

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA



Facultad de Ciencias

Desarrollo de un protocolo de *Metabarcoding* para la identificación de presas de *Totoaba macdonaldi* a partir del contenido estomacal

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

FADYA HUSSEIN MROUE RUIZ

DIRECTOR DE TESIS:

YOLANDA SCHRAMM URRUTIA

Ensenada, Baja California

Marzo del 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

Desarrollo de un protocolo de *Metabarcoding* para la identificación de presas de *Totoaba macdonaldi* a partir del contenido estomacal

TESIS PROFESIONAL

QUE PRESENTA

FADYA HUSSEIN MROUE RUIZ

APROBADO POR:

DRA. YOLANDA SCHRAMM URRUTIA
Presidenta del jurado

DRA. IVONE GIFFARD MENA
Sinodal

DRA. ASUNCIÓN LAGO LESTÓN
Sinodal

DR. JULIO ENRIQUE VALENCIA SUAREZ
Sinodal

DRA. ALICIA ABADIA CARDOSO
Sinodal

Agradecimientos

Gracias a la Universidad Autónoma de Baja California por el financiamiento del proyecto a través de la Convocatoria Interna de Apoyo a Proyectos de Investigación. Así como a SEMARNAT por los permisos de vida silvestre y a PROFEPA por la donación de los ejemplares de totoaba que posibilitaron este estudio. Además, agradezco al Dr. Luis Enríquez Paredes y al Dr. Conal True por el apoyo brindado a través de su trabajo y experiencia con totoabas.

Con especial aprecio agradezco a mi directora, la Dra. Yolanda Schramm, por mostrarme la clase de mentora que aspiro ser algún día para mis estudiantes. Con infinita paciencia, siempre disponible, siempre apoyándome y ayudándome a creer en mi trabajo y en las habilidades que me ayudó a desarrollar. Gracias por ser cómplice de mis planes, por las infinitas cartas de recomendación y por siempre escucharme.

A mi comité, que puso gran esfuerzo en hacer de este trabajo la mejor versión posible: a la Dra. Ivone Giffard por ver mi potencial a tan temprana etapa de mi carrera, creer en mí y brindarme las oportunidades que me llevaron hasta aquí hoy; al Dr. Julio Valencia por ser un excelente profesor y siempre estar dispuesto a ayudarme en mis proyectos; a la Dra. Asunción Lago por abrirme las puertas de su laboratorio y por su tiempo al enseñarme sobre su área de especialidad; a la Dra. Alicia Abadía por su tiempo y disposición en ayudarme a desarrollar este trabajo. A cada uno de los miembros del comité les admiro y agradezco profundamente.

A la Dra. Jennyfers Chong y a la estudiante de doctorado Arlette Pacheco, por su participación en el proyecto. Les agradezco todo el tiempo, paciencia y consideración que tuvieron para hacerme entender la complejidad de la secuenciación y la mejor manera de analizar las secuencias.

Agradezco con gran apreciación el haber coincidido con mis compañeros biólogos, que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme, apoyarme, jugar uno y sacarme sonrisas durante nuestro trayecto juntos. Especialmente a las extranjeras: Carolina, Mariana y Valeria. Llevo su amistad en mi corazón y sé que no estaría donde estoy sin su apoyo, gracias por sus enseñanzas.

Gracias a familia. Mis padres, incluyendo a mi segunda mamá y mis hermanos por apoyarme en todos mis sueños y motivarme a no darme por vencida por más complicado que fue el camino. Gracias también a mi familia epigenética y a cualquier persona que me haya dado una palabra de apoyo en el proceso.

Finalmente, agradezco a todas las personas que estuvieron detrás de mí y trazaron el camino para que yo pudiera desenvolverme en la ciencia. Camino en hombros de gigantes.

Resumen de la tesis de **Fadya Hussein Mroue Ruiz** presentada como requisito parcial para la obtención de la Licenciatura en Biología. Ensenada, Baja California, México.

Marzo de 2021.

Desarrollo de un protocolo de *Metabarcoding* para la identificación de presas de *Totoaba macdonaldi* a partir del contenido estomacal

Resumen aprobado:

Totoaba macdonaldi es una especie de pez en peligro de extinción, endémica del golfo de California y una fuente de sustento para las comunidades en la costa. Debido a la sobre explotación, el gobierno mexicano prohibió su pesca en 1975. Sin embargo, aún es ilegalmente pescada y exportada a China debido a que su vejiga natatoria es de gran valor en la medicina tradicional china. A pesar de su estado de protección, poco se sabe sobre la biología de la totoaba. Para poder optimizar su cultivo e incluir la información de su ecología trófica en los esfuerzos de conservación, la dieta de este pez debe de ser bien caracterizada. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue estandarizar un protocolo de *metabarcoding* para describir la dieta usando secuenciación de nueva generación. Se disectaron cuatro totoabas silvestres que fueron confiscadas por agentes de las autoridades mexicanas y se colectó el contenido estomacal. Del ADN extraído de las muestras, se generaron librerías de los amplicones representativos para cefalópodos, cordados, invertebrados marinos y eucariotas. Después de la secuenciación, se identificaron 12 diferentes presas que indican la preferencia de la totoaba por los peces (nueve especies), principalmente la anchoveta (*Cetengraulis mysticetus*) y la lisa común (*Mugil cephalus*). Otras presas identificadas fueron miembros de la familia *Euphausiidae* (krill). Comparado con estudios previos basados en reconocimiento morfológico de presas en 35 estómagos, este estudio encontró más taxones y especies (18 y 14 vs 15 y 3, respectivamente) en solo cuatro estómagos. Además, se encontraron siete especies nuevas en la dieta. Este trabajo confirma que el metabarcoding es un método efectivo para el estudio de los hábitos alimenticios de esta especie, proveyendo las herramientas para el futuro análisis de la dieta de la totoaba.

DRA. YOLANDA SCHRAMM URRUTIA
Presidenta del jurado

Abstract of the thesis of **Fadya Hussein Mroue Ruiz** presented as a partial requisite for the obtaining of a degree in Biology. Ensenada, Baja California, Mexico.

March 2021.

Development of a metabarcoding protocol for prey identification from stomach content in *Totoaba macdonaldi*.

Approved abstract:

Totoaba macdonaldi is an endangered fish species endemic from the gulf of California, and was a source of livelihood for people along the coast. Due to overexploitation, the Mexican government banned the fishery in 1975. However, it is still illegally fished and exported to China because the gas bladder is highly valued in traditional Chinese medicine. Despite its status, little is known about totoaba's biology. In order to optimize totoaba farming, and to include the knowledge about its trophic ecology in conservation efforts, the diet of this fish has to be well characterized. Therefore, the aim of this study was to standardize a metabarcoding protocol to describe the diet by next-generation sequencing. We dissected four wild Totoaba individuals that had been seized by Mexican law enforcement agents, and we collected the stomach contents. From extracted DNA, we generated four representative amplicon libraries for cephalopods, chordates, marine invertebrates, and eukaryotes. After sequencing, we identified 12 different prey indicating Totoaba's preference for fish (9 species), mainly Pacific anchovy (*Cetengraulis mysticetus*) and Flathead grey mullet (*Mugil cephalus*). Other identified prey were members of the *Euphausiidae* family (krill). Compared with previous studies based on morphological recognition of prey in 35 stomachs, we identified more taxa and species (18 and 14 vs 15 and 3, respectively) in only 4 stomachs. Moreover, we found seven new prey species. Our work confirms that metabarcoding is an effective method to study the feeding habits of this species, providing the tools to further analyze Totoaba diet.

DR. YOLANDA SCHRAMM URRUTIA
Jury president

Índice

Agradecimientos	II
Resumen	III
Abstract	IV
Lista de figuras	VII
Lista de tablas	VIII
Capítulo 1. Introducción	9
Antecedentes	12
Biología y ecología de la totoaba	12
Estado de conservación	14
<i>Metabarcoding</i>	15
Justificación	18
Objetivo	19
Objetivo general	19
Objetivos particulares	19
Hipótesis	20
Capítulo 2. Metodología	21
Toma de muestras y almacenamiento	21
Extracción de ADN	22
Construcción de librerías de secuenciación	22
Purificación, normalización y cuantificación de las librerías	24
Desnaturalización, solución de carga y secuenciación	25
Procesamiento de datos	26
Capítulo 3. Resultados	29
Extracción y creación de librerías de ADN	29
Secuenciación	31
Identificación de organismos	32
Análisis de los datos de la dieta	34
Capítulo 4. Discusión	38
Factores que afectan la extracción de ADN	38
Construcción de librerías genéticas y secuenciación	39

	VI
Asignación taxónomica	40
Identificación de las presas de la totoaba.....	42
Desempeño del <i>metabarcoding</i>	46
Capítulo 5. Conclusiones	48
Referencias	50
ANEXOS.....	59

Lista de figuras

Figura 1. Distribución de la <i>Totoaba macdonaldi</i> en el golfo de California.....	13
Figura 2. Amplicones de la primera ronda de PCR.....	31
Figura 3. Resumen de la dieta de <i>T. macdonaldi</i> encontrada en este estudio	34
Figura 4. Espectro general de diversidad	35
Figura 5. Dendrograma con el método de grupos pareados del índice de similitud de Jaccard.	36
Figura 6. Curva de acumulación de especies del índice de Chao2.....	37

Lista de tablas

Tabla I. Descripción de los <i>primers</i>	23
Tabla II. Muestras seleccionadas de acuerdo a la mejor calidad de extracción de ADN.	29
Tabla III. Análisis de las secuencias obtenidas	31
Tabla IV. Organismos identificados en el contenido estomacal	32
Tabla V. Organismos identificados por <i>primer</i>	33

Capítulo 1. Introducción

La información sobre los hábitos alimentarios de una especie tiene repercusiones en la comprensión de redes tróficas, el comportamiento de depredadores y la dinámica de poblaciones (McClenaghan *et al.*, 2019). El conocimiento de los hábitos alimentarios de muchos animales no siempre es posible porque algunos tienen hábitats marinos o subterráneos, tamaños microscópicos, conductas evasivas, bajas densidades o hábitos nocturnos (Kinoshita *et al.*, 2019; Pompanon *et al.*, 2012) que no son posibles de observar de manera directa.

Totoaba macdonaldi (Gilbert, 1890) es un pez endémico del golfo de California que se encuentra declarado como especie en peligro de extinción por la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-SEMARNAT-2010 (DOF, 2010), por lo que se prohíbe su aprovechamiento. Sin embargo, su pesca ilegal continúa, ya que su vejiga natatoria, conocida como “buche”, tiene alto valor comercial y es exportada desde México a Estados Unidos y China de manera ilícita (Márquez-Farías y Rosales-Juárez, 2013).

La totoaba es un pez marino de gran tamaño y movilidad, lo que hace difícil determinar sus hábitos alimentarios por medio de métodos visuales o poco invasivos, necesarios por su categoría de conservación. El método que tradicionalmente se ha empleado para describir la dieta de peces en general es el reconocimiento morfológico de estructuras duras o restos de presas en el contenido estomacal (Riccioni *et al.*, 2018). Sin embargo, en el caso de totoaba esto se traduce en la muerte de una gran cantidad de ejemplares para su estudio (De Anda-Montañez *et al.*, 2013), además de que puede generar información taxonómica poco confiable (Bair y Hajibabaei, 2012) debido al estado de los restos por el proceso de digestión.

Actualmente, los avances en las técnicas moleculares pueden ayudar a proveer un mejor entendimiento de los diferentes aspectos de la vida de los animales. Los análisis comparativos del ácido desoxirribonucleico (ADN), genómico y mitocondrial, reflejan una similitud entre organismos de la misma especie y patrones heterogéneos en diferentes especies (Michel *et al.*, 2010). Esta característica es utilizada para elucidar relaciones filogenéticas e identificación de especies mediante regiones específicas del genoma (Hinchliff *et al.*, 2015; Leray y Knowlton, 2015). Actualmente, se cuenta con una gran diversidad de genomas secuenciados gracias a la introducción de la secuenciación de nueva generación que agiliza el proceso de obtención de información (Taberlet *et al.*, 2012); la información obtenida se encuentra disponible en bases de datos públicas, lo que hace posible los estudios extensivos de análisis genómicos.

Gracias al desarrollo de las herramientas mencionadas existe el método conocido como *metabarcoding*, que consiste en la caracterización y utilización de una serie de marcadores genéticos para obtener una representación de la biodiversidad contenida en muestras de ADN ambiental (Fernandes *et al.*, 2018). Estas muestras suelen ser colectadas de sedimento, agua, aire, heces (Nichols *et al.*, 2019) y representa un método no invasivo de estudio. Este método permite entender las interacciones en las cadenas tróficas que no pueden ser documentadas mediante observación o examinación microscópica (Pompanon *et al.*, 2012). En el caso de la totoaba otros autores han realizado muestreos invasivos a partir del contenido estomacal, pero una ventaja del método de *metabarcoding* es que requiere menor cantidad de muestra y de individuos para describir la dieta de un depredador (Ji *et al.*, 2013; Monterroso *et al.*, 2018).

En este estudio se busca establecer un protocolo confiable, por medio del método *metabarcoding*, para identificar presas de *Totoaba macdonaldi* a partir del contenido estomacal

de individuos adultos silvestres, obtenidos como decomisos por parte de la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA). Así como evaluar su efectividad por medio de la comparación de resultados reportados a partir del método tradicional.

Antecedentes

Biología y ecología de la totoaba

La *T. macdonaldi* antiguamente fue clasificada como *Cynoscion macdonaldi* (Villarmar, 1980). Actualmente se le ubica dentro del phylum Chordata, clase Teleostomi, orden Perciformes, familia Sciaenidae, Subfamilia Otolithinae, género *Totoaba* y especie *T. macdonaldi* (Gilbert, 1890). Este pez puede distinguirse visualmente por un característico patrón de pigmentos en la banda caudal (Morales-Ortiz, 1999). La totoaba se registra por primera vez, como los ejemplares más grandes de la familia Sciaenidae, en organismos capturados durante el siglo XIX, con longitudes cercanas a los 2 metros y pesos de más de 100 kg (Flanagan y Hendrickson, 1976). Las hembras son ligeramente más grandes que los machos, sin embargo, no presentan un rasgo obvio de dimorfismo sexual (True, 2012).

Existe información escasa sobre su biología en vida libre y mucha de la literatura data del siglo pasado. Desde entonces, se sabe que el tipo de fertilización es externa, que tienen una longevidad de 25 años en promedio, que a lo largo de su vida realizan migraciones relacionadas con la temperatura del medio, la alimentación y su reproducción (Arvizu y Chávez, 1972; Cisneros-Mata *et al.*, 1995) y que suelen encontrarse entre 25-30 metros de profundidad (Hernandez-Tlapale *et al.*, 2020).

La totoaba se distribuye únicamente en el golfo de California. Los adultos utilizan el delta del río Colorado como área de reproducción durante el invierno y pasan ahí sus primeros años de vida para después migrar al sur (Cisneros-Mata *et al.*, 1995), por lo que su distribución va desde el delta del río Colorado en el norte, hasta la boca del río Fuerte, Sinaloa y del río Colorado hasta bahía Concepción, Baja California Sur (B. C. S.) (Figura 1) (Valenzuela-Quiñonez *et al.*, 2015).

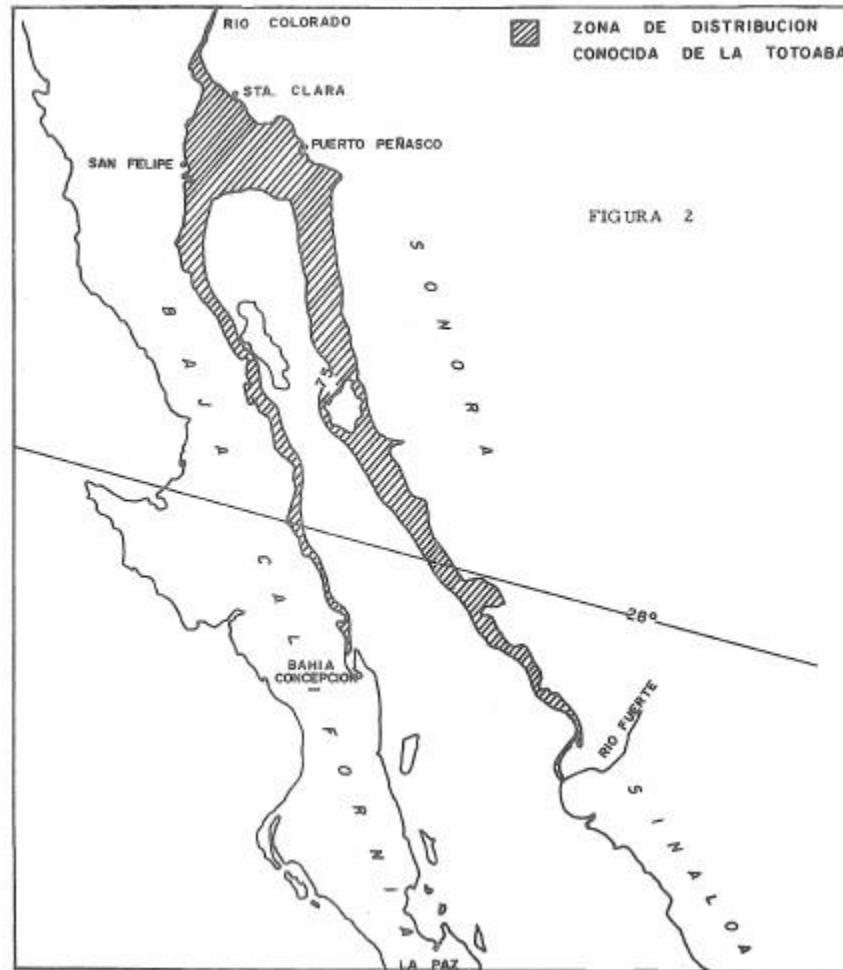


Figura 1. Distribución de la *Totoaba macdonaldi* en el golfo de California. Tomado de Arvizu y Chávez (1972)

Su alimentación ha sido descrita solamente por el reconocimiento de estructuras duras o restos de presas en el contenido estomacal (Berdegué, 1955; Arvizu y Chávez, 1972; De Anda-Montañez et al., 2013). Los últimos autores reportaron la identificación de restos en el contenido estomacal de 65 totoabas colectadas en diferentes meses de los años 2010 y 2011 y mostraron que, de los 29 componentes identificados, los peces constituyen el grupo más importante (84.37%), con mayor abundancia de anchoveta bocona (*Cetengraulis mysticetus*) y pejerrey (*Colpichthys spp.*), seguido de los crustáceos (15.34%) y los cefalópodos (0.29%) (De Anda-

Montañez *et al.*, 2013). Dichos resultados muestran una menor diversidad que los presentados en estudios anteriores (Berdegué, 1955; Arvizu y Chávez, 1972), donde también fueron descritos camarones del género *Penaeus sp.* y peces pequeños de la familia *Gobiidae*. Ambos estudios se realizaron en organismos adultos.

El patrón de desarrollo del sistema digestivo en larvas es el típico observado en peces marinos carnívoros (Córdova-Montejo *et al.*, 2019). Las larvas de totoaba presentan cambios en la actividad de enzimas digestivas durante sus primeros días de vida y el sistema digestivo completa su desarrollo entre 24 y 25 días post eclosión (Galaviz *et al.*, 2015).

Estado de conservación

La totoaba ha sido históricamente explotada comercialmente, lo cual ha contribuido la importante reducción de su población. A lo largo del tiempo, se han emprendido diferentes acciones para su conservación. Primero, se prohibió temporalmente la pesca de tiburón, como un intento por reducir la pesca incidental de totoaba en 1949 (Bobadilla *et al.*, 2011). Posteriormente, se protegió su hábitat y se le incluyó en la Norma Oficial Mexicana (Bobadilla *et al.*, 2011), que la reconoce como una especie en peligro de extinción (NOM-059-ECOL-SEMARNAT-2010) (DOF, 2015).

Ante una disminución en el volumen de pesca, la totoaba pasó de estar denominada como un recurso en declive a amenazada en 1975 (Cisneros-Mata *et al.*, 1995), lo que provocó la prohibición de toda actividad pesquera. Lecari y Chávez (2007) propusieron una hipótesis multi-causal para explicar el declive en la población. Los autores señalan a la pesca comercial entre 1929 y 1975 y al cambio en el flujo del río Colorado como los principales factores que redujeron el número de individuos en la población (Lecari y Chávez, 2007). Este último factor

alteró la zona de reproducción y desarrollo de la especie, pues cambió las condiciones de salinidad en el alto golfo (Lecari y Chávez, 2007). Los mismos autores consideran que perturbaciones ambientales pudieron provocar un efecto cascada y afectar los mecanismos fisiológicos y de comportamiento asociados al desove, reproducción, alimentación, tasa de crecimiento y mortalidad del animal (Lecari y Chávez, 2007). Por otro lado, Cisneros-Mata (2020) en su libro sobre la evaluación del estado de la población de la totoaba desestima que los cambios ambientales tengan grandes repercusiones sobre la abundancia de la especie, ya que es altamente resiliente; en cambio, menciona que la mayor amenaza es la captura ilegal y descontrolada de adultos y subadultos en el alto golfo de California en periodo de reproducción.

Metabarcoding

Existen varios ejemplos de organismos en los que la dieta no puede ser completamente descrita mediante observación, principalmente en algunos invertebrados, microorganismos y en ambientes acuáticos en general (Valentini *et al.*, 2009). En los escenarios antes mencionados, la descripción de los hábitos alimentarios suele hacerse mediante el reconocimiento de estructuras remanentes en heces o directamente en el tracto digestivo del organismo en cuestión (Bowles *et al.*, 2011). Además de que tener acceso a muestras del tracto digestivo es una práctica invasiva y puede requerir sacrificar al organismo, la digestión impide su correcta identificación taxonómica. Debido a esto, se han desarrollado diferentes técnicas para elucidar las dietas de los organismos, como la electroforesis de proteínas (Walrant y Loreau, 1995), la espectroscopia del infrarrojo cercano (Rothman *et al.*, 2009), los isótopos estables (Ostrom *et al.*, 1997) u otras técnicas moleculares (Pompanon *et al.*, 2012). Sin embargo, la electroforesis de proteínas ha demostrado ser poco eficiente con organismos generalistas, la espectroscopia es un método más

adecuado para describir componentes nutricionales y los isótopos proveen información sobre el ambiente explotado por el depredador en lugar de la identificación taxonómica de las presas (Pompanon *et al.*, 2012).

En 2003, Hebert y colaboradores propusieron el uso del gen mitocondrial Citocromo *c* Oxidasa subunidad I (COI) como una opción alternativa a la identificación de especies basada en caracteres morfológicos, ya que está presente en casi todos los animales y su divergencia permite el reconocimiento de especies (Hebert *et al.*, 2003). Lo anterior permitió agilizar la identificación de especies y mejorar la certeza de dicha identificación; así nació el método del *barcoding*. Este método se entiende como el uso de la variación nucleotídica de un gen en específico para la identificación taxonómica de los organismos (Geller *et al.*, 2013). El *metabarcoding* utiliza *primers* universales en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para amplificar secuencias informativas de un conjunto de organismos o de una muestra de ADN ambiental, donde el prefijo “*meta*” se refiere al uso de los genes marcadores en una muestra compleja (Ji *et al.*, 2013). La invención de ese método representó un gran avance en varios campos de la ciencia, incluyendo evolución, ecología y conservación (Kress *et al.*, 2018). Particularmente, ha sido útil en el estudio de las interacciones tróficas mediante la identificación molecular de presas en las dietas de depredadores (de Sousa *et al.*, 2019). Ejemplo de lo anterior, es el estudio realizado por González-Varo (2014), en el cual se describe la comunidad de aves responsables de la dispersión de semillas, utilizando como muestra el ADN recolectado de semillas defecadas o regurgitadas, representando un método no invasivo para caracterizar la interacción presa-depredador; al igual que el estudio de Brassea *et al.* (2019) en el cual se utilizaron heces para caracterizar la dieta de la foca común del Pacífico (*Phoca vitulina richardii*).

El alcance del *barcoding* de ADN se extiende hasta la identificación de plantas, como lo demuestra el estudio de Soininen y colaboradores (2009), en el cual determinan la dieta de dos roedores herbívoros utilizando microhistología y *barcoding* del gen *trnL*. Sus resultados muestran una mayor resolución con el método de ADN ya que fue posible identificar, a nivel de género, el 75% de las secuencias, mientras que con histología menos del 20% de los fragmentos fueron identificables a ese nivel (Soininen *et al.*, 2009). Por otro lado, Ji *et al.* (2013) probaron la precisión del *metabarcoding* en un estudio donde compararon los resultados de la identificación de tres conjuntos de datos de alta calidad, colectados en Malasia, China y el Reino Unido, en los cuales se incluyeron 55,813 especies de artrópodos y aves identificadas a nivel de especie; trabajo que llevó 2,505 horas a taxónomos expertos. Aquí concluyeron que las muestras identificadas con *metabarcoding* produjeron resultados más exhaustivos y rápidos, con menor dependencia en la habilidad del taxónomo y menor refutabilidad por terceros (Ji *et al.*, 2013). Basado en toda la evidencia mencionada, en el presente estudio se seleccionó el método de *metabarcoding* para realizar la identificación molecular de las presas en el contenido estomacal de la totoaba.

Justificación

La identificación precisa de la dieta de la totoaba impactará diferentes aspectos en la conservación de la especie, ya que, sin el conocimiento de su biología, ecología poblacional y estructura genética poblacional, su manejo es difícil (de León *et al.*, 2010). El conocer su dieta permitirá considerar la ecología trófica de la totoaba en las estrategias de conservación.

Es importante destacar que, desde la década de los años noventa, en la Facultad de Ciencias Marinas, de la Universidad Autónoma de Baja California, se estudia y cultiva a esta especie con éxito (True, 2012). Entre 1997 y 2012 se liberaron alrededor de 12,000 individuos marcados genéticamente para tratar de incrementar la población silvestre. Sin embargo, se reconoce que se necesita un mayor conocimiento sobre diferentes aspectos para optimizar su cultivo y minimizar su alta mortalidad en cautiverio (True, 2012). Esta mortalidad está asociada, entre otras cosas, a problemas de nutrición (Mata-Sotres *et al.*, 2015) por lo que cualquier información sobre los requerimientos nutricionales es de gran importancia para mejorar su producción (Minjarez-Osorio *et al.*, 2012).

El comercio de totoaba es altamente rentable, dicha actividad fue facilitada gracias a los esfuerzos de investigación en la Universidad Autónoma de Baja California y permitió que actualmente la carne de totoaba de cautiverio sea exitosamente comercializada (Juarez *et al.*, 2016). Además, la vejiga natatoria de este pez es similar a la de *Bahaba taipingensis*, un pez endémico del este de Asia en peligro crítico de extinción, del cual este órgano llegó a cotizarse en casi medio millón de dólares (Tuuli *et al.*, 2016). Con el apoyo de peces provenientes del cultivo, el recurso podría contemplarse como renovable en el área y abre la posibilidad de reconstruir una pesquería sustentable para mejorar la economía local (Juarez *et al.*, 2016).

El golfo de California es un sitio de gran importancia económica, ya que en él se obtiene alrededor de medio millón de toneladas al año, representando el 50% de la pesca total nacional, lo que genera más de 50,000 empleos (Ulloa *et al.*, 2006). Además, ha sido de manera histórica, fuente de sustento para los pobladores de la costa e incluso para las comunidades indígenas como los Seris (Bahre *et al.*, 2000). Actualmente, la actividad pesquera en el alto golfo está prohibida, ya que se declaró como área protegida en 1993 (DOF, 1993). Es por esto, que las personas que solían dedicarse a la pesca debieron buscar otra manera de generar ingresos. En el periodo entre 2005 y 2009 comenzó a darse una compensación económica a los pescadores (Bobadilla *et al.*, 2011), pero esta no ha logrado satisfacer las necesidades de la comunidad, por lo que la pesca ilegal continúa sucediendo (Rojas-Bracho, 2019). Además, Cinti *et al.* (2010) mencionan que la pesca ilegal tiene repercusiones en la comunidad, causando segregación, lo que aumenta la problemática social. Cualquier esfuerzo encaminado a un cultivo más exitoso de la totoaba y/o a la reapertura de la pesca, ayudará al bienestar socioeconómico de la región.

Objetivo

Objetivo general

El objetivo general de este estudio es desarrollar un protocolo basado en método de *metabarcoding* para identificar a las presas del pez totoaba (*Totoaba macdonaldi*) silvestre, a partir del contenido estomacal.

Objetivos particulares

1. Identificar las presas del contenido estomacal de *Totoaba macdonaldi* adulta silvestre, con el método *metabarcoding*.

2. Comparar las presas identificadas molecularmente con las reportadas en la literatura e identificadas por medio de reconocimiento morfológico, para evaluar la efectividad del nuevo protocolo.

Hipótesis

El *metabarcoding* identifica una mayor cantidad de presas a nivel de especie de *Totoaba macdonaldi* en comparación con el método de reconocimiento taxonómico de contenido estomacal, a partir de una menor cantidad de muestras.

Capítulo 2. Metodología

Toma de muestras y almacenamiento

Bajo los permisos de oficio número SGPA/DGVS/06959/17 y SGPA/DGVS/03981/19, se recibieron cuatro ejemplares de *Totoaba macdonaldi* de la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente, decomisadas de la bahía de San Felipe. Dichos ejemplares se recibieron congelados, sin embargo, se desconocen las condiciones de manejo desde su pesca hasta la entrega en el laboratorio, como por ejemplo si en algún momento estuvieron a temperatura ambiente, o por cuánto tiempo.

La disección de los peces se llevó a cabo en el Laboratorio 3 de Biología en la Facultad de Ciencias Marinas. De cada uno de los ejemplares se realizó un corte ventral longitudinal y se extrajo el tubo digestivo completo desde la boca hasta el ano, el cual se colocó en aluminio y se abrió longitudinalmente. Se tomaron cinco réplicas de cada segmento (estómago anterior y posterior, saco pilórico, intestino anterior, intestino posterior y recto) por espécimen. Sin embargo, para este estudio solo se utilizó el estómago (sin distinguir anterior y posterior). Cada muestra fue colectada en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL estéril, después, se pesó y adecuó para que todos los tubos contuvieran aproximadamente 0.20 gramos de materia digestiva. A continuación, se añadió 1 mL de RNAlater (Sigma Aldrich) para evitar la degradación del material genético, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Extracción de ADN

Para asegurar una calidad de ácido desoxirribonucleico (ADN) adecuada para secuenciar, se probaron diferentes métodos de extracción: por sales (Miller *et al.*, 1988), CTAB (Doyle y Doyle, 1987), por medio de kits *DNeasy blood & tissue kit* (QIAGEN) y *QIAamp DNA Stool Mini Kit* (QIAGEN). En este último se probó el protocolo sugerido por el fabricante y el protocolo modificado por Brassea-Pérez, *et al.* (2019). De acuerdo al mejor rendimiento obtenido se seleccionaron los dos kits y los protocolos sugeridos por el fabricante para el estudio. Pevio a la extracción con el *DNeasy blood & tissue kit*, se descongelaron las muestras, se pesaron 0.100 g de material por muestra y se procedió al lavado de RNAlater, que consistió en añadir 100 µL de agua de destilada, desionizada y esterilizada (DDE) y centrifugar a 20,000 x g por 3 minutos. Para las muestras extraídas con del *QIAamp DNA Stool Mini Kit* (QIAGEN), por las indicaciones del protocolo, se utilizó la totalidad de la muestra y se continuó con el lavado. Una vez extraído el ADN, se realizó la confirmación visual mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE (0.5 X), corrido a 1.14 V/cm² durante 40 minutos. Además, se cuantificó la concentración y calidad del ADN en el espectrofotómetro Nanodrop[®] (Thermo Fisher). La extracción y amplificación se realizaron en el laboratorio de Ecología Molecular “Dr. Jorge de la Rosa Vélez” de la Facultad de Ciencias Marinas.

Construcción de librerías de secuenciación

La biblioteca de secuenciación se preparó de acuerdo al protocolo de Preparación de biblioteca de 16S (Illumina) para la plataforma Illumina Miseq. Dicho protocolo consiste en amplificar regiones de interés en una primera ronda de PCR y realizar una segunda ronda para etiquetar y añadir los adaptadores de secuenciación. Finalmente se purifican, normalizan y diluyen los productos de PCR para juntarlos en concentraciones equimolares y continuar con la desnaturalización y secuenciación.

Con el fin de identificar a los grupos de cordados, cefalópodos, invertebrados marinos y eucariotas, se generaron las cuatro librerías respectivas. Para ello, para el primer PCR se eligieron los *primers* descritos en la literatura que se muestran en la Tabla 1, siguiendo las condiciones de PCR recomendadas por los autores.

Se utilizaron los reactivos MyTaq™ DNA (Bioline), en donde el buffer incluye la mezcla de reactivos necesarios para la reacción y solo se requirió añadir la Taq polimerasa, los *primers*, el ADN y agua. El producto de PCR se visualizó en gel de agarosa al 1%.

Tabla I. Descripción de los *primers*. *Primers* utilizados en el PCR punto final junto con la secuencia del mismo, el gen o la región del gen que amplifica, autores y la longitud del fragmento esperado en pares de bases (pb).

<i>Primer</i>	Secuencia	Gen blanco Autores del <i>primer</i>	Amplicón (pb)
Chord_16S_F	CGAGAAGACCCTRTGGAGCT	ADNmt 16S	~120
Chord_16S_R	CCTNGGTCGCCCCAAC	(Deagle <i>et al.</i> , 2013)	
Ceph_16S_F	GACGAGAAGACCCTAWTGAGCT	ADNmt 16S	~260-310
Ceph_16S_R	AAATTACGCTGTTATCCCT	(Deagle <i>et al.</i> , 2009)	
Euk_F	GTACACACCGCCCGTC	V9-18S ARNr	~260
Euk_R	TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC	(Gilbert <i>et al.</i> , 2014)	
mICOIntF_F (invertebrados)	GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC	COI	~313
tgHCO2198_R (invertebrados)	TAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA	(Leray <i>et al.</i> , 2013)	
		(Geller <i>et al.</i> , 2013)	

Una vez obtenidos los productos de la primera ronda de la PCR, se transportaron al laboratorio de Metagenómica del Departamento de Innovación Biomédica del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) para continuar con la

segunda ronda de PCR y la secuenciación. Se seleccionaron los productos que presentaron la mejor calidad (concentración e integridad) para hacer una mezcla de las réplicas acorde a la región y organismo al que pertenecen. Dichos productos se utilizaron como template para la segunda ronda de la PCR, de acuerdo al protocolo *Two-step PCR Approach* (Illumina, 2011), el cual consiste en la incorporación de los adaptadores de secuenciación y los índices para distinguir el organismo del cual proviene la secuencia. Las muestras fueron indexadas usando el Nextera XT Index Kit (Illumina). El producto de la segunda ronda de PCR fue confirmado mediante visualización en gel de agarosa al 1%.

Purificación, normalización y cuantificación de las librerías

La normalización y purificación de las muestras se realizó con el kit *SequalPrep™ Normalization Plate (96)* (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Esto permite eliminar los residuos de los reactivos de la PCR y normalizar a una concentración similar los productos de PCR. El éxito de la normalización se confirmó mediante la cuantificación de las muestras en el equipo Qubit™ 3.0 fluorómetro (Invitrogen™) utilizando 2 µL de muestra por tubo con el protocolo del kit *Qubit™ dsDNA BR Assay* de Molecular Probes® (Invitrogen™). Los valores obtenidos estuvieron entre 1-2 ng/µL, por lo que se ajustó la concentración de cada muestra para garantizar que la secuenciación se realizara a partir de la misma cantidad de producto. Para ello se obtuvo la concentración equimolar utilizando una ecuación que toma en cuenta el tamaño del amplicón de cada muestra. Una vez normalizadas las muestras, se procedió a crear el metapool del total de las muestras por cada amplicón (n=4 metapoles) y se volvió a cuantificar y obtener la concentración equimolar.

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

Posteriormente, el resultado obtenido se convirtió a picomoles:

$$1 \text{ nM} = 1000 \text{ pM}$$

Con base en dicha ecuación, se creó el pool de cada metamuestra que contenía la misma concentración de cada muestra, y posteriormente se diluyeron las bibliotecas a una concentración final de 20 pM. Esta técnica busca igualar las lecturas que tendrá cada librería, basada en las características particulares del amplicón.

Desnaturalización, solución de carga y secuenciación

La desnaturalización es necesaria para poder realizar la secuenciación, ya que se requieren hebras sencillas de ADN para que sean capaces de hibridar con la celda de flujo. Este procedimiento se hizo siguiendo las indicaciones del protocolo “16S Metagenomics sequencing libraries”. Cada metamuestra se desnaturalizó con NaOH y se combinó con el buffer de hibridación para obtener una concentración final deseada, que en este caso fue de 5 pM. El pool final se formó al combinar cada metamuestra (de cada amplicón) en proporciones iguales, excepto el amplicón de invertebrados marinos, el cual se añadió en un 20% más para compensar la existencia de dos bandas en el PCR (com. pers. J. Chong¹).

El mismo procedimiento se realizó para desnaturalizar la librería control PhiX, donde se produjo la librería desnaturalizada a una concentración de 5 pM. Finalmente, la solución de

¹ Dra. Jennyfers Chong-Robles. Postdoc asociado al proyecto del Consorcio de Investigación del Golfo de México (CIGoM), en el laboratorio de Metagenómica de CICESE.

trabajo se preparó con 20% de librería control o phiX. La secuenciación se realizó con la estrategia *paired end* con el kit *MiSeq Reagent Kit v2* de 300 ciclos de Illumina.

Procesamiento de datos

Los *primers* forward y reverse fueron eliminados con Cutadapt v2.8 (Martin, 2011) en el modo *paired end*. Las secuencias se filtraron, se eliminaron los errores de secuenciación, se unieron y se determinaron las quimeras utilizando el paquete DADA2 (Callahan *et al.*, 2016) (<https://benjjneb.github.io/dada2/tutorial.html>) en el lenguaje R (R Core Team, 2018) con los parámetros predeterminados. En el caso de los amplicones de invertebrados, solamente se utilizó la secuencia forward debido a la falta de traslape de nucleótidos entre las secuencias forward y reverse, ya que estos eran > 300 pb.

La tabla final de la Variante de Secuencia de Amplicón (ASV), que contiene un registro del número de veces que cada ASV fue observada en cada muestra, se alineó con una base de datos de nucleótidos no redundante (v5) utilizando los ejecutables BLAST+ (v2.9). Se realizó un BLAST nt (nucleótidos) para asignar la taxonomía de las presas bajo los siguientes parámetros: E-value mínimo de 10^{-20} , porcentaje de identidad $\geq 96\%$ y alineamiento \geq a 100 pb. Este procedimiento fue realizado para cada uno de los marcadores taxonómicos.

Una vez obtenidos los resultados del BLAST, se analizaron manualmente para asignarles una identidad bajo los siguientes criterios:

1. Porcentaje de identidad más alto y E-value más bajo.
2. Identificación a nivel de familia, en caso de que la secuencia fuera homóloga a varios géneros.

3. Distribución geográfica: organismos marinos, presentes en el golfo de California.

Para el último punto, se utilizaron bases de datos como World Register of Marine Species (WoRMS Editorial Board, 2020), FishBase (Froese y Pauly, 2020) y Encyclopedia of life (Encyclopedia of life, 2014).

Finalmente, se realizó un análisis para encontrar las presas de la totoaba entre los organismos identificados. Los criterios de inclusión fueron:

1. Organismos que estuvieran previamente reportados como presa de totoaba.
2. Organismos que no hayan sido reportados como parásitos de peces.
3. Organismos presentes en el análisis, que no estén reportados como dieta de las presas de la totoaba en la literatura.
4. Organismos referidos en la dieta de otros peces de la familia Sciaenidae similares a la totoaba.

Como proxy de la eficiencia del método de *metabarcoding*, con respecto al método tradicional que utiliza el reconocimiento morfológico del contenido estomacal, se construyeron histogramas con el espectro general de diversidad. Los resultados de las presas identificadas en este trabajo se compararon con las presas identificadas en totoabas de tamaño similar en el estudio de De Anda-Montañez *et al.* (2013).

También, se calculó la curva de acumulación de especies con el índice Chao2 (Chao, 1987), utilizando el programa EstimateS (versión 9.1.0) (Colwell, 2013) para observar la riqueza presentada en la muestra comparada con la de una muestra ilimitada y el dendrograma del índice

de similitud de Jaccard (Jaccard, 1901) en Past3 (Hammer *et al.*, 2001) para visualizar la similitud entre las dietas de los individuos.

Capítulo 3. Resultados

Extracción y creación de librerías de ADN

Las muestras se procesaron con los dos kits de extracción y se eligieron los mejores productos. Al final, se contó con un total de 33 muestras del estómago de las totoabas (Tabla 2). Cada una de las muestras procesadas se utilizó para la construcción de las librerías de secuenciación.

Tabla II. Muestras seleccionadas de acuerdo a la mejor calidad de extracción de ADN. T: número de totoaba; E1: Estómago anterior; E2: Estómago posterior. En réplica se señala el número de réplicas que existen de ese segmento. Por último, se señala el método de extracción utilizado y la fecha de extracción.

Individuo y Región	Réplica	Método	
		<i>QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)</i>	<i>DNeasy blood y tissue kit (QIAGEN)</i>
T1E1	1		04/10/17
	2	13/04/18	
T1E2	1		16/11/17
	2		11/12/17
	3		28/02/18
	4		05/03/18
	5	14/03/18	
	6	02/04/18	
T2E1	1		16/11/17
	2		11/12/17
	3		02/04/18
T2E2	1		28/02/18
	2		05/03/18
	3	02/04/18	
T3E1	1	02/04/18	
	2	02/04/18	
	3	02/04/18	
T3E2	1	14/09/17	
	2		11/12/17
	3		28/02/18
	4		05/03/18
	5	02/04/18	
T4E1	1		03/10/17

	2		11/12/17
	3		13/12/17
	4	02/04/18	
	5		09/04/18
	6	02/04/18	
T4E2	1		04/10/17
	2		28/02/18
	3		05/03/18
	4	02/04/18	
	5	02/04/18	

Al menos una de las réplicas de cada región por individuo presentó amplificación con cada uno de los *primers* (Figura 2). Con dichas amplificaciones, se creó exitosamente el pool para el indexado que se realizó en una segunda ronda de PCR.

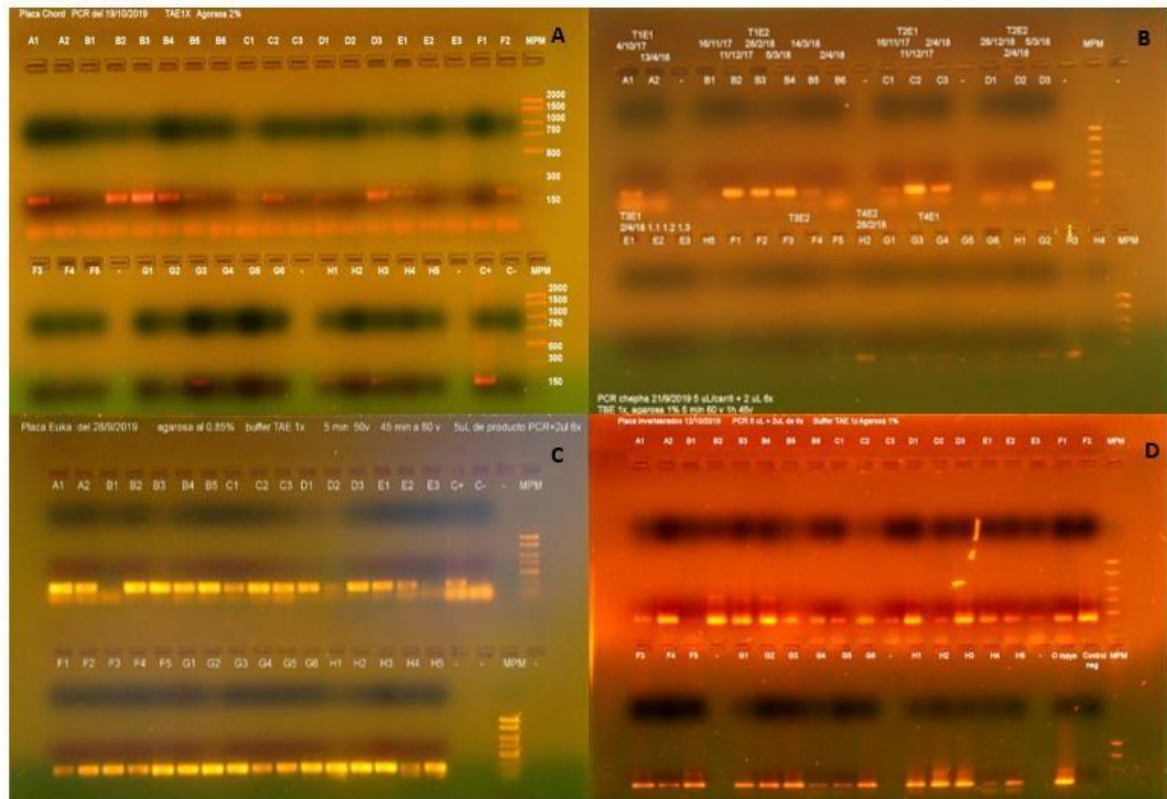


Figura 2. Amplicones de la primera ronda de PCR; en el gel A se muestra los productos del primer de cordados (16S mt); en B, el primer de cefalópodos (16S mt); en C, el primer de eucariota (18S ARNr) y en D el primer de invertebrados (COI).

Secuenciación

Como resultado de la secuenciación, se obtuvieron 934,866 secuencias después del control de calidad de Illumina; de éstas, se identificaron 772,355 mediante BLAST, lo que representó el 83% del total (Tabla 3).

Tabla III. Análisis de las secuencias obtenidas. Número de secuencias obtenidas por cada primer, el tipo de análisis: F-R (*Forward-Reverse*) o F (*Forward*) y el número de secuencias identificadas en BLAST. Las últimas dos columnas muestran el número y porcentaje de secuencias que pertenecen a la totoaba.

Primer	Tipo de análisis	Secuencias totales	Secuencias identificadas	% de Secuencias identificadas	Secuencias únicas	Secuencias asignadas	Secuencias de totoaba	% de Secuencias de totoaba
Ceph	F-R	156,905	149,487	95	40	37	115,051	77

Euk	F-R	196,431	181,220	92	46	42	0	-
Chord	F-R	288,268	245,964	85	33	25	149,801	61
Invert	F	293,262	195,684	67	59	29	98,181	50
Total		934,866	772,355	83	178	133	363,033	47

Identificación de organismos

Según los criterios de identificación, se les asignó identidad a 18 organismos (Tabla 4). Se encontraron 12 organismos como presa de totoaba, de los cuales cinco han sido previamente reportados y siete se identificaron aquí por primera vez. Además, cuatro especies detectadas se asociaron a la dieta de las presas de la totoaba, una como parásito de pez (*Kudoa thyrsites*) y un gusano marino (*Parasagitta elegans*) que se descartó según los criterios de inclusión. Del total de organismos identificados, diez fueron reconocidos por el *primer* de eucariota (18S ARNr), nueve por el de cordados (16S ADNmt), ocho por el de cefalópodos (16S ADNmt) y cinco por el de invertebrados (COI); presentando redundancia en algunos organismos (Tabla 5).

Tabla IV. Organismos identificados en el contenido estomacal. Organismos identificados en la secuenciación, así como su nombre común y los datos de sexo y talla de la totoaba en la que se identificaron. Los organismos marcados con ** han sido previamente reportados como dieta de la totoaba y los marcados con * se consideran presa de la totoaba según los criterios utilizados en este estudio: animales que no han sido reportados como parásitos de peces, animales que no se han reportado como dieta de las presas de la totoaba, presas de otros sciánidos.

Organismo	Nombre común	T1	T2	T3	T4
		♀ 99.9 cm	♂ 81.0 cm	♂ 104.1 cm	♀ 135.8 cm
<i>Cetengraulis mysticetus</i> **	Anchoveta, sardina bocona	✓	✓	✓	✓
<i>Mugil cephalus</i> **	Lisa común	✓	✓	✓	✓
<i>Totoaba macdonaldi</i> *	Totoaba	✓	✓	✓	✓
<i>Micropogonias megalops</i> *	Chano norteño	✓	✓	✓	
<i>Engraulis mordax</i> **	Anchoveta norteña		✓	✓	✓
<i>Thalassiosira minuscula</i>	Diatomea	✓	✓		✓
<i>Euphasiidae sp.</i> **	Krill	✓	✓		✓

<i>Calanidae sp.</i>	Copépodos	✓	✓		
<i>Kudoa thyrsites</i>	Parásito	✓		✓	
<i>Anchoa mundeoloides**</i>	Anchoa golfina	✓			
<i>Calanoida sp.</i>	Copépodos		✓		
<i>Caulolatilus princeps*</i>	Pez blanco				✓
<i>Chanos chanos*</i>	Chano, sabalote				✓
<i>Planktoniella sol</i>	Diatomea			✓	
<i>Sardinops sagax*</i>	Sardina del Pacífico				✓
<i>Tessarabrachion oculatum*</i>	Krill		✓		
<i>Thysanoessa sp.*</i>	Krill	✓			
<i>Parasagitta elegans</i>	Gusano flecha				✓

Tabla V. Organismos identificados por *primer*. Organismos identificados, nombre común y el *primer* por el cual se amplificaron.

Organismo	Nombre común	Amplificado por:			
		Ceph	Euk	Chord	Invert
<i>Cetengraulis mysticetus</i>	Anchoveta, sardina bocona	✓		✓	✓
<i>Mugil cephalus</i>	Lisa común	✓		✓	✓
<i>Totoaba macdonaldi</i>	Totoaba	✓		✓	✓
<i>Micropogonias megalops</i>	Chano norteño	✓		✓	✓
<i>Engraulis mordax</i>	Anchoveta norteña	✓		✓	
<i>Thalassiosira minuscula</i>	Diatomea		✓		
<i>Euphasiidae sp.</i>	Krill	✓	✓		✓
<i>Calanidae sp.</i>	Copépodos			✓	
<i>Kudoa thyrsites</i>	Parásito		✓		
<i>Anchoa mundeoloides</i>	Anchoa golfina	✓	✓	✓	
<i>Calanoida sp.</i>	Copépodos		✓		
<i>Caulolatilus princeps</i>	Pez blanco	✓			
<i>Chanos</i>	Chano, sabalote		✓		
<i>Planktoniella sol</i>	Diatomea		✓		
<i>Sardinops sagax</i>	Sardina del pacífico		✓	✓	
<i>Tessarabrachion oculatum</i>	Krill			✓	
<i>Thysanoessa sp.</i>	Krill		✓		
<i>Parasagitta elegans</i>	Gusano flecha		✓		

Análisis de los datos de la dieta

Las principales presas de la *Totoaba macdonaldi*, con base en su frecuencia de aparición, fueron *Cetengraulis mysticetus*, *Mugil cephalus* y *Totoaba macdonaldi*, ya que se identificaron en todos los individuos, seguidas de *Engraulis mordax*, *Micropogonias megalops* y *Euphasiidae sp.* que se presentaron en tres de las cuatro totoabas (Figura 4). Al comparar los datos con el estudio de dieta de totoaba más reciente (De Anda-Montañez et al., 2013), solo se encontró a *Cetengraulis mysticetus* identificado al mismo nivel taxonómico en totoabas de etapa adulta (Figura 5).

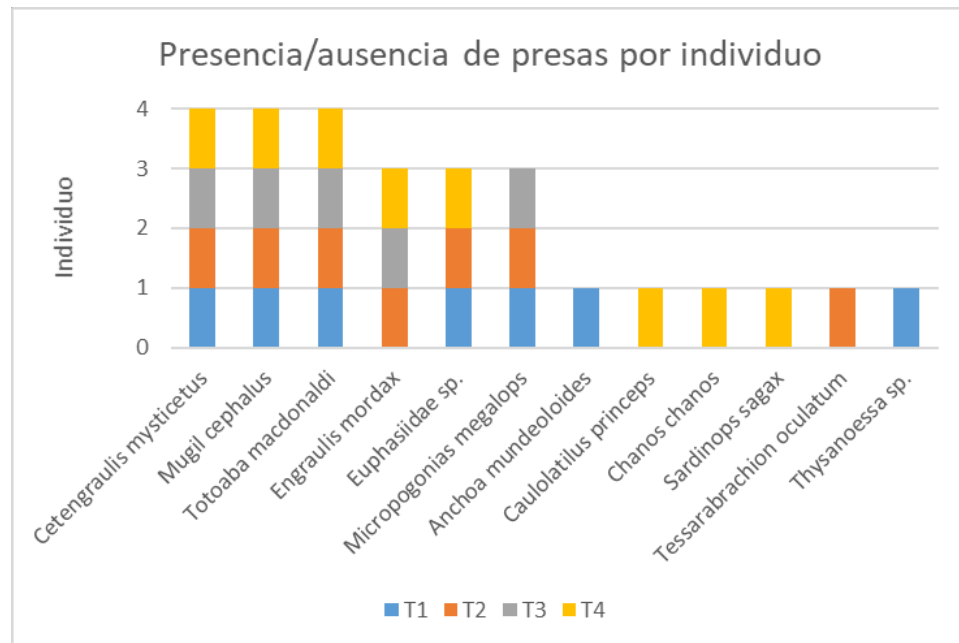


Figura 3. Resumen de la dieta de *T. macdonaldi* encontrada en este estudio. Se presentan los datos de presencia/ausencia por totoaba (T1, T2, T3, T4).

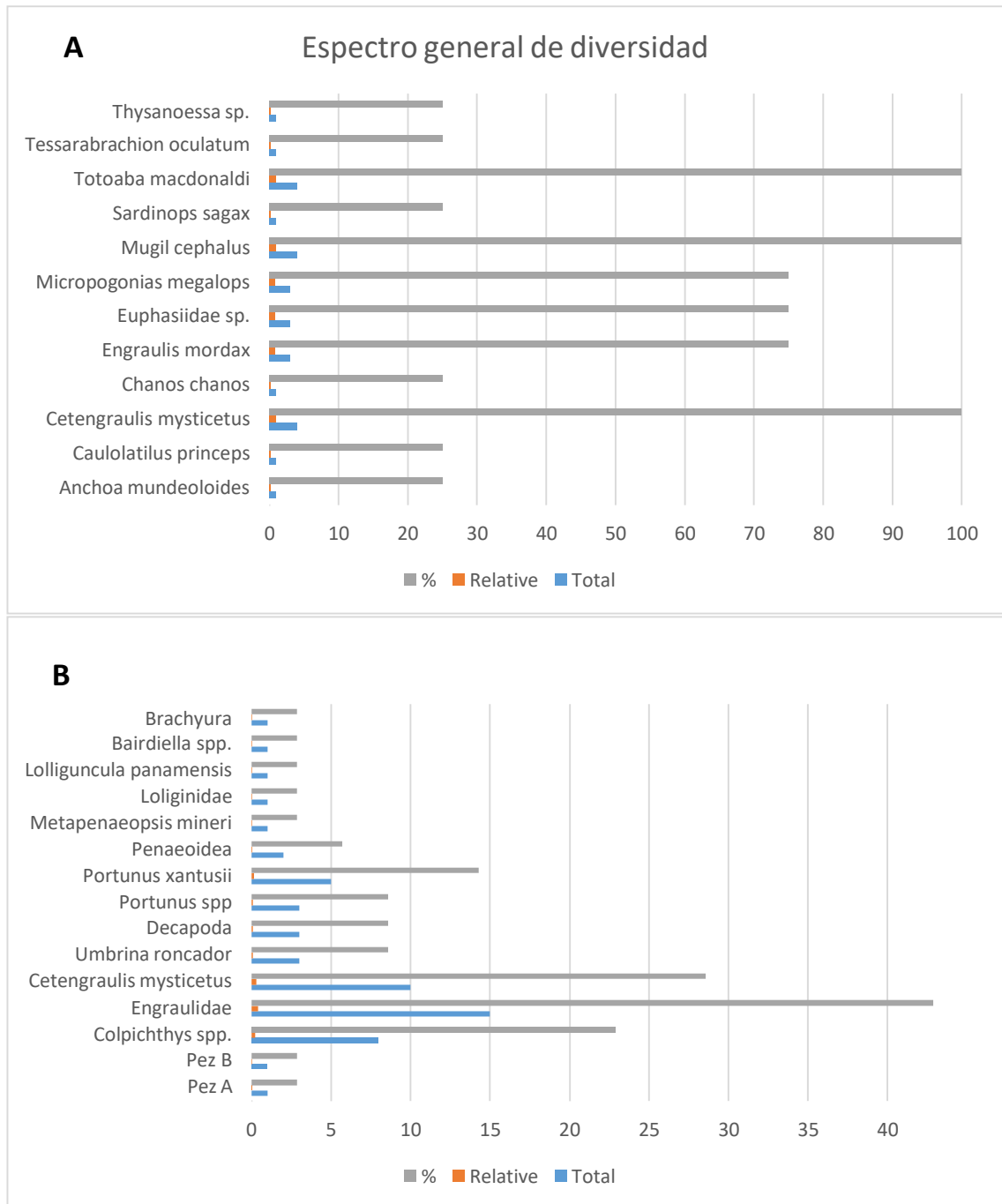


Figura 4. Espectro general de diversidad. Se muestran tres aspectos de los datos de presencia/ausencia: Total, representa el número crudo de presencia de dicho organismo; Relativo, es el número total del taxón, dividido entre el número de estómagos estudiados; y Porcentaje (%), número relativo multiplicado por 100. El gráfico A muestra los datos obtenidos en el presente estudio (n=4), mientras que B se construyó con los datos de las campañas 3 y 4 del estudio de reconocimiento morfológico de De Anda-Montañez et al. (2013) (n=35).

El dendrograma obtenido por medio del índice de Jaccard mostró que la relación más cercana se encuentra entre las dietas de las totoabas 2 y 3. Al mismo tiempo que este grupo se asemeja a la totoaba 1, y la totoaba 4 resulta como el individuo con la alimentación más diferente (Figura 6).

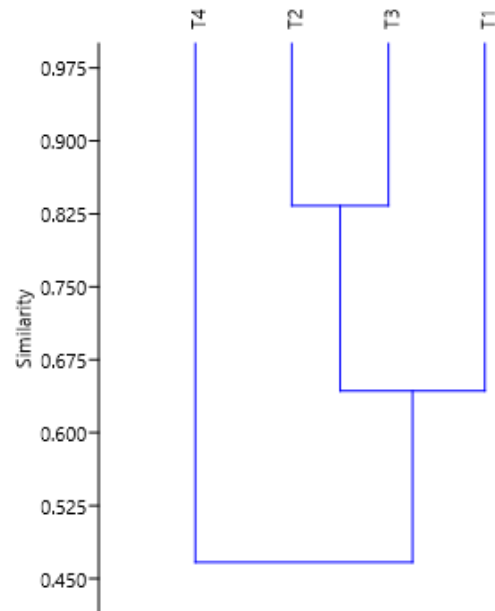


Figura 5. Dendrograma con el método de grupos pareados del índice de similitud de Jaccard. El dendrograma muestra que la alimentación de las totoabas 2 y 3 se encuentra más relacionada; al mismo tiempo que este grupo se asemeja a la dieta de la totoaba 1 y, por último, la totoaba 4 difiere en mayor medida.

La curva de acumulación de especies con el índice de Chao2 muestra una eficiencia de 68.96% (Figura 7).

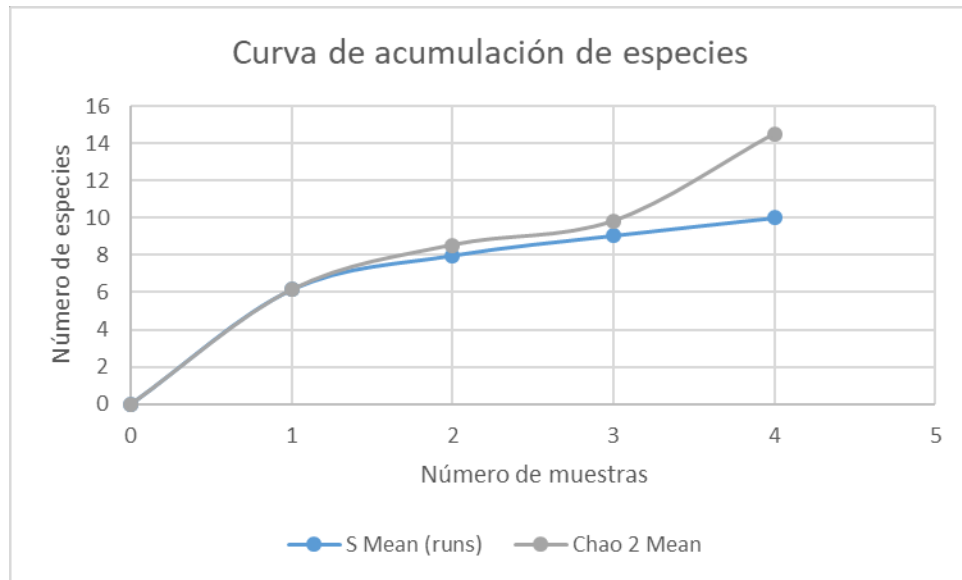


Figura 6. Curva de acumulación de especies del índice de Chao2. El índice de Chao2 y las especies encontradas. Este índice es una estimación del número total de especies en la muestra basado en el número de especies únicas y el número de especies duplicadas. Eficiencia: 68.96%.

Capítulo 4. Discusión

El presente estudio provee un análisis preliminar de la dieta de *Totoaba macdonaldi* utilizando por primera vez una técnica molecular para el análisis. El método del *metabarcoding* resultó ser efectivo, incluso con un número de muestra pequeño, lo cual es importante al trabajar con especies catalogadas en peligro de extinción, como es el caso de la totoaba.

Factores que afectan la extracción de ADN

Las condiciones de lisis que presenta el estómago favorecen la degradación del material genético, sin embargo, se han realizado estudios exitosos de análisis de *metabarcoding* de contenido estomacal en peces, ya que estos animales suelen tragar a su presa entera, causando que la descomposición sea lenta y permitiendo coleccionar ADN íntegro (Amundsen y Sánchez-Hernández, 2019). En este caso, no se sabe si los peces estuvieron en descongelación en algún momento desde su captura, lo que posiblemente llevó a tener dificultades en la extracción. Para solucionar esto, las muestras que no fueron exitosamente procesadas con el *QIAamp DNA Stool Mini Kit*, se procesaron con el *DNeasy blood y tissue kit*.

En algunas de las muestras la banda de ADN observada en el gel de agarosa no fue nítida, además de presentar un barrido. Esto puede ser indicador de la degradación del material genético (Anexo G). La cuantificación realizada con el espectrofotómetro resultó en concentraciones bajas de ADN, lo cual se ha demostrado puede generar errores en la cuantificación (Yu *et al.* 2017). Por lo cual, para determinar la cantidad ADN en la reacción de amplificación, se utilizó información combinada del espectrofotómetro y la integridad en el gel de agarosa.

Construcción de librerías genéticas y secuenciación

Se eligieron estratégicamente marcadores de los grupos taxonómicos que fueron reportados en estudios de reconocimiento morfológico de la dieta de la totoaba (Berdegú, 1955; Arvizu y Chávez, 1972; De Anda-Montañez *et al.*, 2013). El éxito del análisis depende de la habilidad de la PCR para amplificar material genético de todas las presas. Esto se puede ver afectado por la presencia de ADN del depredador, ya que se encuentra en mayor concentración y con mejor integridad (Leray *et al.*, 2013). La amplificación preferencial del depredador puede llevar a la pérdida de información de las secuencias objetivo que se encuentran en baja concentración (Boessenkool *et al.*, 2012). Para contrarrestar esto, se han desarrollado diferentes estrategias, como digerir el ADN del depredador con enzimas de restricción (Blankenship y Yayanos, 2005) o el uso de un *primer* bloqueador diseñado específicamente para el depredador (Vestheim y Jarman, 2008). En este estudio se optó por aumentar la profundidad de secuenciación (Devloo-Delva *et al.*, 2018) y por una reducción en los ciclos de la PCR (Polz y Cavanaugh, 1998), debido a la insuficiente información genética de la totoaba para poder diseñar un *primer* bloqueador adecuado o elegir enzimas de restricción específicas. Sin embargo, en el caso de totoaba, tal vez no sea recomendable utilizar un *primer* bloqueador o enzimas de restricción, debido a su aparente canibalismo. Es decir, al bloquear la amplificación del ADN del depredador, también se estaría evitando identificar a la propia totoaba como presa.

Para la optimización de las lecturas en las muestras se utilizó el *Two-step PCR Approach* (Illumina, 2011). En este método, se amplifican los *loci* de interés con un número bajo de ciclos en la primera reacción, mientras que en la segunda reacción se utiliza el producto de la primera reacción como molde para el indexado de cada muestra (Arandjelovic *et al.*, 2009). El tamaño

promedio de los amplicones fue de 126.51 pares de bases, a excepción del amplicón de invertebrados (>300 pb). La longitud de estos amplicones es ideal para este tipo de estudios, debido a que pueden ser usados en muestras que presenten cierto grado de degradación del ADN (Pompanon *et al.*, 2012). En el caso de los amplicones del *primer* de invertebrados (COI), donde la longitud era mayor que la capacidad de lectura de la celda de flujo (150 pb), el análisis se realizó usando solo la secuencia *forward* (124 pb); en contraste con el resto de los amplicones, donde el análisis utilizó las secuencias *forward* y *reverse*.

Con esta información se obtuvo la Unidad Taxonómica Operativa (OTU), en donde una diferencia de una sola base se consideraba una OTU diferente. El análisis basado en OTUs es deseable, ya que es independiente a la taxonomía y representa una ventaja al no estar limitado por un marco de referencia taxonómico que se encuentra en constante evolución (Berry *et al.*, 2017); en su lugar, analiza las secuencias como un conjunto de datos y las compara entre sí (Schloss y Westcott, 2011).

Asignación taxonómica

La asignación taxonómica se llevó a cabo a través de la herramienta BLAST y una serie de criterios de inclusión. Dichos criterios se seleccionaron para descartar las secuencias que se hubieran identificado erróneamente en el BLAST, contaminación o errores de la secuenciación.

Solamente en cuatro casos no se reconoció la especie de la secuencia. Particularmente, en el caso del krill no fue posible distinguir entre *Euphausia pacifica*, *Nematobrachion flexipes* y *Tessarabrachion oculatum*, por lo que dicha identidad se presenta a nivel de familia como *Euphasiidae sp.*

En los resultados se puede observar que los marcadores no presentaron alta especificidad en cuanto a su taxón destinado (Tabla 5), ya que amplificaron organismos de otros grupos. Sin embargo, es destacable el hecho de que el marcador para eucariotas fue el único que no amplificó ADN de totoaba. Esto se debe a que, aunque el *primer* puede amplificar un gran espectro de eucariotas, tiene preferencia por los microorganismos (Gilbert *et al.*, 2014). También, puede deberse a que la región que amplifica no está disponible para un rango amplio de animales en las bases de datos genéticas. Sin embargo, ha sido exitosamente utilizado para determinar la dieta de especies zooplanctívoras de peces (Albaina *et al.*, 2016).

Por otro lado, con el marcador de invertebrados marinos, que se basa en el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa subunidad I (COI), se obtuvo el menor número de organismos identificados y el menor porcentaje de secuencias de calidad. Este marcador se añadió con la intención de identificar la presencia de cangrejos pequeños y camarones del género *Penaenus* descritos por Berdegué (1955) y crustáceos de los órdenes *Decapoda*, *Portunoidea*, *Penaeoidea*, *Euphausiacea*, *Sicyoniidae* y *Stomatopoda* descritos como alimento de la totoaba por De Anda-Montañez y colaboradores (2013). Además, se buscaba identificar organismos de este grupo, que no hayan sido identificados mediante reconocimiento morfológico. Contrario a lo esperado, los amplicones no detectaron ningún molusco ni crustáceo, solamente peces y krill. Existen posibles explicaciones para este fenómeno. Podría ser que, en efecto, las totoabas muestreadas no los ingirieron, o es que hubiera un sesgo en la PCR y no se hayan amplificado dichas secuencias por la naturaleza degenerada del *primer* (Polz y Cavanaugh, 1998). En el estudio hecho por Leray *et al.* (2013) demuestran que, aunque el *primer* se diseñó para detectar invertebrados marinos,

tiene una preferencia para amplificar ADN de peces cuando no se utiliza ninguna técnica para eliminar el ADN del depredador en muestras digestivas.

En contraste con el marcador de invertebrados marinos, el de cordados resultó ser el más informativo. Este tuvo un porcentaje de identificación de 85%, lo cual se atribuye a que la región de interés es la más corta de entre todos los marcadores (~120 pb) y que pudo distinguir a nivel de especie a todos los organismos detectados a excepción de *Calanidae sp.* Los marcadores para eucariotas y cefalópodos también resultaron adecuados dadas las condiciones del estudio. Éstos tuvieron porcentajes de identidad de 92% y 95% respectivamente. Sin embargo, aunque presentaron un porcentaje mayor al marcador de cefalópodos, también fueron inferiores en resolución.

Identificación de las presas de la totoaba

Al igual que en la asignación taxonómica, las presas se seleccionaron mediante una serie de criterios, porque es importante discernir entre las presas de totoaba, los organismos parásitos del depredador o de sus presas, o del alimento de sus presas, debido a la alta resolución del *metabarcoding* (Hardy et al., 2017). Para ello, se consideraron las presas previamente descritas y la biología de la totoaba, ya que el conocimiento de la ecología trófica del depredador bajo estudio ayuda a reducir los falsos positivos en la identificación de las presas (Monterroso *et al.*, 2018). Berdegué (1955) examinó, por reconocimiento morfológico, los estómagos de siete totoabas en estados juvenil y adulto; en los adultos determinó como alimento principal a las anchovetas (*Cetengraulis mysticetus*) y las anchoas (principalmente *Anchoa mundeoloides*). Por otro lado, De Anda-Montañez *et al.* (2013) realizaron campañas de monitoreo entre abril del

2010 y noviembre del 2011. En su estudio, obtuvieron 65 estómagos con alimento e identificaron por reconocimiento morfológico 29 componentes: 17 peces, 10 crustáceos y dos cefalópodos.

De los 18 OTUs identificados en este estudio, se descartaron cuatro especies y una subclase, como posibles presas de totoaba. *Kudoa thyrsites* se eliminó como candidato a presa de totoaba, ya que está descrito como parásito de peces. Por otro lado, se observó la presencia de dos diatomeas: *Thalassiosira minúscula* y *Planktoniella sol*; su aparición se atribuye a la amplificación de la dieta de *Cetengraulis mysticetus* (James, 1988) o de *Mugil cephalus*, que se alimenta de diatomeas, algas, copépodos y materia orgánica (Islam *et al.*, 2009). A pesar de que no se encontró información sobre el consumo de copépodos por parte de alguna especie presa de totoaba identificada, ni del gusano flecha (*Parasagitta elegans*) se optó por el criterio más conservador, por lo que se descartaron como presas de totoaba. Sin embargo, se requieren estudios más profundos para confirmar esto.

Como se mencionó anteriormente, no se usó un *primer* bloqueador de totoaba en este trabajo, por lo que es lógico que en todos los casos exista amplificación del depredador. Es destacable mencionar que las secuencias obtenidas de totoaba resultaron en diferentes OTUs, esto quiere decir que presentan mínimo una base diferente entre ellas. Esto no es evidencia directa de que estos peces hayan consumido otras totoabas, ya que ninguno de los sitios amplificados contiene regiones para diferenciación intraespecífica. Sin embargo, tampoco hay evidencia de que se trate de errores en la amplificación o secuenciación.

El estudio de reconocimiento morfológico de De Anda-Montañez *et al.* (2013) no reporta haber encontrado restos de totoaba en los estómagos estudiados. Sin embargo, sí se han identificado otolitos de totoaba cuando se han extraído organismos silvestres para utilizarlos

como reproductores en cultivo, y éstos expulsan el contenido estomacal por el cambio de presión (com. pers. L. M. Enríquez Paredes²). Por otro lado, Enríquez Paredes menciona que, en la experiencia de cultivo de *Totoaba macdonaldi*, los peces deben ser separados por talla, para evitar el canibalismo. Es necesario realizar un análisis que permita diferenciar individuos genéticamente para comprobar si los adultos consumen otras totoabas de estadios más jóvenes en vida libre. Esto puede realizarse con microsatélites o polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), que han sido ampliamente utilizados en estudios de ecología, evolución y conservación (Morin *et al.*, 2004).

En este estudio, se identificaron 12 presas ingeridas entre las cuatro totoabas muestreadas. Las especies *Cetengraulis mysticetus* y *Mugil cephalus* fueron detectadas en los cuatro estómagos (Tabla 4). *Mugil cephalus* también fue reportada en el trabajo de De Anda-Montañez *et al.* (2013), pero no fue muy abundante, solo se detectó en cuatro de los 65 estómagos; esto puede deberse tanto a variaciones en la población de *M. cephalus* durante las campañas de muestreo como a problemas de detección en la muestra.

En la Figura 5 se observa la comparación entre lo obtenido por De Anda-Montañez *et al.* (2013) en las campañas de febrero y marzo del 2011, las cuales se eligieron porque todas las totoabas muestreadas estaban en etapa adulta. Al comparar los datos de presencia/ausencia de los organismos identificados y valores adecuados al número de estómagos muestreados, se observan diferencias en los resultados que aparentemente resultaron en una menor diversidad de especies con el método molecular. Sin embargo, se obtuvieron 12 especies de presas a partir

²Dr. Luis Manuel Enríquez Paredes. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California.

de cuatro estómagos, con el método molecular, contra 15 a partir de 35 estómagos, con el reconocimiento morfológico. Esta menor diversidad se podría explicar por el menor número de muestras. Por otro lado, se identificaron 10 especies con el método molecular contra cinco presas a nivel de especie con el reconocimiento morfológico. Por lo tanto, la resolución a nivel taxonómico del método molecular resultó ser superior.

Al comparar las dietas de cada individuo estudiado, usando el índice de similitud de Jaccard, se encontró que la dieta más similar se presenta entre los dos machos, independientemente de sus tallas. Esto debe ser probado estadísticamente con un mayor tamaño de muestra, ya que en la literatura solo se reconocen variaciones en la dieta debido a la edad y a las migraciones (Arvizu y Chávez, 1972).

Por último, se utilizó el índice de Chao2 para determinar si el número de peces muestreados representa la totalidad de la información. Utilizando la metodología aquí descrita se obtuvo un 69.96% de eficiencia a partir de cuatro estómagos, por lo que se podría aumentar la cantidad de *primers* para mejorar la eficiencia, y/o aumentar el número de muestras. A partir de este análisis no es posible determinar la cantidad de muestras necesarias para describir el espectro trófico de totoaba, por medio de *metabarcoding*. Sin embargo, la cantidad de totoabas que se tendrían que sacrificar no deberían de ser tantas como las que se requieren en un estudio utilizando el reconocimiento morfológico. De Anda-Montañez *et al.* (2013) reportaron que se requieren, como mínimo, 60 estómagos para determinar el espectro trófico de la totoaba por medio de reconocimiento morfológico.

Desempeño del *metabarcoding*.

El *metabarcoding* ha probado ser un método más eficiente cuando se le compara con métodos de identificación tradicionales (Moran *et al.*, 2016; Riccioni *et al.*, 2018; Ji *et al.*, 2013; Valentini *et al.*, 2016; Monterroso *et al.*, 2018). Esta investigación contribuye a la utilización de métodos moleculares para futuros estudios que busquen describir la dieta de la totoaba.

Para un análisis más preciso existen varios factores a tomarse en cuenta en el desarrollo de la metodología. Es recomendable tener nociones previas de la dieta para poder elegir *primers* con buena resolución, ya que incluso los *primers* universales tienden a amplificar taxones con secuencias complementarias exactas (Blankenship y Yayanos, 2005) o utilizar mayor número de *primers* que permitan aumentar la resolución. También, se debe tomar en cuenta el tamaño de los amplicones, ya que el ADN template tendrá algún grado de degradación (Pompanon *et al.* (2012) recomiendan amplicones de 100-250 pb), pudiéndose usar varios *primers* para amplificar el mismo amplicón o gen marcador.

Por otro lado, se debe considerar la posibilidad de incorporar un *primer* bloqueador para evitar la amplificación del ADN del depredador y posibilitar la detección de elementos poco comunes en la dieta. En estudios con foca ésta ha resultado ser una estrategia exitosa para una mayor detección de presas (Brassea-Pérez *et al.*, 2019; Pacheco-Sandoval *et al.*, 2019) ya que permite su amplificación durante la PCR y permite su disponibilidad de lectura en la secuenciación. De utilizarse un *primer* bloqueador en el caso de la totoaba, se debe tener en cuenta que se necesita obtener el genoma del pez; así como realizar pruebas en paralelo sin incluir el bloqueador para permitir la amplificación de marcadores genéticos que permitan establecer diferencias entre individuales para determinar si las totoabas presentan canibalismo.

Debe tenerse en cuenta que en este estudio solamente se obtuvieron datos certeros de la presencia/ausencia de las presas en la muestra. Si bien existen métodos de estimación de frecuencia, estos no son evidencia directa de la cantidad de presas consumidas de cada especie. Tampoco provee información sobre la talla, estado de desarrollo ni sexo de las presas (Valentini *et al.*, 2016).

Un factor determinante en los estudios de *metabarcoding* son las bases de datos genéticas. Dichas bases de datos son la referencia con la cual se identifican las secuencias obtenidas, por lo que es elemental que éstas tengan la calidad y cobertura adecuada (Pompanon *et al.*, 2012). En este caso, se utilizó una base de datos no redundante (BLASTdsv5), la cual contiene todas las secuencias de las divisiones tradicionales del GenBank. Las bases de datos públicas se encuentran en constante actualización y se amplían con la contribución de la comunidad científica, por lo que, a través del tiempo, las identificaciones con *metabarcoding* contarán con una mayor cantidad de referencias.

Capítulo 5. Conclusiones

- Se desarrolló un protocolo metodológico que utiliza el *metabarcoding* como herramienta para la identificación de presas de *Totoaba macdonaldi* a partir del contenido estomacal.
- El método de extracción de ADN descrito en el Anexo A resultó ser mejor, según la calidad del ADN observado en el gel.
- El reconocimiento molecular resultó ser más eficiente, en términos de número de individuos requeridos en la muestra y resolución taxonómica, que la identificación por medio de reconocimiento morfológico.
- Los marcadores genéticos ADNmt 16S y ARNr 18S resultaron adecuados para los propósitos del estudio, a diferencia del marcador COI, que tuvo el peor desempeño ya que no se pudieron generar las librerías genéticas para la secuenciación debido a la química de la secuenciación.
- A través del *metabarcoding*, se identificaron 12 especies dentro de la dieta de la totoaba, de los cuales 5 fueron previamente descritos y 7 se describen aquí por primera vez.
- Existe una preferencia de totoaba por consumir otros peces. Los peces de mayor importancia según presencia/ausencia fueron *Cetengraulis mysticetus* y *Mugil cephalus*.
- La presencia de ADN de totoaba en todas las muestras puede deberse a que se amplificó el ADN del depredador. Sin embargo, no se puede descartar que la totoaba se alimente de otros individuos de su misma especie.
- Una vez estandarizados estos protocolos, se recomienda aplicarlos a mayor número de muestras para ampliar información sobre el tema. Es recomendable, inicialmente, complementar la técnica molecular con la de reconocimiento de restos sólidos.

Referencias

- Albaina, A., Aguirre, M., Abad, D., Santos, M. y Estonba, A. (2016). 18S rRNA V9 metabarcoding for diet characterization: a critical evaluation with two sympatric zooplanktivorous fish species. *Ecology and Evolution*, 6(6), 1809-1824.
- Amaral-Zettler, L. A., McCliment, E. A., Ducklow, H. W. y Huse, S. M. (2009). A method for studying protistan diversity using massively parallel sequencing of V9 hypervariable regions of small-subunit ribosomal RNA genes. *PloS one*, 4(7), e6372.
- Amundsen, P. A. y Sánchez-Hernández, J. (2019). Feeding studies take guts—critical review and recommendations of methods for stomach contents analysis in fish. *Journal of Fish Biology*, 95(6), 1364-1373.
- Arandjelovic, M., Guschanski, K., Schubert, G., Harris, T. R., Thalmann, O., Siedel, H. y Vigilant, L. (2009). Two-step multiplex polymerase chain reaction improves the speed and accuracy of genotyping using DNA from noninvasive and museum samples. *Molecular Ecology Resources*, 9(1), 28-36.
- Arvizu, J. y Chávez, H. (1972). Sinopsis sobre la biología de la Totoaba: "*Cynoscion macdonaldi*" Gilbert, 1890. Subsecretaría de Pesca. Secretaría de Industria y Comercio. Instituto Nacional de Pesca. Programa de Investigaciones y Fomento Pesqueros.
- Bahre, C. J., Bourillón, L. y Torre, J. (2000). The Seri and commercial Totoaba fishing (1930-1965). *Journal of the Southwest*, 42(3), 559-575
- Baird, D. J. y Hajibabaei, M. (2012). Biomonitoring 2.0: a new paradigm in ecosystem assessment made possible by next-generation DNA sequencing. *Molecular Ecology*, 21(8), 2039-2044.
- Berdegúe, A. J. (1955). La pesquería de Totoaba (*Cynoscion macdonaldi*) en San Felipe, Baja California. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, 16(1-4): 45-78.
- Berry, T. E., Osterrieder, S. K., Murray, D. C., Coghlan, M. L., Richardson, A. J., Grealy, A. K., Stat, M., Bejder, L. y Bunce, M. (2017). DNA metabarcoding for diet analysis and biodiversity: A case study using the endangered Australian sea lion (*Neophoca cinerea*). *Ecology and evolution*, 7(14), 5435–5453. <https://doi.org/10.1002/ece3.3123>
- Blankenship, L. E. y Yayanos, A. A. (2005). Universal primers and PCR of gut contents to study marine invertebrate diets. *Molecular Ecology*, 14(3), 891-899.
- Bobadilla, M., Alvarez-Borrego, S., Avila-Foucat, S., Lara-Valencia, F. y Espejel, I. (2011). Evolution of environmental policy instruments implemented for the protection of totoaba and the vaquita porpoise in the Upper Gulf of California. *Environmental Science & Policy*, 14(8), 998-1007.

- Boessenkool, S., Epp, L. S., Haile, J., Bellemain, E., Edwards, M., Coissac, E., Willerslev, E. y Brochmann, C. (2012). Blocking human contaminant DNA during PCR allows amplification of rare mammal species from sedimentary ancient DNA. *Molecular ecology*, 21(8), 1806–1815. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05306.x>
- Bowles, E., Schulte, P. M., Tollit, D. J., Deagle, B. E. y Trites, A. W. (2011). Proportion of prey consumed can be determined from faecal DNA using real-time PCR. *Molecular Ecology Resources*, 11(3), 530-540.
- Brassea-Pérez, E., Schramm, Y., Heckel, G., Chong-Robles, J. y Lago-Lestón, A. (2019). Metabarcoding analysis of the Pacific harbor seal diet in Mexico. *Marine Biology*, 166(8), 106.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A. y Holmes, S. P. (2016). DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581.
- Chao, A. (1987). Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. *Biometrics*, 783-791.
- Cinti, A., Shaw, W., Cudney-Bueno, R. y Rojo, M. (2010). The unintended consequences of formal fisheries policies: Social disparities and resource overuse in a major fishing community in the Gulf of California, Mexico. *Marine Policy*, 34(2), 328–339. doi: 10.1016/j.marpol.2009.08.002
- Cisneros-Mata, M.A. (2020). Evaluación de la población de *Totoaba macdonaldi*. Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura. México. 105p.
- Cisneros-Mata, M. A., Montemayor-López, G. y Román-Rodríguez, M. J. (1995). Life history and conservation of *Totoaba macdonaldi*. *Conservation Biology*, 9(4), 806-814.
- Colwell, R. K. (2013). EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 9 and earlier. User's Guide and application. Publicado en: <http://purl.oclc.org/estimates>.
- Córdova-Montejo, M., Álvarez-González, C. A., López, L. M., True, C. D., Frías-Quintana, C. A. y Galaviz, M. A. (2019). Changes of digestive enzymes in totoaba (*Totoaba macdonaldi*, Gilbert, 1890) during early ontogeny. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 47(1), 102-113.
- De Anda-Montañez, J. A., García de León, F. J., Zenteno-Savín, T., Balart-Paez, E., Méndez-Rodríguez, L. C., Bocanegra-Castillo, N., Martínez-Aguilar, S., Campos-Dávila, L., Román Rodríguez, M. J., Valenzuela-Quiñonez, F., Rodríguez-Jaramillo, M. E., Meza-Chávez, M. E., Ramírez-Rosas, J. J., Saldaña-Hernández, I. J., Olguín-Monroy, N. O. y M. E. Martínez-Delgado. (2013). Estado de salud y estatus de conservación de la(s) población(es) de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) en el Golfo de California: una especie en peligro de

extinción. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. La Paz, Baja California Sur. Informe Final, SNIB-CONABIO. Proyecto No. HK050, México, D.F.

- de Sousa, L. L., Silva, S. M. y Xavier, R. (2019). DNA metabarcoding in diet studies: Unveiling ecological aspects in aquatic and terrestrial ecosystems. *Environmental DNA*, 1(3), 199-214.
- Deagle, B. E., Jarman, S. N., Pemberton, D. y Gales, N. J. (2005). Genetic screening for prey in the gut contents from a giant squid (*Architeuthis* sp.). *Journal of Heredity*, 96(4), 417-423.
- Deagle, B. E., Kirkwood, R. y 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. y 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.
- Devloo-Delva, F., Huerlimann, R., Chua, G., Matley, J. K., Heupel, M. R., Simpfendorfer, C. A. y Maes, G. E. (2018). How does marker choice affect your diet analysis: comparing genetic markers and digestion levels for diet metabarcoding of tropical-reef piscivores. *Marine and Freshwater Research*, 70(1), 8-18.
- DOF (10/06/1993). DECRETO por el que se declara área natural protegida con el carácter de Reserva de la Biosfera, la región conocida como Alto Golfo de California y Delta del Río Colorado, ubicada en aguas del Golfo de California y los municipios de Mexicali, B.C., de Puerto Peñasco y San Luis Río Colorado, Son.
- DOF (21/12/2015). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental, especies nativas de México de flora y fauna silvestre, categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio y lista de especies en riesgo. México. 78 pp.
- Doyle, J. J. y Doyle, J. L. (1987). A rapid procedure for DNA purification from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.
- Encyclopedia of Life (2014). Disponible en: <http://eol.org>. Fecha de acceso 2020-09-05.
- Fernandes, K., van der Heyde, M., Bunce, M., Dixon, K., Harris, R. J., Wardell-Johnson, G. y Nevill, P. G. (2018). DNA metabarcoding—a new approach to fauna monitoring in mine site restoration. *Restoration ecology*, 26(6), 1098-1107.
- Flanagan, C. A. y Hendrickson, J. R. (1976). Observations on the commercial fishery and reproductive biology of the totoaba, *Cynoscion macdonaldi*, in the northern Gulf of California. *Fishery Bulletin*, 74(3), 531-544.
- Froese, R. y Pauly, D. (2019) FishBase. Disponible en: www.fishbase.org. Fecha de acceso 2020-09-05.

- Galaviz, M. A., López, L. M., Gasca, A. G., González, C. A. Á., True, C. D. y Gisbert, E. (2015). Digestive system development and study of acid and alkaline protease digestive capacities using biochemical and molecular approaches in totoaba (*Totoaba macdonaldi*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(5), 1117-1130.
- García-De León, F. J., Valles-Jimenez, R., Shaw, K., Ward, R., De Anda Montañez, J. A. y Delgado, M. M. (2010). Characterization of fourteen microsatellite loci in the endemic and threatened totoaba (*Totoaba macdonaldi*) from the Gulf of California. *Conservation Genetics Resources*, 2(1), 219-221.
- Geller, J., Meyer, C., Parker, M. y Hawk, H. (2013). Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys. *Molecular Ecology Resources*, 13(5), 851-861.
- Gilbert C. H. 1890. A preliminary report on the fishes collected by the steamer "Albatross" on the Pacific coast of North America during the year 1889, with descriptions of twelve new genera and ninety-two new species. *Proceedings of the United States National Museum* 13: 49-126
- Gilbert, J. A., Jansson, J. K. y Knight, R. (2014). The Earth Microbiome project: successes and aspirations. *BMC Biology*, 12(1), 69.
- González-Varo, J. P., Arroyo, J. M. y Jordano, P. (2014). Who dispersed the seeds? The use of DNA barcoding in frugivory and seed dispersal studies. *Methods in Ecology and Evolution*, 5(8), 806-814.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. y Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontología Electrónica*, 4(1), 9.
- Hardy N., Berry T., Kelaher B.P., Goldsworthy S.D., Bunce M., Coleman M.A., Gillanders B.M., Connell S.D., Blewitt M. y Figueira W. (2017). Assessing the trophic ecology of top predators across a recolonization frontier using DNA metabarcoding of diets. *Marine Ecology Progress Series*, 573:237–254. <https://doi.org/10.3354/meps12165>
- Hebert, P. D., Cywinska, A. y Ball, S. L. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S. y de Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(Suppl_1), S96–S99. <https://doi:10.1098/rsbl.2003.0025>.
- Hernandez-Tlapale, C., De Anda-Montañez, J. A., Trasviña-Castro, A., Valenzuela-Quíñonez, F., Ketchum, J. T. y Muhlia-Melo, A. (2020). First record of vertical movements of the totoaba (*Totoaba macdonaldi*) as evidenced by pop-up satellite tags in the Upper Gulf of

- California. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 100(1), 143-151.
- Hinchliff, C. E., Smith, S. A., Allman, J. F., Burleigh, J. G., Chaudhary, R., Coghill, L. M., Crandall, K. A., Deng, J., Drew, B. T., Gazis, R., Gude, K., Hibbett, D. S., Katz, L. A., Laughinghouse, H. D., 4th, McTavish, E. J., Midford, P. E., Owen, C. L., Ree, R. H., Rees, J. A., Soltis, D. E., Williams, K. y Cranston, K. A. (2015). Synthesis of phylogeny and taxonomy into a comprehensive tree of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(41), 12764–12769. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423041112>
- Illumina. (2011). Preparing 16S ribosomal RNA gene amplicons for the Illumina MiSeq system. Illumina technical note.
- Islam, R., Hossain, M. B., Das, N. G. y Rafi, R. U. N. (2009). Food and feeding behavior of grey mullet *Mugil cephalus* of Bangladesh coastal water. *Bangladesh Journal of Progressive Science and Technology*, 7, 273-276.
- Jaccard, P. (1901). Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles*, 37, 547-579.
- James, A. G. (1988). Are clupeid microphagists herbivorous or omnivorous? A review of the diets of some commercially important clupeids. *South African Journal of Marine Science*, 7(1), 161-177.
- Ji, Y., Ashton, L., Pedley, S. M., Edwards, D. P., Tang, Y., Nakamura, A., Kitching, R., Dolman, P. M., Woodcock, P., Edwards, F. A., Larsen, T. H., Hsu, W. W., Benedick, S., Hamer, K. C., Wilcove, D. S., Bruce, C., Wang, X., Levi, T., Lott, M., Emerson, B. C. y Yu, D. W. (2013). Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding. *Ecology letters*, 16(10), 1245-1257.
- Juarez, L. M., Konietzko, P. A. y Schwarz, M. H. (2016). Totoaba aquaculture and conservation: Hope for an endangered fish from Mexico's Sea of Cortez. *World Aquaculture*, 47(4), 30-38.
- Kinoshita, G., Yonezawa, S., Murakami, S. y Isagi, Y. (2019). Environmental DNA Collected from Snow Tracks is Useful for Identification of Mammalian Species. *Zoological Science*, 36(3), 198-207.
- Kress, W. J., García-Robledo, C., Uriarte, M. y Erickson, D. L. (2015). DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 30(1), 25-35.
- Leray, M., Agudelo, N., Mills, S. C. y Meyer, C. P. (2013). Effectiveness of annealing blocking primers versus restriction enzymes for characterization of generalist diets: unexpected prey revealed in the gut contents of two coral reef fish species. *PloS one*, 8(4), e58076.

- Leray, M. y Knowlton, N. (2015). DNA barcoding and metabarcoding of standardized samples reveal patterns of marine benthic diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(7), 2076-2081.
- Leray, M., Yang, J. Y., Meyer, C. P., Mills, S. C., Agudelo, N., Ranwez, V., Boehm, J.T. y Machida, R. J. (2013). A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. *Frontiers in Zoology*, 10(1), 34.
- Lercari, D. y Chávez, E. A. (2007). Possible causes related to historic stock depletion of the totoaba, *Totoaba macdonaldi* (Perciformes: *Sciaenidae*), endemic to the Gulf of California. *Fisheries Research*, 86(2-3), 136-142.
- Márquez-Farías, J. F. y Rosales-Juárez, F. J. (2013). Intrinsic rebound potential of the endangered (*Totoaba macdonaldi*) population, endemic to the Gulf of California, México. *Fisheries Research*, 147, 150-153.
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. Journal*, 17(1), 10-12.
- Mata-Sotres, J. A., Lazo, J. P. y Baron-Sevilla, B. (2015). Effect of age on weaning success in totoaba (*Totoaba macdonaldi*) larval culture. *Aquaculture*, 437, 292-296.
- McClenaghan, B., Nol, E. y Kerr, K. C. (2019). DNA metabarcoding reveals the broad and flexible diet of a declining aerial insectivore. *The Auk: Ornithological Advances*, 136(1), 1-11.
- Michel, A. P., Sim, S., Powell, T. H., Taylor, M. S., Nosil, P. y Feder, J. L. (2010). Widespread genomic divergence during sympatric speciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(21), 9724-9729.
- Microsynth AG. 2015. Amplicon Deep Sequencing on the Illumina MiSeq / NextSeq Platform (Application Note), 1-4.
- Miller, S., Dykes, D. y Polesky, H. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16, 1215.
- Minjarez-Osorio, C., González-Félix, M. L. y Perez-Velazquez, M. (2012). Biological performance of *Totoaba macdonaldi* in response to dietary protein level. *Aquaculture*, 362, 50-54.
- Monterroso, P., Godinho, R., Oliveira, T., Ferreras, P., Kelly, M.J., Morin, D.J., Waits, L.P., Alves, P.C. y Mills, L.S. (2018). Feeding ecological knowledge: the underutilised power of faecal DNA approaches for carnivore diet analysis. *Mammal Review*. <https://doi.org/10.1111/mam.12144>
- Morales-Ortiz, C. (1999). Descripción del desarrollo embrionario de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) bajo condiciones de laboratorio (Doctoral dissertation, Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, BC, México).

- Moran, Z., Orth, D. J., Schmitt, J. D., Hallerman, E. M. y Aguilar, R. (2016). Effectiveness of DNA barcoding for identifying piscine prey items in stomach contents of piscivorous catfishes. *Environmental Biology of Fishes*, 99(1), 161-167.
- Morin, P. A., Luikart, G. y Wayne, R. K. (2004). SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in ecology & evolution*, 19(4), 208-216.
- Nichols, R. V., Vollmers, C., Newsom, L. A., Wang, Y., Heintzman, P. D., Leighton, M., Green, R. E. y Shapiro, B. (2018). Minimizing polymerase biases in metabarcoding. *Molecular ecology resources*, 10.1111/1755-0998.12895.
- Ostrom, P. H., Colunga-Garcia, M. y Gage, S. H. (1996). Establishing pathways of energy flow for insect predators using stable isotope ratios: field and laboratory evidence. *Oecologia*, 109(1), 108-113.
- Pacheco-Sandoval, A., Schramm, Y., Heckel, G., Brassea-Pérez, E., Martínez-Porchas, M. y Lago-Lestón, A. (2019). The Pacific harbor seal gut microbiota in Mexico: Its relationship with diet and functional inferences. *PloS one*, 14(8), e0221770.
- Polz, M. F. y Cavanaugh, C. M. (1998). Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Applied and environmental Microbiology*, 64(10), 3724-3730.
- Pompanon, F., Deagle, B. E., Symondson, W. O., Brown, D. S., Jarman, S. N. y Taberlet, P. (2012). Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing. *Molecular Ecology*, 21(8), 1931-1950.
- R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Riccioni, G., Stagoni, M., Piccinetti, C. y Libralato, S. (2018). A metabarcoding approach for the feeding habits of European hake in the Adriatic Sea. *Ecology and evolution*, 8(21), 10435-10447.
- Rojas-Bracho, L., Gulland, F., Smith, C., Taylor, B., Wells, R., Thomas, P., Bauer, B., Heide-Jørgensen, M., Teilmann, J., Dietz, R., Balle, J., Jensen, M., Sinding, M., Jaramillo-Legorreta, A., Abel, G., Read, A., Westgate, A., Colegrove, K., Gomez, F., Martz, K., Rebolledo, R., Ridgway, S., Rowles, T., Van Elk, C., Boehm, J., Cardenas-Hinojosa, G., Constandse, R., Nieto-Garcia, E., Phillips, W., Sabio, D., Sanchez, R., Sweeney, J., Townsend, F., Vivanco, J., Vivanco, J. Y Walker, S. (2019). A field effort to capture critically endangered vaquitas *Phocoena sinus* for protection from entanglement in illegal gillnets. *Endangered Species Research*, 38, 11-27.
- Rothman, J. M., Chapman, C. A., Hansen, J. L., Cherney, D. J. y Pell, A. N. (2009). Rapid assessment of the nutritional value of foods eaten by mountain gorillas: applying near-infrared reflectance spectroscopy to primatology. *International Journal of Primatology*, 30(5), 729-742.

- Schloss, P. D. y Westcott, S. L. (2011). Assessing and improving methods used in operational taxonomic unit-based approaches for 16S rRNA gene sequence analysis. *Applied and environmental microbiology*, 77(10), 3219-3226.
- Shokralla, S., Spall, J. L., Gibson, J. F. y Hajibabaei, M. (2012). Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology*, 21(8), 1794-1805.
- Soininen, E. M., Valentini, A., Coissac, E., Miquel, C., Gielly, L., Brochmann, C., Brysting, A.K., Sønstebo, J.H., Ims, R.A., Yoccoz, N.G. y Taberlet, P. (2009). Analysing diet of small herbivores: the efficiency of DNA barcoding coupled with high-throughput pyrosequencing for deciphering the composition of complex plant mixtures. *Frontiers in Zoology*, 6(1), 16.
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C. y Willerslev, E. (2012). Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 21(8), 2045-2050.
- True, C. D. (2012). Desarrollo de la biotecnia de cultivo de *Totoaba macdonaldi* (Disertación doctoral, Disertación. Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, Mexico).
- Tuuli, C. D., de Mitcheson, Y. S. y Wai-Chuen, N. G. (2016). Molecular identification of croaker dried swim bladders (maw) on sale in Hong Kong using 16S rRNA nucleotide sequences and implications for conservation. *Fisheries Research*, 174, 260-269.
- Ulloa, R., Torre, J., Bourillón, L., Gondor, A. y Alcantar, N. (2006). Planeación ecorregional para la conservación marina: Golfo de California y costa occidental de Baja California Sur. Informe final a The Nature Conservancy. Guaymas (México): Comunidad y Biodiversidad AC, 153.
- Valentini, A., Pompanon, F. y Taberlet, P. (2009). DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology & Evolution*, 24(2), 110-117.
- Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P.F., Bellemain, E., Besnard, A., Coissac, E., Boyer, F., Gaboriaud, C., Jean, P., Poulet, N., Roset, N., Copp, G.H., Geniez, P., Pont, D., Argillier, C., Baudoin, J.-M., Peroux, T., Crivelli, A.J., Olivier, A., Acqueberge, M., Le Brun, M., Møller, P.R., Willerslev, E. y Dejean, T. (2016). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular ecology*, 25(4), 929-942.
- Valenzuela-Quiñonez, F., Arreguín-Sánchez, F., Salas-Márquez, S., García-De León, F. J., Garza, J. C., Román-Rodríguez, M. J. y De-Anda-Montañez, J. A. (2015). Critically endangered totoaba *Totoaba macdonaldi*: signs of recovery and potential threats after a population collapse. *Endangered Species Research*, 29(1), 1-11.

- Vestheim, H. y 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(1), 1-11.
- Villarmar, A. (1980). Totoaba, un nuevo género de la familia *sciaenidae* del Golfo de California, México (pisces: teleostei). *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas Mexico*, 231(4), 129-133.
- Walrant, A. y Loreau, M. (1995) Comparison of iso-enzyme electrophoresis and gut content examination for determining the natural diets of the groundbeetle species *Abax ater* (Coleoptera: Carabidae). *Entomologia Generalis*, 19, 253–259.
- WoRMS Editorial Board (2020). World Register of Marine Species. Disponible en: <http://www.marinespecies.org>. Fecha de acceso 2020-09-06. doi:10.14284/170
- Yu, S., Wang, Y., Li, X., Yu, F. y Li, W. (2017). The factors affecting the reproducibility of micro-volume DNA mass quantification in Nanodrop 2000 spectrophotometer. *Optik*, 145, 555-560.

ANEXOS

Anexo A: Protocolo de extracción de ADN con kit *DNeasy blood and tissue kit* estandarizado para contenido de tracto digestivo de *T. macdonaldi*.

Antes de comenzar:

- Pre-calentar la incubadora a 56°C.
 - Etiquetar 2 pares de tubos Eppendorf para cada muestra.
 - Descongelar RNAsa y centrifugar en la microcentrífuga por 15 segundos.
 - Gradilla fría para mantener las muestras.
 - Programar la centrifuga a 20°C para todas las centrifugaciones.
1. Tarar un tubo etiquetado para pesar 100 mg de muestra.
 2. Pesar 100 mg de muestra y dejar el resto en el tubo original con RNAlater.
 3. Añadir 100 µL de agua DDE a los 100 mg de muestra.
 4. Centrifugar muestras a 20,000 g por 3 minutos.
 5. Preparar tubos nuevos con 180 µL de Buffer ATL, 20 µL de proteinasa K [20 mg/ml] y 4 µL de RNAsa [10 mg/ml].
 6. Pasar la muestra del tubo al que se añadió agua con un palillo estéril al tubo con la mezcla de buffer y macerar con pistilo.
 7. Sellar con parafilm e incubar 10 minutos a 56°C con agitación.
 8. Añadir 200 µL de buffer AL, dar vórtex, sellar con parafilm e incubar 10 minutos a 56°C con agitación.
 9. Añadir 200 µL de etanol grado molecular, dar vórtex y esperar 15 minutos.
 10. Pipetear la muestra en una columna y centrifugar a 6,000 g por 1 minuto.
 11. Desechar el tubo colector y el filtrado. Poner el filtro en un nuevo tubo colector y añadir 500 µL de buffer AW1, centrifugar a 6,000 g por 1 minuto.
 12. Desechar el tubo colector y el filtrado. Poner el filtro en un nuevo tubo colector y añadir 500 µL de buffer AW2, centrifugar por 20,000 g por 3 minutos.
 13. Desechar el tubo colector y el filtrado.
 14. Poner el filtro en un tubo Eppendorf, añadir 25 µL de buffer AE e incubar 1 minuto a T° ambiente. Centrifugar a 6,000 g por 1 minuto.
 15. Repetir el paso 14.
 16. Almacenar en refrigerador hasta su uso.

**Anexo B: Protocolo de extracción de ADN con QIAamp DNA Stool Mini Kit.
Procedimiento de extracción de ADN en heces para detección de patógenos adecuado a
contenido estomacal de *T. macdonaldi*.**

Antes de comenzar:

- Precalentar la incubadora a 70°C.
 - Descongelar RNAsa y centrifugar en la microcentrífuga por 15 segundos.
 - Gradilla fría para mantener las muestras.
 - Programar la centrífuga a 20°C para todas las centrifugaciones.
 - Utilizar tubos de 2 mL.
1. Centrifugar muestras a 20,000 g por 3 minutos.
 2. Descartar el RNAlater con una pipeta y añadir 100 µL de agua DDE.
 3. Centrifugar muestras a 20,000 g por 3 minutos y descartar el agua DDE.
 4. Añadir 1.4 mL de buffer ASL y macerar con pistilo hasta que la muestra luzca homogénea.
 5. Calentar la suspensión a 70°C durante 5 minutos.
 6. Vórtex 15 segundos y centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto.
 7. Pipetear 1.2 mL del sobrenadante a un nuevo tubo de 2 mL y descartar el pellet.
 8. Añadir una tableta de InhibitEX por muestra e inmediatamente dar vórtex hasta que la pastilla se haya disuelto. Incubar 1 minuto a T° ambiente.
 9. Centrifugar a máxima velocidad durante 3 minutos.
 10. Pipetear la totalidad del sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y repetir el paso 9.
 11. Pipetear 15 µL de proteinasa K [20 mg/ml] a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml
 12. Pipetear 200 µL del sobrenadante resultante del paso 10 al tubo que contiene la proteinasa K.
 13. Añadir 200 µL de Buffer AL y dar vórtex por 15 s.
 14. Incubar a 70°C por 10 minutos.
 15. Añadir 200 µL de etanol de grado molecular al lisado y mezclar con vórtex.
 16. Etiquetar la tapa de una columna QIAmp colocada en un tubo de recolección de 2 mL. Vaciar el total del lisado del paso 15 en la columna, sin tocar el filtro.
 17. Centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto. Colocar la columna en un nuevo tubo de recolección y descartar el tubo que contiene el filtrado.
 18. Añadir 500 µL de Buffer AW1.
 19. Centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto. Colocar la columna en un nuevo tubo de recolección y descartar el tubo que contiene el filtrado.
 20. Añadir 500 µL de Buffer AW2.
 21. Centrifugar máxima velocidad por 3 minutos. Colocar la columna en un nuevo tubo de recolección y descartar el tubo que contiene el filtrado.
 22. Repetir la centrifugación durante 1 minuto en un nuevo tubo de recolección.
 23. Transferir la columna a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL etiquetado.

24. Pipetear 100 μ L de Buffer AE directamente a la membrana de la columna, cerrar la tapa e incubar durante 1 minuto a T° ambiente.
25. Centrifugar durante 1 minuto a máxima velocidad para eluir el ADN.
26. Almacenar en refrigerador hasta su uso.

Anexo C: Reactivos y condiciones para PCR1:

Reactivo	Concentración	Cantidad por 1 reacción (µl)
MyTaq Mix	1X	4
<i>Primer F</i>	10 mM	1
<i>Primer R</i>	10 mM	1
MyTaq	5 u/µL	0.125
ADN template	≤ 20 ng/µL	1
H ₂ O DDE		12.875
Total:		20

Programa de PCR Cephalopoda			
		°C	Tiempo
25 ciclos	Desnaturalización inicial	95	15 min
	Desnaturalización	94	30 s
	Alineamiento	57	90 s
	Elongación	72	60 s
	Elongación final	72	2 min

Programa de PCR Chordata			
		°C	Tiempo
25 ciclos	Desnaturalización inicial	95	5 min
	Desnaturalización	94	30 s
	Alineamiento	65.5	30 s
	Elongación	72	45 s
	Elongación final	72	2 min

Programa de PCR Invertebrados marinos			
		°C	Tiempo
16 ciclos	Desnaturalización inicial	95	2 min
	Desnaturalización	95	10 s
	Alineamiento	62*	30 s
	Elongación	72	60 s
25 ciclos	Desnaturalización	95	10 s
	Alineamiento	46	30 s
	Elongación	72	60 s
	Elongación final	72	5 min

*-1°/ciclo

Programa de PCR Eukarya			
		°C	Tiempo
	Desnaturalización inicial	94	3 min
25 ciclos	Desnaturalización	94	45 s
	<i>Primer</i> alineamiento	65	15 s
	Segundo alineamiento	57	30 s
	Elongación	72	90 s
	Elongación final	72	10 min

Anexo D: Reactivos y condiciones para PCR 2:

Reactivo	Concentración	Cantidad por 1 reacción (µl)
Taq Buffer	10 X	4
MgCl ₂	25 mM	4
dNTP mix	10 mM	0.55
<i>Primer</i> F	10 mM	1
<i>Primer</i> R	10 mM	1
Taq Polimerasa	0.5 nM/µl	0.125
ADN templete	20 µg/µL	1
H ₂ O DDE		13.325
Total:		25

Programa de PCR			
		°C	Tiempo
	Desnaturalización inicial	95	3 min
∞ ciclos	Desnaturalización	95	30 s
	Alineamiento	61	30 s
	Elongación	72	5 min
	Elongación final	72	5 min

Anexo E: Tabla 5. Análisis exploratorio de los datos de las secuencias representativas por cada *primer*. No se incluye el *primer* de invertebrados debido a que su análisis solo involucró al *primer* forward.

<i>Primer</i>	Conteo de secuencias	Largo mínimo	Largo máximo	Largo promedio	Rango	Desviación estándar
Ceph	40	132	239	212.55	107	24.02
Chord	33	50	173	108.09	123	35.04
Euk	46	134	178	138.63	44	9.3

Anexo F: Tabla 6. Hits de organismos parte de la dieta, organizados por *primer*.

<i>Primer</i>	Organismo	% identidad	e value	bit score
Eucariota	<i>Chanos chanos</i>	96.203	7.98E-27	130
	<i>Totoaba macdonaldi</i>	100	6.23E-57	230
	<i>Totoaba macdonaldi</i>	100	6.23E-57	230
	<i>Totoaba macdonaldi</i>	100	6.23E-57	230
	<i>Totoaba macdonaldi</i>	96.429	1.37E-43	185
	<i>Totoaba macdonaldi</i>	97.561	2.26E-51	211
	<i>Totoaba macdonaldi</i>	100	6.23E-57	230
	<i>Totoaba macdonaldi</i>	100	6.23E-57	230
	<i>Totoaba macdonaldi</i>	96.581	8.17E-46	193
	<i>Mugil cephalus</i>	100	6.23E-57	230
	<i>Mugil cephalus</i>	98.131	3.80E-44	187
	<i>Mugil cephalus</i>	100	8.34E-31	143
	<i>Micropogonias megalops</i>	100	6.23E-57	230
	<i>Micropogonias megalops</i>	100	6.23E-57	230
	<i>Micropogonias megalops</i>	99.194	2.90E-55	224
	<i>Cetengraulis mysticetus</i>	99.194	2.90E-55	224
	<i>Cetengraulis mysticetus</i>	98.387	1.35E-53	219
	<i>Euphasia pacifica</i>	100	6.23E-57	230
	<i>Anchoa mundeloides</i>	100	6.23E-57	230
	<i>Sardinops sagax</i>	100	6.23E-57	230
Cordados	<i>Totoaba macdonaldi</i>	100	1.18E-37	165
	<i>Totoaba macdonaldi</i>	100	4.25E-37	163
	<i>Totoaba macdonaldi</i>	100	1.18E-37	165

	<i>Totoaba macdonaldi</i>	100	4.25E-37	163
	<i>Cetengraulis mysticetus</i>	100	7.52E-40	172
	<i>Cetengraulis mysticetus</i>	100	7.52E-40	172
	<i>Mugil cephalus</i>	100	1.18E-37	165
	<i>Mugil cephalus</i>	100	4.25E-37	163
	<i>Mugil cephalus</i>	100	1.18E-37	165
	<i>Mugil cephalus</i>	100	4.25E-37	163
	<i>Mugil cephalus</i>	100	4.25E-37	163
	<i>Micropogonias megalops</i>	100	1.18E-37	165
	<i>Micropogonias megalops</i>	100	4.25E-37	163
	<i>Anchoa mundeloides</i>	100	7.52E-40	172
	<i>Engraulis mordax</i>	100	7.52E-40	172
	<i>Sardinops sagax</i>	99.296	3.41E-65	257
	<i>Calanoida sp</i>	100	1.45E-79	305
Cefalópodos	<i>Totoaba macdonaldi</i>	100	6.97E-109	403
	<i>Totoaba macdonaldi</i>	100	6.97E-109	403
	<i>Totoaba macdonaldi</i>	99.502	9.14E-98	366
	<i>Totoaba macdonaldi</i>	100	9.08E-103	383
	<i>Totoaba macdonaldi</i>	99.512	5.46E-100	374
	<i>Totoaba macdonaldi</i>	99.512	5.46E-100	374
	<i>Totoaba macdonaldi</i>	97.906	3.34E-87	331
	<i>Totoaba macdonaldi</i>	100	5.62E-80	307
	<i>Totoaba macdonaldi</i>	97.906	3.34E-87	331
	<i>Totoaba macdonaldi</i>	100	5.62E-80	307
	<i>Totoaba macdonaldi</i>	97.647	1.57E-75	292
	<i>Totoaba macdonaldi</i>	99.502	9.14E-98	366

<i>Totoaba macdonaldi</i>	100	9.08E-103	383
<i>Totoaba macdonaldi</i>	97.647	1.57E-75	292
<i>Totoaba macdonaldi</i>	98.01	9.21E-93	350
<i>Cetengraulis mysticetus</i>	100	6.97E-109	403
<i>Cetengraulis mysticetus</i>	100	6.97E-109	403
<i>Cetengraulis mysticetus</i>	100	6.97E-109	403
<i>Cetengraulis mysticetus</i>	99.541	3.24E-107	398
<i>Cetengraulis mysticetus</i>	99.541	3.24E-107	398
<i>Cetengraulis mysticetus</i>	99.541	3.24E-107	398
<i>Cetengraulis mysticetus</i>	99.541	3.24E-107	398
<i>Cetengraulis mysticetus</i>	99.541	3.24E-107	398
<i>Cetengraulis mysticetus</i>	98.193	5.66E-75	291
<i>Cetengraulis mysticetus</i>	100	3.34E-87	331
<i>Engraulis mordax</i>	100	6.97E-109	403
<i>Engraulis mordax</i>	100	1.95E-109	405
<i>Micropogonias megalops</i>	100	6.97E-109	403
<i>Anchoa mundeloides</i>	99.541	3.24E-107	398
<i>Mugil cephalus</i>	100	1.64E-120	442
<i>Mugil cephalus</i>	100	1.64E-120	442
<i>Mugil cephalus</i>	99.582	7.65E-119	436

ANEXO G: Electroforesis. Gel de agarosa al 1% corrido a 80 V por 40 minutos. Se presentan las muestras de estómago de totoaba. El número después de la T indica el número de totoaba en cuestión y el número después de E indica si se trata de estómago anterior (1) o posterior (2). E255 es el marcador de peso molecular. Las muestras E y EP fueron descartadas.

