. Clines revisited: The timing of pupping in the harbour seal (*Phoca vitulina*). *Journal of Zoology*. 224(4), 617-632.
- Thomas, A. C. 2015. Diet analysis of Pacific harbour seals (*Phoca vitulina richardsi*) using high-throughput DNA sequencing. *Doctoral Thesis in Philosophy*. University of British Columbia. 147 pp.
- Thomas, A. C., Deagle, B. E., Eveson, J. P., Harsch, C. H., Trites, A. W. 2015. Quantitative DNA metabarcoding: improved estimates of species proportional biomass using correction factors derived from control material. *Molecular Ecology Resources*.
- Thomas, A. C., Jarman, S. N., Haman, K. H., Trites, A. W., Deagle, B. E. 2014. Improving accuracy of DNA diet estimates using food tissue control materials and an evaluation of proxies for digestion bias. *Molecular ecology*, 23(15), 3706-3718.
- Thomas, A. C., Lance, M. M., Jeffries, S. J., Miner, B. G., Acevedo-Gutiérrez, A. 2011. Harbor seal foraging response to a seasonal resource pulse, spawning Pacific herring. *Marine Ecology Progress Series*, 441, 225-239.

- Thomas, T., Gilbert, J., Meyer, F. 2012. Metagenomics: a guide from sampling to data analysis. *Microbial Informatics and Experimentation*, 2(1), 1-12.
- Thompson, P. M. 1993. Harbor seal movement patterns. *Symposium of the Zoological Society of London*, (66), 225-239.
- Tollit, D. J., Black, A. D., Thompson, P. M., Mackay A., Corpe, H. M., Wilson, B., Van Parijs, S. M., Grellier, K., Parlane, S. 1998. Variations in harbour seal *Phoca vitulina* diet and dive-depths in relation to foraging habitat. *Journal of Zoology*, 244, 209-222.
- Tollit, D. J., Steward, M. J., Thompson, P. M., Pierce, G. J., Santos, M. B., Hughes, S. 1997. Species and size differences in the digestion of otoliths and beaks: implications for estimates of pinniped diet composition. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54(1), 105-119.
- Torok, M. 1994. Movements, daily activity patterns, dive behavior, and food habits of harbor seals (*Phoca vitulina richardsi*) in San Francisco Bay, California. Tesis de Maestría en Ciencias. California State University, Stanislaus, California. 88 pp.
- Torres, A., Esquivel, C., Ceballos, G. 1995. Diversidad y conservación de los mamíferos marinos de México. *Revista Mexicana de Mastozoología*, 1, 22-43.
- Trainer, V. L., Adams, N. G., Bill, B. D., Stehr, C. M., Wekell, J. C., Moeller, P., Busman, M., Woodruff, D. 2000. Domoic acid production near California coastal upwelling zones, June 1998. *Limnology and Oceanography*, 45, 1818-1833.
- Trillmich, F., Ono, K. A., Costa, D. P., De Long, R. L., Feldkamp, S. D., Francis, J. M., Gentry, R. I., Heath, C. B., Le Boeuf, B. J., Majluf, P., York, A. E. 1991. The effects of El Niño on pinniped populations in the eastern Pacific. En: Trillmich, F., Kathryn A. O. (Eds.), *Pinnipeds and El Niño*. Springer, Berlin. pp. 247-270.
- Trites, A. W. 1997. The role of pinnipeds in the ecosystem. En: G. Stone, J. Goebel, S. Webster (Eds.), *Pinniped populations, eastern north Pacific: status, trends and issues. A symposium of the 127th Annual Meeting of the American Fisheries Society*. New England Aquarium, Conservation Department, Central Wharf, Boston, M. A. pp. 31-39.
- Trumble, S. J., Barboza, P. S., Castellini, M. A. 2003. Digestive constraints on an aquatic carnivore: effects of feeding frequency and prey composition on harbor seals. *Journal of Comparative Physiology B*, 173(6), 501-509.
- Trumble, S.J. 1995. Abundance, movements, dive behavior, food habits and mother-pup interactions of harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*) near Monterey Bay, California. Master Thesis in Science. California State University, U.S.A. 100 pp.
- United States Fish Commission. 1901. Report of the sea lion investigation. Press Publication, 1, 116–119.
- Vestheim H., Jarman, S.N. 2008. Blocking primers to enhance PCR amplification of rare sequences in mixed samples: a case study on prey DNA in Antarctic krill stomachs. *Frontiers in Zoology*, 5, 12.
- Vojkovich, M., Crooke, S. 2001. White seabass. En: Leet, W.S., Dewees, C.M., Klingbeil, R., Larson, E.J. (Eds.), *California's Living Marine Resources: A Status Report*. California Department of Fish and

- Game, University of California Division of Agriculture and Natural Resources Publications, SG01-11, 592.
- Wang, Y., Tian, R. M., Gao, Z. M., Bougouffa, S., Qian, P. Y. 2014. Optimal eukaryotic 18S and universal 16S/18S ribosomal RNA primers and their application in a study of symbiosis. *PLoS one*, 9(3), e90053.
- Whitehead, P.J. 1985. *Clupeoid Fishes of the World (Suborder Clupeoidei): An Annotated and Illustrated Catalogue of the Herrings, Sardines, Pilchards, Sprats, Shads, Anchovies, and Wolfherrings*. FAO Fisheries Synopsis, Rome.
- Wilson, Edward O. 2016. The encyclopedia of life. Consultado el 1 de agosto de 2016, de: <http://www.eol.org>.
- Winnepenninckx, B., Backeljau, T., De Wachter, R. 1993. Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *Trends Genetics*, 9, 407.
- Wood, J. B. 2016. CephBase. Consultado el 1 de agosto de 2016, de: <http://www.thecephalopodpage.org/cephbase.php>
- Wooley, J. C., Godzik, A., Friedberg, I. 2010. A primer on metagenomics. *PLOS Computational Biology*, 6(2), e1000667.
- Xu, J. 2006. Invited review: microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. *Molecular Ecology*, 15(7), 1713-1731.
- Zavala-González, A. 2000. Las especies que viven en nuestros mares. Recuperado el 14 de julio de 2015, de: <http://www.jornada.unam.mx/2000/07/10/eco-especies.html>
- Zourob, M. 2010. *Recognition receptors in biosensors*. Springer, New York.

Anexos

Anexo 1

Principales especies presa de la subespecie *Phoca vitulina richardii* a lo largo de su distribución en el Pacífico Oriental. El orden de las especies está en función de su importancia o frecuencia de ocurrencia dentro de la dieta de la foca de puerto, esta importancia depende de la zona de estudio y es compartida por algunas localidades. Lo anterior a excepción de las especies señaladas con [-]. La marca (*) indica que el estudio se llevó a cabo mediante el análisis de contenido estomacal.

Espece	Nombre común	Localidad	Cita
<i>Peces Óseos</i>			
<i>Leptocottus armatus</i>	Charrasco de astas	Puget Sound y Willapa Bay, Washington/ Bahías Netarts y Tillamook, Oregon/ Bahía de San Francisco, California/ Desdemona Sands, Canadá	*Scheffer y Sperry, 1931; Brown y Mate, 1982; Torok, 1994; Browne <i>et al.</i> , 2002
<i>Sebastes spp</i>	Rocotes	Puget Sound y Willapa Bay, Washington/ Bahías Netarts y Tillamook, Oregon/ Glacier Bay y Prince William Sound, Alaska/ Estero Punta Banda e Isla Todos Santos Sur, Ensenada/ Islas Todos Santos Sur, San Jerónimo, Natividad y San Roque, México	*Scheffer y Sperry, 1931; Brown y Mate, 1982; Browne <i>et al.</i> , 2002; Herreman <i>et al.</i> , 2009; Alamán-de-Regules, 2014; Durazo-Rodríguez, 2015
<i>Porichthys notatus</i>	Sapo cabezón	Puget Sound y Willapa Bay, Washington/ Bahía de San Francisco, California/ Estero Punta Banda e Isla Todos Santos Sur, Ensenada/ Islas Todos Santos Sur, San Jerónimo, Natividad y San Roque, México	*Scheffer y Sperry, 1931; Torok, 1994; Alamán-de-Regules, 2014; Durazo-Rodríguez, 2015
<i>Clupea pallasii</i>	Arenque del Pacífico	Puget Sound y Willapa Bay, Washington/ Bahías Netarts y Tillamook, Oregon/ Glacier Bay y Prince William Sound, Alaska	*Scheffer y Sperry, 1931; Brown y Mate, 1982; Herreman <i>et al.</i> , 2009
<i>Gadus macrocephalus</i>	Bacalao del Pacífico	Puget Sound y Willapa Bay, Washington/ Glacier Bay y Prince William Sound, Alaska	*Scheffer y Sperry, 1931; Herreman <i>et al.</i> , 2009
<i>Theragra chalcogramma</i>	Abadejo o colín de Alaska	Puget Sound y Willapa Bay, Washington/ Glacier Bay y Prince William Sound, Alaska	*Scheffer y Sperry, 1931; Herreman <i>et al.</i> , 2009

Especie	Nombre común	Localidad	Cita
<i>Citharichthys sordidus</i>	Lenguado moteado	Bahías Netarts y Tillamook, Oregon/ Estero Punta Banda e Isla Todos Santos Sur, Ensenada/ Islas Todos Santos Sur, San Jerónimo, Natividad y San Roque, México	Brown y Mate, 1982; Alamán-de-Regules, 2014; Durazo-Rodríguez, 2015
<i>Chilara taylori</i>	Congriperla moteada	Bahía de San Francisco, California/ Estero Punta Banda e Isla Todos Santos Sur, Ensenada/ Islas Todos Santos Sur, San Jerónimo, Natividad y San Roque, México	Torok, 1994; Alamán-de-Regules, 2014; Durazo-Rodríguez, 2015
<i>Synodus lucioceps</i>	Lagarto lucio	Isla Natividad, Baja California Sur/ Estero Punta Banda e Isla Todos Santos Sur, Ensenada/ Islas Todos Santos Sur, San Jerónimo, Natividad y San Roque, México	Elorriaga-Verplancken <i>et al.</i> , 2013; Alamán-de-Regules, 2014; Durazo-Rodríguez, 2015
Familia Gadidae	Bacalaos	Puget Sound y Willapa Bay, Washington, EUA	*Scheffer y Sperry, 1931
<i>Acanthogobius flavimanus</i>	Gobio extranjero	Bahía de San Francisco, California, EUA	Torok, 1994
<i>Lampanyx spp</i>	Lamprea	Desdemona Sands, Columbia Británica, Canadá	Browne <i>et al.</i> , 2002
<i>Mallotus villosus</i>	Capelín	Glacier Bay y Prince William Sound, Alaska, EUA	Herreman <i>et al.</i> , 2009
<i>Achirus mazatlanus</i>	Sol de Mazatlán	Isla Natividad, Baja California Sur, México	Elorriaga-Verplancken <i>et al.</i> , 2013
<i>Strongylura exilis</i>	Agujón californiano	Isla Natividad, Baja California Sur, México	Elorriaga-Verplancken <i>et al.</i> , 2013
<i>Citharichthys xanthostigma</i>	Lenguado alón	Isla Natividad, Baja California Sur, México	Elorriaga-Verplancken <i>et al.</i> , 2013
<i>Sardinops sagax</i>	Sardina Monterrey	Isla Natividad, Baja California Sur, México	Elorriaga-Verplancken <i>et al.</i> , 2013
<i>Microgadus proximus</i>	Bacalao Tom del Pacífico	Puget Sound y Willapa Bay, Washington/ Bahías Netarts y Tillamook, Oregon/ Desdemona Sands, Canadá	*Scheffer y Sperry, 1931; Brown y Mate, 1982; Browne <i>et al.</i> , 2002
<i>Parophrys vetulus</i>	Lenguado inglés	Bahías Netarts y Tillamook, Oregon/ Bahía de San Francisco, California	Brown y Mate, 1982; Torok, 1994
<i>Citharichthys stigmaeus</i>	Lenguado pecoso	Bahías Netarts y Tillamook, Oregon/ Bahía de San Francisco, California/ Estero Punta Banda e Isla Todos Santos Sur, Ensenada/ Islas Todos Santos Sur, San Jerónimo, Natividad y San Roque, México	Brown y Mate, 1982; Torok, 1994; Alamán-de-Regules, 2014; Durazo-Rodríguez, 2015
Familia Osmeridae	Smelt	Bahías Netarts y Tillamook, Oregon/ Desdemona Sands, Canadá	Brown y Mate, 1982; Browne <i>et al.</i> , 2002

Especie	Nombre común	Localidad	Cita
<i>Platichthys stellatus</i>	Lenguado	Bahías Netarts y Tillamook, Oregon/ Desdemona Sands, Canadá	Brown y Mate, 1982; Browne <i>et al.</i> , 2002
<i>Ammodytes hexapterus</i>	Lanza de arena del Pacífico	Bahías Netarts y Tillamook, Oregon/ Canadá/ Glacier Bay y Prince William Sound, Alaska	Brown y Mate, 1982; Browne <i>et al.</i> , 2002; Herreman <i>et al.</i> , 2009
<i>Atheresthes stomias</i>	Lenguado diente de flecha	Bahías Netarts y Tillamook, Oregon/ Glacier Bay y Prince William Sound, Alaska	Brown y Mate, 1982; Herreman <i>et al.</i> , 2009
<i>Glyptocephalus zachirus</i>	Lenguado rey	Bahías Netarts y Tillamook, Oregon/ Glacier Bay y Prince William Sound, Alaska/ Estero Punta Banda e Isla Todos Santos Sur, Ensenada	Brown y Mate, 1982; Herreman <i>et al.</i> , 2009; Alamán-de-Regules, 2014
<i>Genyonemus lineatus</i>	Roncador blanco	Bahía de San Francisco, California/ Estero Punta Banda e Isla Todos Santos Sur, Ensenada	Torok, 1994; Alamán-de-Regules, 2014
Invertebrados			
<i>Octopus rubescens</i>	Pulpo rojo del Pacífico	Puget Sound y Willapa Bay, Washington/ Isla Natividad, Baja California Sur	*Scheffer y Sperry, 1931; Elorriaga-Verplancken <i>et al.</i> , 2013
<i>Doryteuthis opalescens</i>	Calamar californiano	Bahía de San Francisco, California/ Estero Punta Banda e Isla Todos Santos Sur, Ensenada/ Islas Todos Santos Sur, San Jerónimo, Natividad y San Roque, México	Torok, 1994; Alamán-de-Regules, 2014; Durazo-Rodríguez, 2015
<i>Crangon franciscorum franciscorum</i>	Camarón	Puget Sound y Willapa Bay, Washington, EUA	*Scheffer y Sperry, 1931
<i>Octopus bimaculatus</i>	Pulpo anillado	Estero Punta Banda e Isla Todos Santos Sur, Ensenada, Baja California, México	Alamán-de-Regules, 2014
<i>Octopus spp</i>	Pulpo	Islas Todos Santos Sur, San Jerónimo, Natividad y San Roque, México	Durazo-Rodríguez, 2015
<i>Penaeus stylirostris</i>	Camarón	Puget Sound y Willapa Bay, Washington, EUA	*Scheffer y Sperry, 1931
[-]Clase Hydrozoa	Hidrozoos	Puget Sound y Willapa Bay, Washington, EUA	*Scheffer y Sperry, 1931
[-] <i>Enteroctopus dofleini</i>	Pulpo gigante del Pacífico	Puget Sound y Willapa Bay, Washington, EUA	*Scheffer y Sperry, 1931
[-] <i>Glebocarcinus oregonensis</i>	Cangrejo de roca pigmeo	Puget Sound y Willapa Bay, Washington, EUA	*Scheffer y Sperry, 1931
[-] <i>Lissocrangon stylirostris</i>	Camarón	Puget Sound y Willapa Bay, Washington, EUA	*Scheffer y Sperry, 1931

Especie	Nombre común	Localidad	Cita
[-] <i>Metacarcinus gracilis</i>	Cangrejo delgado	Puget Sound y Willapa Bay, Washington, EUA	*Scheffer y Sperry, 1931
[-] <i>Metacarcinus magister</i>	Cangrejo de Dungeness	Puget Sound y Willapa Bay, Washington, EUA	*Scheffer y Sperry, 1931
[-] <i>Trichotropis</i> sp.	Caracol	Puget Sound y Willapa Bay, Washington, EUA	*Scheffer y Sperry, 1931
[-] <i>Yoldia myalis</i>	Almeja	Puget Sound y Willapa Bay, Washington, EUA	*Scheffer y Sperry, 1931
[-] <i>Hemigrapsus oregonensis</i>	Cangrejo costero de Oregón	Puget Sound y Willapa Bay, Washington, EUA	*Scheffer y Sperry, 1931
[-] <i>Pagurus</i> sp.	Cangrejo hermitaño	Puget Sound y Willapa Bay, Washington, EUA	*Scheffer y Sperry, 1931
[-] <i>Petrolisthes cinctipes</i>	Cangrejo porcelana	Puget Sound y Willapa Bay, Washington, EUA	*Scheffer y Sperry, 1931
[-] <i>Petrolisthes eriomerus</i>	Cangrejo porcelana	Puget Sound y Willapa Bay, Washington, EUA	*Scheffer y Sperry, 1931
[-] <i>Pandalus danae</i>	Camarón fantasma	Puget Sound y Willapa Bay, Washington, EUA	*Scheffer y Sperry, 1931
[-] <i>Neotrypaea californiensis</i>	Camarón fantasma	Puget Sound y Willapa Bay, Washington, EUA	*Scheffer y Sperry, 1931
[-] <i>Upogebia pugettensis</i>	Camarón fantasma	Puget Sound y Willapa Bay, Washington, EUA	*Scheffer y Sperry, 1931
[-] <i>Pinnixa schmitti</i>	Camarón fantasma	Puget Sound y Willapa Bay, Washington, EUA	*Scheffer y Sperry, 1931

Anexo 2

Kit de extracción QIAamp DNA Stool Mini Kit de QIAGEN (protocolo para el aislamiento y detección del ADN de patógenos en heces). Protocolo ligeramente modificado a partir de las recomendaciones del fabricante.

Reactivos:

- Buffer ASL
- Buffer AL
- Buffer AW1
- Buffer AW2
- Etanol grado molecular (99-100%)
- Buffer AE
- Proteinasa K (0.6 mg/ml)

Procedimiento:

1. Desarrollar el protocolo con una cantidad inicial de muestra fecal no menor a 200 mg y no mayor a 600 mg.
2. Agregar 1.4 ml de Buffer ASL y agitar la muestra con vortex durante 1 minuto, o bien, hasta que la muestra se encuentre completamente homogenizada.
3. Incubar la suspensión a 50°C durante 5 minutos con movimiento.
4. Agitar las muestras vía vortex durante 15 segundos y centrifugarlas durante 1 minuto a 20,000 x g.
5. Pipetear 1.2 ml del sobrenadante dentro de un tubo eppendorf (capacidad de 1.5 ml) y descartar el pellet.
6. Agregar una tableta de InhibitEX a cada muestra evitando tocar la pastilla con los guantes. Agitar inmediatamente las muestras mediante vortex por un minuto e incubar la suspensión a temperatura ambiente por 1 minuto.
7. Centrifugar las muestras por 3 minutos a 20,000 x g.
8. Recuperar aproximadamente 400-600 µl del sobrenadante del paso 6 dentro de un tubo eppendorf (capacidad 1.5 ml) y descartar el pellet. Centrifugar nuevamente las muestras durante 3 minutos a 20,000 x g.
9. Dentro de un nuevo vial tipo "O-ring" (capacidad 2 ml) pipetear 15 µl de proteinasa K (1.6 mg/ml).
10. Pipetear 200 µl del sobrenadante correspondiente al paso 8 dentro del vial preparado en el paso número 9.

11. Agregar 200 μ l de Buffer AL y homogenizar la muestra mediante vortex por 15 segundos y centrifugar brevemente por 5 segundos.
12. Incubar la suspensión a 50°C durante 30 minutos con movimiento. Es importante rotar las muestras de lo contrario el producto de extracción puede ser nulo u obtenerse en bajas concentraciones.
13. Agregar 200 μ l de etanol grado molecular (99-100%) al lisado y agitar las muestras vía vortex por 10 segundos. Posteriormente centrifugar lisado brevemente por 10 segundos.
14. Vaciar el total del lisado de cada muestra dentro de una columna de centrifugación QIA amp (independiente) con tubo colector de 2 ml. Durante el vaciado debe cuidarse no humedecer el anillo en la boca de la columna de centrifugación. Centrifugar el lisado por un minuto a 20,000 x g, pasar la columna a un nuevo tubo colector y descartar el anterior (que contiene el filtrado).
15. Agregar a la columna 500 μ l de Buffer AW1 y centrifugar las muestras por 1 minuto a 20,000 x g. Pasar la columna a un nuevo tubo colector y descartar el filtrado.
16. Agregar a la columna 500 μ l de Buffer AW2 y centrifugar las muestras por 3 minutos a 20,000 x g. Pasar la columna a un nuevo tubo colector y descartar el anterior (que contiene el filtrado).
17. Pasar la columna a un nuevo tubo colector y centrifugar nuevamente las muestras por 1 minuto a 20,000 x g. Descartar el tubo colector que contiene el filtrado y transferir la columna a un nuevo tubo eppendorf (capacidad 1.5 ml).
18. Pipetear 200 μ l de Buffer AE directamente sobre el filtro dentro de la columna. Incubar las muestras a temperatura ambiente por 5 minutos. Eluir el ADN centrifugando las muestras durante 5 minutos a 20,000 x g. Almacenar los productos de extracción a -20°C.

Anexo 3

Extracción por Sales-Proteinasa K, modificación al protocolo descrito por Aljanabi y Martinez (1997).

Reactivos:

- Solución amortiguadora de sales (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; NaCl 400 mM; EDTA 1 mM).
- NaCl 3 M
- SDS al 20%
- Proteinasa K (0.6 mg/ml)
- Isopropanol al 99%
- Etanol al 70%
- Solución amortiguadora de almacenamiento (Tris-HCl 5 mM, pH 7.9; EDTA 0.1 mM, pH 8.0).

Procedimiento:

1. Desarrollar el protocolo con una cantidad inicial de muestra fecal no menor a 200 mg y no mayor a 600 mg.
2. Agregar 400 μ l de la solución de sales a cada muestra y agitar vía vortex hasta homogenizar la suspensión.
3. Pipetear 40 μ l de SDS al 20% y 8 μ l de proteinasa K (0.6 mg/ml) al homogenizado.
4. Incubar la suspensión a 50°C por 30 minutos (muestras de la Isla Todos Santos Sur), o bien 20 minutos (muestras de la Isla San Roque) con movimiento. Se recomienda utilizar viales tipo "O-ring".
5. Pipetear 600 μ l de NaCl 3 M al homogenizado, agitar vía vortex durante 30 segundos e incubar las muestras a temperatura ambiente por 5 minutos.
6. Centrifugar las muestras a 10,000 x g durante 30 minutos.
7. Recuperar de 600 a 700 μ l del sobrenadante del paso 6 dentro de un nuevo tubo eppendorf (capacidad 1.5 ml) sin extraer parte del pellet.
8. Agregar 650 μ l de isopropanol al 99% y homogenizar la suspensión vía vortex por 15 segundos. Incubar las muestras dentro de un ultracongelador (-70°C) durante 10 minutos.
9. Centrifugar las muestras a 12,000 x g por 15 minutos.
10. Decantar el sobrenadante y agregar 500 μ l de etanol al 70%. Centrifugar las muestras a durante 15 minutos a 12, 000 x g.
11. Descartar nuevamente el alcohol sobrenadante y dejar secar de forma invertida los tubos abiertos durante 16 minutos. En el de la Isla Todos Santos Sur las muestras se secaron abiertas e invertidas durante 5 minutos y posteriormente fueron colocadas dentro de la centrifuga de vacío a 50°C por 15 minutos.

12. Eluir el ADN en 50 μ l de solución amortiguadora de almacenamiento y dejar incubar las muestras por aproximadamente 12 horas. Posterior a la incubación las muestras son almacenadas a -20°C .

Anexo 4

Condiciones de amplificación utilizadas para llevar a cabo los dos pasos de PCR punto final.

Primer paso de PCR:

Amplicón Chordata (16Smt), reacción para 25 µl:

Reactivos	Volumen de reacción (µl)
H ₂ O dde	9.7
Taq Buffer (10X)	2.75
MgCl ₂ (25 mM)	4
dNTP mix (10 mM)	0.55
Oligo sentido (10 mM)	0.5
Oligo antisentido (10 mM)	0.5
Oligo bloqueador (10 mM)	5
Taq Polimerasa (50 nM/µl)	1
ADN genómico (20 ng)	1

Programa de PCR			
		°C	Tiempo
	Desnaturalización inicial	95	15 min.
34 ciclos	Desnaturalización	94	30 s
	Alineación	65.5	90 s
	Extensión	72	45 s
	Extensión final	72	2 min.

Amplicón Cephalopoda (16Smt), reacción para 25 µl:

Reactivos	Volumen de reacción (µl)
H ₂ O dde	14.7
Taq Buffer (10X)	2.75
MgCl ₂ (25 mM)	4
dNTP mix (10 mM)	0.55
Oligo sentido (10 mM)	0.5
Oligo antisentido (10 mM)	0.5
Oligo bloqueador (10 mM)	-
Taq Polimerasa (50 nM/µl)	1
ADN genómico (20 ng)	1

Programa de PCR			
		°C	Tiempo
	Desnaturalización inicial	95	15 min.
34 ciclos	Desnaturalización	94	30 s
	Alineación	57	90 s
	Extensión	72	60 s
	Extensión final	72	2 min.

Amplicón Eukaryota (ARNr 18S), reacción para 25 µl:

Reactivos	Volumen de reacción (µl)
H ₂ O dde	10.7
Taq Buffer (10X)	2.75
MgCl ₂ (25 mM)	4
dNTP mix (10 mM)	0.55
Oligo sentido (10 mM)	0.5
Oligo antisentido (10 mM)	0.5
Oligo bloqueador (10 mM)	4
Taq Polimerasa (50 nM/µl)	1
ADN genómico (20 ng)	1

Programa de PCR			
		°C	Tiempo
	Desnaturalización inicial	94	3 min.
35 ciclos	Desnaturalización	94	45 s
	Primera alineación	65	15 s
	Segunda alineación	57	30 s
	Extensión	72	90 s
	Extensión final	72	10 min.

Segundo paso de PCR:

Índices, reacción para 25 µl:

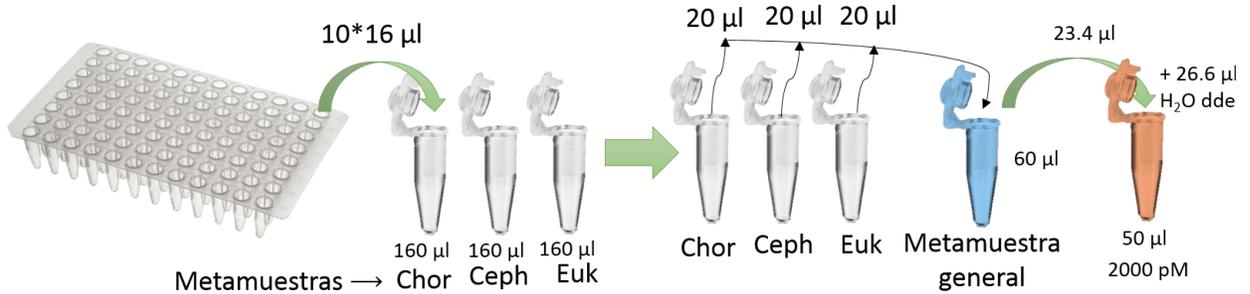
Reactivos	Volumen de reacción (µl)
H ₂ O dde	13.7
Taq Buffer (10X)	2.75
MgCl ₂ (25 mM)	4
dNTP mix (10 mM)	0.55
Oligo sentido (10 mM)	1
Oligo antisentido (10 mM)	1
Oligo bloqueador (10 mM)	-
Taq Polimerasa (0.5 nM/µl)	1
ADN genómico (20 ng)	1

Programa de PCR			
		°C	Tiempo
	Desnaturalización inicial	95	3 min.
20 ciclos	Desnaturalización	95	30 s
	Alineación	61	30 s
	Extensión	72	5 min.
	Extensión final	72	5 min.

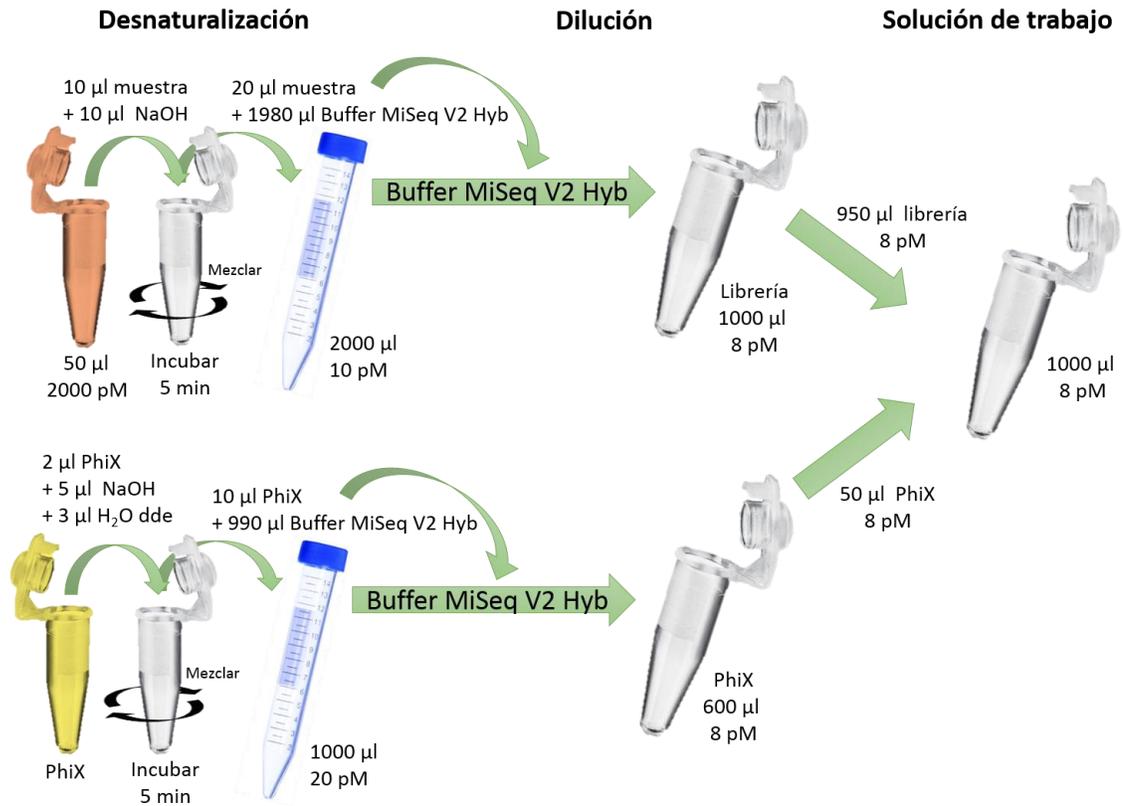
Anexo 5

Esquema sobre la preparación de las metamuestras y formación de las librerías.

Formación de metamuestras a partir de las librerías generadas

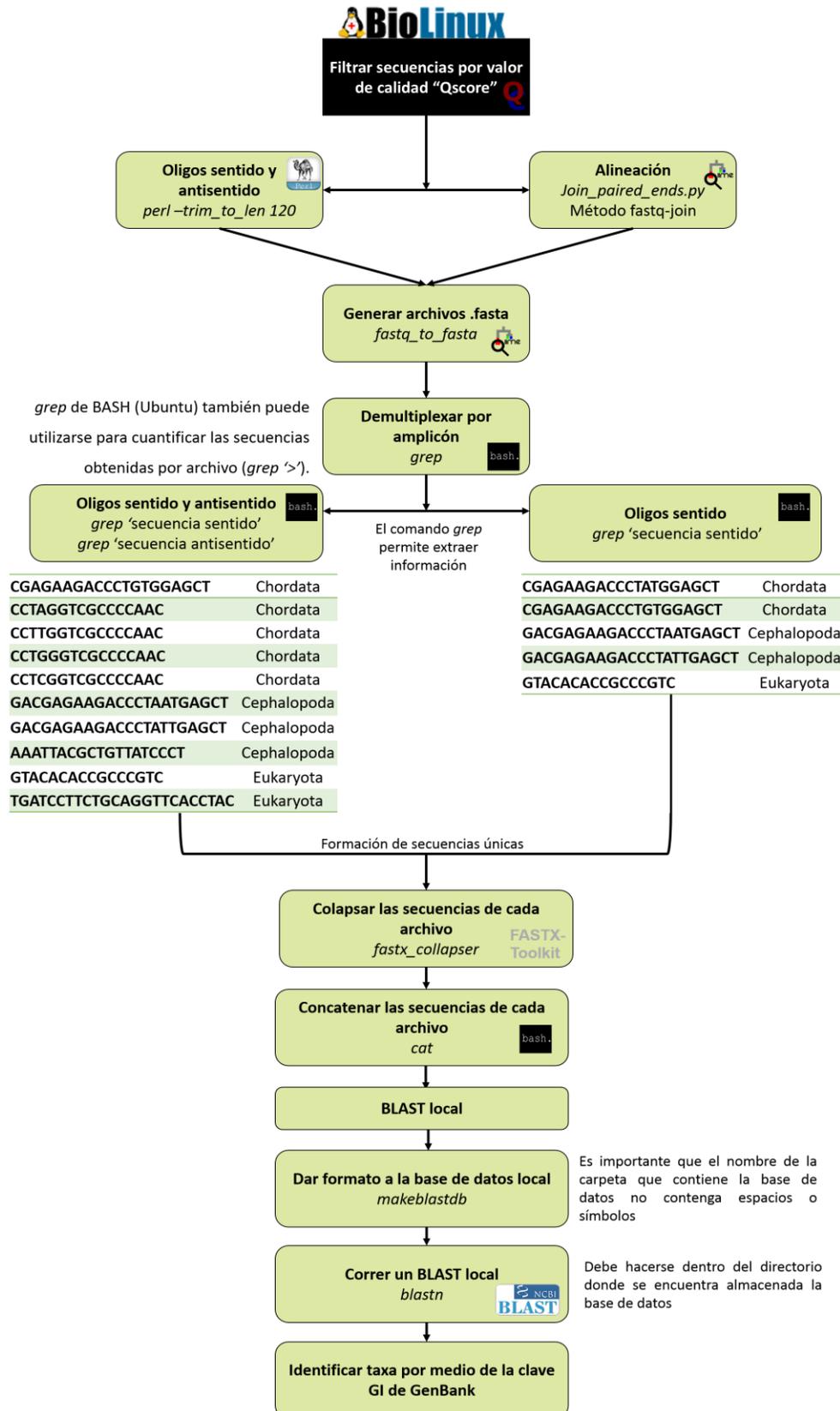


Solución de trabajo



Anexo 6

Esquema sobre el análisis *in silico* de las secuencias obtenidas.



Anexo 7

Especies presa de la subespecie *Phoca vitulina richardii* en Isla Todos Santos Sur. El orden de las especies está en función de la frecuencia de ocurrencia de cada taxa en orden descendente. Los datos sobre el nivel trófico y la talla de los organismos fueron obtenidos a través de FishBase, CephBase, EOL y SeaLifeBase.

	Especie	Nombre común	Familia	%FO	Nivel trófico	Talla (cm)
1	<i>Chilara taylori</i>	Congriperla moteada	Ophidiidae	100	4.34	30
2	<i>Citharichthys xanthostigma</i>	Lenguado alón	Paralichthyidae	100	4.07	17
3	<i>Synodus lucioceps</i>	Lagarto lucio	Synodontidae	100	3.1	30
4	<i>Atractoscion nobilis</i>	Corvina Blanca	Sciaenidae	75	3.6	100
5	<i>Microstomus pacificus</i>	Platija escurridiza	Pleuronectidae	75	3.4	40
6	<i>Octopus rubescens</i>	Pulpo rojo del Pacífico	Octopodidae	75	3.33	45
7	<i>Porichthys notatus</i>	Sapo cabezón	Batrachoididae	75	3.86	38
8	<i>Raja inornata</i>	Raya de California	Rajidae	75	3.1	45
9	<i>Xystreurus liolepis</i>	Lenguado cola de abanico	Paralichthyidae	75	4.24	25
10	<i>Citharichthys stigmaeus</i>	Lenguado pecoso	Paralichthyidae	50	3.43	20
11	<i>Lyopsetta exilis</i>	Platija flaca	Pleuronectidae	50	2.7	35
12	<i>Zaniolepis latipinnis</i>	Cepillo espina larga	Hexagrammidae	50	3.45	30
13	<i>Chrysaora fuscescens</i>	Ortiga del Pacífico	Pelagiidae	25	4.35	30
14	<i>Crangon</i> spp.	Camarón	Crangonidae	25	3.22	8
15	<i>Doryteuthis opalescens</i>	Calamar de California	Loliginidae	25	3.5	36.5
16	<i>Engraulis mordax</i>	Anchoveta norteña	Engraulidae	25	3.86	15
17	<i>Eptatretus stoutii</i>	Mixínido del Pacífico	Myxinidae	25	4.04	63.5
18	<i>Genyonemus lineatus</i>	Corvineta blanca	Sciaenidae	25	3.8	41
19	Infraorden Brachyura	Cangrejo	Infraorden Brachyura	25	2.84	NA
20	<i>Merluccius productus</i>	Merluza norteña	Merlucciidae	25	2	60
21	<i>Octopus californicus</i>	Pulpo ojo grande de California	Octopodidae	25	4.5	40
22	<i>Sardinops sagax</i>	Sardina Monterrey	Clupeidae	25	3.5	20
23	<i>Soestia zonaria</i>	Salpa	Salpidae	25	3.44	6
24	<i>Zaniolepis frenata</i>	Cepillo espina corta	Hexagrammidae	25	3.27	25

Anexo 8

Especies presa de la subespecie *Phoca vitulina richardii* en Isla Todos Santos Sur identificadas a través del análisis de restos duros y herramientas de secuenciación masiva.

TS1		TS31	
Restos sólidos	Metagenómica	Restos sólidos	Metagenómica
<i>Citharichthys sordidus</i>	<i>Atractoscion nobilis</i>	<i>Doryteuthis opalescens</i>	<i>Atractoscion nobilis</i>
<i>Engraulis mordax</i>	<i>Chilara taylori</i>	<i>Microstomus pacificus</i>	<i>Chilara taylori</i>
	<i>Citharichthys stigmaeus</i>	<i>Octopus spp.</i>	<i>Citharichthys stigmaeus</i>
	<i>Citharichthys xanthostigma</i>		<i>Citharichthys xanthostigma</i>
	<i>Crangon franciscorum</i>		<i>Lyopsetta exilis</i>
	<i>Doryteuthis opalescens</i>		<i>Microstomus pacificus</i>
	<i>Engraulis mordax</i>		<i>Octopus californicus</i>
	<i>Genyonemus lineatus</i>		<i>Octopus rubescens</i>
	Infraorden Brachyura		<i>Porichthys notatus</i>
	<i>Merluccius productus</i>		<i>Soestia zonaria</i>
	<i>Microstomus pacificus</i>		<i>Synodus lucioceps</i>
	<i>Octopus rubescens</i>		<i>Xystreurys liolepis</i>
	<i>Raja inornata</i>		
	<i>Synodus lucioceps</i>		
	<i>Xystreurys liolepis</i>		
	<i>Zaniolepis frenata</i>		
	<i>Zaniolepis latipinnis</i>		

TS38		TS39	
Restos sólidos	Metagenómica	Restos sólidos	Metagenómica
<i>Synodus lucioceps</i>	<i>Atractoscion nobilis</i>	<i>Doryteuthis opalescens</i>	<i>Chilara taylori</i>
	<i>Chilara taylori</i>		<i>Chrysaora fuscescens</i>
	<i>Citharichthys xanthostigma</i>		<i>Citharichthys xanthostigma</i>
	<i>Octopus rubescens</i>		<i>Eptatretus stoutii</i>
	<i>Porichthys notatus</i>		<i>Lyopsetta exilis</i>
	<i>Raja inornata</i>		<i>Microstomus pacificus</i>
	<i>Sardinops sagax</i>		<i>Porichthys notatus</i>
	<i>Synodus lucioceps</i>		<i>Raja inornata</i>
	<i>Xystreurys liolepis</i>		<i>Synodus lucioceps</i>
	<i>Zaniolepis latipinnis</i>		

Anexo 9

Especies presa de la subespecie *Phoca vitulina richardii* en Isla San Jerónimo. El orden de las especies está en función de la frecuencia de ocurrencia de cada taxa en orden descendente. Los datos sobre el nivel trófico y la talla de los organismos fueron obtenidos a través de FishBase, CephBase, EOL y SeaLifeBase.

	Especie	Nombre común	Familia	%FO	Nivel trófico	Talla (cm)
1	<i>Atractoscion nobilis</i>	Corvina Blanca	Sciaenidae	100	3.6	100
2	<i>Citharichthys stigmaeus</i>	Lenguado pecoso	Paralichthyidae	100	3.4	17
3	<i>Citharichthys xanthostigma</i>	Lenguado alón	Paralichthyidae	100	3.6	20
4	<i>Porichthys notatus</i>	Sapo cabezón	Batrachoididae	100	4.04	38
5	<i>Synodus lucioceps</i>	Lagarto lucio	Synodontidae	100	4.5	30
6	<i>Chilara taylori</i>	Congriperla moteada	Ophidiidae	75	4.07	30
7	<i>Doryteuthis opalescens</i>	Calamar de California	Loliginidae	75	3.86	36.5
8	<i>Genyonemus lineatus</i>	Corvineta blanca	Sciaenidae	75	3.43	41
9	<i>Octopus rubescens</i>	Pulpo rojo del Pacífico	Octopodidae	75	3.86	45
10	<i>Raja inornata</i>	Raya de California	Rajidae	75	3.8	45
11	<i>Chromis punctipinnis</i>	Castañeta herrera	Pomacentridae	50	2.73	25
12	<i>Chrysaora fuscescens</i>	Ortiga del Pacífico	Pelagiidae	50	4.35	30
13	<i>Prionotus stephanophrys</i>	Rubio volador	Triglidae	50	3.5	30
14	<i>Eptatretus stoutii</i>	Mixínido del Pacífico	Myxinidae	25	4.24	63.5
15	Fam. Veneridae	Almeja	Veneridae	25	2	NA
16	<i>Kathetostoma avertuncus</i>	Miracielo sapo	Uranoscopidae	25	4.29	32
17	<i>Larimus pacificus</i>	Corvineta tambor	Sciaenidae	25	4.46	18
18	<i>Lepophidium</i> spp.	Congriperla	Ophidiidae	25	3.7	30
19	<i>Merluccius productus</i>	Merluza norteña	Merlucciidae	25	4.35	60
20	<i>Microstomus pacificus</i>	Platija escurridiza	Pleuronectidae	25	3.22	40
21	<i>Parophrys vetulus</i>	Platija limón	Pleuronectidae	25	3.39	57
22	<i>Peprilus simillimus</i>	Palometa plateada	Stromateidae	25	4	28
23	<i>Pleuronichthys verticalis</i>	Platija espinosa	Pleuronectidae	25	3.1	37
24	Sebastes spp.	Rocote	Scorpaenidae	25	3.8	66
25	<i>Zalembeius rosaceus</i>	Perca	Embiotocidae	25	3.3	20
26	<i>Zaniolepis frenata</i>	Cepillo espina corta	Hexagrammidae	25	3.44	25

Anexo 10

Especies presa de la subespecie *Phoca vitulina richardii* en Isla San Jerónimo identificadas a través del análisis de restos duros y herramientas de secuenciación masiva.

SJ49		SJ55	
Restos sólidos	Metagenómica	Restos sólidos	Metagenómica
<i>Citharichthys sordidus</i>	<i>Atractoscion nobilis</i>	<i>Citharichthys sordidus</i>	<i>Atractoscion nobilis</i>
<i>Citharichthys stigmaeus</i>	<i>Chilara taylori</i>	<i>Citharichthys stigmaeus</i>	<i>Chilara taylori</i>
<i>Chilara taylori</i>	<i>Citharichthys stigmaeus</i>	<i>Chilara taylori</i>	<i>Citharichthys stigmaeus</i>
<i>Lepidopsetta bilineata</i>	<i>Citharichthys xanthostigma</i>	<i>Octopus</i> spp.	<i>Citharichthys xanthostigma</i>
<i>Doryteuthis opalescens</i>	<i>Doryteuthis opalescens</i>	<i>Porichthys notatus</i>	<i>Doryteuthis opalescens</i>
<i>Microstomus pacificus</i>	<i>Eptatretus stoutii</i>		<i>Genyonemus lineatus</i>
<i>Octopus</i> spp.	<i>Kathetostoma averruncus</i>		<i>Octopus rubescens</i>
<i>Porichthys notatus</i>	<i>Lepophidium</i> sp.		<i>Porichthys notatus</i>
	<i>Microstomus pacificus</i>		<i>Raja inornata</i>
	<i>Octopus rubescens</i>		<i>Sebastes</i> sp.
	<i>Parophrys vetulus</i>		<i>Synodus lucioceps</i>
	<i>Porichthys notatus</i>		
	<i>Raja inornata</i>		
	<i>Synodus lucioceps</i>		

SJ49		SJ55	
Restos sólidos	Metagenómica	Restos sólidos	Metagenómica
<i>Citharichthys sordidus</i>	<i>Atractoscion nobilis</i>	<i>Genyonemus lineatus</i>	<i>Atractoscion nobilis</i>
<i>Citharichthys stigmaeus</i>	<i>Chromis punctipinnis</i>	<i>Peprillus semillimus</i>	<i>Chilara taylori</i>
<i>Cymatogaster aggregata</i>	<i>Chrysaora fuscescens</i>	<i>Synodus lucioceps</i>	<i>Chromis punctipinnis</i>
<i>Doryteuthis opalescens</i>	<i>Citharichthys stigmaeus</i>		<i>Chrysaora fuscescens</i>
<i>Octopus</i> spp.	<i>Citharichthys xanthostigma</i>		<i>Citharichthys stigmaeus</i>
	<i>Doryteuthis opalescens</i>		<i>Citharichthys xanthostigma</i>
	Fam. Veneridae		<i>Genyonemus lineatus</i>
	<i>Genyonemus lineatus</i>		<i>Larimus pacificus</i>
	<i>Merluccius productus</i>		<i>Peprillus simillimus</i>
	<i>Octopus rubescens</i>		<i>Porichthys notatus</i>
	<i>Pleuronichthys verticalis</i>		<i>Prionotus stephanophrys</i>
	<i>Porichthys notatus</i>		<i>Synodus lucioceps</i>
	<i>Prionotus stephanophrys</i>		<i>Zalembeius rosaceus</i>
	<i>Raja inornata</i>		
	<i>Synodus lucioceps</i>		
	<i>Zaniolepis frenata</i>		

Anexo 11

Especies presa de la subespecie *Phoca vitulina richardii* en Isla Natividad. El orden de las especies está en función de la frecuencia de ocurrencia de cada taxa en orden descendente. Los datos sobre el nivel trófico y la talla de los organismos fueron obtenidos a través de FishBase, CephBase, EOL y SeaLifeBase.

Especies	Nombre común	Familia	%FO	Nivel trófico	Talla (cm)
<i>Atractoscion nobilis</i>	Corvina Blanca	Sciaenidae	100	3.6	100
<i>Citharichthys xanthostigma</i>	Lenguado alón	Paralichthyidae	100	3.6	20
<i>Synodus lucioceps</i>	Lagarto lucio	Synodontidae	100	4.5	30
<i>Chilara taylori</i>	Congriperla moteada	Ophidiidae	75	4.07	30
<i>Prionotus stephanophrys</i>	Rubio volador	Triglidae	75	3.5	30
<i>Porichthys notatus</i>	Sapo cabezón	Batrachoididae	50	4.04	38
<i>Raja inornata</i>	Raya de California	Rajidae	50	3.8	45
<i>Zaniolepis frenata</i>	Cepillo espina corta	Hexagrammidae	50	3.44	25
<i>Citharichthys sordidus</i>	Lenguado arenero del Pacífico	Paralichthyidae	25	3.46	41
<i>Hemisquilla californiensis</i>	Camarón mantis	Hemisquillidae	25	2.4	32
<i>Hippoglossina stomata</i>	Lenguado bocón	Paralichthyidae	25	4	35
<i>Kathetostoma averruncus</i>	Miracielo sapo	Uranoscopidae	25	4.29	32
<i>Lepophidium</i> spp.	Congriperla	Ophidiidae	25	3.7	30
<i>Merluccius productus</i>	Merluza norteña	Merlucciidae	25	4.35	60
<i>Microstomus pacificus</i>	Platija escurridiza	Pleuronectidae	25	3.22	40
<i>Octopus rubescens</i>	Pulpo rojo del Pacífico	Octopodidae	25	3.86	45
<i>Pleuronichthys coenosus</i>	Platija de fango	Pleuronectidae	25	3.16	36
<i>Pleuronichthys ritteri</i>	Platija moteada	Pleuronectidae	25	3.2	30
<i>Porichthys myriaster</i>	Sapo aleta manchada	Batrachoididae	25	4.29	51
<i>Xystreurus liolepis</i>	Lenguado cola de abanico	Paralichthyidae	25	3.5	25
<i>Zaniolepis latipinnis</i>	Cepillo espina larga	Hexagrammidae	25	3.27	30

Anexo 12

Especies presa de la subespecie *Phoca vitulina richardii* en Isla Natividad identificadas a través del análisis de restos duros y herramientas de secuenciación masiva.

N17		N21	
Restos sólidos	Metagenómica	Restos sólidos	Metagenómica
<i>Citharichthys sordidus</i>	<i>Atractoscion nobilis</i>	-	<i>Atractoscion nobilis</i>
<i>Chilara taylori</i>	<i>Chilara taylori</i>		<i>Chilara taylori</i>
<i>Leptocottus armatus</i>	<i>Citharichthys sordidus</i>		<i>Citharichthys xanthostigma</i>
<i>Oxyjulis californica</i>	<i>Citharichthys xanthostigma</i>		<i>Microstomus pacificus</i>
<i>Synodus lucioceps</i>	<i>Hemisquilla californiensis</i>		<i>Porichthys notatus</i>
	<i>Kathetostoma avertuncus</i>		<i>Prionotus stephanophrys</i>
	<i>Lepophidium sp.</i>		<i>Synodus lucioceps</i>
	<i>Merluccius productus</i>		
	<i>Octopus rubescens</i>		
	<i>Pleuronichthys coenosus</i>		
	<i>Pleuronichthys ritteri</i>		
	<i>Porichthys myriaster</i>		
	<i>Porichthys notatus</i>		
	<i>Prionotus stephanophrys</i>		
	<i>Raja inornata</i>		
	<i>Synodus lucioceps</i>		
	<i>Xystreureys liolepis</i>		
	<i>Zaniolepis frenata</i>		
	<i>Zaniolepis latipinnis</i>		

N24		N30	
Restos sólidos	Metagenómica	Restos sólidos	Metagenómica
<i>Citharichthys spp.</i>	<i>Atractoscion nobilis</i>	<i>Citharichthys sordidus</i>	<i>Atractoscion nobilis</i>
<i>Citharichthys sordidus</i>	<i>Chilara taylori</i>	<i>Synodus lucioceps</i>	<i>Citharichthys xanthostigma</i>
<i>Citharichthys stigmaeus</i>	<i>Citharichthys xanthostigma</i>		<i>Synodus lucioceps</i>
<i>Chilara taylori</i>	<i>Hippoglossina stomata</i>		
<i>Hippoglossina stomata</i>	<i>Prionotus stephanophrys</i>		
<i>Ophidion scrippsae</i>	<i>Raja inornata</i>		
<i>Porichthys myriaster</i>	<i>Synodus lucioceps</i>		
<i>Porichthys notatus</i>	<i>Zaniolepis frenata</i>		
<i>Prionotus stephanophrys</i>			
<i>Synodus lucioceps</i>			

Anexo 13

Especies presa de la subespecie *Phoca vitulina richardii* en Isla San Roque. El orden de las especies está en función de la frecuencia de ocurrencia de cada taxa en orden descendente. Los datos sobre el nivel trófico y la talla de los organismos fueron obtenidos a través de FishBase, CephBase, EOL y SeaLifeBase.

Especies	Nombre común	Familia	%FO	Nivel trófico	Talla (cm)
<i>Chilara taylori</i>	Congriperla moteada	Ophidiidae	100	4.07	30
<i>Citharichthys sordidus</i>	Lenguado arenoso del Pacífico	Paralichthyidae	100	3.46	41
<i>Citharichthys xanthostigma</i>	Lenguado alón	Paralichthyidae	100	3.6	20
<i>Hippoglossina stomata</i>	Lenguado bocón	Paralichthyidae	100	4	35
<i>Pleuroncodes planipes</i>	Langostilla roja	Munididae	100	2.5	7.5
<i>Raja inornata</i>	Raya de California	Rajidae	100	3.8	45
<i>Sardinops sagax</i>	Sardina Monterrey	Clupeidae	100	2.84	20
<i>Synodus lucioceps</i>	Lagarto lucio	Synodontidae	100	4.5	30
<i>Atractoscion nobilis</i>	Corvina Blanca	Sciaenidae	75	3.6	100
<i>Hemisquilla californiensis</i>	Camarón mantis	Hemisquillidae	75	2.4	32
<i>Microstomus pacificus</i>	Platija escurridiza	Pleuronectidae	75	3.22	40
<i>Merluccius productus</i>	Merluza norteña	Merlucciidae	50	4.35	60
<i>Prionotus stephanophrys</i>	Rubio volador	Triglidae	50	3.5	30
<i>Sicyonia laevigata</i>	Camarón roca	Sicyoniidae	50	2.7	10
<i>Zaniolepis frenata</i>	Cepillo espina corta	Hexagrammidae	50	3.44	25
<i>Citharichthys stigmaeus</i>	Lenguado pecoso	Paralichthyidae	25	3.4	17
<i>Crangon</i> spp.	Camarón	Crangonidae	25	3.22	8
<i>Genyonemus lineatus</i>	Corvineta blanca	Sciaenidae	25	3.43	41
Infraorden Brachyura	Cangrejo	Infraorden Brachyura	25	2.84	NA
<i>Kathetostoma averruncus</i>	Miracielo sapo	Uranoscopidae	25	4.29	32
<i>Leptocottus armatus</i>	Charrasco de astas	Cottidae	25	3.68	35.5
<i>Octopus rubescens</i>	Pulpo rojo del Pacífico	Octopodidae	25	3.86	45
<i>Paralichthys californicus</i>	Lenguado de California	Paralichthyidae	25	4.5	152
<i>Penaeus vannamei</i>	Camarón blanco	Penaeidae	25	2.5	23
<i>Porichthys notatus</i>	Sapo cabezón	Batrachoididae	25	4.04	38
<i>Scorpaena guttata</i>	Escorpión californiano	Scorpaenidae	25	3.9	43
<i>Sebastes macdonaldi</i>	Rocote mexicano	Scorpaenidae	25	3.8	66
<i>Symphurus atricaudus</i>	Lengua californiana	Cynoglossidae	25	3.39	13
<i>Xystreurus liolepis</i>	Lenguado cola de abanico	Paralichthyidae	25	3.5	25

Anexo 14

Especies presa de la subespecie *Phoca vitulina richardii* en Isla San Roque identificadas a través del análisis de restos duros y herramientas de secuenciación masiva.

SR6b		SR14b	
Restos sólidos	Metagenómica	Restos sólidos	Metagenómica
<i>Citharichthys sordidus</i>	<i>Atractoscion nobilis</i>	-	<i>Chilara taylori</i>
<i>Chilara taylori</i>	<i>Chilara taylori</i>		<i>Citharichthys sordidus</i>
<i>Microstomus pacificus</i>	<i>Citharichthys sordidus</i>		<i>Citharichthys stigmaeus</i>
<i>Sebastes</i> spp.	<i>Citharichthys xanthostigma</i>		<i>Citharichthys xanthostigma</i>
<i>Synodus lucioceps</i>	<i>Hemisquilla californiensis</i>		<i>Hemisquilla californiensis</i>
<i>Zaniolepis</i> spp.	<i>Hippoglossina stomata</i>		<i>Hippoglossina stomata</i>
	<i>Microstomus pacificus</i>		<i>Kathetostoma averruncus</i>
	<i>Octopus rubescens</i>		<i>Merluccius productus</i>
	<i>Pleuroncodes planipes</i>		<i>Microstomus pacificus</i>
	<i>Porichthys notatus</i>		<i>Pleuroncodes planipes</i>
	<i>Raja inornata</i>		<i>Prionotus stephanophrys</i>
	<i>Sardinops sagax</i>		<i>Raja inornata</i>
	<i>Sebastes macdonaldi</i>		<i>Sardinops sagax</i>
	<i>Synodus lucioceps</i>		<i>Symphurus atricaudus</i>
	<i>Zaniolepis frenata</i>		<i>Synodus lucioceps</i>

SR16b		SR43b	
Restos sólidos	Metagenómica	Restos sólidos	Metagenómica
<i>Citharichthys sordidus</i>	<i>Atractoscion nobilis</i>	<i>Citharichthys</i> spp.	<i>Atractoscion nobilis</i>
<i>Porichthys notatus</i>	<i>Chilara taylori</i>	<i>Citharichthys sordidus</i>	<i>Chilara taylori</i>
<i>Sebastes</i> spp.	<i>Citharichthys sordidus</i>	<i>Citharichthys stigmaeus</i>	<i>Citharichthys sordidus</i>
	<i>Citharichthys xanthostigma</i>	<i>Hippoglossina stomata</i>	<i>Citharichthys xanthostigma</i>
	<i>Crangon franciscorum</i>	<i>Octopus</i> spp.	<i>Genyonemus lineatus</i>
	<i>Hemisquilla californiensis</i>	<i>Porichthys notatus</i>	<i>Hippoglossina stomata</i>
	<i>Hippoglossina stomata</i>	<i>Symphurus atricauda</i>	<i>Paralichthys californicus</i>
	Infraorden Brachyura		<i>Penaeus vannamei</i>
	<i>Leptocottus armatus</i>		<i>Pleuroncodes planipes</i>
	<i>Merluccius productus</i>		<i>Prionotus stephanophrys</i>
	<i>Microstomus pacificus</i>		<i>Raja inornata</i>
	<i>Pleuroncodes planipes</i>		<i>Sardinops sagax</i>
	<i>Raja inornata</i>		<i>Scorpaena guttata</i>
	<i>Sardinops sagax</i>		<i>Sicyonia laevigata</i>
	<i>Sicyonia laevigata</i>		<i>Synodus lucioceps</i>
	<i>Synodus lucioceps</i>		<i>Xystreurus liolepis</i>
	<i>Zaniolepis frenata</i>		

Anexo 15

Proporción de presas consumidas por la foca de puerto en Isla Todos Santos Sur. Los datos incluyen el listado de especies junto al número de secuencias y porcentaje que le corresponde por muestra (TS1, TS31, TS38 y TS39).

	TS1												TS31											
	Chordata				Cephalopoda				Eukaryota				Chordata				Cephalopoda				Eukaryota			
	5'-3'		3'-5'		5'-3'		3'-5'		5'-3'		3'-5'		5'-3'		3'-5'		5'-3'		3'-5'		5'-3'		3'-5'	
Presas	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
<i>Atractoscion nobilis</i>	2	0.01	1	0.01	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	362	3.17	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Chilara taylori</i>	154	0.77	77	0.66	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	0.01	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Chrysaora fuscescens</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Citharichthys stigmaeus</i>	209	1.05	59	0.51	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.01	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Citharichthys xanthostigma</i>	537	2.69	335	2.87	40	0.34	0	0.0	0	0.0	0	0.0	172	0.89	118	1.03	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Crangon</i> spp.	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	6	0.04	5	0.03	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Doryteuthis opalescens</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	28	0.18	26	0.18	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Engraulis mordax</i>	40	0.20	19	0.16	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Eptatretus stoutii</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Genyonemus lineatus</i>	70	0.35	26	0.22	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Infraorden Brachyura	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	0.01	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Lyopsetta exilis</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	141	0.73	78	0.68	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Merluccius productus</i>	1	0.01	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Microstomus pacificus</i>	0	0.0	1	0.01	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1506	7.78	839	7.35	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Octopus californicus</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.01	24	0.23	0	0.0	0	0.0
<i>Octopus rubescens</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	104	0.89	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.01	0	0.0	0	0.0
<i>Porichthys notatus</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	310	1.60	175	1.53	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Raja inornata</i>	199	1.00	98	0.84	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Sardinops sagax</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Soestia zonaria</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	6	0.004	0	0.0
<i>Synodus lucioceps</i>	1078	5.4	570	4.89	48	0.41	54	0.46	0	0.0	0	0.0	2	0.01	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0

<i>Merluccius productus</i>	1	0.01	1	0.02	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Microstomus pacificus</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Octopus rubescens</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	3	0.03	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Parophrys vetulus</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Peprilus simillimus</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	444	3.19	235	3.05	248	2.34	253	2.40	0	0.0	0	0.0
<i>Pleuronichthys verticalis</i>	1	0.01	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Porichthys notatus</i>	2	0.02	2	0.03	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Prionotus stephanophrys</i>	5	0.04	5	0.08	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	0.03	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Raja inornata</i>	1	0.01	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Sebastes spp.</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Synodus lucioceps</i>	298	2.58	175	2.82	30	0.25	37	0.31	0	0.0	0	0.0	435	3.13	241	3.1	100	0.94	107	1.02	0	0.0	0	0.0
<i>Zalemnius rosaceus</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	4	0.03	2	0.03	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Zaniolepis frenata</i>	4	0.03	2	0.03	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Total de secuencias por presa	497		308		970		1103		329		293		1311		671		712		732		21		19	
Mamíferos																								
<i>Phoca vitulina richardii</i>	1361	11.76	663	10.69	1690	17.11	1865	15.71	0	0.0	0	0.0	1968	14.15	1158	15.04	1919	18.09	2142	20.36	0	0.0	0	0.0
<i>Homo sapiens</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Canis lupus familiaris</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.01	0	0.0

Anexo 18

Proporción de presas consumidas por la foca de puerto en Isla San Roque. Los datos incluyen el listado de especies junto al número de secuencias y porcentaje que le corresponde por muestra (SR6b, SR14b, SR16b y SR43b).

Presas	SR6b												SR14b													
	Chordata				Cephalopoda				Eukaryota				Chordata				Cephalopoda				Eukaryota					
	5'-3'		3'-5'		5'-3'		3'-5'		5'-3'		3'-5'		5'-3'		3'-5'		5'-3'		3'-5'		5'-3'		3'-5'			
No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	
<i>Atractoscion nobilis</i>	50	0.31	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Chilara taylori</i>	260	1.63	132	1.38	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.005	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Citharichthys sordidus</i>	5	0.03	12	0.13	1	0.01	0	0.0	0	0.0	0	0.0	8	0.04	8	0.06	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Citharichthys stigmatæus</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.005	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Citharichthys xanthostigma</i>	4495	28.13	2381	24.91	12	0.09	15	0.11	0	0.0	0	0.0	7573	35.3	4103	32.26	128	0.74	143	0.83	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Crangon spp.</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Genyonemus lineatus</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Hemisquilla californiensis</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.01	1	0.01	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	9	0.07	0	0.0	0	0.0
<i>Hippoglossina stomata</i>	671	4.20	367	3.84	33	0.25	57	0.44	0	0.0	0	0.0	40	0.19	17	0.13	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
Infraorden Brachyura	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Kathetostoma averruncus</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	242	1.13	124	0.97	0	0.0	14	0.08	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Leptocottus armatus</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Merluccius productus</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	3	0.01	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Microstomus pacificus</i>	2	0.01	1	0.01	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.005	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Octopus rubescens</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1656	12.69	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Paralichthys californicus</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Penaeus vannamei</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Pleuroncodes planipes</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	9	0.06	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	22	0.17	0	0.0	0	0.0
<i>Porichthys notatus</i>	4	0.03	1	0.01	5	0.04	6	0.05	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Prionotus stephanophrys</i>	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	147	0.7	69	0.54	8	0.05	10	0.06	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Raja inornata</i>	2	0.01	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	0.005	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<i>Sardinops sagax</i>	1	0.01	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1733	8.08	948	7.45	40	0.23	69	0.40	0	0.0	528	4.44	0	0.0

