

Fish without water: Validation and application of $\delta^{18}\text{O}$ in *Totoaba macdonaldi* otoliths

Peces sin agua: Validación y aplicación de $\delta^{18}\text{O}$ en los otolitos de *Totoaba macdonaldi*

K Rowell^{1*}, C True², KW Flessa¹, DL Dettman¹

¹ Department of Geosciences, University of Arizona, Tucson, Arizona 85721, USA.

² Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, Baja California, México.

* Corresponding author's current address: Department of Biology, University of Washington, 528 Kincaid Hall, Box 351800, Seattle, WA 98195-1800, USA. E-mail: rowellk@u.washington.edu.

Abstract

The geochemistry of fish otoliths is a valuable tool for reconstructing environmental conditions, migrations and life histories. In this study we validate the relationship between temperature, the water oxygen isotope composition ($\delta^{18}\text{O}$) and otolith $\delta^{18}\text{O}$ for the endangered *Totoaba macdonaldi*, raised under controlled aquaculture conditions and in the field. This type of validation is instrumental for habitat reconstruction. By comparing $\delta^{18}\text{O}$ values in the natal portion of totoaba otoliths from modern and pre-dam specimens ~1000–4500 yr BP, we test the hypothesis that the totoaba used the Colorado River estuary as a nursery site before the river was over-allocated. We found that otolith $\delta^{18}\text{O}$ could be predicted in a laboratory setting as well as in the wild. Totoaba otoliths from before river diversion had drastically lower natal $\delta^{18}\text{O}$ values than predicted values, indicating that these differences in $\delta^{18}\text{O}$ values are the result of a change in the water $\delta^{18}\text{O}$, a consequence of diverting the isotopically negative Colorado River flow from the totoaba's nursery grounds. We conclude that the Colorado River flow was a major component of the totoaba's nursery habitat before river diversions. These results are pertinent to ongoing research on this endangered fish, using otoliths to piece together important ecological and life history information.

Key words: otoliths, oxygen isotopes, Colorado River estuary, totoaba, estuary.

Resumen

La geoquímica de otolitos de peces es una herramienta muy valiosa para reconstruir sus condiciones ambientales, migraciones y ciclos de vida. En este estudio se validó la relación entre la temperatura, la composición de los isótopos de oxígeno del agua ($\delta^{18}\text{O}$) y del otolito de *Totoaba macdonaldi*, una especie en peligro de extinción, tanto en individuos cultivados en condiciones controladas como en individuos encontrados en el medio natural. Este tipo de validación es muy importante para la reconstrucción del hábitat. Al comparar los valores de $\delta^{18}\text{O}$ en la porción natal de los otolitos de especímenes de totoaba modernos y previos a la construcción de presas (~1000–4500 años AP), se examinó la hipótesis de que la totoaba usaba el estero del Río Colorado como sitio de crianza antes de que el río dejara de fluir debido a la sobreexplotación del agua. Los resultados indican que es posible predecir los valores de $\delta^{18}\text{O}$ de los otolitos tanto en condiciones de laboratorio como en el medio natural. Los otolitos de las totoabas antes de la construcción de presas tienen valores natales de $\delta^{18}\text{O}$ significativamente menores que los valores predecibles, lo que indica que estas diferencias en los valores de $\delta^{18}\text{O}$ son el resultado de un cambio en los valores de $\delta^{18}\text{O}$ en el agua, el cual a su vez es el resultado de la reducción del flujo del Río Colorado hacia la zona de crianza de la totoaba antes de la construcción de presas. Se concluye que el flujo del Río Colorado fue un componente principal del hábitat de crianza de la totoaba antes de la construcción de presas y la reducción del flujo del río. Estos resultados indican que es apropiado usar los otolitos para reconstruir información ecológica importante y el ciclo de vida de la totoaba, lo que resulta relevante para la investigación sobre esta especie en peligro de extinción.

Palabras clave: otolitos, isótopos de oxígeno, estuario del Río Colorado, totoaba, estuario.

Introduction

Determining baseline ecological information for many marine species is a difficult task (Dayton *et al.* 1998). Marine ecosystems have been heavily influenced by human alterations and industrial fishing long before ecological monitoring occurred. In the case of the endangered *Totoaba macdonaldi* (Gilbert 1891) (Teleostei: Sciaenidae), an intense fishing effort on adults (1930–1975), combined with the diversion of nearly

Introducción

La determinación de información ecológica básica para muchas especies marinas es una tarea difícil (Dayton *et al.* 1998). Los ecosistemas marinos han sido fuertemente influenciados por el impacto antropogénico y la pesca industrial desde mucho antes de que comenzaran los monitoreos ecológicos. En el caso de la *Totoaba macdonaldi* (Gilbert 1891) (Teleostei: Sciaenidae), una especie declarada en peligro de extinción, el

all of the Colorado River flows (1963) away from their only spawning and nursery habitat was a perfect “one-two punch”. Despite the correlative connection between the fishery crash and the alterations to the Colorado River estuary, there is no empirical evidence that totoaba used the brackish estuarine habitat for nursery grounds (Flanagan and Hendrickson 1976, Cisneros-Mata *et al.* 1995, Lercari and Chávez 2007) and no studies have been conducted addressing how altering the estuary has effected this species (Avila-Serrano *et al.* 2006). Here we use laboratory calibrations of ambient oxygen isotope ratios and temperature, and the oxygen isotope ratio in otoliths (ear stones) to help us test if juvenile totoaba inhabited the brackish water formerly provided by the Colorado River. This environmental reconstruction of pre-dam juvenile habitat is the first step to understanding the relationship between the totoaba and the Colorado River.

Fish otoliths have become an increasingly popular means for life history and environmental reconstructions (Kalish 1991, Thorrold *et al.* 1997, Patterson 1998, Campana and Thorrold 2001, Weidman and Millner 2001, Rowell *et al.* 2005). The oxygen stable isotope ratios in growth increments of otolith CaCO_3 can provide a chronological record of environmental parameters associated with life history stages, creating a window into ancient and modern environments encountered by fish populations and their interaction with these environments (Patterson 1998, Campana and Thorrold 2001). Variations in $\delta^{18}\text{O}$ ($\text{O}^{18}/\text{O}^{16}$ compared to a standard) in otoliths have been used to detect climate shifts (Patterson 1998), anadromous migrations (Dufour *et al.* 1992), and to discriminate between brackish, fresh-water and oceanic habitats (Rowell *et al.* 2005). For fish that stay in a purely marine environment, the $\delta^{18}\text{O}$ values in otoliths has a predictable relationship with temperature (see Kalish 1991, Thorrold *et al.* 1997, Weidman and Millner 2000). The discrepancy among published relationships between water temperature, water $\delta^{18}\text{O}$, and otolith $\delta^{18}\text{O}$, suggests that relationships may be species-specific. Although the relationships are broadly similar, there is little guidance for choosing one over another for oxygen isotope-based reconstructions without testing the taxon used in the study.

In this study, we test the hypothesis that the nursery grounds of the endangered totoaba have been substantially altered due to upstream diversions of the Colorado River. We do this by testing if published relationships of temperature-driven variation in otolith $\delta^{18}\text{O}$ can predict observed otolith $\delta^{18}\text{O}$ values in controlled conditions and in the field. By confirming the predictability of otolith $\delta^{18}\text{O}$ values *in situ* from today's known conditions, we will be able to interpret natal $\delta^{18}\text{O}$ values for totoaba from the past, such as when the Colorado River estuary was not controlled by upstream river regulation. The goals of this study are two-fold (fig. 1): (1) demonstrate that published relationships between temperature and otolith $\delta^{18}\text{O}$ values can be used to interpret natal $\delta^{18}\text{O}$ values in totoaba otoliths from fish living before upstream river regulation occurred (*ca.* 1000–4500 yr BP; Rowell 2006), and

intensivo esfuerzo de pesca sobre la población adulta (de 1930 a 1975), en combinación con la desviación de casi todo el flujo del Río Colorado (1963) que vertía sus aguas al único hábitat de desove y crianza de esta especie resultó ser crítico. A pesar de la conexión correlativa entre la declinación de la pesquería y las alteraciones al estuario del Río Colorado, no hay evidencia empírica de que la totoaba utilizaba este hábitat estuarino salobre como criadero (Flanagan y Hendrickson 1976, Cisneros-Mata *et al.* 1995, Lercari y Chávez 2007), ni tampoco se ha estudiado la influencia de la modificación del hábitat en la declinación de esta pesquería (Avila-Serrano *et al.* 2006). En este estudio se realizaron calibraciones en el laboratorio de las razones de los isótopos ambientales de oxígeno y la temperatura, y la razón de los isótopos de oxígeno en los otolitos (piedras del oído) para poder determinar si los juveniles de la totoaba habitaban el agua salobre que existía en el estero debido al vertido del Río Colorado. Esta reconstrucción ambiental del hábitat de los juveniles previo a la construcción de presas es el primer paso para entender la relación entre la totoaba y el Río Colorado.

Los otolitos de peces se han convertido en un recurso popular para la reconstrucción de sus ambientes y ciclos de vida (Kalish 1991, Thorrold *et al.* 1997, Patterson 1998, Campana y Thorrold 2001, Weidman y Millner 2001, Rowell *et al.* 2005). Las razones de los isótopos estables de oxígeno conforme se incrementa el CaCO_3 en los otolitos con el crecimiento, pueden proporcionar un registro cronológico de los parámetros ambientales asociados con los diferentes estadios del ciclo de vida de los peces proporcionando una visión de los ambientes antiguos y modernos donde se desarrollan sus poblaciones y su interacción con estos ambientes (Patterson 1998, Campana y Thorrold 2001). Las variaciones de $\delta^{18}\text{O}$ ($\text{O}^{18}/\text{O}^{16}$ en comparación con un estándar) en los otolitos han sido utilizadas para detectar cambios climáticos (Patterson 1998) y migraciones anádromas (Dufour *et al.* 1992), y para discriminar entre hábitats salobres, oceánicos y de agua dulce (Rowell *et al.* 2005). Para los peces que permanecen en ambientes meramente marinos, los valores de $\delta^{18}\text{O}$ en otolitos presentan una relación predecible con la temperatura (ver Kalish 1991, Thorrold *et al.* 1997, Weidman y Millner 2000). La discrepancia entre las relaciones publicadas entre la temperatura del agua, $\delta^{18}\text{O}$ del agua y $\delta^{18}\text{O}$ del otolito sugiere que éstas pueden ser específicas de cada especie. Aunque las relaciones son similares, es difícil elegir una de ellas para las reconstrucciones basadas en los isótopos de oxígeno sin examinar el taxón empleado en cada estudio.

En este estudio se probó la hipótesis de que los criaderos de *T. macdonaldi*, en peligro de extinción, se han visto alterados significativamente debido a la desviación de las aguas del Río Colorado. Para ello se examinó si las relaciones publicadas sobre la variación causada por la temperatura en el valor de $\delta^{18}\text{O}$ de los otolitos puede predecir los valores de $\delta^{18}\text{O}$ observados en los otolitos de las totoabas en condiciones controladas y en el medio natural. Al confirmar la predictibilidad de los valores de $\delta^{18}\text{O}$ en los otolitos *in situ* en las condiciones actuales, se

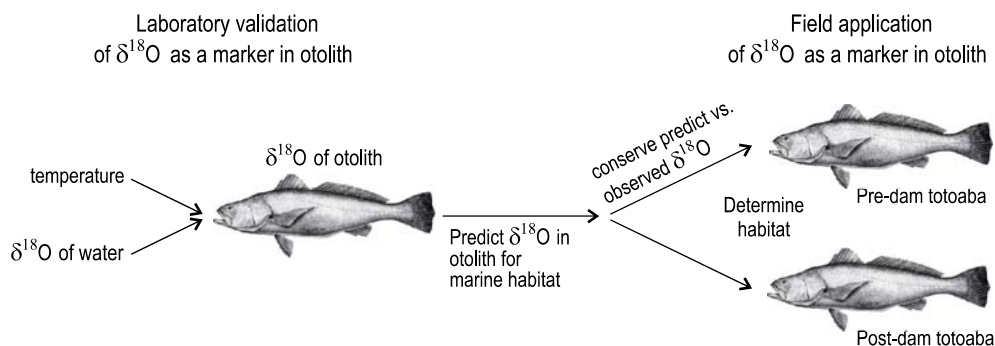


Figure 1. Conceptual design of the laboratory validation for the relationship between water temperature, the $\delta^{18}\text{O}$ of the water, and the $\delta^{18}\text{O}$ of the otolith, and how this is used to test if totoaba use the estuarine waters provided by the Colorado River.

Figura 1. Diseño conceptual de la validación en el laboratorio de la relación entre la temperatura del agua, $\delta^{18}\text{O}$ del agua y $\delta^{18}\text{O}$ del otolito, y cómo se utiliza para determinar si la totoaba usa las aguas estuarinas aportadas por el Río Colorado.

(2) determine if the Colorado River flow was a major component of totoaba nursery grounds. This retrospective analysis of historic nursery habitat of the endangered totoaba may provide guidance in planning the recovery of this species.

Background

The totoaba is a large (up to 2 m in length) and long-lived predatory marine fish (Flanagan and Hendrickson 1976, Román-Rodríguez and Hammann 1997). It is endemic to the northern Gulf of California and spawns exclusively in the mouth of the Colorado River during spring (Román-Rodríguez and Hammann 1997). In 1976, after years of intense fishing pressure in their spawning habitat and not long after the river flows diminished from upstream diversions (1965), the totoaba was declared endangered in Mexico and the United States (Flanagan and Hendrickson 1976, Cisneros-Mata *et al.* 1995).

Conservation efforts for the totoaba have had limited success, even though its spawning and nursery grounds have been protected since 1993 (Cisneros-Mata *et al.* 1995). During the 1990s, as part of a restocking program, the totoaba was successfully reared in captivity from an initial wild broodstock. Fish were captured and brought to the Universidad Autónoma de Baja California (UABC), in Ensenada (Mexico), where they were held in captive rearing conditions simulating natural photoperiod and temperature to induce maturation and spawning (True *et al.* 1997). Despite habitat protection, a ban on fishing, and restocking efforts, there is little evidence of a significant recovery of this species. Major habitat alterations to totoaba nursery grounds may be another contributing threat to this species (Flanagan and Hendrickson 1976, Cisneros-Mata *et al.* 1995). Until now there has been little empirical evidence that the totoaba historically used the brackish estuarine habitat provided by the Colorado River.

Study site

The Colorado River used to have a major influence on the upper Gulf of California. It had large variable flows that

podrán interpretar los valores de $\delta^{18}\text{O}$ de la porción natal de los otolitos de la totoaba en el pasado, cuando el estuario del Río Colorado no estaba controlado por la regulación de sus aguas río arriba. Este estudio tiene dos objetivos principales (fig. 1): (1) demostrar que se pueden utilizar las relaciones publicadas entre temperatura y $\delta^{18}\text{O}$ de los otolitos para interpretar los valores natales de $\delta^{18}\text{O}$ en los otolitos de la totoaba a partir de peces que vivieron antes de la regulación de las aguas río arriba (ca. 1000–4500 años AP; Rowell 2006), y (2) determinar si el flujo del Río Colorado ha sido un componente principal del hábitat de crianza de la totoaba. Este análisis retrospectivo del hábitat de crianza histórico de *T. macdonaldi* en peligro de extinción puede proporcionar directrices para la recuperación de esta especie.

Antecedentes

La totoaba es un depredador marino de gran tamaño (hasta 2 m de largo) y longevo (Flanagan y Hendrickson 1976, Román-Rodríguez y Hammann 1997). Es endémica del Alto Golfo de California y desova exclusivamente en la boca del Río Colorado durante la primavera (Román-Rodríguez y Hammann 1997). En 1976, después de años de pesca intensiva en su hábitat de desove y poco después de que los flujos fluviales disminuyeron a raíz de su desvío río arriba (1965), la totoaba fue declarada como especie en peligro de extinción en México y los Estados Unidos (Flanagan y Hendrickson 1976, Cisneros-Mata *et al.* 1995).

El éxito en los esfuerzos para conservar la totoaba ha sido limitado, a pesar de que sus áreas de desove y crianza han estado protegidas desde 1993 (Cisneros-Mata *et al.* 1995). Durante los años noventa, como parte de un programa de repoblación, la totoaba fue cultivada exitosamente en cautiverio a partir de unos reproductores silvestres iniciales. Los peces fueron capturados y trasladados a la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), en Ensenada (México), donde se mantuvieron en cautiverio en condiciones controladas, simulando un fotoperiodo y una temperatura naturales para inducir

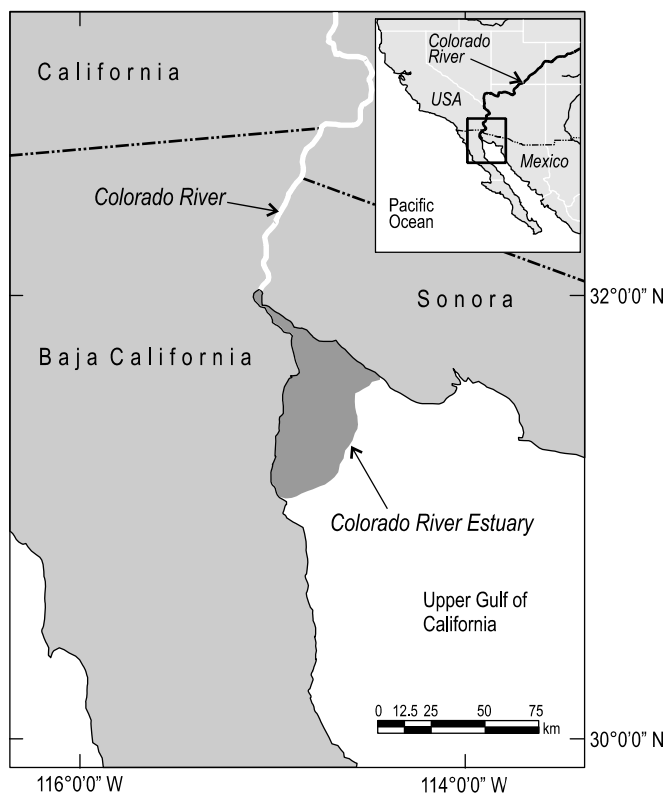


Figure 2. Colorado River mouth and upper Gulf of California with the estimated extent of the original Colorado River estuary according to Carbajal *et al.* (1997), and Lavín and Sánchez (1999).

Figura 2. Boca del Río Colorado y el Alto Golfo de California con el área estimada del estuario original del Río Colorado según Carbajal *et al.* (1997) y Lavín y Sánchez (1999).

maintained an estuary comprising $\sim 4000 \text{ km}^2$ of the uppermost Gulf of California (Lavín and Sánchez 1999) and a mixing zone extending $\sim 65 \text{ km}$ from the river's mouth (Rodríguez *et al.* 2001) (fig. 2). Over the past century the Colorado River has been dammed, diverted and over-allocated; today, it barely trickles into the Gulf of California. The effects of diverting the fresh water have become apparent as the upper Gulf of California has become increasingly saline (Lavín *et al.* 1998). Yet, the ecological effects of eliminating fresh-water flows have not been resolved.

Material and methods

We used three sets of totoaba otoliths: twelve otoliths from laboratory-raised juvenile totoaba at UABC, five otoliths from pre-dam wild totoaba, and five otoliths from wild-caught modern totoaba. Otoliths used for laboratory validation were taken from fish spawned and reared in known conditions. Otolith oxygen isotope ratios of laboratory-reared totoaba were compared to values predicted by three relationships between water temperature and $\delta^{18}\text{O}$ and otolith aragonite $\delta^{18}\text{O}$, published by Thorrold *et al.* (1997), Weidman and Millner (2000), and Kalish (1991). To test if otolith $\delta^{18}\text{O}$ can be predicted in the

la maduración y el desove (True *et al.* 1997). A pesar de la protección de su hábitat, su veda permanente y los esfuerzos de repoblación, hay poca evidencia de que la especie se esté recuperando. Otros factores que pueden estar amenazando a la totoaba son las alteraciones significativas que ha sufrido su hábitat de crianza (Flanagan y Hendrickson 1976, Cisneros-Mata *et al.* 1995). Hasta ahora existe poca evidencia empírica del uso histórico por la totoaba del hábitat estuarino generado por el Río Colorado.

Sitio de estudio

El Río Colorado ejercía una gran influencia sobre el Alto Golfo de California. Tenía flujos grandes y variables que mantenían un estuario que cubría $\sim 4000 \text{ km}^2$ de la parte más interna del Golfo de California (Lavín y Sánchez 1999) y una zona de mezcla que se extendía hasta $\sim 65 \text{ km}$ de la boca del río (Rodríguez *et al.* 2001) (fig. 2). Durante el último siglo el Río Colorado fue represado, desviado y sobreasignado; hoy en día, apenas fluye al Golfo de California. Los efectos de haber desviado el agua dulce han sido patentes conforme el Golfo de California se ha vuelto más salino (Lavín *et al.* 1998). Aun así, los efectos ecológicos a causa de la eliminación de los flujos de agua dulce siguen sin dilucidarse.

Material y métodos

Se utilizaron tres juegos de otolitos: doce otolitos de totoabas juveniles cultivadas en el laboratorio de la UABC, cinco de totoabas silvestres que vivieron antes de la construcción de presas en el Río Colorado, y cinco de totoabas silvestres modernas. Los otolitos usados para la validación en el laboratorio fueron tomados de peces desovados y criados en condiciones controladas y conocidas. Las razones de los isótopos de oxígeno de los otolitos de las totoabas cultivadas en el laboratorio fueron comparadas con los valores pronosticados mediante tres relaciones entre temperatura y $\delta^{18}\text{O}$ del agua y $\delta^{18}\text{O}$ de la aragonita del otolito, publicadas por Thorrold *et al.* (1997), Weidman y Millner (2000) y Kalish (1991). Para probar si los valores de $\delta^{18}\text{O}$ de los otolitos pueden ser pronosticados en el campo, se compararon los valores natales de $\delta^{18}\text{O}$ de otolitos de totoabas silvestres de tiempos tanto prehistóricos como modernos, y las diferencias se interpretaron en términos de diferencias ambientales.

Los otolitos de totoabas anteriores al represado del río se obtuvieron de dos conchales diferentes en la costa del Alto Golfo de California. Cuatro especímenes pertenecientes a la Colección de Vertebrados Marinos del Instituto Oceanográfico Scripps (EUA) fueron recolectados en 1955, cerca de San Felipe, Baja California (México), en un conchal fechado (por ^{14}C) por una concha marina (1885 años AP) y tres edades de carbón vegetal (1065–1220 años AP) (ver Goodfriend y Flessa (1997) para mayor información). El quinto otolito fue donado por el Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, campus Guaymas (Mexico), a la Colección de Peces de la Universidad de Arizona (EUA), y fue obtenido de

field, we compared natal $\delta^{18}\text{O}$ values from otoliths of wild totoaba from both prehistoric and modern times, and interpreted these differences in terms of environmental differences.

Pre-dam totoaba otoliths came from surface finds at two different shell midden deposits on the upper Gulf of California coast. Four specimens loaned by the Scripps Institution of Oceanography Marine Vertebrate Collection were collected in 1955, near San Felipe, Baja California (Mexico), at a midden dated (^{14}C age) by one marine shell (1885 yr BP) and three charcoal dates (1065–1220 yr BP) (see Goodfriend and Flessa (1997) for more information). The fifth pre-dam otolith was donated by the Guaymas campus of the Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey (Mexico) to the University of Arizona Fish Collection and was retrieved from the surface of a coastal midden at Bahía San Jorge, Sonora (Mexico). This specimen was dated directly at 4580 ± 130 ^{14}C yr BP. A more complete description of these otoliths, dating methods and the $\delta^{18}\text{O}$ profiles for their entire life span are reported in Rowell (2006).

Post-dam otoliths were extracted from individuals of *T. macdonaldi* as part of a population monitoring study in 1987 and 1990, and were used to study totoaba age and growth (Román-Rodríguez and Hammann 1997). These specimens were later donated by the Instituto del Medio Ambiente y el Desarrollo Sustentable del Estado de Sonora to the University of Arizona Fish Collection. We used the natal portion of these otoliths, which represented the years 1963–1976.

Otolith $\delta^{18}\text{O}$ analysis

The oxygen isotope ratio ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) in the aragonite deposited in otoliths is in near equilibrium with that of the ambient water (Kalish 1991, Thorrold *et al.* 1997, Weidman and Millner 2000). A change in this ratio (expressed as $\delta^{18}\text{O}$) is the result of a change in ambient temperature or in the $\delta^{18}\text{O}$ of the water in which the animal lives. Shifts in water source (e.g., inland vs marine) can also cause changes in $\delta^{18}\text{O}$ values. But, if a fish is restricted to marine conditions, the $\delta^{18}\text{O}$ cycle in the otolith will remain within limits controlled by seasonal temperature. Otoliths from fish inhabiting brackish estuarine habitats will still have a temperature-driven cycle in the otolith $\delta^{18}\text{O}$, but the values will be more negative than a typical marine record due to the addition of isotopically negative river water to the estuary (Ingram *et al.* 1996, Dettman *et al.* 2004). Thus, $\delta^{18}\text{O}$ in otoliths can be used to document water temperature and the presence and quantity of isotopically distinct waters (Dettman *et al.* 2004, Jamieson *et al.* 2004, Rowell *et al.* 2005).

When the $\delta^{18}\text{O}$ of water and temperature are known, predictions of the $\delta^{18}\text{O}$ otolith aragonite can be made. While several studies document the temperature-driven variation in otolith $\delta^{18}\text{O}$, each published relationship differs in the relative influence temperature has on the fractionation of $\delta^{18}\text{O}$ for otoliths. We compared the observed average values from 12 natal otoliths to three predicted values using the published

la superficie de un conchal en Bahía San Jorge, Sonora (México). Este espécimen fue fechado directamente en 4580 ± 130 ^{14}C años AP. Rowell (2006) ha realizado una descripción más completa de estos otolitos, los métodos de fechado y los perfiles de $\delta^{18}\text{O}$ para todo su ciclo de vida.

Los otolitos posteriores al represado del río fueron extraídos de individuos de *T. macdonaldi* como parte de un estudio de monitoreo de la población realizado en 1987 y 1990, y empleados para estudiar la edad y crecimiento de las totoabas (Román-Rodríguez y Hammann 1997). Estos especímenes fueron posteriormente donados por el Instituto del Medio Ambiente y el Desarrollo Sustentable del Estado de Sonora a la Colección de Peces de la Universidad de Arizona. En este trabajo se utilizó la porción natal de estos otolitos, que representó los años de 1963 a 1976.

Análisis de $\delta^{18}\text{O}$ en los otolitos

La proporción o razón de isótopos de oxígeno ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) en la aragonita depositada en los otolitos está en cuasi equilibrio con la del medio acuático (Kalish 1991, Thorrold *et al.* 1997, Weidman y Millner 2000). Un cambio en esta razón (expresado como $\delta^{18}\text{O}$) es resultado de un cambio en la temperatura ambiente o en el $\delta^{18}\text{O}$ del agua en que habita el animal. Cambios en el origen del agua (e.g., tierra adentro vs marina) también pueden ocasionar cambios en los valores de $\delta^{18}\text{O}$; sin embargo, si un pez es restringido a condiciones marinas, el ciclo de $\delta^{18}\text{O}$ en el otolito permanecerá dentro de los límites controlados por la temperatura estacional. El ciclo de $\delta^{18}\text{O}$ en los otolitos de peces que habitan ambientes estuarinos salobres estará controlado por la temperatura, pero sus valores serán más negativos que los de un registro marino típico debido a la adición de agua de río isotópicamente negativa al estuario (Ingram *et al.* 1996, Dettman *et al.* 2004). Por tanto, el $\delta^{18}\text{O}$ en otolitos puede ser utilizado para documentar la temperatura del agua, así como la presencia y cantidad de aguas isotópicamente distintas (Dettman *et al.* 2004, Jamieson *et al.* 2004, Rowell *et al.* 2005).

Cuando se conocen el $\delta^{18}\text{O}$ del agua y la temperatura, se pueden realizar predicciones del $\delta^{18}\text{O}$ de la aragonita de los otolitos. Aunque varios estudios documentan la variación en el $\delta^{18}\text{O}$ del otolito generada por la temperatura, cada relación publicada difiere en la influencia relativa que tiene la temperatura sobre la fraccionación de $\delta^{18}\text{O}$ para otolitos. Se compararon los promedios observados de la porción natal de 12 otolitos con tres valores pronosticados usando las siguientes relaciones, donde T es el promedio de la temperatura del agua (registrada en $^{\circ}\text{C}$), $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolito}}$ es el promedio de $\delta^{18}\text{O}$ del otolito expresado como *Vienna Pee Dee Belemnite* (VPDB), y $\delta^{18}\text{O}_{\text{agua}}$ es el promedio de $\delta^{18}\text{O}$ del agua expresado como *Vienna Standard Mean Ocean Water* (VSMOW):

$$\delta^{18}\text{O}_{\text{otolito pronosticado}} = 4.38 - 0.21 \times T + \delta^{18}\text{O}_{\text{agua}} \quad (1)$$

Thorrold *et al.* (1997), con base en la gurrubata *Micropogonias undulatus* cultivada a temperaturas entre 18°C y 25°C .

relationships below, where T is the average water temperature recorded in °C, $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolith}}$ is the average measured otolith $\delta^{18}\text{O}$ expressed as Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB), and $\delta^{18}\text{O}_{\text{water}}$ is the average $\delta^{18}\text{O}$ of the water expressed as Vienna Standard Mean Ocean Water (VSMOW):

$$\delta^{18}\text{O}_{\text{predicted otolith}} = 4.38 - 0.21 \times T + \delta^{18}\text{O}_{\text{water}} \quad (1)$$

Thorrold *et al.* (1997), based on Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) reared in temperatures between 18°C and 25°C.

$$\delta^{18}\text{O}_{\text{predicted otolith}} = 4.39 - 0.22 \times T + \delta^{18}\text{O}_{\text{water}} \quad (2)$$

Weidman and Millner (2000), based on North Atlantic cod (*Gadus morhua*) reared in temperatures between 2.5°C and 10.5°C.

$$\delta^{18}\text{O}_{\text{predicted otolith}} = 6.69 - 0.326 \times T + \delta^{18}\text{O}_{\text{water}} \quad (3)$$

Kalish (1991), based on Australian salmon (*Arripis trutta*) reared in temperatures between 13°C and 22°C.

Laboratory validation

Because totoaba are federally protected, experiments that involved manipulation of environmental parameters that may put individuals at risk were not permitted. Therefore, water conditions were simply monitored and water samples were taken for isotopic analysis. Fertile totoaba eggs were collected from broodstock tanks, and stocked in 2200 L cone tanks supplied with sterile running seawater (local Pacific) at a flow rate of 3 L min⁻¹ at a controlled temperature of 25°C. Feeding was initiated once larvae exhibited a functional gut and mouth (~4–5 days post-hatching). At day 22, early stage juveniles were transferred to larger tanks (8000 L) to allow proper growth. Culture conditions were maintained for this stage, although seawater flow increased to 33 L min⁻¹. The temperatures in both tanks were held between 24°C and 27°C, mimicking the natural setting for spring-summer hatchlings in the northern Gulf of California (True *et al.* 1997, 2001). Temperature was recorded every 30 min with Hobo temperature data loggers. For a more detailed description of the larval rearing conditions see True *et al.* (1997, 2001).

Three sets of water samples from the aquaculture tanks were collected over a period of two months. Water $\delta^{18}\text{O}$ was measured using a dual inlet mass spectrometer (Delta-S, Thermo Finnegan, Bremen, Germany) equipped with an automated CO₂-H₂O equilibration unit. Standardization was based on internal standards referenced to VSMOW and Vienna Standard Light Antarctic Precipitation (VSLAP). Precision was better than $\pm 0.08\text{‰}$ for $\delta^{18}\text{O}$.

Sagittal otoliths ($n = 12$) from totoaba fingerlings of known age (range 31–60 days) were removed from the fish and

$$\delta^{18}\text{O}_{\text{otolith pronosticado}} = 4.39 - 0.22 \times T + \delta^{18}\text{O}_{\text{agua}} \quad (2)$$

Weidman y Millner (2000), con base en el bacalao del Atlántico *Gadus morhua* cultivado a temperaturas entre 2.5°C y 10.5°C.

$$\delta^{18}\text{O}_{\text{otolith pronosticado}} = 6.69 - 0.326 \times T + \delta^{18}\text{O}_{\text{agua}} \quad (3)$$

Kalish (1991), con base en el salmón australiano *Arripis trutta* cultivado a temperaturas entre 13°C y 22°C.

Validación en el laboratorio

En vista de que las totoabas están protegidas federalmente, no se permiten realizar experimentos que requieran manipular los parámetros ambientales y puedan poner en riesgo a los individuos. Por tanto, simplemente se monitorearon las condiciones del agua y se tomaron muestras de agua para el análisis isotópico. Se recolectaron huevos fértiles de totoaba de tanques de reproductores, y se almacenaron en tanques cónicos de 2200 L a una temperatura controlada de 25°C y con flujo de agua de mar estéril (del Pacífico local) a una tasa de 3 L min⁻¹. La alimentación inició cuando las larvas mostraron una boca y un estómago funcional (~4–5 días después de la eclosión). Al día 22 los juveniles en etapa temprana fueron transferidos a tanques más grandes (8000 L) para permitir un crecimiento adecuado. Durante esta etapa se mantuvieron las condiciones de cultivo, aunque el flujo de agua de mar se incrementó a 33 L min⁻¹. La temperatura en ambos tanques se mantuvo entre 24°C y 27°C, simulando el ambiente natural de los alevines en primavera y verano en el norte del Golfo de California (True *et al.* 1997, 2001). La temperatura se registró cada 30 min con un termógrafo Hobo. Para una descripción más detallada de las condiciones de cultivo larval, ver los trabajos de True *et al.* (1997, 2001).

Se recolectaron tres juegos de muestras de agua de los tanques de cultivo durante un periodo de dos meses. El $\delta^{18}\text{O}$ del agua se midió mediante un espectrómetro de masas de doble entrada (Delta-S, Thermo Finnegan, Brema, Alemania) equipado con una unidad automática para balancear CO₂-H₂O. La estandarización se basó en patrones internos referenciados a VSMOW y Vienna Standard Light Antarctic Precipitation (VSLAP). La precisión para $\delta^{18}\text{O}$ fue mayor a $\pm 0.08\text{‰}$.

Se extrajeron los otolitos sagitales ($n = 12$) de los alevines de totoabas de edad conocida (31–60 días) y se lavaron ultrasónicamente en agua destilada. Ya que los otolitos de los juveniles eran demasiado chicos para obtener un corte delgado (~2 mm), se utilizó un molinillo para exponer una sección transversal dorsoventral. Se tomaron dos muestras de cada otolito: una de la porción natal del otolito y otra del borde exterior del mismo. Se utilizó un microtaladro y una broca de 0.3 mm de diámetro para recolectar las muestras de 30–60 µg. Las muestras se calentaron a 180°C en un horno de vacío durante

cleaned ultrasonically in distilled water. Because the otoliths of juveniles were too small to thin-section (~ 2 mm), a grinder was used to expose a dorso-ventral cross-section. Two spot samples were taken from each otolith: one from the natal portion of the otolith and a second from the outer edge of the otolith. We used a micro-drill and a 0.3-mm-diameter drill bit to collect samples, weighing 30–60 μg . Samples were heated to 180°C in a vacuum oven for one hour to remove volatile material. All oxygen ratios in carbonate values are expressed relative to the VPDB standard, and were measured in the Environmental Isotope Laboratory of the Department of Geosciences, University of Arizona. Carbonates were analyzed using a Finnigan MAT 252 mass spectrometer equipped with a Kiel-III automated carbonate sampling device. Powdered samples were reacted with dehydrated phosphoric acid under vacuum at 70°C . The isotope ratio measurement was calibrated by repeated measurements of NBS-19 and NBS-18, and precision was $\pm 0.1\text{‰}$.

The average otolith value was paired with an average predicted value using the mean water temperature for the period of time that each sample represents. Because we know the time of spawning (natal) and death (perimeter), we can estimate the time interval represented by each sample (0.3 mm of material), by assuming constant growth and measuring otolith size (diameter). We used a paired *t*-test to compare the predicted average value, using each equation, for each otolith with the observed average value.

Field validation

Because validating the relationship between temperature, $\delta^{18}\text{O}_{\text{water}}$ and $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolith}}$ is most valuable when it can be used to determine environmental conditions for wild totoaba, we tested whether these above-mentioned equations can predict $\delta^{18}\text{O}$ of natal otoliths from wild-caught totoaba in purely marine conditions. We predicted the average and range of $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolith}}$ values for the natal portion of otoliths using average weekly temperatures from 1964 to 1999 for the spawning period of the totoaba (March–June) (Rowell *et al.* 2005). We assumed that the upper Gulf of California $\delta^{18}\text{O}_{\text{water}}$ was similar to mean ocean water, 0.0‰ for modern totoaba. Current estimates of $\delta^{18}\text{O}_{\text{water}}$ in the upper Gulf of California are more positive than this value ($\sim +0.6\text{‰}$) as a result of the high evaporation rates and half a century of little to no Colorado River water inflow to the estuary (Dettman *et al.* 2004, Rowell *et al.* 2005). During evaporation, O^{16} is more easily taken up and causes the remaining water to be more enriched in O^{18} . The inflow from the isotopically negative Colorado River ($\sim -12\text{‰}$) counters the enrichment of evaporation (Dettman *et al.* 2004). As we know the time of capture we can back-calculate the year that the natal section represents: 1963–1976, only a short time after the last major dams were built on the Colorado River. We make the conservative assumption that during this time the effect of evaporation (and no river flow) was not yet as strong an influence on the $\delta^{18}\text{O}_{\text{water}}$ as seen today in the upper Gulf of California.

una hora para eliminar el material volátil. Todas las razones de oxígeno en los valores de carbonato se expresan en relación con el estándar VPDB, y se midieron en el Laboratorio de Isótopos Ambientales del Departamento de Geociencias de la Universidad de Arizona. Los carbonatos fueron analizados usando un espectrómetro de masas Finnigan MAT 252 equipado con un dispositivo automático de muestreo de carbonatos Kiel-III. Las muestras pulverizadas fueron tratadas al vacío con ácido fosfórico deshidratado a 70°C . La medición de la razón isotópica se calibró mediante mediciones repetidas de NBS-19 y NBS-18, y la precisión fue de $\pm 0.1\text{‰}$.

El valor medio del otolito fue emparejado con el promedio pronosticado usando la temperatura media del agua para el periodo de tiempo que representa cada muestra. Como se conoce el tiempo de desove (porción natal) y muerte (perímetro), se puede estimar el intervalo de tiempo que representa cada muestra (0.3 mm de material), suponiendo un crecimiento constante y midiendo el diámetro del otolito. Se utilizó una prueba *t* por pares para comparar el promedio pronosticado, usando cada una de las ecuaciones para cada otolito, con el promedio observado.

Validación en el medio natural

Considerando que la validación de la relación entre temperatura, $\delta^{18}\text{O}_{\text{agua}}$ y $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolito}}$ es más valiosa cuando se puede utilizar para determinar las condiciones ambientales de las totoabas silvestres, se analizó si las ecuaciones utilizadas pueden predecir el $\delta^{18}\text{O}$ en otolitos natales de totoabas silvestres capturadas en condiciones meramente marinas. Se pronosticó el promedio y el intervalo de los valores de $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolito}}$ para la porción natal de los otolitos usando promedios semanales de la temperatura de 1964 a 1999 para el periodo de desove de la totoaba (de marzo a junio) (Rowell *et al.* 2005). Se supuso que para el Alto Golfo de California, $\delta^{18}\text{O}_{\text{agua}}$ era similar a la media del agua oceánica, 0.0‰ para la totoaba moderna. Las estimaciones actuales de $\delta^{18}\text{O}_{\text{agua}}$ en el Alto Golfo de California son más positivas que tal valor ($\sim +0.6\text{‰}$) a causa de las altas tasas de evaporación y medio siglo de poca o nula entrada de agua del Río Colorado al estuario (Dettman *et al.* 2004, Rowell *et al.* 2005). Durante la evaporación, el O^{16} se consume con mayor facilidad, lo que ocasiona el enriquecimiento del agua restante con O^{18} . El aporte de agua isotópicamente negativa del Río Colorado ($\sim -12\text{‰}$) compensaría este enriquecimiento de la evaporación (Dettman *et al.* 2004). Dado que se conoce el tiempo de captura se puede retrocalcular el año que representa la porción natal: de 1963 a 1976, poco tiempo después de que se construyeron las últimas presas importantes del Río Colorado. Se supone, de manera conservadora, que durante ese tiempo la evaporación (y la falta de flujo fluvial) aún no tenía una influencia tan importante sobre el $\delta^{18}\text{O}_{\text{agua}}$ en el Alto Golfo de California como la tiene actualmente.

Para determinar si el hábitat de crianza se ha visto alterado significativamente por las derivaciones río arriba, se

To test if the nursery habitat has been significantly altered by upstream diversions, we compared the predicted ranges of $\delta^{18}\text{O}$ of natal values for totoaba *in situ* to the average natal values of otoliths ($n = 5$) from totoaba caught under federal permit in 1987 and 1990 (Román-Rodríguez and Hammann 1997). Otolith carbonate samples were collected by the same method as laboratory-raised fish. We expect that observed $\delta^{18}\text{O}$ values for modern wild totoaba should fall within expected temperature-driven variation for the spawning season. Confirmation that a temperature-driven relationship can predict $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolith}}$ for wild totoaba allows us to test if prehistoric totoaba lived in an isotopically distinct habitat: one dominated by the influence of the isotopically negative fresh-water flows of the Colorado River.

We compared these same predicted values to the observed average natal values of prehistoric totoaba otoliths ($n = 5$). Prehistoric otoliths represent fish that developed in “unperturbed” conditions, a period when anthropogenic habitat alteration was relatively minute in comparison to today. We used the average of the two most natal otolith $\delta^{18}\text{O}$ values for each specimen. Any difference in the $\delta^{18}\text{O}$ of aragonite between pre-dam and post-dam otoliths secreted at the same temperature is thus the result of a shift in the relative influence of isotopically different waters.

Results

Laboratory validation

We found that otolith $\delta^{18}\text{O}$ could be predicted under known conditions. During the grow-out period, the $\delta^{18}\text{O}_{\text{water}}$ values became increasingly more negative with time (samples measured -0.5‰ , -0.6‰ , and -0.7‰) and temperature stayed

compararon los intervalos pronosticados de $\delta^{18}\text{O}$ de los valores natales para la totoaba *in situ* con los promedios natales de los otolitos ($n = 5$) de totoabas capturadas mediante un permiso federal en 1987 y 1990 (Román-Rodríguez y Hammann 1997). Se recolectaron muestras del carbonato de los otolitos usando el mismo método utilizado con los peces criados en el laboratorio. Los valores de $\delta^{18}\text{O}$ observados para las totoabas silvestres modernas deberían de estar dentro del rango de la variación generada por la temperatura durante la temporada de desove. La confirmación de que una relación generada por la temperatura puede predecir el $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolito}}$ en totoabas silvestres permite determinar si las totoabas prehistóricas vivían en un hábitat isotópicamente distinto: uno dominado por la influencia de los flujos de agua isotópicamente negativa del Río Colorado.

Se compararon estos mismos valores pronosticados con los promedios natales observados de los otolitos de las totoabas prehistóricas ($n = 5$). Los otolitos prehistóricos representan peces que se desarrollaron en condiciones no perturbadas, un periodo cuando la alteración antropogénica del hábitat era mínima en comparación con la actual. Se utilizó el promedio de los dos valores más natales de $\delta^{18}\text{O}$ en otolitos para cada espécimen; por tanto, cualquier diferencia en el $\delta^{18}\text{O}$ de la aragonita entre los otolitos anteriores y posteriores a las derivaciones del agua del Río Colorado, secretados a la misma temperatura, es el resultado de un cambio en la influencia relativa de aguas isotópicamente diferentes.

Resultados

Validación en el laboratorio

Se encontró que es posible predecir el $\delta^{18}\text{O}$ de los otolitos en condiciones conocidas. Durante el periodo de crecimiento, los valores de $\delta^{18}\text{O}_{\text{agua}}$ fueron cada vez más negativos con el tiempo (las muestras dieron -0.5‰ , -0.6‰ y -0.7‰) y la temperatura se mantuvo relativamente constante ($25.3^{\circ}\text{C} \pm 0.01$ EE). Los valores de $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolito}}$ observados para las totoabas cultivadas en el laboratorio oscilaron entre -1.86‰ y -2.85‰ , y el promedio de $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolito}}$ fue de $-2.2\text{‰} \pm 0.7$ EE (tabla 1). Los promedios para los otolitos de peces con mayor tiempo de crecimiento fueron más negativos; o sea, los peces más viejos presentaban valores de $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolito}}$ más negativos (fig. 3). El intervalo entre los valores pronosticados de $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolito}}$ fue menor a uno por mil (-1.5‰ a -2.17‰), y el promedio pronosticado de $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolito}}$ para las ecuaciones 1, 2 y 3 fue de -1.54‰ , -1.78‰ y -2.14‰ , respectivamente. Los valores observados de $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolito}}$ difirieron significativamente de los valores pronosticados por las ecuaciones 1 (t pareada = -9.98 , $P < 0.0001$) y 2 (t pareada = -6.32 , $P < 0.0001$), pero no de los valores pronosticados por la ecuación 3 (t pareada = -0.927 , $P = 0.374$; fig. 4). El promedio de las diferencias entre los valores pronosticados y los observados fue de 0.66‰ para la ecuación 1, 0.42‰ para la ecuación 2 y 0.06‰ para la ecuación 3.

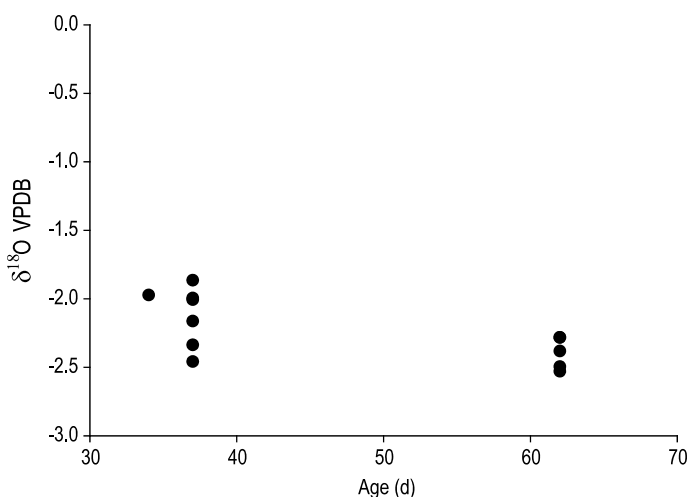


Figure 3. Average otolith $\delta^{18}\text{O}$ (VPDB) value for laboratory-reared *Totoaba macdonaldi* ($n = 12$) by age (days).

Figura 3. Promedio de $\delta^{18}\text{O}$ del otolito (VPDB) para *Totoaba macdonaldi* cultivada en el laboratorio ($n = 12$) por edad (días).

Table 1. Laboratory-reared otoliths: total length of fish, age of individual, average temperature for the time that each sample represents, time that the sample represents (days), observed $\delta^{18}\text{O}$, and $\delta^{18}\text{O}_{\text{predicted otolith}}$ for each equation.

Tabla 1. Otolitos cultivados en el laboratorio: longitud total del espécimen, edad del individuo, temperatura media para el tiempo que representa cada muestra, tiempo que representa la muestra (días), $\delta^{18}\text{O}$ observado y $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolito pronosticado}}$ para cada ecuación.

Laboratory totoaba					Observed $\delta^{18}\text{O}$		Predicted $\delta^{18}\text{O}$		
Specimen ID #	Total length (cm)	Fish age (days)	Avg. temp. ($^{\circ}\text{C}$)	Sample days	Otolith	SD	Kalish 1991	Thorrold <i>et al.</i> 1997	Weidman and Millner 2000
UA2005-07	3.80	34	24.6	9.4	-2.07	0.09	-2.03	-1.49	-1.72
UA2005-07			25.4	9.4	-1.87	0.14	-2.19	-1.55	-1.79
UA2005-08	5.60	37	24.4	9.0	-2.00	0.05	-1.97	-1.45	-1.68
UA2005-08			25.4	9.0	-1.99	0.14	-2.18	-1.55	-1.79
UA2005-09	1.90	37	25.0	24.7	-1.96	0.25	-2.07	-1.47	-1.71
UA2005-09			25.0	30.0	-2.05	0.04	-2.06	-1.47	-1.71
UA2005-10	4.90	37	24.6	9.5	-2.06	0.06	-2.03	-1.49	-1.72
UA2005-10			25.4	9.5	-2.85	0.07	-2.18	-1.55	-1.79
UA2005-11	5.10	37	25.4	9.9	-1.86	0.15	-2.18	-1.55	-1.79
UA2005-12	5.00	37	24.9	11.2	-2.03	0.27	-2.13	-1.55	-1.79
UA2005-12			25.4	11.2	-2.30	0.07	-2.18	-1.55	-1.79
UA2005-13	4.90	37	24.4	9.0	-2.36	0.07	-1.97	-1.45	-1.68
UA2005-13			25.5	9.0	-2.31	0.10	-2.22	-1.57	-1.82
UA2005-14	9.30	62	24.8	10.6	-2.25	0.17	-2.11	-1.54	-1.78
UA2005-14			25.5	10.6	-2.51	0.03	-2.31	-1.67	-1.91
UA2005-15	11.30	62	24.4	8.8	-2.32	0.08	-1.97	-1.45	-1.68
UA2005-15			25.5	8.8	-2.74	0.06	-2.31	-1.67	-1.91
UA2005-16	10.30	62	24.8	10.4	-2.24	0.07	-2.08	-1.52	-1.76
UA2005-16			25.5	10.4	-2.75	0.09	-2.31	-1.67	-1.91
UA2005-17	10.30	62	24.4	8.7	-2.38	0.08	-1.97	-1.45	-1.68
UA2005-17			25.5	8.7	-2.18	0.27	-2.31	-1.67	-1.91
UA2005-18	10.00	62	24.6	9.9	-2.18	0.03	-2.03	-1.49	-1.72
UA2005-18			25.5	9.9	-2.39	0.05	-2.32	-1.67	-1.92

relatively constant ($25.3^{\circ}\text{C} \pm 0.01$ SE). Observed $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolith}}$ values for the laboratory-reared totoaba ranged from -1.86‰ to -2.85‰ and the mean $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolith}}$ value was $-2.2\text{‰} \pm 0.7$ SE (table 1). Average values for otoliths were more negative for fish that experienced more of the grow-out conditions; or in other words, older fish tended to have more negative $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolith}}$ (fig. 3). The range of predicted $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolith}}$ values was less than one per mill (-1.5‰ to -2.17‰), and the average predicted $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolith}}$ was -1.54‰ , -1.78‰ , and -2.14‰ for equations 1, 2, and 3, respectively. The observed $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolith}}$ values differed significantly from the values predicted from equations 1 (paired $t = -9.98$, $P < 0.0001$) and 2 (paired $t = -6.32$, $P < 0.0001$), but did not differ from the predicted values for equation 3 (paired $t = -0.927$, $P = 0.374$; fig. 4). The mean difference between predicted and observed values was 0.66‰ for equation 1, 0.42‰ for equation 2, and 0.06‰ for equation 3.

Validación en el medio natural

Los valores observados de $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolito}}$ fueron $-0.84\text{‰} \pm 0.1$ EE para las totoabas modernas y $-2.99\text{‰} \pm 0.6$ EE para las antiguas (tabla 2). Los valores natales pronosticados de $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolito}}$ para los peces silvestres que se desarrollan en aguas marinas y a temperaturas características de su temporada de desove ($\sim 16\text{--}27^{\circ}\text{C}$) varió de $+1.5\text{‰}$ a -2.11‰ . Los promedios natales pronosticados de $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolito}}$ para las ecuaciones 1, 2 y 3 fueron -0.05‰ , -0.25‰ y -0.18‰ , respectivamente. Los valores observados para las totoabas silvestres modernas estuvieron dentro del intervalo de los valores pronosticados de $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolito}}$, pero los valores natales antiguos fueron más de 2‰ más negativos que los valores modernos observados y más de 0.8‰ más negativos que el menor valor pronosticado de $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolito}}$ (fig. 5).

Table 2. Modern and ancient $\delta^{18}\text{O}$ values for the natal section of totoaba otoliths from the wild.

Tabla 2. Valores de $\delta^{18}\text{O}$ modernos y antiguos para la sección natal de los otolitos de totoabas silvestres.

Sample ID	$\delta^{18}\text{O}$ PDB	$\delta^{18}\text{O}$ SD
Modern UAZ - 2005-01	-0.75	0.07
Modern UAZ - 2005-02	-1.03	0.05
Modern UAZ - 2005-03	-1.22	0.05
Modern UAZ - 2005-04	-0.38	0.08
Modern UAZ - 2005-05	-0.83	0.04
Ancient SIO 50 - 119-02	-3.07	0.08
Ancient SIO 50 - 119-01	-1.32	0.11
Ancient SIO 50 - 119-03	-2.26	0.10
Ancient SIO 50 - 119-04	-3.88	0.17
Ancient UAZ - 2005-06	-4.41	0.05

Field validation

Observed natal $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolith}}$ values averaged $-0.84\text{‰} \pm 0.1$ SE for modern totoaba and $-2.99\text{‰} \pm 0.6$ SE for ancient totoaba otoliths (table 2). Predicted natal $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolith}}$ values for wild fish developing in marine waters and in temperatures characteristic of their spawning season ($\sim 16\text{--}27^\circ\text{C}$) ranged from $+1.5\text{‰}$ to -2.11‰ . Predicted average natal $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolith}}$ values for equations 1, 2, and 3 were -0.05‰ , -0.25‰ , and -0.18‰ , respectively. The observed values for modern wild totoaba were within the range of predicted $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolith}}$ values, but ancient natal values were more than 2‰ more negative than observed modern otolith values, and more than 0.8‰ more negative than the lowest predicted $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolith}}$ value (fig. 5).

Discussion

When temperature and water $\delta^{18}\text{O}$ are known, the $\delta^{18}\text{O}$ of totoaba otolith carbonate in laboratory and field settings can be predicted. The observed oxygen isotope values in otoliths of cultured fish matched the values predicted by equation 3 (Kalish 1991), and in the field, all three relationships successfully predicted natal values for modern otoliths in a marine habitat. The scale of resolution (seasonal) used to model field conditions was much coarser than in the laboratory setting, and is perhaps the reason that all equations were able to predict natal otolith $\delta^{18}\text{O}$ in modern wild fish. The $\sim 11^\circ\text{C}$ range of possible temperatures during the totoaba spawning season (March–June), translates into a range of $\delta^{18}\text{O}$ values $> 3.5\text{‰}$. Natal $\delta^{18}\text{O}$ values for prehistoric totoaba otoliths had drastically different values from modern otoliths and from those predicted for purely marine conditions. This difference indicates that these pre-dam fish were reared in a substantially different setting. The strongly negative offset is evidence that these pre-dam fish were developing in river-influenced nursery grounds.

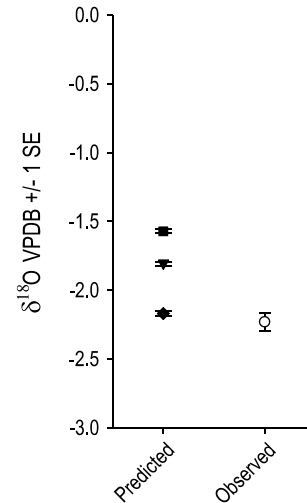


Figure 4. Mean predicted and observed $\delta^{18}\text{O}$ values (VPDB) for the natal portion of laboratory-raised *Totoaba macdonaldi* otoliths. Black symbols are predicted values: square = equation 1, Thorrold *et al.* 1997; triangle = equation 2, Weidman *et al.* 2000; diamond = equation 3, Kalish 1991. The empty circle is the mean observed value. All error bars represent ± 1 SE.

Figura 4. Promedios de $\delta^{18}\text{O}$ (VPDB) pronosticados y observados para la porción natal de los otolitos de *Totoaba macdonaldi* cultivados en el laboratorio. Los símbolos negros son los valores pronosticados: cuadrado = ecuación 1, Thorrold *et al.* 1997; triángulo = ecuación 2, Weidman *et al.* 2000; diamante = ecuación 3, Kalish 1991. El círculo vacío es el promedio observado. Todas las barras de error representan ± 1 EE.

Discusión

Cuando se conoce la temperatura y el $\delta^{18}\text{O}$ del agua, es posible predecir el $\delta^{18}\text{O}$ del carbonato de los otolitos de la totoaba tanto en el laboratorio como en el medio natural. Los valores observados del isótopo de oxígeno en los otolitos de los peces cultivados coincidieron con los valores pronosticados por la ecuación 3 (Kalish 1991), y en el medio natural, las tres relaciones pronosticaron exitosamente los valores natales para los otolitos modernos en un hábitat marino. La escala de la resolución (estacional) usada para modelar las condiciones del medio natural fue mayor que en el laboratorio y es posible que por ello todas las ecuaciones hayan podido predecir el $\delta^{18}\text{O}$ natal en otolitos de peces silvestres modernos. El intervalo de $\sim 11^\circ\text{C}$ de temperaturas posibles durante la temporada de desove de la totoaba (marzo a junio), se traduce en un intervalo de valores de $\delta^{18}\text{O} > 3.5\text{‰}$. Los valores natales de $\delta^{18}\text{O}$ en los otolitos de las totoabas prehistóricas fueron significativamente diferentes de los de los otolitos modernos y de los pronosticados para condiciones totalmente marinas. Esta diferencia indica que los peces previos a la construcción de presas se criaron en un ambiente significativamente diferente. Esta compensación fuertemente negativa evidencia que los peces antiguos se desarrollaban en zonas con influencia fluvial.

En general, los valores de $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolito}}$ para las totoabas cultivadas en el laboratorio fueron más negativos que los valores pronosticados. La compensación negativa entre los valores observados y los pronosticados puede ser resultado de varios

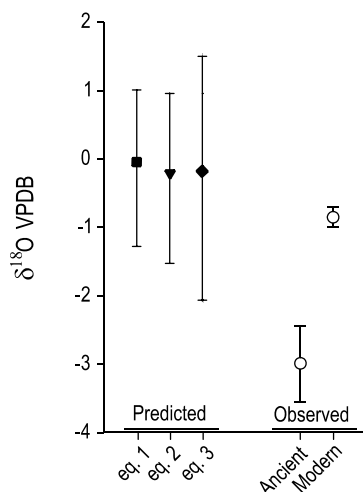


Figure 5. Mean otolith $\delta^{18}\text{O}$ (VPDB) predicted (square = equation 1, Thorrold *et al.* 1997; triangle = equation 2, Weidman *et al.* 2000; diamond = equation 3, Kalish 1991; range of values illustrated by bars) compared to mean natal otolith $\delta^{18}\text{O}$ (± 1 SE) observed in otoliths from wild-caught *Totoaba macdonaldi* from ancient and modern times.

Figura 5. Promedio de $\delta^{18}\text{O}$ del otolito (VPDB) pronosticado (cuadrado = ecuación 1, Thorrold *et al.* 1997; triángulo = ecuación 2, Weidman *et al.* 2000; diamante = ecuación 3, Kalish 1991; las barras indican el intervalo de valores) comparado con el promedio de $\delta^{18}\text{O}$ de la porción natal del otolito (± 1 EE) observado en los otolitos de *Totoaba macdonaldi* silvestres de tiempos antiguos y modernos.

In general, the $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolith}}$ values in laboratory-reared totoaba are more negative than predicted values. The negative offset between the observed and predicted values could be caused by several factors. One possibility is a species-specific kinetic effect, where during otolith growth more ^{16}O is incorporated in the carbonate than in the ratio determined by slow equilibrium fractionation. While sample size was low, there is a negative relationship between fish growth rate (mm day^{-1}) and average $\delta^{18}\text{O}$ value ($F_{1,12} = 4.39$, $P < 0.0001$, $r^2 = 0.24$). Thorrold *et al.* (1997), however, found no relationship between growth rate and $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolith}}$ within the species *M. undulatus*. While $\delta^{18}\text{O}$ fractionation may or may not be affected by otolith growth, temperature influences are sure to play a role. Because fish tend to grow faster in warmer temperatures, the average $\delta^{18}\text{O}$ of an otolith may be weighted toward warmer conditions experienced, resulting in more carbonate material deposited during warmer temperatures and more negative $\delta^{18}\text{O}$ values. So, in other words, the $\delta^{18}\text{O}$ in otoliths may simply be biased towards the optimal temperatures for growth. Current equations predicting $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolith}}$ do not include temperature-influenced growth rate.

Another possible explanation for the negative offset between the observed and the predicted values is that our otolith sampling may be at a higher resolution than the sampling $\delta^{18}\text{O}_{\text{water}}$ and, therefore, we were unable to accurately characterize water chemistry affecting the prediction. Samples represented, on average, 9–10 days of growth. We sampled

factores. Uno podría ser un efecto cinético específico de la especie, en el que durante el crecimiento el ^{16}O se incorpora en el carbonato en una razón mayor a la determinada por la fraccionación lenta en equilibrio. A pesar del pequeño tamaño de muestra, se presentó una relación negativa entre la tasa de crecimiento de la totoaba (mm día^{-1}) y el promedio de $\delta^{18}\text{O}$ ($F_{1,12} = 4.39$, $P < 0.0001$, $r^2 = 0.24$); sin embargo, Thorrold *et al.* (1997) no encontraron ninguna relación entre la tasa de crecimiento y $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolito}}$ en la especie *M. undulatus*. Aunque la fraccionación de $\delta^{18}\text{O}$ puede verse o no afectada por el crecimiento del otolito, seguramente la temperatura debe tener algún efecto. Dado que el crecimiento de los peces tiende a ser más rápido a temperaturas cálidas, el promedio de $\delta^{18}\text{O}$ de un otolito puede estar cargado hacia condiciones más cálidas, dando como resultado mayor depósito de material carbonatado a temperaturas mayores y valores de $\delta^{18}\text{O}$ más negativos. En otras palabras, el $\delta^{18}\text{O}$ de otolitos simplemente puede estar sesgado hacia las temperaturas óptimas para el crecimiento. Las ecuaciones que actualmente predicen $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolito}}$ no consideran la influencia de la temperatura en la tasa de crecimiento.

Otra posible explicación para la compensación negativa entre los valores observados y los pronosticados es que nuestro muestreo de los otolitos se haya realizado a mayor resolución que el de $\delta^{18}\text{O}_{\text{agua}}$ y, por tanto, no se pudo caracterizar de manera precisa la química del agua que afecta la predicción. Las muestras representaron, en promedio, de 9 a 10 días de crecimiento. Las muestras de agua se tomaron tres veces a lo largo de 62 días. Los valores de $\delta^{18}\text{O}_{\text{agua}}$ variaron más de lo anticipado debido a una serie de tormentas invernales y al hecho de que el suministro de agua para los tanques ocurre donde el escurrimiento local hacia el mar podría haber influenciado la señal marina, potencialmente causando una variación a corto plazo sesgada hacia valores de $\delta^{18}\text{O}_{\text{agua}}$ más negativos. Consecuentemente, nuestro régimen de muestreo del agua pudo haber sido insuficiente para caracterizar los valores de $\delta^{18}\text{O}_{\text{agua}}$ durante los momentos en que se precipitaba el carbonato del otolito; sin embargo, los valores de $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolito}}$ sí siguieron la misma tendencia hacia valores más negativos observados en las muestras de $\delta^{18}\text{O}_{\text{agua}}$ durante el periodo de crecimiento.

Los valores natales de $\delta^{18}\text{O}$ observados en los otolitos de las totoabas silvestres modernas se encuentran dentro del intervalo pronosticado para cada ecuación. Si se supone que estos peces desovaron a la temperatura media de la temporada de desove, hay una compensación negativa entre los valores natales observados y los pronosticados. Claro, es posible que estos individuos hayan desovado más tarde en la temporada. Usando las ecuaciones 1, 2 y 3, se puede retrocalcular a partir de los valores natales observados de los otolitos silvestres modernos, lo que sugiere que la porción natal de los otolitos se desarrolló en aguas a 18–19°C, temperaturas características de finales de abril y principios de mayo. En favor de ello, existe evidencia de que la temporada de desove de la totoaba se ha desplazado hacia finales de la primavera y que se ha visto truncada significativamente por el esfuerzo de pesca selectivo durante las

water three times over 62 days. The $\delta^{18}\text{O}_{\text{water}}$ values varied more than anticipated due to a series of winter storms and the fact that the water intake for the tanks is where local run-off could have influenced the marine signal, potentially leading to short-term variation biased to more negative $\delta^{18}\text{O}_{\text{water}}$ values. Thus, our water sampling regime may have been insufficient to characterize $\delta^{18}\text{O}_{\text{water}}$ values during the times that otolith carbonate was precipitated. Otolith $\delta^{18}\text{O}$ values did, however, follow the same trend toward more negative values observed in the $\delta^{18}\text{O}_{\text{water}}$ samples over the grow-out period.

Observed natal otolith $\delta^{18}\text{O}$ values from wild-caught (modern-day) totoaba are within the range predicted for each equation. If we assume that these fish were spawned in the average temperature of the spawning season, there is a negative offset between observed and predicted natal values. Of course, it is possible that these fish were spawned later in the season. Using equations 1, 2, and 3, we can back-calculate from the observed natal values of wild modern otoliths, which suggest that the natal portion of the otoliths developed in waters that were 18–19°C. This is characteristic of temperatures in late April and early May. In support of this, there is evidence that the totoaba spawning season has shifted to late spring, and has been truncated significantly due to selective fishing pressure during the spawning aggregations in the earlier part of the season (Flannagan and Hendrickson 1976). Flannagan and Hendrickson (1976) reported that before totoaba were protected, the bulk of landings occurred in the last couple of days of the fishing season (30 March–1 April). The warm temperatures used in totoaba aquaculture spawning and larval rearing also suggest that spawning and successful larval recruitment may be favored by these warmer temperatures.

The ability to predict otolith $\delta^{18}\text{O}$ in known environmental conditions gives us the means to test if otoliths from totoaba living in the past (unknown conditions) were developed in an isotopically different habitat. We found that prehistoric natal totoaba $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolith}}$ values were considerably lower than the predicted values as well as values measured in modern fish. Even if the natal portion of the otolith developed at the hottest temperature of the year (31°C), predicted values would not match those recorded by these ancient fish. This is direct evidence that before human alteration to river flow, totoaba were spawned in a very different environment: one with a significantly lower $\delta^{18}\text{O}_{\text{water}}$ value, characteristic of river-influenced estuaries (Rowell *et al.* 2005).

Like many marine communities, little pre-disturbance data exist for the upper Gulf of California ecosystem, making it difficult to ground-truth expectations of natural conditions (Dayton *et al.* 1998, Jackson *et al.* 2001). Unfortunately, the burden of proof lies with scientists, providing evidence that human alterations (over-fishing, river regulation, coastal development, pollution) have had negative impacts on the marine ecosystem (Dayton 1998). Techniques that use natural tracers to document natural (pre-disturbance) environmental conditions and the ecology of organisms are invaluable for

agregaciones reproductivas a principios de la temporada (Flannagan y Hendrickson 1976). Flannagan y Hendrickson (1976) indicaron que antes de que la totoaba fuera protegida, la mayor parte de las capturas se realizaban en los últimos dos días de la temporada de pesca (30 de marzo al 1 de abril). Las temperaturas cálidas usadas durante el cultivo para el desove de las totoabas y la crianza de las larvas también indican que el desove y el éxito del reclutamiento de larvas se pueden ver favorecidos por estas temperaturas más cálidas.

La capacidad de predecir el $\delta^{18}\text{O}$ del otolito en condiciones ambientales conocidas nos permite determinar si los otolitos de las totoabas que vivían en el pasado (condiciones desconocidas) se desarrollaron en un hábitat isotópicamente diferente. Encontramos que los valores natales de $\delta^{18}\text{O}_{\text{otolito}}$ de las totoabas prehistóricas fueron considerablemente menores que los valores pronosticados al igual que los valores obtenidos para los especímenes modernos. Aun cuando la porción natal del otolito se hubiera desarrollado durante las mayores temperaturas del año (31°C), los valores pronosticados no serían iguales que los registrados por los peces antiguos. Esto es evidencia directa de que antes de la alteración antropogénica del flujo del río las totoabas desovaban en un ambiente muy diferente: uno con un valor de $\delta^{18}\text{O}_{\text{agua}}$ significativamente menor, característico de estuarios influenciados por ríos (Rowell *et al.* 2005).

Al igual que para varias comunidades marinas, existen pocos datos sobre el ecosistema del Alto Golfo de California antes de las perturbaciones antropogénicas, lo que dificulta la validación de las condiciones naturales (Dayton *et al.* 1998, Jackson *et al.* 2001). Desafortunadamente son los científicos los que tienen que aportar evidencias de que las alteraciones antropogénicas (sobrepesca, regulación de ríos, desarrollo costero, contaminación) han tenido efectos negativos sobre el ecosistema marino (Dayton 1998). Las técnicas que usan indicadores naturales para documentar las condiciones ambientales naturales (antes de las perturbaciones) y la ecología de los organismos son de inestimable valor para el manejo adecuado de los océanos. Se ha confirmado aquí que el $\delta^{18}\text{O}$ de los otolitos de totoabas puede resolver algunas de estas lagunas del conocimiento. También se demostró que el $\delta^{18}\text{O}$ tiene una relación predecible con la temperatura del agua del medio si se conoce el $\delta^{18}\text{O}$ del agua. Por medio de estas herramientas para investigar el impacto de la reducción del flujo del Río Colorado hacia el Golfo de California, se encontró que la zona de crianza de *T. macdonaldi*, una especie en peligro de extinción, ha sido profundamente alterada y modificada de ser un estuario salobre a convertirse en uno salino. El éxito en la recuperación de la totoaba probablemente requerirá un flujo estacional apropiado de agua del Río Colorado hacia su histórico estuario.

Agradecimientos

Reconocemos y agradecemos a LM López-Acuña el suministro de las dietas para las larvas, así como a G Sandoval-Garibaldi e I Monay su apoyo en la crianza de las larvas, los

sound management of the oceans. We confirm that $\delta^{18}\text{O}$ in totoaba otoliths can resolve some of these gaps in knowledge. We demonstrated that $\delta^{18}\text{O}$ has a predictable relationship with ambient water temperature, if the $\delta^{18}\text{O}$ of water is known. Using these tools to investigate impacts of upstream diversions of the Colorado River flow away from the Gulf of California, we found that the nursery habitat of the endangered totoaba has been profoundly altered from a brackish estuary to a saline estuary. Successful restoration of totoaba will likely require a seasonally appropriate influx of Colorado River water to the historic Colorado River estuary.

Acknowledgements

We would like to acknowledge and thank LM López-Acuña for providing the larval diets, and G Sandoval-Garibaldi and I Monay for their efforts in larval rearing and water sampling and skillful help with otolith collections. The otoliths were donated by the Universidad Autónoma de Baja California (Ensenada) to the University of Arizona Natural History Museum (UAZ2005-07 to 18). The post-dam otoliths (UAZ-S2005-01 to 05) were donated by the Instituto del Medio Ambiente y el Desarrollo Sustentable del Estado de Sonora to the University of Arizona Fish Collection. The pre-dam specimen (UAZ-S2005-06) was donated by the Tecnológico de Monterrey, Campus Guaymas. All donated specimens were imported under CITES Permit 06US119621/9 to the University of Arizona, EEB Zoological Collections. We would like to thank P Reinthal (University of Arizona Vertebrate Collection), LT Findley and MJ Román for providing the specimens used in this study. Insightful comments and suggestions by JJ Tewksbury and C Cintra-Buenrostro contributed to the success of this project. Funding came from the National Science Foundation (EAR-0125025 and INT-0323139), T&E Inc., Southern Arizona Environmental Management, and the Marshall Foundation. We also thank two thoughtful reviewers and S Shephard for editorial comments.

References

- Avila-Serrano GE, Flessa KW, Téllez-Duarte MA, Cintra-Buenrostro CE. 2006. Distribution of the intertidal macrofauna of the Colorado River Delta, northern Gulf of California, Mexico. *Cienc. Mar.* 32: 649–661.
- Campana SE, Thorrold SR. 2001. Otoliths, increments and elements: Keys to a comprehensive understanding of fish populations. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 58: 30–38.
- Carbajal N, Souza A, Durazo R. 1997. A numerical study of the ex-ROFI of the Colorado River. *J. Mar. Sys.* 12: 17–33.
- Cisneros-Mata MA, Montemayor-López G, Román-Rodríguez MJ. 1995. Life history and conservation of *Totoaba macdonaldi*. *Conserv. Biol.* 9: 806–814.
- Dayton PK. 1998. Reversal of the burden of proof in fisheries management. *Science* 279: 821–822.
- Dayton PK, Tegner MJ, Edwards PB, Riser KL. 1998. Sliding baselines, ghosts and reduced expectations in kelp forest communities. *Ecol. Appl.* 8: 309–322.
- muestreos de agua y la recolección de otolitos. Los otolitos fueron donados por la Universidad Autónoma de Baja California (Ensenada) al Museo de Historia Natural de la Universidad de Arizona (UAZ2005-07 al 18). Los otolitos recolectados en 1987 y 1990 (UAZ-S2005-01 al 05) fueron donados por el Instituto del Medio Ambiente y el Desarrollo Sustentable del Estado de Sonora a la Colección de Peces de la Universidad de Arizona. El espécimen antiguo (UAZ-S2005-06) fue donado por el Tecnológico de Monterrey, campus Guaymas. Todos los especímenes donados fueron importados bajo el permiso CITES 06US119621/9 a la Universidad de Arizona. Los especímenes utilizados en este estudio fueron proporcionados por P Reinthal (Colección de Vertebrados de la Universidad de Arizona), LT Findley y MJ Román. Los comentarios y las sugerencias atinadas de JJ Tewksbury y C Cintra-Buenrostro contribuyeron al éxito de este proyecto. Se recibió apoyo financiero de National Science Foundation (EAR-0125025 y INT-0323139), T&E Inc., Southern Arizona Environmental Management, y Marshall Foundation. También agradecemos los comentarios editoriales de dos revisores y S Shephard.
- Traducido al español por Christine Harris.
- Dettman D, Flessa KW, Roopnarine PD, Schöne BR, Goodwin DH. 2004. The use of oxygen isotope variation in shells of estuarine mollusks as a quantitative record of seasonal and annual Colorado River discharged. *Geochim. Cosmochim. Acta* 68: 1253–1263.
- Dufour V, Pierre C, Rancher J. 1992. Stable isotopes in fish otoliths discriminate between lagoonal and oceanic residents of Taiaro Atoll (Tuamotu Archipelago French Polynesia). *Coral Reefs* 17: 23–28.
- Flanagan CA, Hendrickson JR. 1976. Observations on the commercial fishery and reproductive biology of the totoaba, *Cynoscion macdonaldi*, in the northern Gulf of California. *Fish. Bull.* 74: 531–544.
- Gilbert CH. 1891. Scientific results of the exploration by the US Fish Commission steamer *Albatross*. No. XII. 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. *Proc. US Natl. Mus.* 13: 49–126.
- Goodfriend GA, Flessa KW. 1997. Radiocarbon reservoir ages in the Gulf of California: Roles of upwelling and flow from the Colorado River. *Radiocarbon* 39: 139–148.
- Ingram BL, Conrad ME, Ingle JE. 1996. Stable isotope and salinity systematics in estuarine waters and carbonates: San Francisco Bay. *Geochim. Cosmochim. Acta* 60: 455–467.
- Jackson JBC, Kirby MX, Berger WH, Bjorndal KA, Botsford LW, Bourque BJ, Bradbury RH, Cooke R, Erlandson J, Estes JA, Hughes TP, Kidwell S, Lange CB, Lenihan HS, Pandolfi JM, Peterson CH, Steneck RS, Tegner MJ, Warner RR. 2001. Historical overfishing and the recent collapse of coastal ecosystems. *Science* 293: 629–638.
- Jamieson RE, Schwarcz HP, Bratney J. 2004. Carbon isotopic records from the otoliths of Atlantic cod (*Gadus morhua*) from eastern Newfoundland, Canada. *Fish. Res.* 68: 83–97.
- Kalish JM. 1991. Oxygen and carbon stable isotopes in the otoliths of wild and laboratory-reared Australian salmon (*Arripis trutta*). *Mar. Biol.* 110: 37–47.

- Lavín MF, Sánchez S. 1999. On how the Colorado River affected the hydrography of the upper Gulf of California. *Cont. Shelf Res.* 19: 1545–1560.
- Lavín MF, Godínez VM, Alvarez LG. 1998. Inverse-estuarine features of the upper Gulf of California. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 47: 769–795.
- Lercari D, Chávez E. 2007. Possible causes related to historic stock depletion of the totoaba, *Totoaba macdonaldi* (Perciformes: Sciaenidae), endemic to the Gulf of California. *Fish. Res.* 86: 136–142.
- Patterson WP. 1998. North American continental seasonality during the last millennium: High resolution analysis of sagittal otoliths. *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol.* 138: 271–303.
- Rodríguez CA, Flessa KW, Dettman DL. 2001. Effects of upstream diversion of Colorado River water on the estuarine bivalve mollusc *Mulinia coloradoensis*. *Conserv. Biol.* 15: 249–258.
- Román-Rodríguez MJ, Hammann MF. 1997. Age and growth of totoaba, *Totoaba macdonaldi* (Sciaenidae), in the upper Gulf of California. *Fish. Bull.* 95: 620–628.
- Rowell K. 2006. Isotopic logs of the Sea of Cortez: Oxygen and carbon stable isotopes in otoliths from marine fish record the impact of diverting the Colorado River from the sea. Dissertation, University of Arizona.
- Rowell K, Flessa KW, Dettman DL, Román M. 2005. The importance of Colorado River flow to nursery habitats of the Gulf corvina (*Cynoscion othonopterus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 62: 2874–2885.
- Thorrold SR, Campana SE, Jones CM, Swart PK. 1997. Factors determining $\delta^{13}\text{C}$ $\delta^{18}\text{O}$ fractionation in aragonitic otoliths of marine fish. *Geochim. Cosmochim. Acta* 61: 2990–2919.
- True CD, Loera AS, Castro NC. 1997. Acquisition of broodstock of *Totoaba macdonaldi*: Field handling, decompression, and prophylaxis of an endangered species. *Prog. Fish-Cult.* 59: 246–248.
- True CD, Castro-Castro N, Sandoval-Garibaldi G, Morales-Ortiz C. 2001. Reproducción controlada de *Totoaba macdonaldi* (Gilbert). VIII Congreso Nacional y II Simposium Internacional sobre el Mar de Cortés.
- Weidman CR, Millner R. 2000. High-resolution stable isotope records from North Atlantic cod. *Fish. Res.* 46: 327–342.

*Recibido en abril de 2007;
aceptado en enero de 2008.*