



Universidad Veracruzana

# UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

Campus - Tuxpan

**Maestría en Manejo de Ecosistemas Marinos y Costeros**

**“Caracterización del ciclo reproductivo de *Acropora palmata* (Lamarck, 1816) en el arrecife En medio, Tuxpan y la conservación de gametos mediante crio-preservación”**

**TESIS**

**Que para obtener el título de:**

**MAESTRO EN MANEJO DE ECOSISTEMAS MARINOS Y  
COSTEROS**

**P R E S E N T A:**

**Biol. Mar. Jared Leyva Hernández**

**Director:**

**Dr. Rodrigo Cuervo González**

Tuxpan, Veracruz

2015

---

La presente Tesis titulada **“Caracterización del ciclo reproductivo de *Acropora palmata* (Lamarck, 1816) en el arrecife En medio, Tuxpan y la conservación de gametos mediante crio-preservación”** realizada por el C. Biol. Mar. Jared Leyva Hernández, ha sido aprobada y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN MANEJO DE ECOSISTEMAS MARINOS Y COSTEROS**

**CONSEJO PARTICULAR**



---

**Dr. Rodrigo Cuervo González**

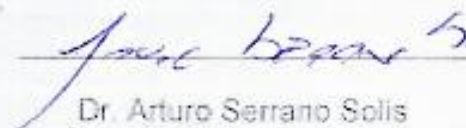
**DIRECTOR**

Tuxpan de Rodríguez Cano, Ver; Septiembre de 2015

---

La presente tesis titulada “Caracterización del ciclo reproductivo de *Acropora palmata* (Lamarck, 1816) en el arrecife En medio, Tuxpan y la crio-preservación de gametos” realizada por el C. Biol. Mar. Jared Leyva Hernández, ha sido aprobada y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN MANEJO DE ECOSISTEMAS MARINOS Y COSTEROS**



Dr. Arturo Serrano Solis

LECTOR



Dr. Eduardo Alfredo Zarza Meza

LECTOR



Dr. Javier Aguilar Fuentes

LECTOR

---

## AGRADECIMIENTOS

*Al llevar a cabo un trabajo de gran importancia como lo fue la realización de esta tesis, es un verdadero placer agradecer a todas esas personas e instituciones que estuvieron a mi lado y fueron de vital importancia para lograr el éxito de este proyecto, ya que con su ayuda, comprensión y compañía brindada el camino fue menos duro y más fácil de recorrer.*

*Primero debo agradecer infinitamente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT CVU/Becario: 558146/297595) quien financió la elaboración de este proyecto, gracias por creer y apostar en mí.*

*De manera muy especial y honesta a mi maestro, director de tesis y amigo, el Dr. Rodrigo Cuervo González a quien debo agradecer su comprensión, paciencia y sobre todo sus conocimientos que compartió conmigo durante todo este tiempo, sinceramente mil gracias.*

*A la comisión revisora, especialmente al doctor Arturo Serrano Solís por sus muy atinadas correcciones que hicieron de este un trabajo mejor, gracias por su paciencia y valioso tiempo invertido en la revisión de este proyecto.*

*A todos mis profesores que durante estos dos años compartieron sus conocimientos y dieron lo mejor de sí para formar a un nuevo Maestro en Manejo de Ecosistemas Marinos y Costeros.*

*Finalmente pero no menos importante al Laboratorio de Evolución y Embriología y a la Universidad Veracruzana en cuyas magníficas instalaciones se realizó este proyecto.*

*Por todo eso y más, a todos... Mil gracias.*

---

## DEDICATORIA

### A MI FAMILIA:

*Quiénes me han enseñado que el amor es incondicional y perdona errores, que las cosas que realmente valen la pena en la vida no son las materiales si no las que se guardan en el espíritu, ya que es ahí y solamente ahí, donde lo que más atesoramos está realmente seguro, a mis hermanas y hermanos que son la prueba viviente de que la familia es primero y que al igual que el amor, todo lo perdonan y soportan, gracias por soportarme y perdonarme.*

### A MI MADRE:

*Por enseñarme con tu ejemplo que vale la pena cambiar unas horas de sueño por un sueño más grande, gracias por enseñarme esa lección que fue la que me mantuvo de pie en esta carrera que he corrido y terminado con aguante.*

### A MIS COMPAÑERAS Y AMIGAS:

*Ustedes, que hicieron de este proyecto una experiencia hermosa en mi vida, horas increíbles de diversión Elíe, Ale, Arlene, Lau, Anniux, Magda, Poly y por qué no... Karen, ustedes las principales cómplices en esta experiencia, son de lo mejor que hay.*

### A TÍ:

*Gracias por tu amistad que me hizo soñar tan alto y tu fe en mí, por abrir tus brazos, porque sigues aquí junto a mí, porque aprendí a sonreír, por cada sonrisa en cualquier lugar y por tu grande luz que no voy a olvidar. J&J.*

---

## ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| I.INTRODUCCIÓN.....   | 1  |
| II. ANTECEDENTES.....   | 5  |
| III.OBJETIVOS.....  | 11 |
| 3.1 Objetivo general.....   | 11 |
| 3.2 Objetivos particulares.....   | 11 |
| IV.MATERIAL Y MÉTODOS.....  | 12 |
| 4.1 Área de estudio.....  | 12 |
| 4.2 Extracción de muestras.....   | 13 |
| 4.3 Fijación y desmineralización.....   | 14 |
| 4.4 Cortes histológicos.....  | 14 |
| 4.5 Tinción histoquímica y captura de imágenes.....                           | 15 |
| 4.6 Ciclo reproductivo en gametos femeninos (óvulos).....                     | 15 |
| 4.7 Correlación tallas-meses en los óvulos.....                               | 16 |
| 4.8 Crio – preservación de embriones.....                                     | 17 |
| V. RESULTADOS.....  | 20 |
| 5.1 Caracterización mediante histología, tinción histoquímica e imágenes..... | 20 |
| 5.2 Ciclo reproductivo en gametos femeninos (óvulos).....                     | 61 |
| 5.3 Correlación tallas-meses en los óvulos.....                               | 63 |
| 5.4 Crio-preservación de embriones.....                                       | 65 |
| VI. DISCUSIÓN.....  | 67 |

---

|   |    |
|---|----|
| VII. CONCLUSION.....  | 72 |
| 7.1 Recomendaciones.....  | 74 |
| VIII. APLICACIÓN PRÁCTICA DEL TRABAJO.....  | 75 |
| IX. BIBLIOGRAFÍA.....   | 78 |
| X ANEXOS.....   | 82 |
| 9.1 Protocolo de desmineralización.....   | 82 |
| 9.2 Protocolo para la inclusión en parafina.....  | 83 |
| 9.3 Protocolo para realizar los cortes histológicos en un micrótopo para cortes<br>en parafina..... | 84 |
| 9.4 Protocolo para la tinción hematoxilina – eosina.....  | 85 |
| 9.5 Toma de imágenes.....   | 85 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Ubicación geográfica del arrecife “En medio”.....       | 12 |
| <b>Figura 2.</b> Colecta y transporte de los embriones.....              | 17 |
| <b>Figura 3.</b> Separación e inmersión en DMSO de los embriones.....    | 18 |
| <b>Figura 4.</b> Inmersión de los embriones en nitrógeno líquido.....    | 19 |
| <b>Figura 5.</b> Corte histológico de la colonia A en julio de 2013..... | 21 |

---

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 6.</b> Corte histológico de la colonia B en julio de 2013.....      | 22 |
| <b>Figura 7.</b> Corte histológico de la colonia C en julio de 2013.....      | 23 |
| <b>Figura 8.</b> Corte histológico de la colonia A en agosto de 2013.....     | 24 |
| <b>Figura 9.</b> Corte histológico de la colonia B en agosto de 2013.....     | 25 |
| <b>Figura 10.</b> Corte histológico de la colonia C en agosto de 2013.....    | 26 |
| <b>Figura 11.</b> Corte histológico de la colonia A en octubre de 2013.....   | 27 |
| <b>Figura 12.</b> Corte histológico de la colonia B en octubre de 2013.....   | 28 |
| <b>Figura 13.</b> Corte histológico de la colonia C en octubre de 2013.....   | 29 |
| <b>Figura 14.</b> Corte histológico de la colonia C en octubre de 2013.....   | 30 |
| <b>Figura 15.</b> Corte histológico de la colonia A en noviembre de 2013..... | 31 |
| <b>Figura 16.</b> Corte histológico de la colonia B en noviembre de 2013..... | 32 |
| <b>Figura 17.</b> Corte histológico de la colonia C en noviembre de 2013..... | 33 |
| <b>Figura 18.</b> Corte histológico de la colonia A en diciembre de 2013..... | 34 |
| <b>Figura 19.</b> Corte histológico de la colonia A en diciembre de 2013..... | 35 |
| <b>Figura 20.</b> Corte histológico de la colonia B en diciembre de 2013..... | 36 |
| <b>Figura 21.</b> Corte histológico de la colonia B en diciembre de 2013..... | 37 |
| <b>Figura 22.</b> Corte histológico de la colonia C en diciembre de 2013..... | 38 |
| <b>Figura 23.</b> Corte histológico de la colonia A en febrero de 2014.....   | 39 |
| <b>Figura 24.</b> Corte histológico de la colonia B en febrero de 2014.....   | 40 |
| <b>Figura 25.</b> Corte histológico de la colonia C en febrero de 2014.....   | 41 |
| <b>Figura 26.</b> Corte histológico de la colonia A en marzo de 2014.....     | 42 |
| <b>Figura 27.</b> Corte histológico de la colonia B en marzo de 2014.....     | 43 |



---

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 28.</b> Corte histológico de la colonia C en marzo de 2014.....   | 44 |
| <b>Figura 29.</b> Corte histológico de la colonia C en marzo de 2014.....   | 45 |
| <b>Figura 30.</b> Corte histológico de la colonia A en abril de 2014.....   | 46 |
| <b>Figura 31.</b> Corte histológico de la colonia A en abril de 2014.....   | 47 |
| <b>Figura 32.</b> Corte histológico de la colonia B en abril de 2014.....   | 48 |
| <b>Figura 33.</b> Corte histológico de la colonia C en abril de 2014.....   | 49 |
| <b>Figura 34.</b> Corte histológico de la colonia A en mayo de 2014.....    | 50 |
| <b>Figura 35.</b> Corte histológico de la colonia B en mayo de 2014.....    | 51 |
| <b>Figura 36.</b> Corte histológico de la colonia C en mayo de 2014.....    | 52 |
| <b>Figura 37.</b> Corte histológico de la colonia A en julio de 2014.....   | 53 |
| <b>Figura 38.</b> Corte histológico de la colonia A en julio de 2014.....   | 53 |
| <b>Figura 39.</b> Corte histológico de la colonia B en julio de 2014.....   | 54 |
| <b>Figura 40.</b> Corte histológico de la colonia C en julio de 2014.....   | 55 |
| <b>Figura 41.</b> Corte histológico de la colonia A en agosto de 2014.....  | 56 |
| <b>Figura 42.</b> Corte histológico de la colonia B en agosto de 2014.....  | 57 |
| <b>Figura 43.</b> Corte histológico de la colonia C en agosto de 2014.....  | 58 |
| <b>Figura 44.</b> Corte histológico de la colonia A en octubre de 2014..... | 59 |
| <b>Figura 45.</b> Corte histológico de la colonia B en octubre de 2014..... | 60 |
| <b>Figura 46.</b> Corte histológico de la colonia C en octubre de 2014..... | 60 |
| <b>Figura 47.</b> Ciclo reproductivo de los óvulos en la colonia A.....     | 61 |
| <b>Figura 48.</b> Ciclo reproductivo de los óvulos en la colonia B.....     | 62 |
| <b>Figura 49.</b> Ciclo reproductivo de los óvulos en la colonia C.....     | 62 |

---

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 50.</b> Correlación tallas-meses en óvulos de la colonia A.....                | 63 |
| <b>Figura 51.</b> Correlación tallas-meses en óvulos de la colonia B.....                | 64 |
| <b>Figura 52.</b> Correlación tallas-meses en óvulos de la colonia C.....                | 64 |
| <b>Figura 53.</b> Correlación general tallas-meses en óvulos de las colonias A, B y C .. | 65 |
| <b>Figura 54.</b> Embriones previos y posteriores a la técnica de crio-preservación..... | 66 |
| <b>Figura 55.</b> Óvulos posteriores a la técnica de crio-preservación.....              | 66 |

---

**“Caracterización del ciclo reproductivo de *Acropora palmata* (Lamarck, 1816) en el arrecife En medio, Tuxpan y la conservación de gametos mediante crio-preservación”**

**RESUMEN**

*Acropora palmata* está considerado como uno de los corales de mayor importancia debido a su papel como constructor del arrecife. Provee un sinfín de bienes y servicios tanto ecológicos como económicos, incluso no se tienen registros de ninguna otra especie de coral que pueda cubrir los beneficios que *A. palmata* aporta a los arrecifes, por lo que los esfuerzos por conservar dicha especie mediante distintos estudios y experimentos pueden generar información valiosa para asegurar su conservación. En el presente trabajo se observó la estructura, tallas y desarrollo de los gametos presentes en este coral durante los meses de julio de 2013 a octubre de 2014 abarcando todo ciclo de reproducción anual, así mismo se colectaron embriones de *A. palmata* para ser sometidos a la técnica de crio-preservación. Se colectaron 3 muestras mensualmente durante 12 meses en 3 colonias de *A. palmata* en el arrecife “En medio” localizado a unos 9 km frente a la costa de Tuxpan, Veracruz, México. Con las muestras se realizaron cortes histológicos y tinciones histoquímicas para observar el desarrollo de los gametos y determinar si existe una relación con los meses del año conforme se aproxima el evento de reproducción. En agosto de 2014 se colectaron los embriones de este coral, se impregnaron con DMSO y agua de mar al 10%, se descendió su temperatura gradualmente hasta 0 °c y fueron colocados en nitrógeno líquido a -180°c para conservarlos con vida. Este estudio demostró que la maduración de los gametos en *A. palmata* es anual y que dichos gametos alcanzan su máximo desarrollo en agosto, siendo este el mes cuando se reproduce sexualmente este coral en esta zona, se demostró que existe una correlación positiva excelente entre el desarrollo de los óvulos a partir de su aparición en Diciembre y los 8 meses siguientes conforme se aproxima el evento de reproducción. La técnica de crio-preservación pareció ser más exitosa en células sexuales que aún no habían sido fecundadas que en los mismos embriones.

---

**PALABRAS CLAVE:** *A. palmata*, gametos, tallas, óvulos, espermários, crio-  
preservación, embriones.

---

## I. INTRODUCCIÓN

Los arrecifes de coral hacen importantes aportaciones al ambiente, como la protección a la línea de costa que ofrece ante tormentas y huracanes, favorecen la producción de especies de valor comercial, e incluso la captación de carbono en virtud de la simbiosis entre los pólipos de los corales con algas fotosintéticas que ayudan al proceso de formación del esqueleto de carbonato de calcio de un gran número de especies de corales pétreos, dentro de los cuales se encuentra *Acropora palmata*. Aun así desde hace varias décadas los arrecifes coralinos se encuentran bajo la presión de una serie de factores que ponen en riesgo su existencia (Bryant, *et al.*, 1998).

El uso irresponsable de estos hábitats ha provocado un descenso en su biodiversidad y un aumento en su destrucción por diversos factores como el turismo, desarrollo urbano y sobrepesca (Richmond, 1993). México no es la excepción con respecto a la problemática que enfrentan los corales, y las condiciones de *A. palmata* han llegado a ser las mismas a nivel regional. De hecho las poblaciones de este coral se han visto afectadas de forma considerable y su área de distribución ha disminuido dentro de nuestro país, en donde se encuentran tres zonas principales: el caribe Mexicano, Suroeste del Golfo de México y Banco de Campeche. En la zona del suroeste del Golfo de México se reporta una mortalidad que ocurrió de manera gradual por varios años a partir de

---

la década de los 70's (Jordán-Dahlgren y Rodríguez-Martínez, 2003), con pérdidas en la cobertura de estas especies que van del 50 al 100% entre los años 1971 y 1989 (Tunnell, 1992), se sugiere como principal causa la enfermedad de la banda blanca producida por una sinergia entre afectaciones naturales y humanas. Una situación similar se presentó en los arrecifes del Banco de Campeche entre los años 1997 y 1999, observándose una mortalidad de la mayoría de las colonias de *A. palmata* (Jordán-Dahlgren y Rodríguez-Martínez, 2003).

Aunque ya han pasado los años aún no se cuenta con un registro que indique la recuperación de los *Acropóridos* en los arrecifes Mexicanos, por lo que su situación aún continua siendo de riesgo. Existe la teoría de posibles obstáculos permanentes todavía no descritos que no han permitido la recuperación de las colonias de este coral (SEMARNAT, 2011).

México, por su parte y en congruencia con la política internacional, ha valorado y reconocido la importancia de proteger esta especie. Desde la creación y publicación de la actual NOM-059-SEMARNAT-2010, *Acropora palmata* y está considerada con un estatus de protección especial, y es bajo este régimen de protección que se determina la necesidad de propiciar la recuperación y conservación de sus poblaciones y hábitat, reto complejo debido a la diversidad de factores que inciden negativamente en su viabilidad como especie (SEMARNAT, 2011).

---

Una de las principales problemáticas es el relativo poco conocimiento que a estas fechas se tiene con respecto a la distribución y abundancia exactas de los *Acroporidos* en nuestro país, pues son pocos los trabajos que se han realizado con respecto a este tema, principalmente en la sonda de Campeche, y en los arrecifes veracruzanos de Tuxpan y Lobos de donde se tienen algunos datos en los que se menciona que las poblaciones de *A. palmata* en el arrecife “en medio” se encuentran en condiciones aceptables recuperándose de eventos catastróficos ocurridos en años previos al estudio (Maruri, 2009). También se confirma la preferencia de esta especie por la parte somera del arrecife. Además las formas de crecimiento de las colonias indican que la población tiene un importante componente de reproducción asexual. Cuando se habla de una distribución en el Golfo de México, solo se hace de forma general puesto que aún se desconoce la ubicación y extensión exactas que *Acropora palmata* abarca en los arrecifes y aún no se tiene un diagnóstico general de en qué situación se encuentran dichas poblaciones (SEMARNAT, 2011).

Aunque no se tiene un diagnóstico exacto de los *Acroporidos*, si existen evidencias del deterioro que han tenido las poblaciones de *A. palmata* en México, como es la mortalidad masiva que ha afectado a esta especie en toda su área de distribución (Jordán-Dahlgren y Rodríguez-Martínez, 2003). A los efectos negativos ya mencionados tenemos que aunar los efectos globales del cambio climático que también están alterando a las poblaciones de los *Acroporidos* en

---

México, lo cual ha provocado fenómenos de blanqueamiento en esta especie, (Woodley *et al.*, 1996), una reducción en las tasas de crecimiento, una mayor incidencia de enfermedades (Jordán- Dahlgren y Rodríguez-Martínez, 2004) y la constante alteración por tormentas y huracanes (Jordán-Dahlgren y Rodríguez-Martínez, 1998).

Al igual que en México, existe un reconocimiento de la importancia y vulnerabilidad de *A. palmata* a nivel internacional pues está considerada como especie en peligro crítico de extinción en el libro rojo de Especies Amenazadas elaborado por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN por sus siglas en inglés) de acuerdo a la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas.

Es bastante evidente que las poblaciones de *A. palmata* tanto a nivel mundial como regional se encuentran en grave peligro, y nos encontramos en un punto crucial y decisivo en la historia de esta especie, por lo que es imperativo el preservar y asegurar su conservación, lamentablemente se tiene un conocimiento solo moderado de la misma, tanto de su situación poblacional actual como de su biología, incluido su ciclo reproductivo sexual el cual es muy importante ya que es la única manera de que exista una combinación genética que le permita a la especie una mayor probabilidad de asegurar su existencia y viabilidad.



---

## II. ANTECEDENTES

Los arrecifes de coral son ecosistemas complejos y altamente productivos (Barnes y Hughes, 1988), considerados como los ambientes marinos con mayor diversidad, brindan un gran número de bienes y servicios ambientales sin contar además con su valor escénico. *A. palmata* está considerado como uno de los principales corales constructores del arrecife y desde un punto de vista ecológico, la abundancia de esta especie y su morfología típicamente ramificada favorece la formación de hábitat y refugio para muchos organismos que habitan en el arrecife, siendo además áreas de alimentación para un gran número de ellos.

Consecuentemente, en torno a estos sitios se forman intrincadas interacciones entre especies y se establecen flujos de energía complejos. Un ejemplo claro de lo anterior es la fuerte asociación que presentan los Acropóridos con los peces de arrecife tales como meros, pargos, loros, sargentos, ángeles, lábridos y damiselas (Itzkowitz, 1977; Gladfelter y Gladfelter, 1978; Lirman, 1999), dentro de los que se encuentran muchas especies de importancia pesquera. Al igual que los peces, muchos otros organismos como equinodermos, moluscos, langostas, cangrejos, tortugas, etc., encuentran refugio y áreas de alimentación en torno a los *Acropóridos*.

Considerando todo lo mencionado anteriormente, la importancia estructural y ecológica que tiene *Acropora palmata* para la construcción, mantenimiento y

---

función de los arrecifes es única, ya que involucra la generación de una serie de bienes y servicios, tanto ambientales como económicos, para el beneficio humano. Por ende, la pérdida o alteración de sus poblaciones podrían resultar en una reducción significativa de la función y estructura del arrecife (*Acropora* Biological Review Team, 2005), y lo que es más, no existe evidencia de que alguna otra especie de coral posea las mismas características de *A. palmata* para cubrir tales funciones dentro del ecosistema arrecifal (Bruckner, 2002).

Aún así esta especie de coral se encuentra amenazada y en peligro de extinción como consecuencia lógica de la adición de factores de riesgo y del efecto de perturbaciones simultáneas que están ocurriendo en los arrecifes (Hughes *et al.*, 2003), que les impiden a los corales como *A. palmata* desarrollar de manera efectiva sus mecanismos de resistencia y de resiliencia como comunidad y ecosistema.

Esta situación de deterioro en los arrecifes coralinos resulta ser frecuentemente más severa en la parte superior de la estructura arrecifal la cual se desarrolla a baja profundidad, ya que recibe de manera directa y con mayor intensidad los impactos antrópicos originados por el uso y contaminación de su hábitat como lo son el encallamiento de embarcaciones así como el derrame de agentes tóxicos muchas veces ocasionadas por las mismas embarcaciones, las perturbaciones naturales producidas por tormentas o huracanes y las del cambio climático por elevación de temperatura, irradiación de luz ultravioleta y cambios en el nivel

---

medio del mar que de igual manera afectan principalmente la parte somera del arrecife.

Consecuentemente, los corales del género *Acropora*, quienes históricamente han dominado la parte somera de los arrecifes, se han convertido en especies altamente vulnerables, ya que permanecen expuestas a una compleja interacción de factores de riesgo y una creciente pérdida y deterioro del hábitat propicio para su desarrollo, lo que altera la estructura y dinámica de sus poblaciones (SEMARNAT, 2011).

Aunado a esto, en años recientes la navegación marítima con fines turísticos y de transporte ha traído consigo una nueva amenaza por la ocurrencia de impactos y encallamientos en la zona somera de los arrecifes, tanto en el Sistema Arrecifal Veracruzano como en las costas del Caribe mexicano, lo que causa considerables daños a esta especie (SEMARNAT, 2011). Esta compleja interacción de diferentes factores de riesgo a los que están sometidas las poblaciones de *A. palmata* hacen cada vez más vulnerable a esta especie al disminuir su abundancia y presentar un deterioro de sus parámetros poblacionales como puede ser la pérdida de cobertura por mortalidad parcial, una reducción de sus tasas de fecundidad pero sobre todo un bajo reclutamiento sexual.

---

*A. palmata* tiene la capacidad de reproducirse de dos maneras distintas: sexualmente, donde libera sus gametos, tanto masculinos como femeninos de manera simultánea a la columna de agua en donde se lleva a cabo la fertilización, presentando un mecanismo que inhibe la fertilización entre gametos de un mismo individuo con lo que se favorece la variabilidad genética, debido a que las especies del género *Acropora* son hermafroditas simultáneas (Wallace *et al.*, 1986), y de manera asexual que involucra un proceso de fragmentación el cual consiste en el desprendimiento de un fragmento de la colonia que vuelve a fijarse al sustrato para formar una nueva (Highsmith, 1982). Sin embargo este tipo de reproducción solo produce un incremento de biomasa pero no contribuye a la variabilidad genética tan necesaria para afrontar los cambios evolutivos.

Es solo mediante la reproducción sexual de *A. palmata* que se logra una combinación genética entre distintos organismos, lo que brinda a su progenie mayores posibilidades de sobrevivir y adaptarse a nuevas condiciones, siendo esta última característica algo muy esencial debido a los cambios que se generan actualmente y que alteran la dinámica de los océanos, existen estudios que muestran evidencia de que *A. palmata* presenta la capacidad de adaptarse a nuevas condiciones como cambios en la temperatura (Bravo, 2013). Mientras tanto en los últimos años se ha ampliado considerablemente el conocimiento con estudios controlados por la implementación de acuarios marinos, que ha servido

---

para entender procesos que se llevan a cabo en entornos naturales como lo es el blanqueamiento (Veron, 2000).

Dentro de los pocos estudios enfocados a la preservación de algunas especies de corales mediante la preservación de su material genético se encuentra el trabajo experimental realizado en Puerto Rico en donde durante la expulsión de gametos de *A. palmata* en agosto de 2009 se colectaron muestras de distintas colonias y se evaluó la mejor metodología para criogenizar espermatozoides y óvulos para posteriormente en algunos años e incluso décadas estos sean fecundados y reintroducidos al medio marino sin que exista ninguna alteración en su genoma (Hagedorn *et al.*, 2012).

Actualmente en México se encuentran realizando estudios en el cual se colectan gametos femeninos y masculinos de algunas especies de corales, entre ellos *Acropora palmata*, con el fin de realizar una fecundación in vitro en condiciones de laboratorio y obtener embriones para cultivarlos en viveros y de esta manera obtener reclutas sexuales y así posiblemente poder repoblar el Caribe Mexicano con los reclutas de los corales *Orvicella faveolata*, *Diploria labyrinthiformis* y *Acropora palmata* que resulten exitosos, todo esto con las limitaciones que implica el hecho de que la mayoría de estas especies tienen ciclos reproductivos anuales por lo que el margen de error debe ser mínimo (la jornada, 2013).

---

Es por todo lo mencionado anteriormente que el presente trabajo pretende estudiar, caracterizar e interpretar el ciclo reproductivo sexual completo de *A. palmata* y someter sus embriones a la técnica de crio-preservación con el fin de generar nuevos conocimientos y metodologías que ayuden a la preservación de esta especie.

---

### III. OBJETIVOS

#### OBJETIVO GENERAL

- Estudiar, caracterizar e investigar un ciclo reproductivo anual de *A. palmata* en el arrecife “En medio”, Tuxpan, Ver. y someter sus gametos a la técnica de crio-preservación.

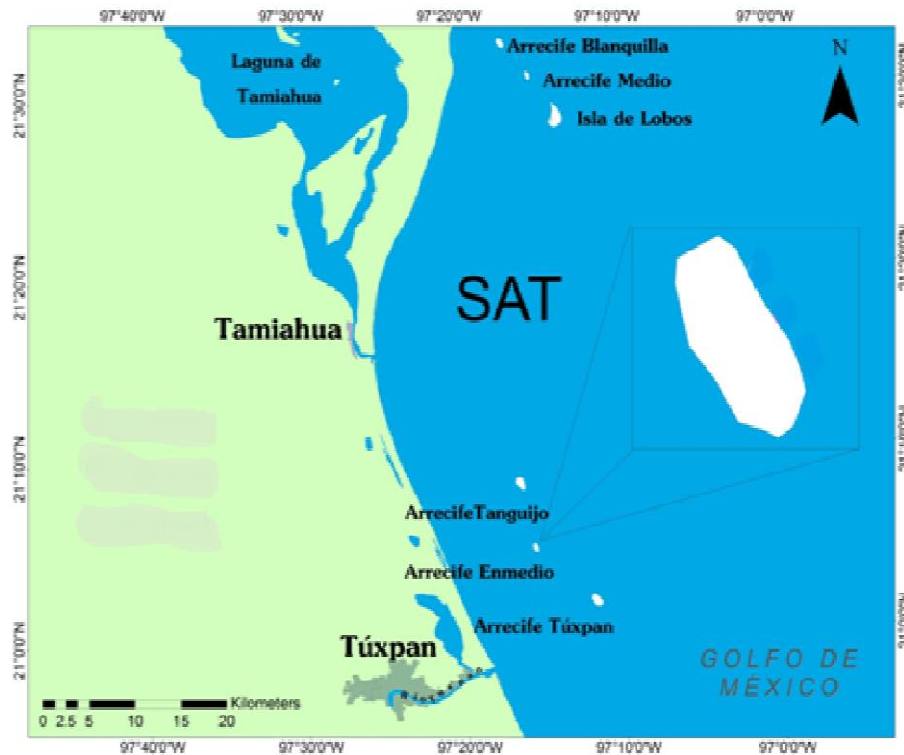
#### OBJETIVOS PARTICULARES

- Estudiar la formación, desarrollo y maduración de gametos mediante técnicas histológicas, tinciones histoquímicas y captura de imágenes durante julio de 2013 a octubre de 2014.
- Caracterizar el ciclo reproductivo en los gametos femeninos de *A. palmata*
- Investigar la relación entre el desarrollo de los gametos femeninos en *A. palmata* y su temporalidad en base a un análisis estadístico.
- Colectar embriones de *A. palmata* para someterlos a la técnica de crio-preservación.

## IV. MATERIAL Y METODOS

### 4.1 Área de estudio

El arrecife “En medio” ubicado al noreste del estado de Veracruz se encuentra a una distancia de 9 km de la costa de Tuxpan (Figura 1). Este arrecife es de tipo plataforma emergente, abarca 500 m de longitud y 1,100 m de anchura con una profundidad que va desde los 0 a 24 m (Tunell *et al.*, 2010). Las colonias de *A. palmata* fueron halladas en las coordenadas 21° 04' 51.10" N y 97° 15' 26.12" O, en la parte de barlovento a 3 m de profundidad aproximadamente.



**Figura 1.** Ubicación geográfica del arrecife “En medio” dentro del Sistema Arrecifal Tuxpan, SAT. También se observa el SALT: Sistema Arrecifal Lobos – Tuxpan para un panorama más completo.



---

## 4.2 Extracción de las muestras

Durante la primer salida de campo para este proyecto en el mes de julio de 2013 se identificaron y marcaron 3 colonias de *A. palmata* con el fin de obtener todas las muestras de las mismas colonias. La colecta se realizó generalmente de manera mensual mientras las condiciones lo permitieron, dichos meses fueron: julio, agosto, octubre, noviembre y diciembre de 2013 y febrero, marzo, abril, mayo, julio, agosto (después de confirmar la ocurrencia del evento de reproducción) y octubre de 2014, este último mes se muestreo con la finalidad de comparar los resultados obtenidos en las mismas fechas del año anterior. Utilizando equipo de buceo libre, se colectaron 2 fragmentos de 2 cm<sup>2</sup> aproximadamente de cada una de las 3 colonias, las muestras fueron extraídas con la ayuda de un cincel (Costa et al., 2004), esto se hizo durante todos los meses en que se desarrolló el proyecto. Los fragmentos se colocaron cuidadosamente en tubos “Corning” de 50 ml con paraformaldehído (PFA) diluido al 4% en agua de mar para ser transportados al laboratorio de Evolución y Embriología de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Veracruzana.

---

### **4.3 Fijación y desmineralización**

Para el proceso de fijación del tejido se colocaron las muestras en una nueva solución de paraformaldehído al 4% con agua de mar durante un mínimo de 12 horas, posteriormente para el proceso de desmineralización cada una de las muestras fue puesta en 500 ml de ácido acético diluido al 10% en agua destilada durante 24 horas (Anexo 6.1). Trascurrido ese tiempo se reemplazó todo el ácido acético saturado por otros 500 ml de ácido acético nuevo y se mantuvo durante 4 horas más obteniendo así un tejido totalmente descalcificado. Posteriormente se post-fijaron las muestras de este tejido en formaldehído diluido al 4% en agua destilada y se procedió a la técnica de inclusión en parafina para la identificación de gametos mediante cortes histológicos.

### **4.4 Cortes histológicos**

Una vez obtenido el tejido descalcificado este fue sometido al método de inclusión en parafina (Anexo 6.2). Cuando las muestras se consideraron totalmente preparadas se montaron verticalmente en rejillas especiales para cortes en parafina y se realizaron cortes longitudinales de 10  $\mu$  con la ayuda de un microtomo LEICA RM2125RTS para cortes en parafina (Anexo 6.3). Los cortes histológicos fueron colocados en un recipiente con agua de la llave a una temperatura de 55°C para ser estirados y posteriormente montados en

---

porta objetos previamente preparados con un recubrimiento de poli-L-lisina para una mejor fijación del tejido.

#### **4.5 Tinción histoquímica y captura de imágenes**

Se utilizaron porta objetos esmerilados previamente recubiertos con en poli-L-lisina (Sigma) y cada corte de la muestra fue colocada en ellos, posteriormente fueron teñidos mediante la técnica Hematoxilina-eosina (Anexo 6.4), finalmente se montaron los porta objetos con las muestras teñidas con ayuda de un poco de resina y un cubre objetos. Una vez teñidas y montadas las muestras se procedió a la captura de imágenes de cada una de ellas con una cámara digital "Canon Power Shot A490 de 16 mpx" (Anexo 6.5) para su posterior análisis e interpretación.

#### **4.6 Ciclo reproductivo en gametos femeninos (óvulos)**

Se consideró el tamaño de las gónadas femeninas como un índice adecuado de la relativa madurez reproductiva de las colonias (Ch, E. M., 1981). Ahora bien, con el fin de obtener el crecimiento máximo promedio por mes de los óvulos, se midieron solamente los gametos femeninos considerados más grandes presentes en cada muestra. A fin de estandarizar la obtención del "tamaño máximo de gónadas" se midieron las 4 más grandes de cada "sección" (3 secciones por muestra), lo que

---

representa un total de 12 gónadas por colonia (3 colonias), 36 por mes (12 meses) y 432 por año. El tamaño de las estructuras sexuales se consideró como el promedio entre el diámetro mayor y el diámetro perpendicular a éste, todo esto con el fin de determinar en qué momento se inicia y cuál es el tiempo de duración de la ovogénesis en los gametos de las colonias de *A. palmata* en el arrecife “en medio” de Tuxpan, Veracruz.

#### **4.7 Correlación tallas-meses en los óvulos**

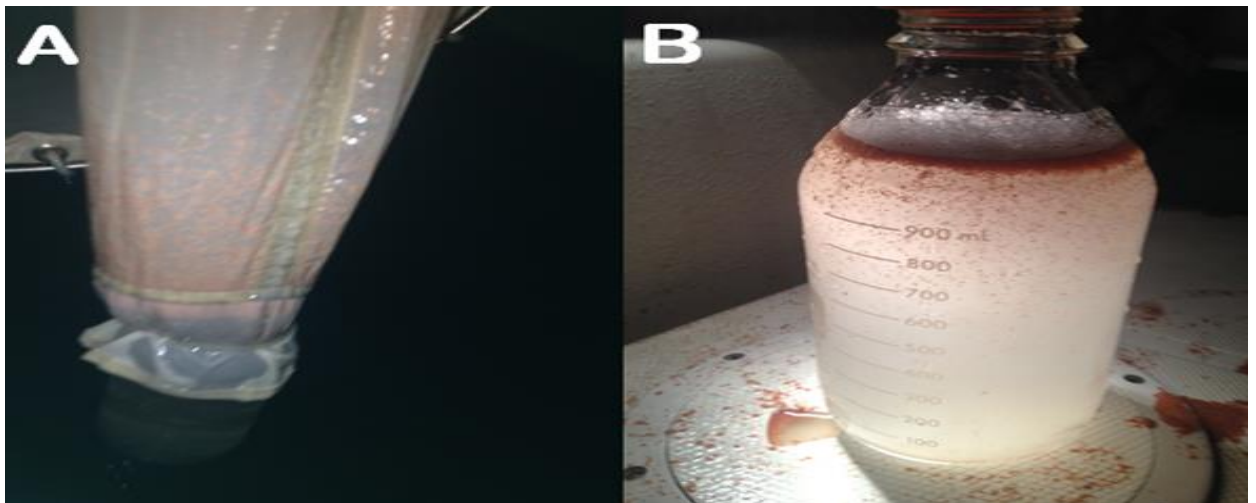
Para encontrar si existía una correlación entre las tallas de los óvulos y los meses en las que estas se presentaron se realizó un análisis estadístico, primeramente los meses muestreados fueron enumerados con el fin de tener una secuencia y orden biológico con respecto al ciclo reproductivo de los gametos femeninos de *A. palmata* partiendo desde la aparición de dichos gametos quedando de la siguiente manera: 1.- Diciembre; 3.- Febrero; 4.- Marzo; 5.-Abril; 6.- Mayo; 8.- Julio; 9.- Agosto. Se realizó un análisis estadístico mediante una “correlación” la cual nos resume el grado de intensidad entre dos variables, en este caso las “tallas” de los óvulos y los “meses” en los que éstas se presentaron; primero se realizó una prueba de Shapiro para asumir o no normalidad, posteriormente al comprobarse una distribución normal se utilizó la prueba de Pearson “producto-momento” la cual es una correlación que se utiliza en una situación como esta, es decir; tener una distribución normal y paramétrica con dos variables cuantitativas, todo lo anterior se realizó con ayuda del programa “R” versión 3.0.0

---

## 4.8 Crio-preservación de embriones

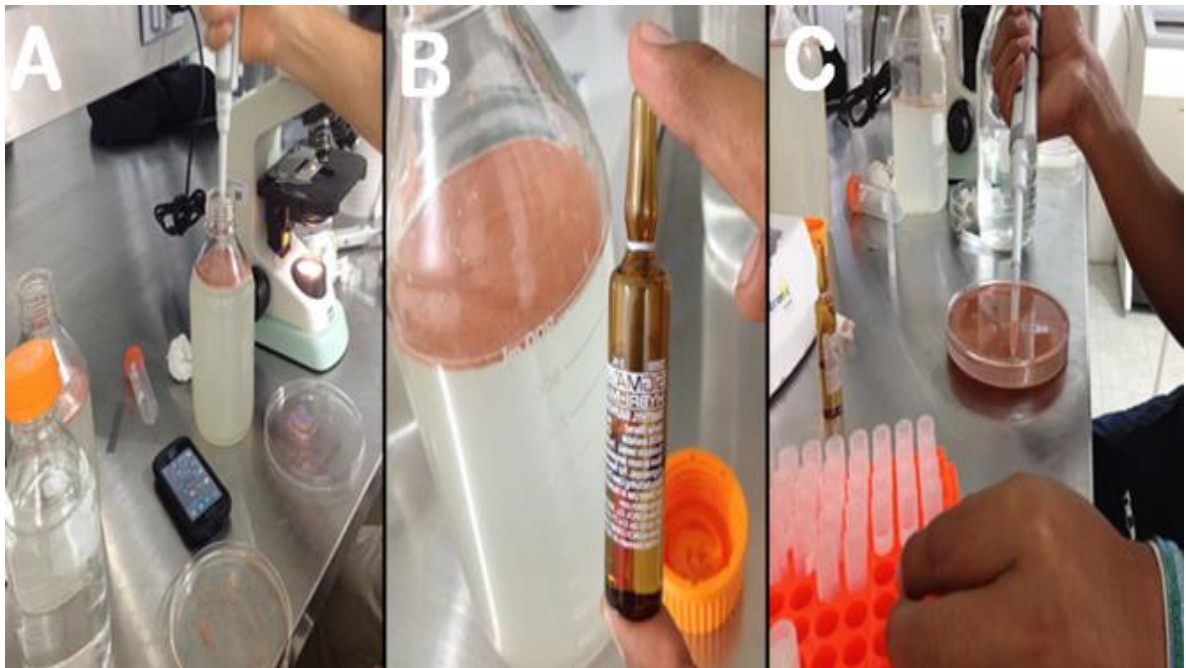
En agosto de 2014 se colectaron los embriones de *A. Palmata* para someterlos a la técnica de crio-preservación. Para capturarlos se realizaron salidas nocturnas después de la luna llena de ese mes hasta coincidir con el día de la liberación de gametos lo cual ocurrió cuatro días después, una vez logrado esto e iniciado el proceso de liberación de los gametos:

1.- Se capturaron los embriones con la ayuda de una red de fitoplancton (Figura 2 A), fueron colocados en frascos con agua de mar (figura 2 B) y se transportaron al laboratorio de Evolución y Embriología donde ya se contaba con los materiales necesarios (mencionados más adelante) para someterlos a esta técnica.



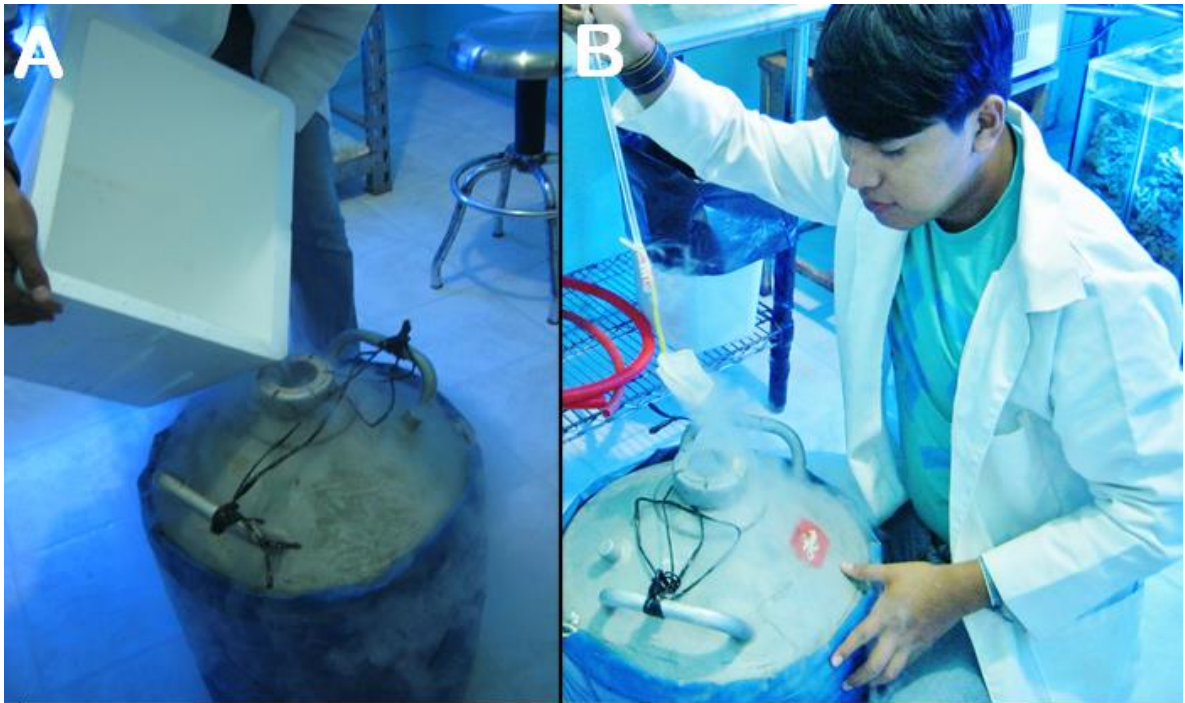
**Figura 2:** A) Red de fitoplancton con la cual se capturaron los embriones, B) Frasco en donde se transportaron los embriones en agua de mar.

2.- Con ayuda de pipetas graduadas se separaron los embriones colectados de los frascos en donde fueron transportados y se colocaron en agua de mar limpia, esto con el fin de reducir la cantidad de material biológico (espermatozoides principalmente) (Figura 3 A), posteriormente se utilizó DMSO haciendo una solución al 10% con agua de mar (Figura 3 B) y se vació en los crio-tubos en donde se colocaron los embriones durante 20 minutos (Figura 3 C) con el fin de permeabilizar a las células con esta solución.



**Figura 3:** A) separación de los embriones con ayuda de pipetas graduadas, B) DMSO, C) inmersión de los embriones en la solución al 10% de DMSO y agua de mar.

3.- Posteriormente se descendió de manera gradual la temperatura de los embriones colocándolos en un congelador hasta alcanzar la temperatura aproximada de  $-20^{\circ}\text{C}$  y así poder colocarlos, como paso final, en nitrógeno líquido en donde se conservaron a una temperatura de  $-180^{\circ}\text{C}$  (Figura 4).



**Figura 4:** A y B) inmersión de los embriones en Nitrógeno líquido.

4.- Para la descongelar y medir el éxito en la crio-preservación de los embriones se tomó un crio-tubo con las muestras y se colocó en agua a una temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$  hasta que volvió a su estado líquido, posteriormente se colocó el contenido del crio-tubo en agua de mar filtrada y se analizó la muestra por medio del microscopio óptico para verificar el éxito obtenido.

---

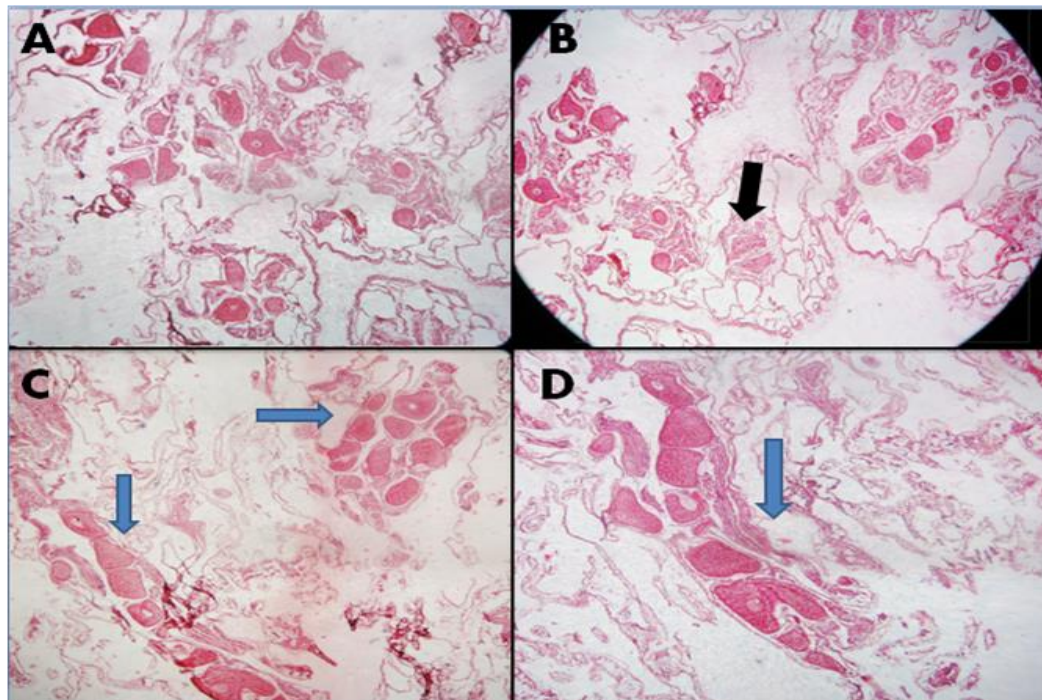
## **V. RESULTADOS**

### **5.1 Caracterización mediante histología, tinción histoquímica e imágenes.**

Durante todo el estudio se obtuvieron y analizaron un total de 324 muestras de cortes histológicos, a saber, 9 muestras mensuales de cortes histológicos de cada colonia (3 colonias) por 12 meses.



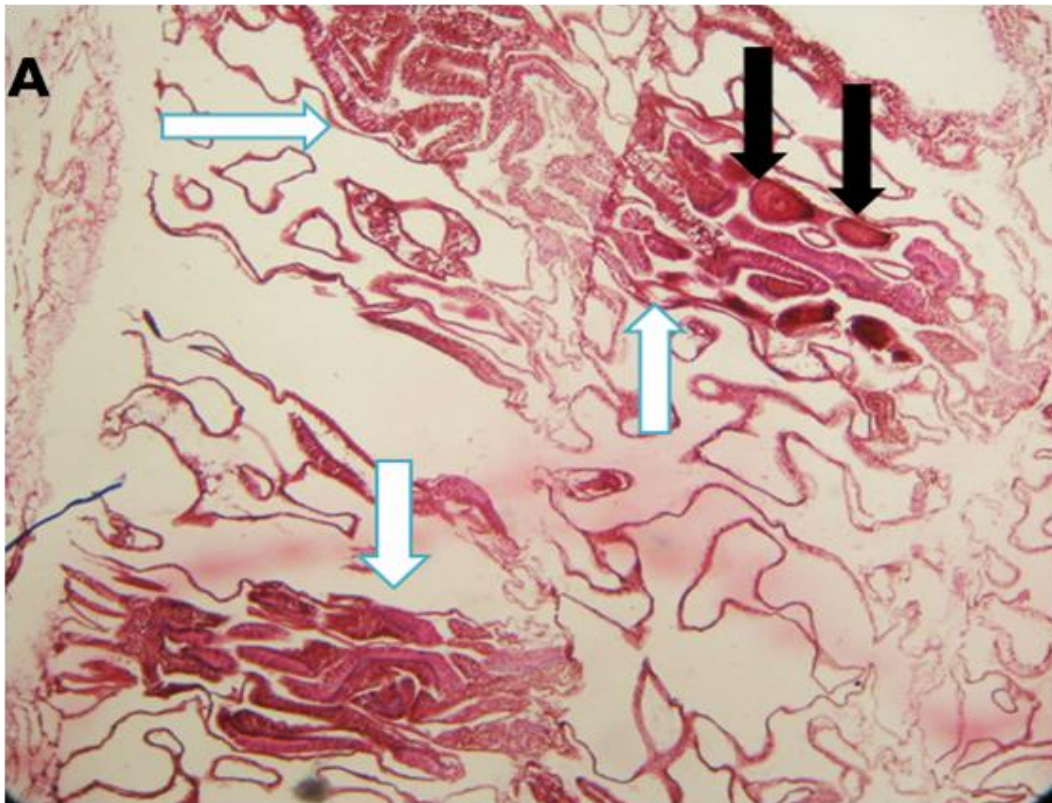
**Imágenes de la colonia “A” de julio de 2013:** esta colonia, probablemente al ser la que mayor cantidad de tejido vivo presentó dentro de las tres colonias que se muestrearon, fue en la que se observó mayor presencia de gametos con respecto a las otras dos (Figura 5), en la parte “A” de la Figura se pueden observar claramente los gametos femeninos rodeados de sacos espermarios, los cuales contienen dentro de sí a los espermatozoides como el que se señala en la parte “B” de la Figura, se encontraron ovarios completos dentro de los cuales se observan perfectamente a sus óvulos como se muestra en la parte C y D de la Figura, las tallas de éstos gametos (óvulos) oscilo entre 575 – 625  $\mu$  para esta colonia .



**Figura 5:** A) óvulos rodeados de espermarios, B) saco espermario señalado con la flecha negra, C) cuatro ovarios con óvulos señalados con flechas azules, D) un ovario con 6 óvulos aproximadamente señalado con la flecha azul, aumento(10X).

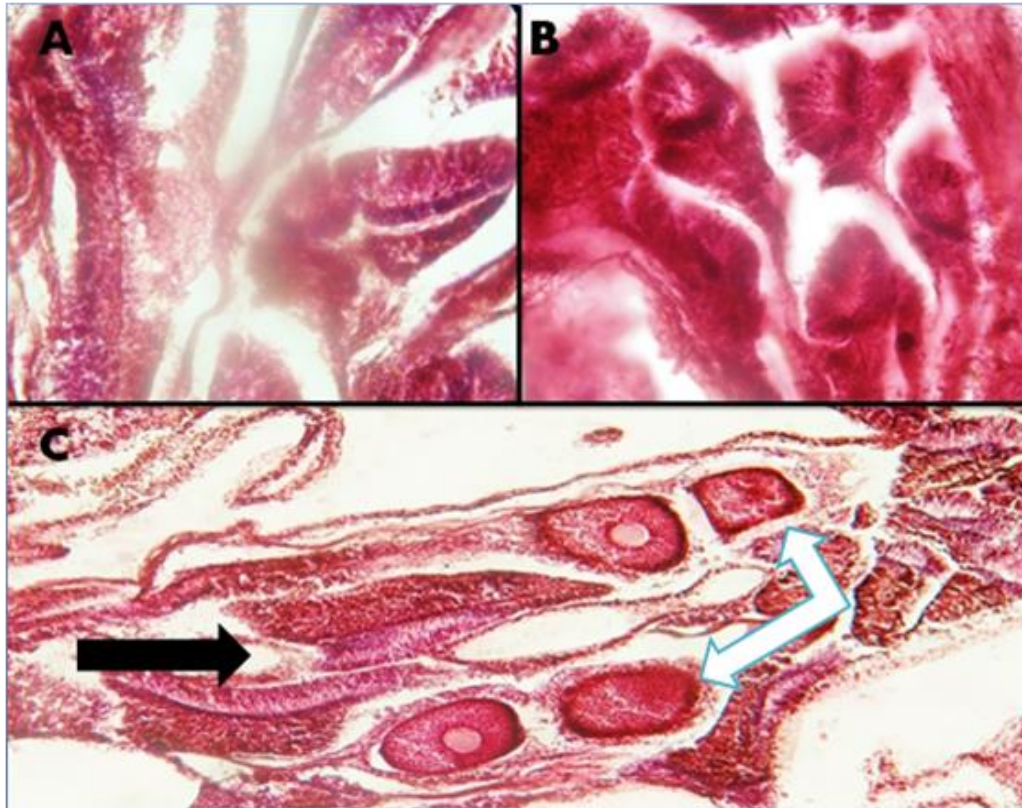
---

**Imágenes de la colonia “B” de julio de 2013:** en esta colonia se observó una mayor cantidad de gametos masculinos con respecto a los gametos femeninos (Figura 6), pues los espermátios superaron a los ovarios y óvulos en cuanto a su presencia como se puede observar en la Figura, los óvulos están señalados con las flechas negras y los espermátios con las flechas, la presencia de ambos tipos de gametos se observó en el 100% de todas las muestras tomadas y analizadas, las tallas de los óvulos oscilaron entre las 550 – 620  $\mu$  en esta colonia para este mes.



**Figura 6:** A) sacos espermáticos (flechas blancas), ovarios con sus respectivos óvulos (flechas negras) aumento (10x).

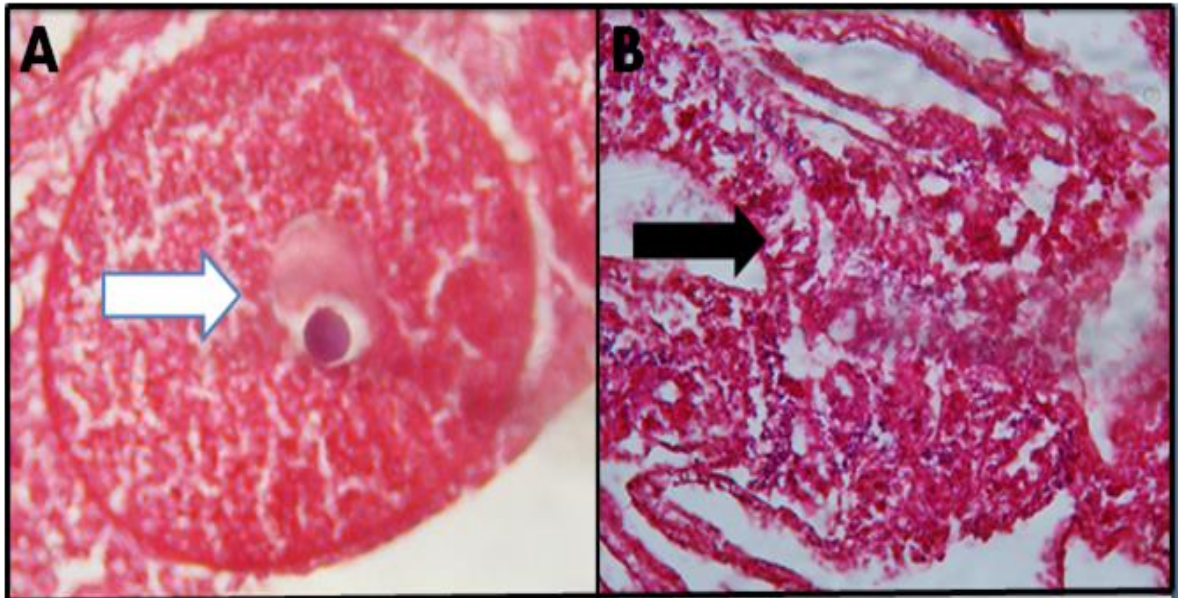
**Imágenes de la colonia “C” de julio de 2013:** al igual que en las colonias A y B en la colonia “C” también se observó la presencia de gametos femeninos como masculinos (Figura 7) aunque la presencia de ambos tipos de gametos a simple vista fue menor con respecto a las colonia A y B, se lograron observar claramente las estructuras de sus gametos como son los espermarios (Figura 7 A y B) y los óvulos rodeados de espermarios (Figura 7 C), las tallas de los óvulos en esta colonia durante este mes fue de 550 – 600  $\mu$ .



**Figura 7:** A y B) estructuras identificadas como sacos espermarios, dentro de los cuales se encuentran los espermatozoides, C) cuatro óvulos señalados con las flechas blancas rodeados de sacos espermarios señalados con la flecha negra, aumento (10x).

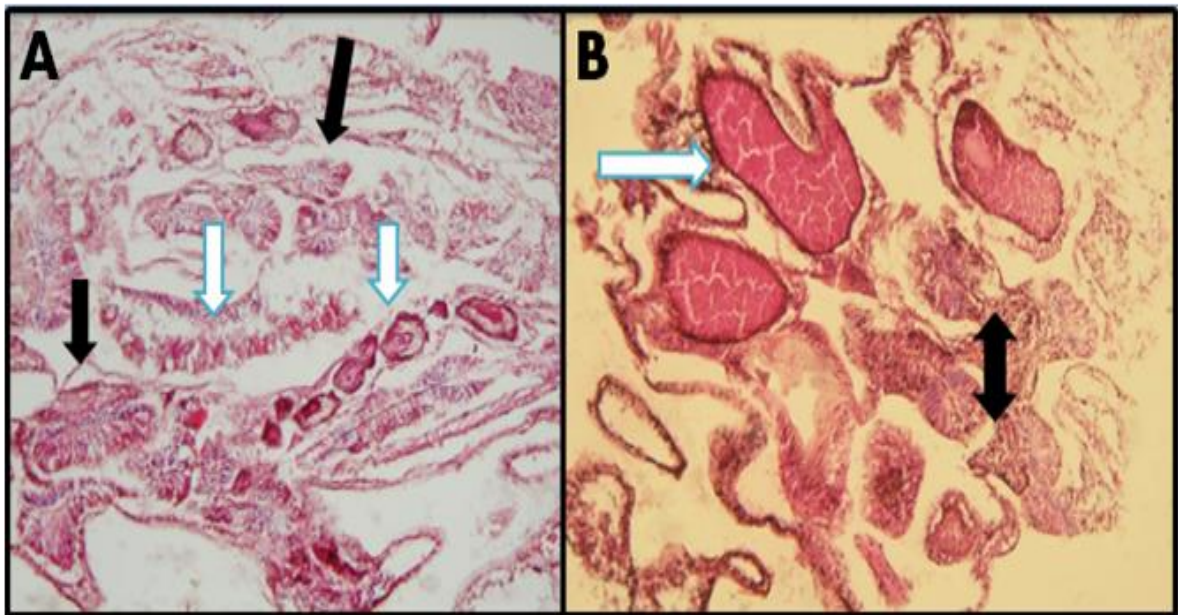
---

**Imágenes de la colonia “A” de agosto de 2013:** en este mes los gametos femeninos (óvulos) y masculinos (espermarios) se observaron de manera más clara (Figura 8) ya que los ovarios y sus óvulos se lograron apreciar con mayor facilidad que el mes anterior obteniéndose imágenes más nítidas como se muestra en la Figura, en donde se observa claramente la estructura de un óvulo (Figura 8 A) y espermatozoides teñidos en color violeta dentro de los sacos espermarios (Figura 8 B), las tallas de los óvulos oscilaron entre 600 – 650  $\mu$ .



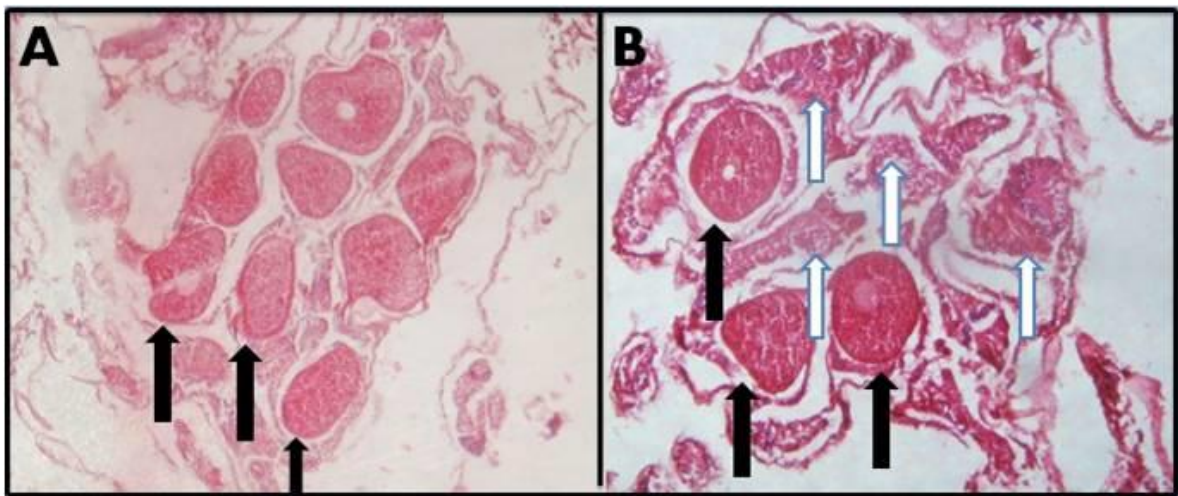
**Figura 8:** A) un óvulo en donde se puede observar su centriolo (flecha blanca), B) espermatozoides señalados con la flecha negra y teñidos en color violeta debido a la tinción Hematoxilina-Eosina encontrados dentro de los sacos espermarios, aumento (40x).

**Imágenes de la colonia “B” de agosto de 2013:** durante este mes también se observó un aumento en las tallas y la cantidad de gametos femeninos y masculinos en esta colonia (Figura 9), también se observó que la cantidad de óvulos con respecto a la cantidad de sacos espermarios fue casi similar como se muestra en la imagen (Figura 9 A) en donde los ovarios con sus respectivos óvulos están señalados con las flechas blancas y los sacos espermarios con las flechas negras, la situación fue similar en todas las muestras analizadas como se muestra en la parte “B” de la Figura 9, las tallas de los óvulos durante este mes oscilaron entre 600 – 650  $\mu$ .



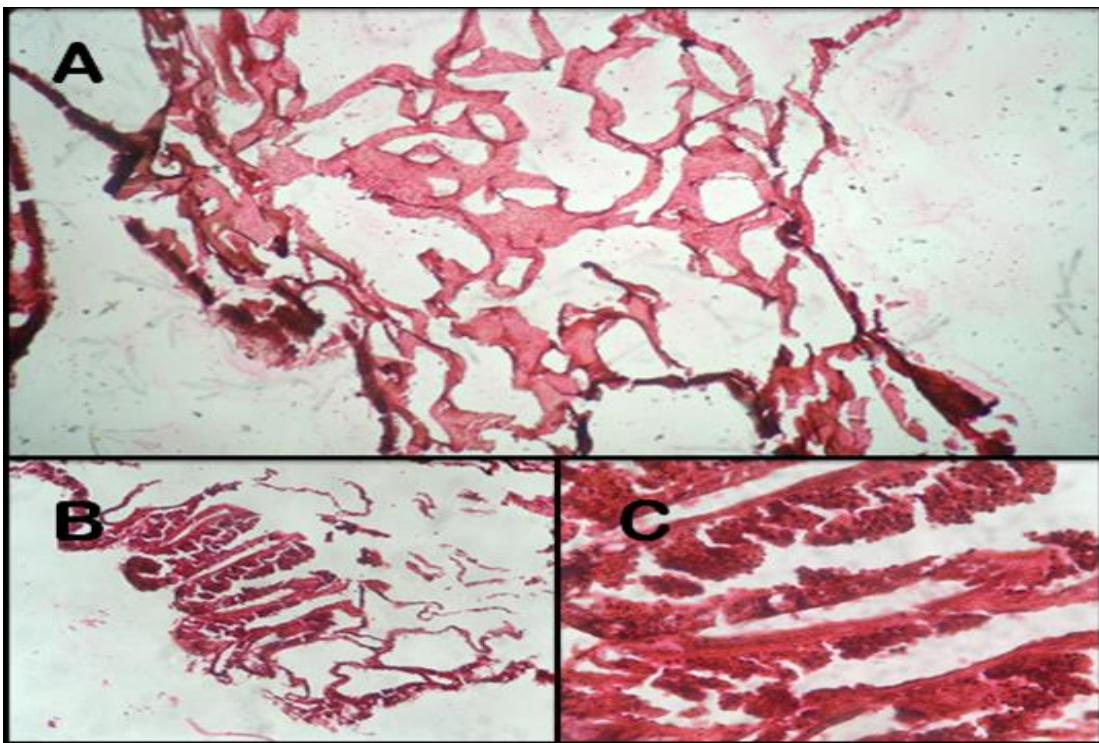
**Figura 9:** A) ovarios y sus óvulos señalados con flechas blancas rodeados de sacos espermarios señalados con flechas negras, aumento (4x), B) tres óvulos (flecha blanca) con sacos espermarios a su lado (flecha negra), aumento (10x).

**Imágenes de la colonia “c” de agosto de 2013:** la colonia “C” no fue la excepción con respecto al aumento en tallas y presencia de gametos femeninos y masculinos con respecto a los resultados obtenidos un mes atrás (Figura 10), pues al igual que las colonias A y B se observó un aumento en las tallas de sus gametos observados en este mes que quedo expuesto en todas las muestras analizadas, estas tallas oscilaron entre 620 – 675  $\mu$ , las estructuras de los gametos fueron más fáciles de identificar como se muestra en la figura donde se observan tres ovarios juntos con 3 óvulos aproximadamente en cada uno de ellos (Figura 10 A), también se observaron sacos espermáticos (marcados con flechas blancas) rodeando a los óvulos como se muestra en la parte B de la Figura en donde se puede observar que el tejido del mesenterio se ha adelgazado lo cual es indicio de maduración.



**Figura 10:** A) 3 ovarios maduros (flechas negras), B) óvulos (flechas negras) y espermáticos maduros (flechas blancas), aumento (10x).

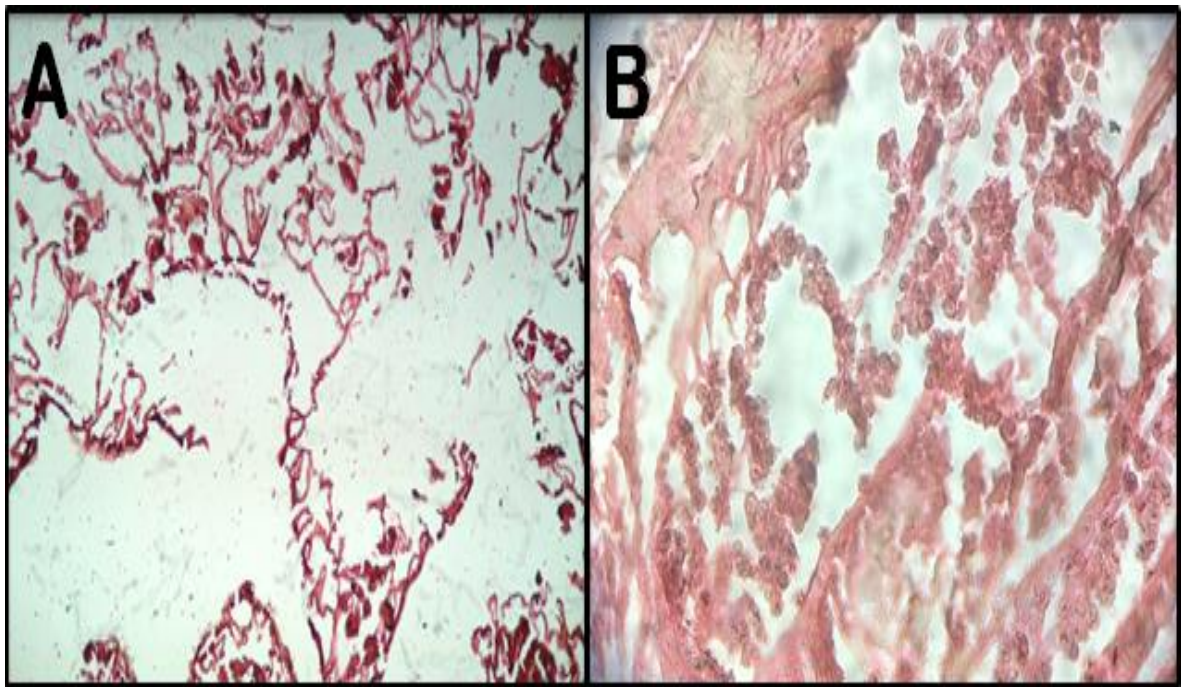
**Imágenes de la colonia “A” de octubre de 2013:** no se observó ningún tipo de gameto femenino presente, pues en la mayoría de las muestras solo se observó tejido solamente. En cuanto a los gametos masculinos, se encontró que estuvieron casi ausentes en su totalidad pues solo se encontraron unos pocos espermarios en donde solo sobresalía el tejido que le da soporte a dichos espermarios (mesénquima) como se puede observar en la Figura 11 parte B y C. Octubre es el mes inmediato posterior al evento de reproducción el cual ocurre en agosto y en algunos casos un evento tardío en septiembre.



**Figura 11:** A) tejido sin presencia de gametos, aumento (10x) B y C) espermarios que podrían encontrarse en proceso de reabsorción, aumentos (4x y 40x respectivamente).

---

**Imágenes de la colonia “B” de octubre de 2013:** el panorama para esta colonia fue muy parecido al que se encontró en la colonia A debido a que solo se observó una pequeña cantidad de espermatóridos y en tallas que aunque no fueron medidas parecían pequeñas a simple vista con respecto a las observadas en los meses previos al evento de reproducción, en la mayoría de las muestras el tejido se encontró casi ausente de gametos como se observa en la Figura 12 parte A y solo se observaron zooxantelas en el tejido (Figura 12 A).

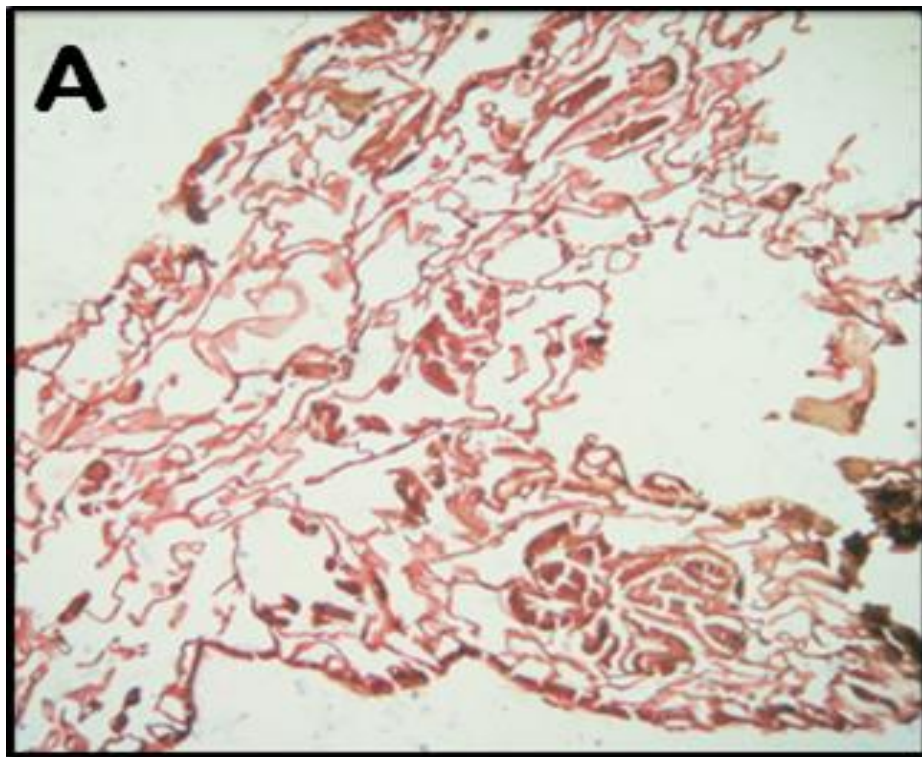


**Figura 12:** A) tejido con poca presencia de gametos masculinos y en tallas consideradas como pequeñas, aumento (4x), B) zooxantelas observadas en el tejido, aumento (40x).

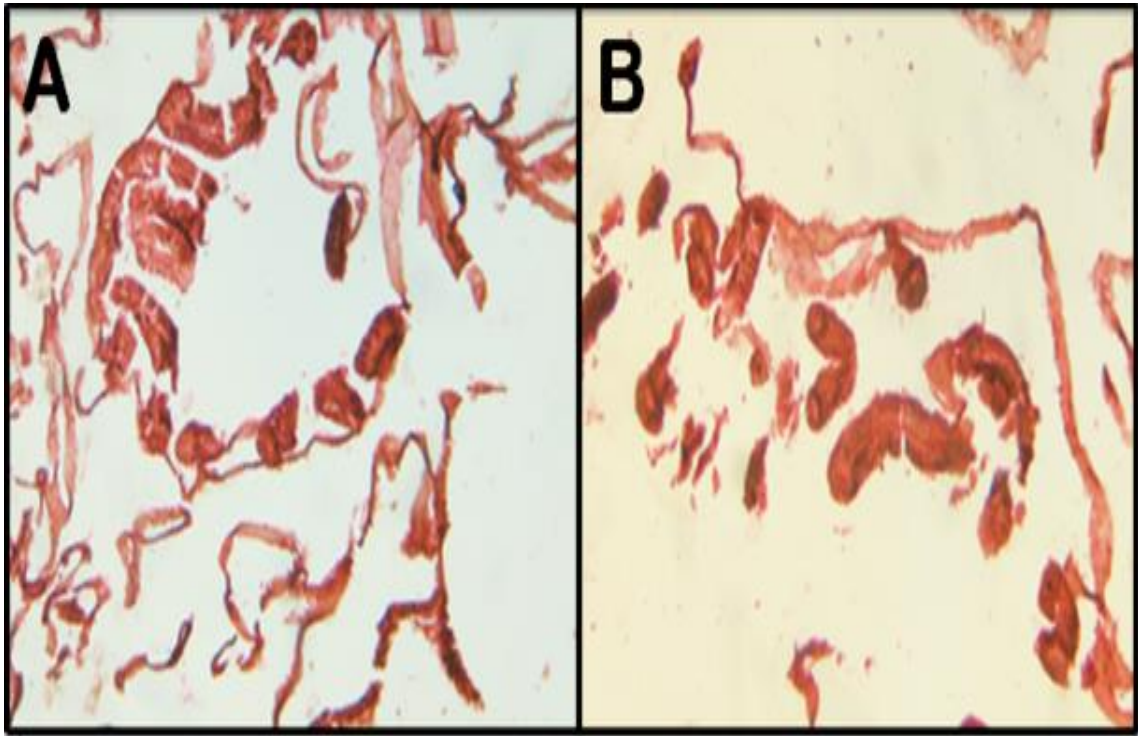


---

**Imágenes de la colonia “C” de octubre de 2013:** en esta colonia se encontraron numerosos gametos masculinos (espermários), sin embargo todos ellos en las mismas condiciones que en las colonias A y B (Figura 13). También se observa la presencia de lo que parecen nuevos gametos en desarrollo (Figura 14 A y B) en donde se puede apreciar su punto de crecimiento con respecto al mesénquima.



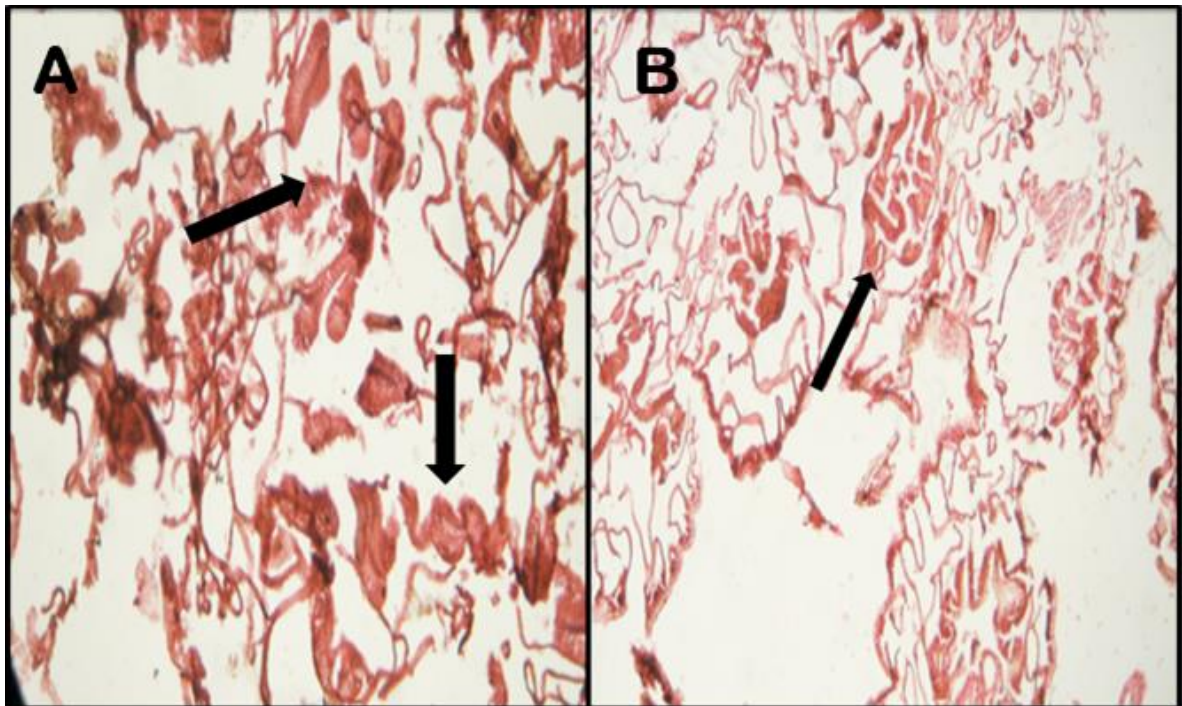
**Figura 13:** A) tejido de un pólipo con presencia de gametos masculinos en tallas consideradas como pequeñas con respecto a los mismos gametos en estado de madurez, aumento (4x).



**Figura 14:** A y B) tejido con presencia de lo que parecen nuevos gametos masculinos en desarrollo, aumento (10x).

---

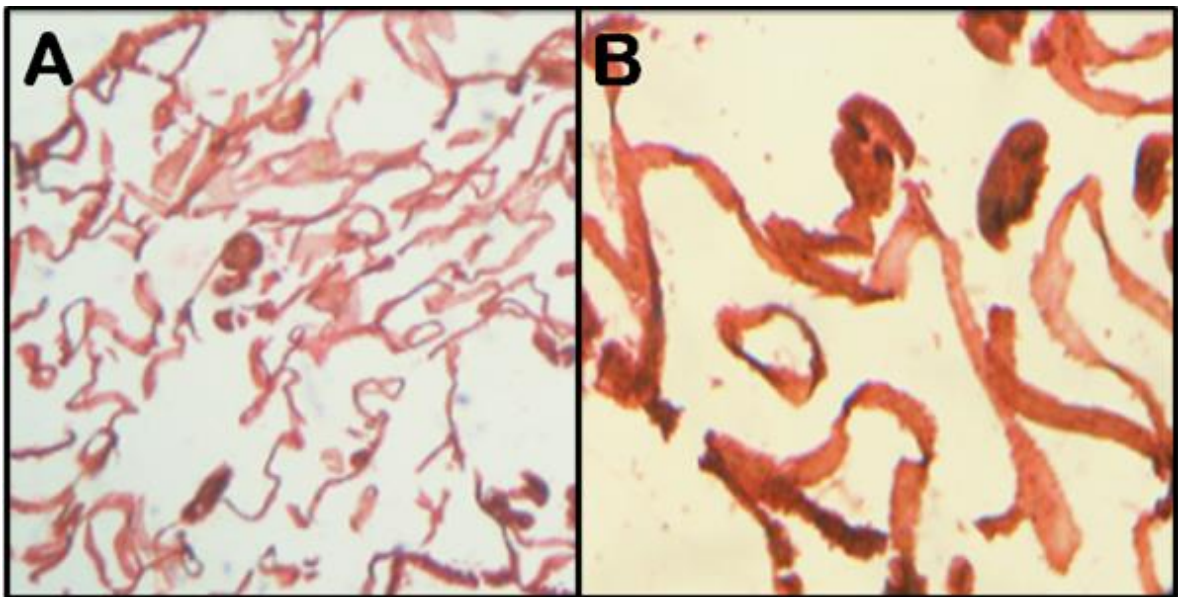
**Imágenes de la colonia “A” de noviembre de 2013:** se sigue observando la presencia de gametos masculinos que a simple vista aparecen en cantidades relativamente pequeñas en comparación con los resultados observados en los meses previos al evento de reproducción, se puede decir lo mismo con respecto a las tallas (Figura 15), la presencia de gametos femeninos ha desaparecido en su totalidad pues en la Figura solo observamos tejido y algunos gametos masculinos, tal y como sucedió el mes anterior.



**Figura 15:** A y B) espermarios agrupados señalados con flechas negras en medio del tejido de los pólipos, aumento (10x).

---

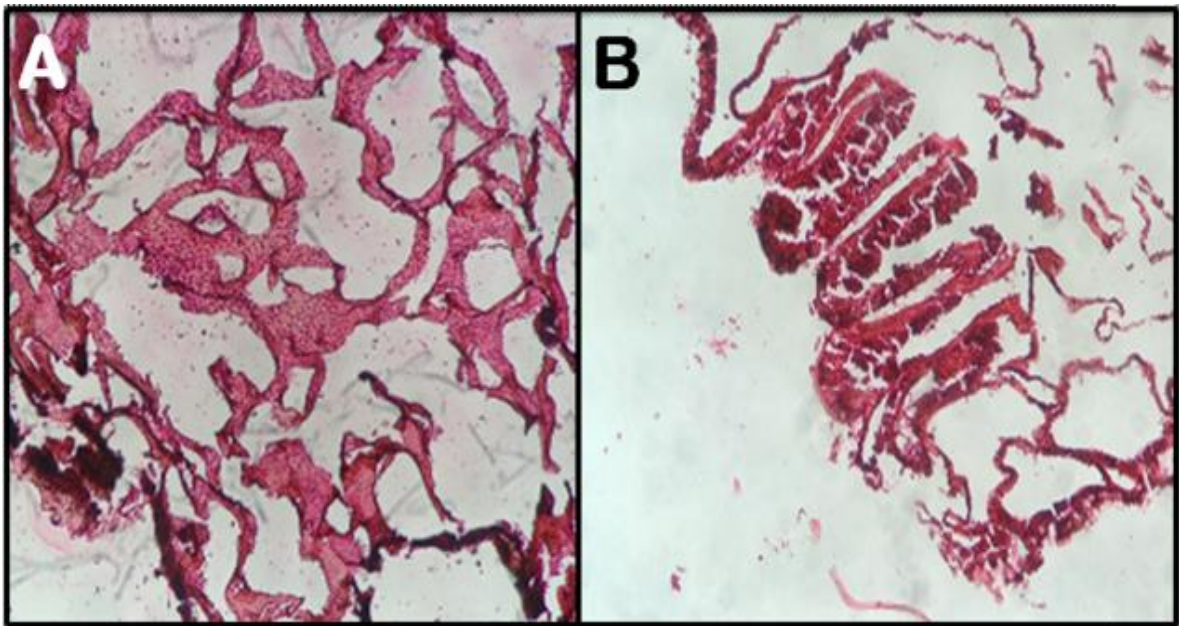
**Imágenes de la colonia “B” de noviembre de 2013:** en este mes la cantidad de gametos masculinos, la cual a simple vista fue muy baja durante el mes anterior a descendido y solo se encuentran sacos espermarios muy pequeños comparados con los observados previamente al evento de reproducción, éstos se encuentran dispersos en todas las muestras (Figura 16 A), las tallas parecen a simple vista seguir disminuyendo y ya no es tan fácil identificar estas estructuras (Figura 16 B), los gametos femeninos así como toda estructura relacionada con ellos siguen siendo totalmente ausentes. Las imágenes dentro de la figura son representativas de las condiciones observadas en la colonia durante este mes.



**Figura 16:** A) tejido con muy pocos espermarios visibles, B) espermarios con tallas consideradas como muy pequeñas, aumentos (10x y 40x respectivamente).

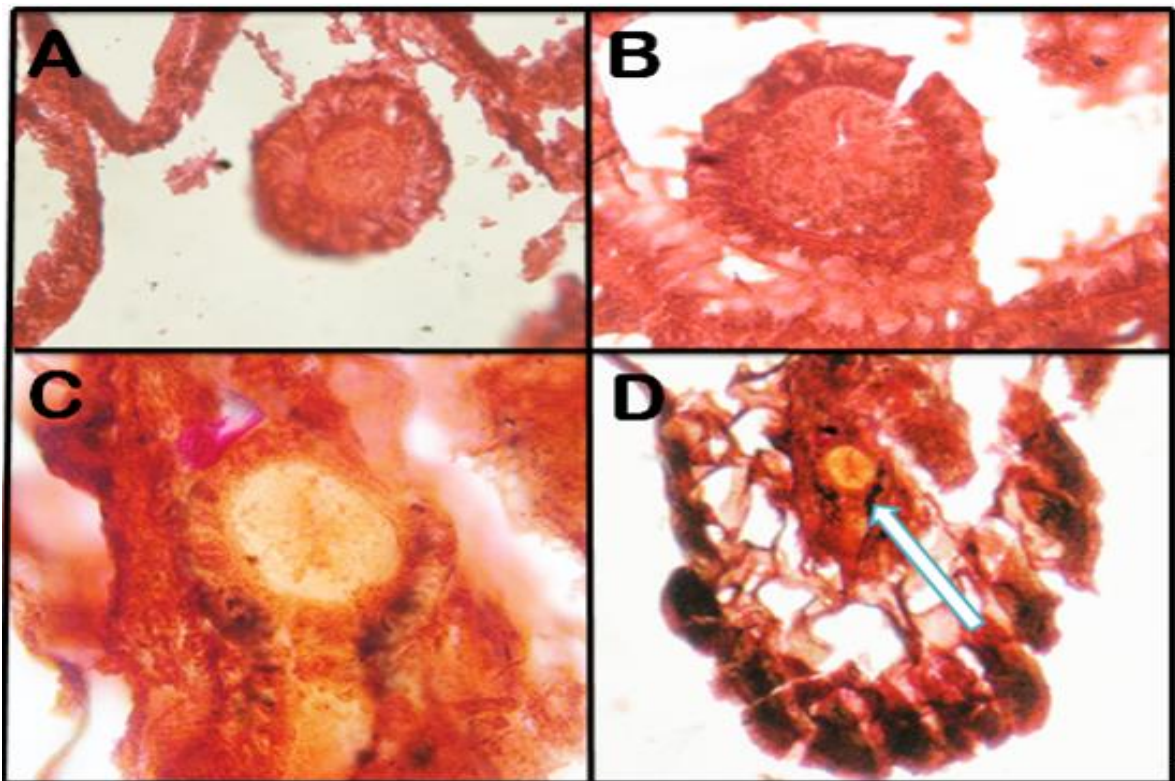
---

**Imágenes de la colonia “C” de noviembre de 2013:** con respecto a los gametos femeninos las condiciones durante este mes para esta colonia no fueron diferentes a las observadas en las colonias A y B durante este mes ni el anterior, pues tampoco se encontraron óvulos en las muestras ni ningún tejido o estructura semejante a ellos, en general el tejido de todas las muestras fue casi carente de ningún tipo de gametos (Figura 17 A) y solo se observaron unos pocos sacos espermáticos como se puede observar en la parte B de la Figura 17.

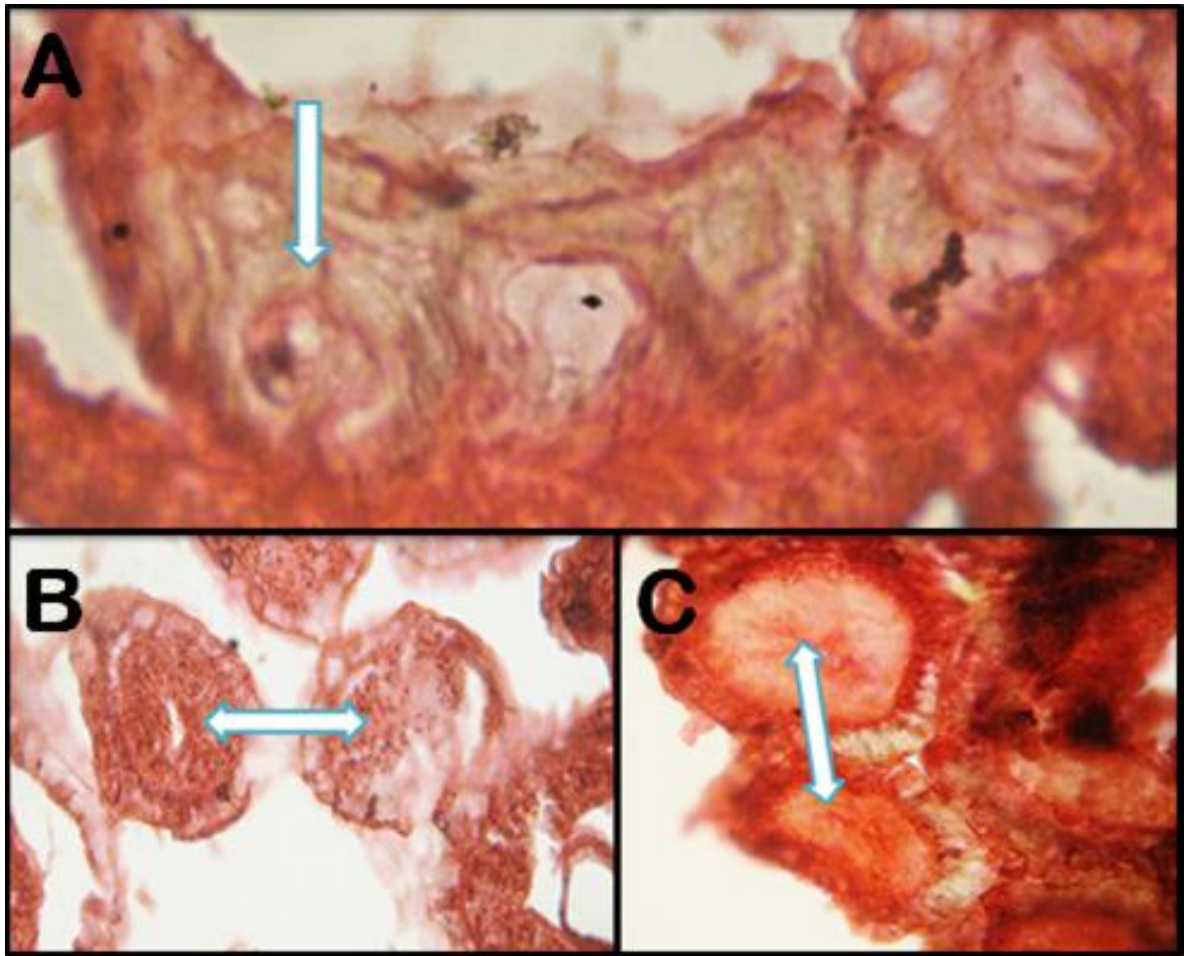


**Figura 17:** A) tejido con total ausencia de gametos, aumento (40x) B) sacos espermáticos con estructura degradada, aumento (10x).

**Imágenes de la colonia “A” de Diciembre de 2013:** este es el primer mes posterior al evento de reproducción en donde se observó la presencia de gametos femeninos, se identificaron los primeros óvulos con tallas muy pequeñas que se encontraban entre 70 - 85  $\mu$  con la pared del mesénquima que los recubría muy gruesa (Figura 18). Incluso se identificó el primero ovario completo de tamaño muy pequeño con sus respectivos óvulos dentro de sí (Figura 19 A). Los gametos masculinos en esta colonia no presentaron diferencias importantes con respecto a las del mes anterior.



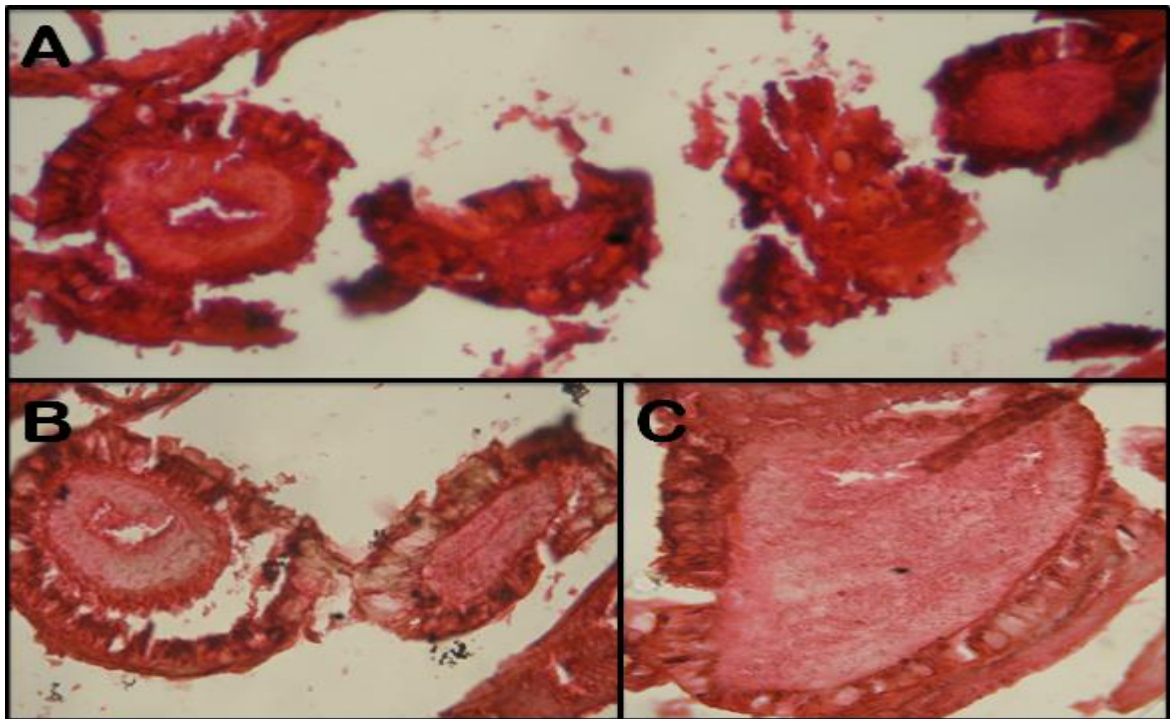
**Figura 18:** A y B) óvulos en desarrollo, su talla es pequeña (70-85 $\mu$ ) y las paredes que lo recubren aún son gruesas. C y D) el mismo ovulo (flecha blanca en D) en distintas escalas que nos permiten darnos una idea de la talla de los primeros óvulos, aumentos: A, B y C) 40x, D) 10x.



**Figura 19:** A) primer ovario identificado con 4 óvulos aproximadamente dentro de él, el óvulo con la estructura mejor formada se encuentra marcado por la flecha blanca, B) dos óvulos señalados con la flecha blanca doble. C) dos óvulos muy próximos probablemente provenientes del mismo ovario señalado con la flecha blanca doble, aumento (40x).

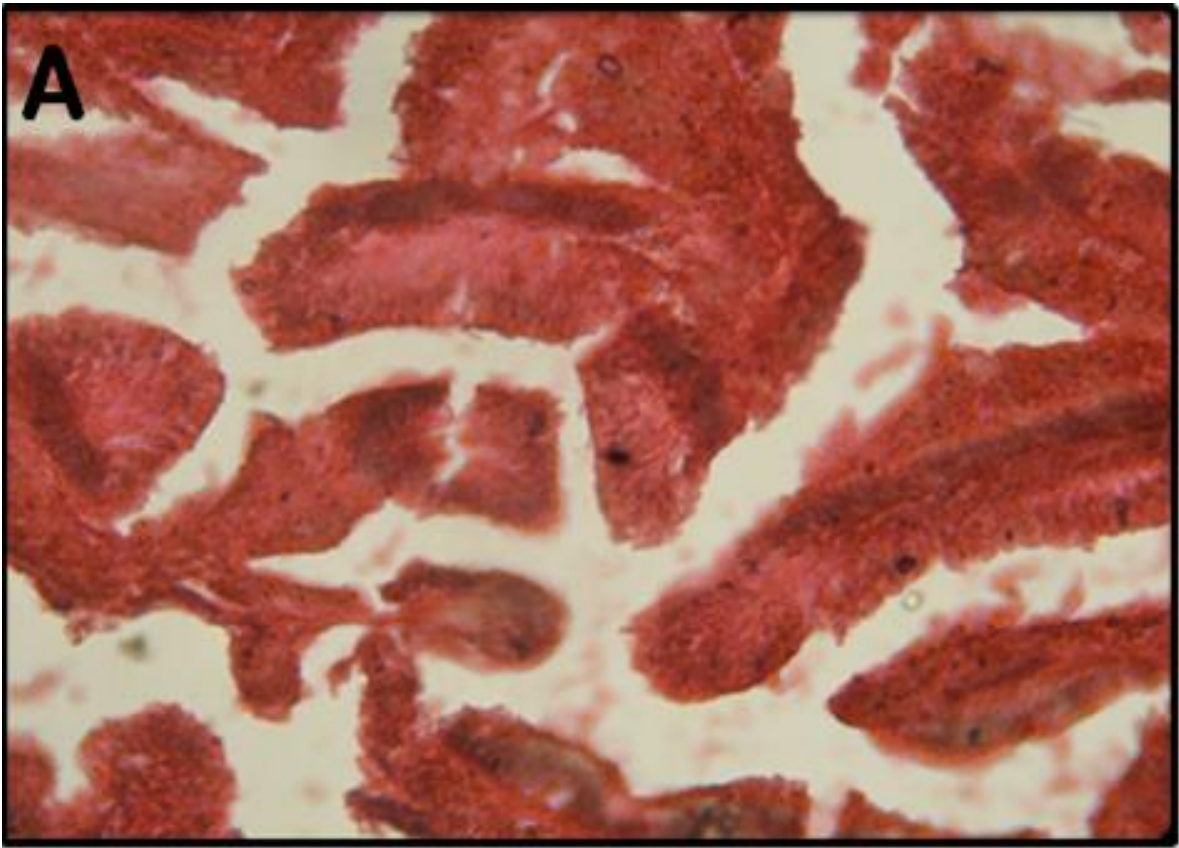
---

**Imágenes de la colonia “B” de Diciembre de 2013:** al igual que en la colonia A, fue durante este mes que se comenzaron a observar los primeros gametos femeninos en esta colonia (Figura 20), los cuales como se puede observar, tienen un aspecto de inmadurez que se ve reflejado en sus tallas que van de las 75 a las 80  $\mu$  y en las paredes muy gruesas del mesénquima que los recubre. Las tallas y el número de los espermátios comienzan a aumentar, esto se puede apreciar a simple vista en todas las muestras (Figura 21).



**Figura 20:** A) ovario identificado con 4 óvulos aproximadamente dentro de él, la pared que lo recubre es muy gruesa. B) dos óvulos juntos de distintas tallas. C) óvulo que muestra lo grueso de sus paredes en esta etapa temprana, aumento (40x).

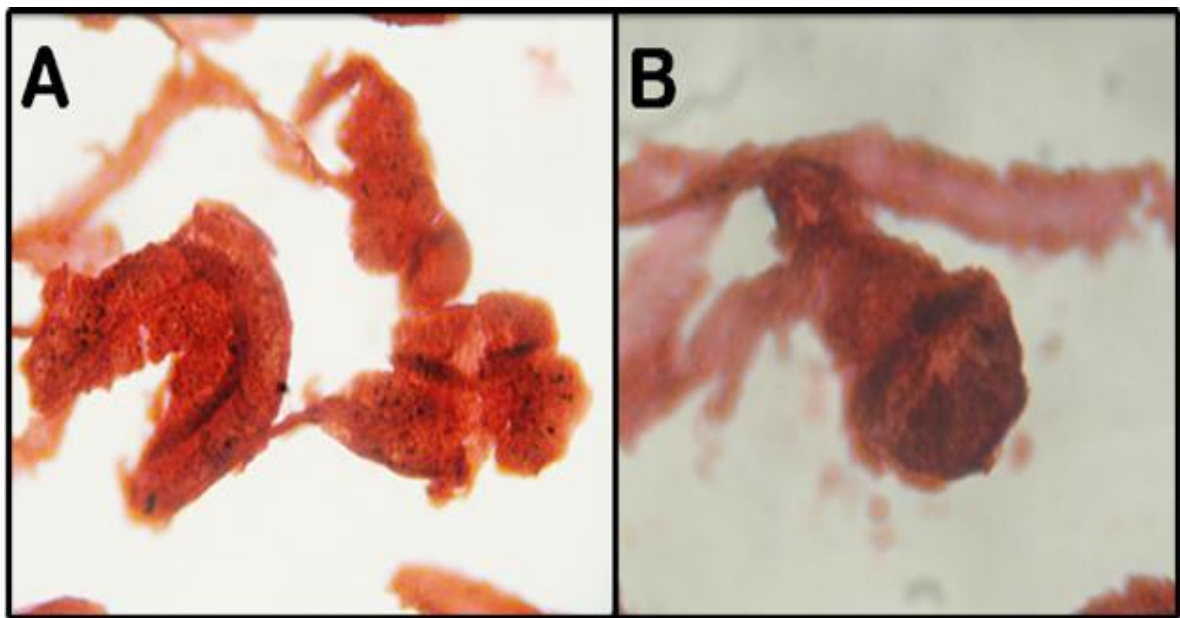




**Figura 21:** A) sacos espermarios observados, los cuales aumentaron en cuanto a presencia y muy posiblemente en tamaño con respecto a los meses observados anteriormente posteriores al evento de reproducción, aumento (40x).

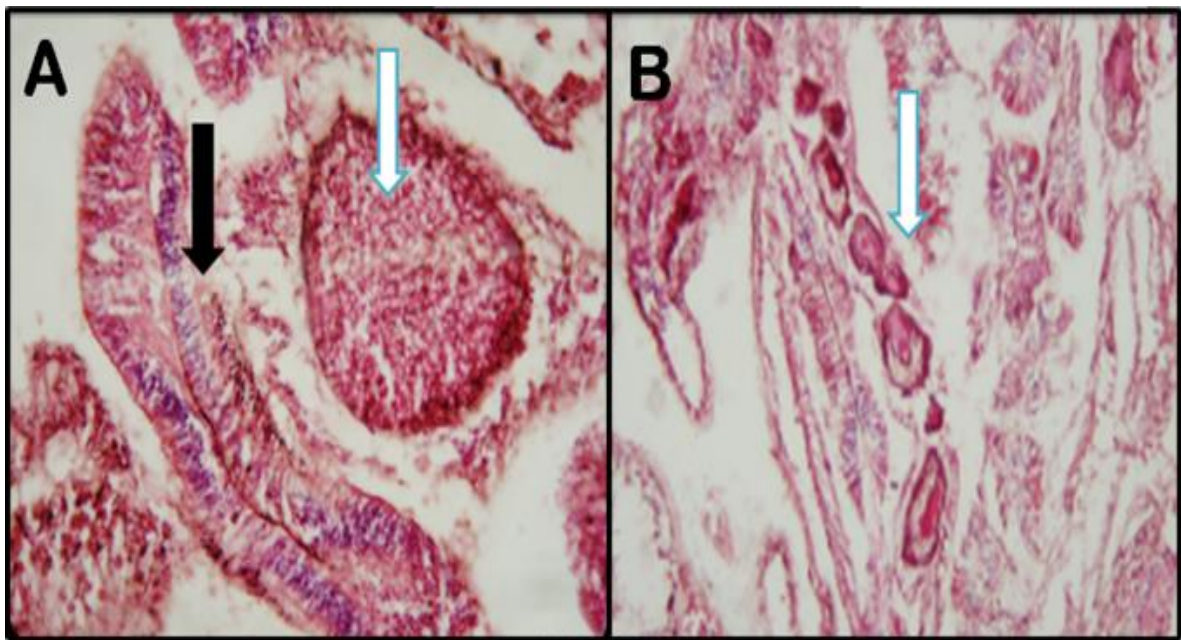
---

**Imágenes de la colonia “C” de Diciembre de 2013:** en esta colonia aún no se observaron gametos femeninos como se hizo en las otras dos ni ninguna estructura o tejido que se le pareciera, Con respecto a los gametos masculinos en los sacos espermáticos se identificaron lo que bien podría ser la presencia de nuevos gametos que se encontraban en desarrollo (Figura 22), estas estructuras son visiblemente de tallas muy pequeñas y se puede observar su conexión con el mesénquima, situación que no es visible en los gametos masculinos de tallas más grandes.



**Figura 22:** A) tres sacos espermáticos en posible desarrollo, B) saco espermático donde se observa su conexión con el mesénquima, aumento (40x).

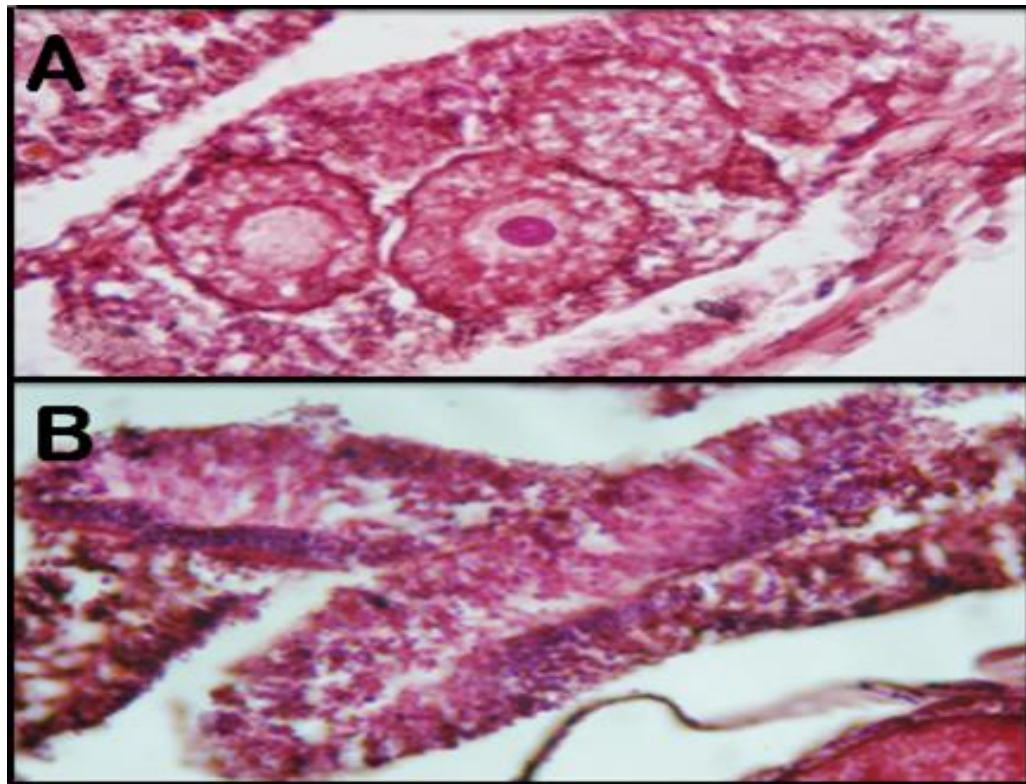
**Imágenes de la colonia “A” de Febrero de 2014:** durante este mes ya se pudieron observar sin ningún problema ambos tipos de gametos (óvulos y espermarios). También se observan estructuras completas de ovarios con sus respectivos óvulos (Figura 23 B) los cuales en este mes ya presentan pequeñas diferencias en sus tallas (figura 23 A) sin que ningún óvulo alcanzara la talla máxima observada para estos gametos. Los espermarios también han aumentado en tamaño y número según se pueden observar y es muy común observarlos rodeando a algunos óvulos (figura 23 A), las tallas máximas para los óvulos en este mes fueron de 107 – 115  $\mu$ .



**Figura 23:** A) espermario señalado con la flecha negra muy cerca de un óvulo señalado con la flecha blanca, aumento (40x), B) ovario con 6 óvulos aproximadamente de distintas tallas (107-115  $\mu$ ) señalado con la flecha blanca, aumento (10x).

---

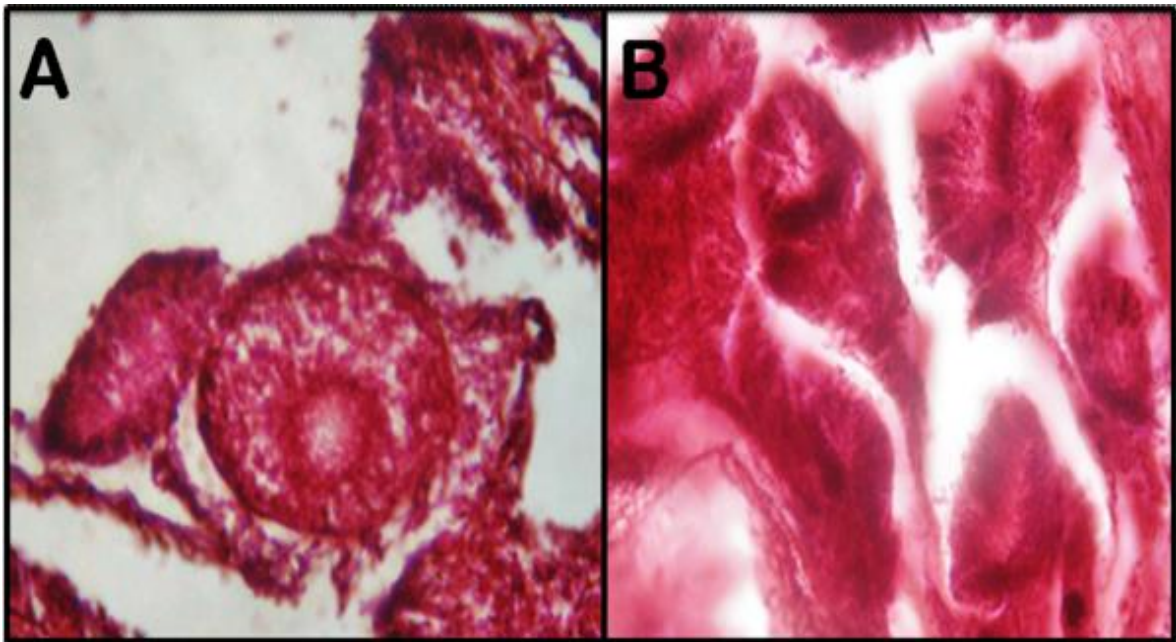
**Imágenes de la colonia “B” de Febrero de 2014:** la situación de esta colonia y la colonia A han sido muy parecidas durante todo el muestreo y este mes no fue la excepción pues igual que en la muestra A aquí también se observó un aumento en la talla de los óvulos las cuales tuvieron máximas de 110 – 120  $\mu$  observados individualmente, así como de los ovarios que contienen a los óvulos (Figura 24 A). Los espermários también presentaron un aumento en sus tallas como se observa en la Figura 20 parte B.



**Figura 24:** A) ovario con cuatro óvulos aproximadamente con tallas un poco diferentes entre sí (110-120  $\mu$ ), B) dos sacos espermários que a simple vista han aumentado de talla con respecto a los primeros meses posteriores al evento de reproducción, aumentos (40x).

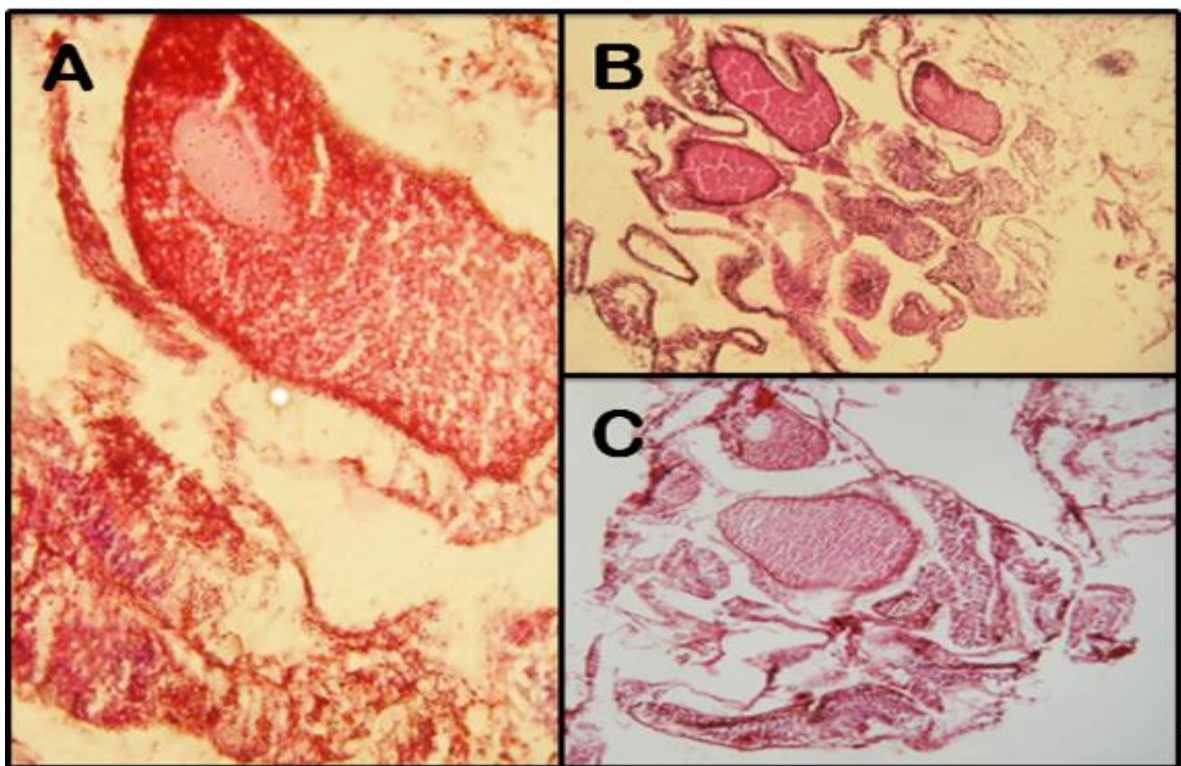
---

**Imágenes de la colonia “C” de Febrero de 2014:** es durante este mes cuando se observan por primera vez los gametos femeninos en esta colonia después del evento de reproducción, los cuales se presentan de manera constante en toda la muestra, sus tallas máximas fueron de 80 – 110  $\mu$  (Figura 25 A), estos óvulos fueron menores en cuanto a talla y presencia con respecto a los gametos masculinos de la misma muestra y los gametos femeninos de las muestras A y B. En los espermátios de esta colonia se observa un aumento en su presencia (Figura 25 B), sin embargo en cuanto a las tallas los cambios que se observan son pequeños con respecto a los espermátios de las colonias A y B.



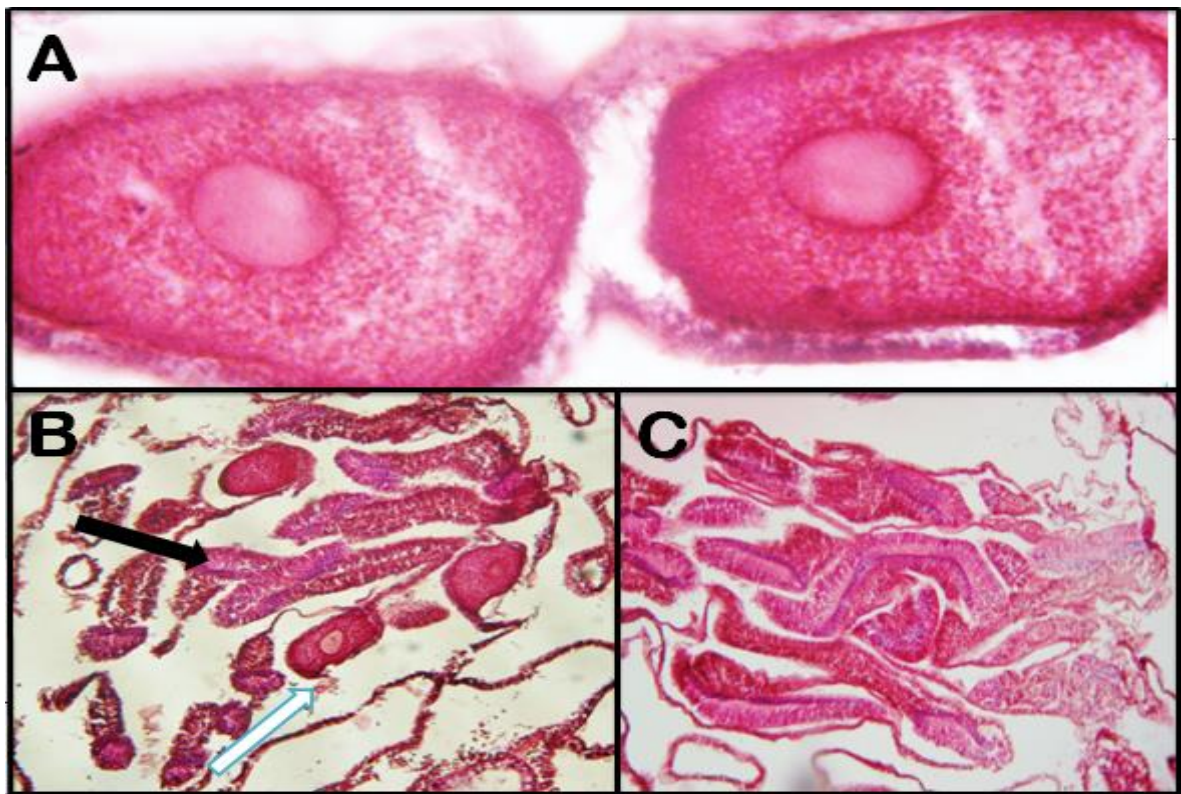
**Figura 25:** A) primer óvulo observado en esta muestra, B) sacos espermarios que han aumentado de talla con respecto a los primeros meses posteriores a la reproducción, aumentos (40x).

**Imágenes de la colonia “A” de Marzo de 2014:** se registró el mayor aumento en la talla de las gónadas hasta el momento, principalmente en las femeninas, pues se observó en este mes que las tallas máximas de los óvulos en todas las muestras aumentaron su talla considerablemente, alcanzando las 320 – 380  $\mu$  (Figura 26) lo cual fue un aumento en las tallas nunca antes registrado. El tamaño de las gónadas masculinas aunque no se registró la medida exacta también ha aumentado pero el aumento en talla de los óvulos es más evidente puesto que estos siempre han sido de tallas más grandes que los espermarios.



**Figura 26:** A) óvulo y espermario de tallas similares (320-380  $\mu$ ), aumento (40x) B y C) óvulos que han aumentado su talla (380  $\mu$ ) rodeados de espermarios en la misma situación, aumento (10x).

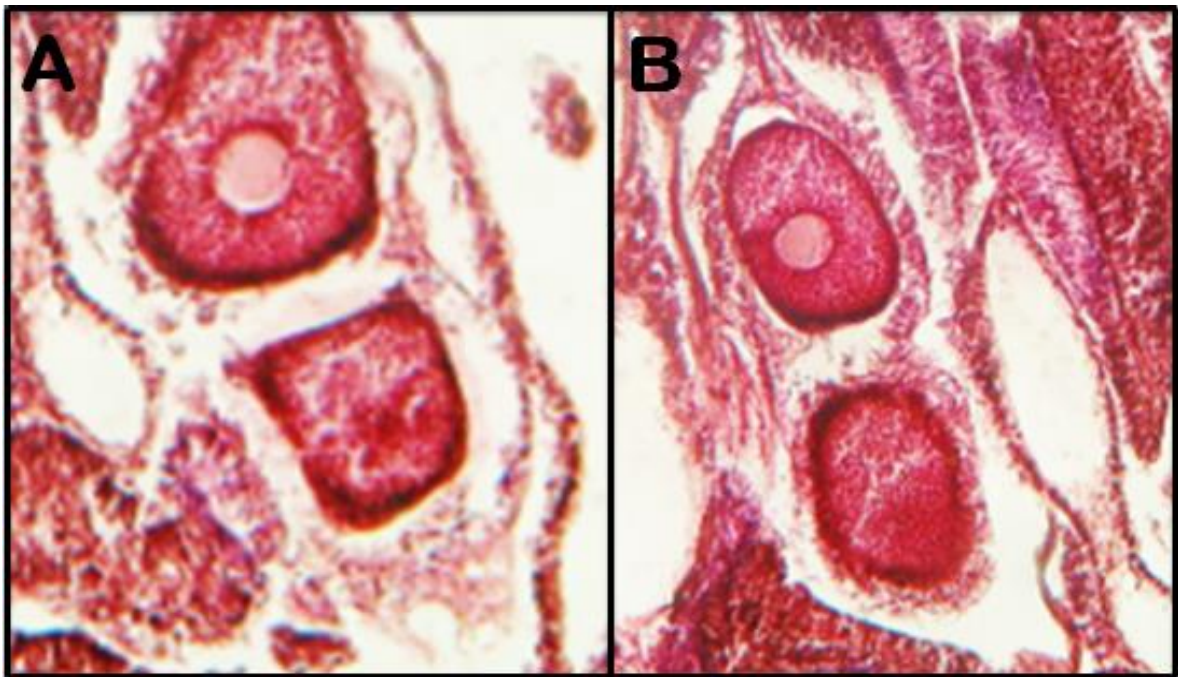
**Imágenes de la colonia “B” de Marzo de 2014:** tanto los gametos femeninos como masculinos en esta colonia también presentan un aumento en sus tallas, sin embargo no en la misma proporción que en la colonia A con respecto a los gametos femeninos lo cual queda expuesto en sus tallas ya que los valores máximos alcanzados fueron de 320 a 370  $\mu$  en los óvulos (Figura 27 A y B). Los espermátios continuaron con su aumento en sus tallas lo cual es evidente a simple vista (Figura 27 C).



**Figura 27:** A) dos óvulos con madurez suficientes para apreciar su núcleo, aumento (40x). B) óvulos que han aumentado su talla (370  $\mu$ , flecha blanca) rodeados de espermátios en la misma situación (flecha negra), C) grupo de sacos espermátios, aumentos (10x).

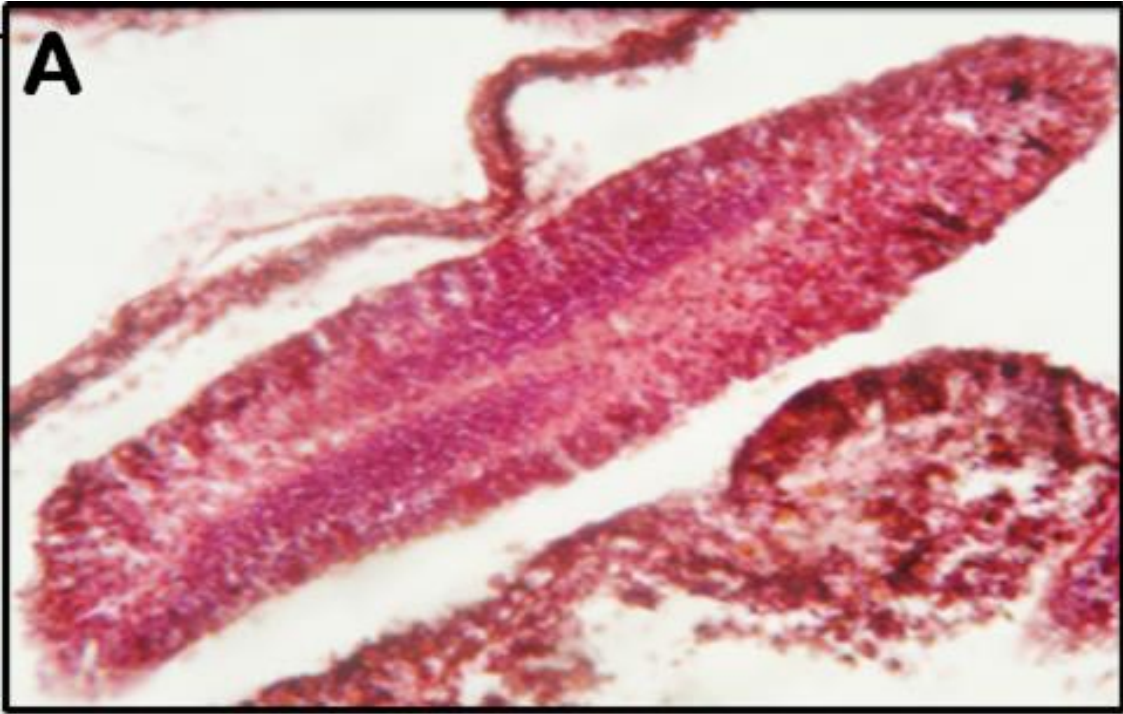
---

**Imágenes de la colonia “C” de Marzo de 2014:** el aumento en el tamaño de los gametos femeninos es progresivo pero no tan avanzado como sucede en la colonias A y B, se observa a los óvulos con un aumento en sus tallas (Figura 28) sin llegar a ser considerado ninguno de estos como maduros aún, las tallas máximas fueron de 280 a 320  $\mu$ . Los espermátios sin embargo han presentado un aumento similar a las muestras A y B y en algunos de ellos se observan características similares a las de gametos en plena madurez y listos para el evento de reproducción como es el adelgazamiento de sus paredes (Figura 29).



**Figura 28:** A y B) óvulos con un pequeño aumento en sus tallas (320  $\mu$ ), en algunos de ellos ya es visible el núcleo, aumentos (40x).

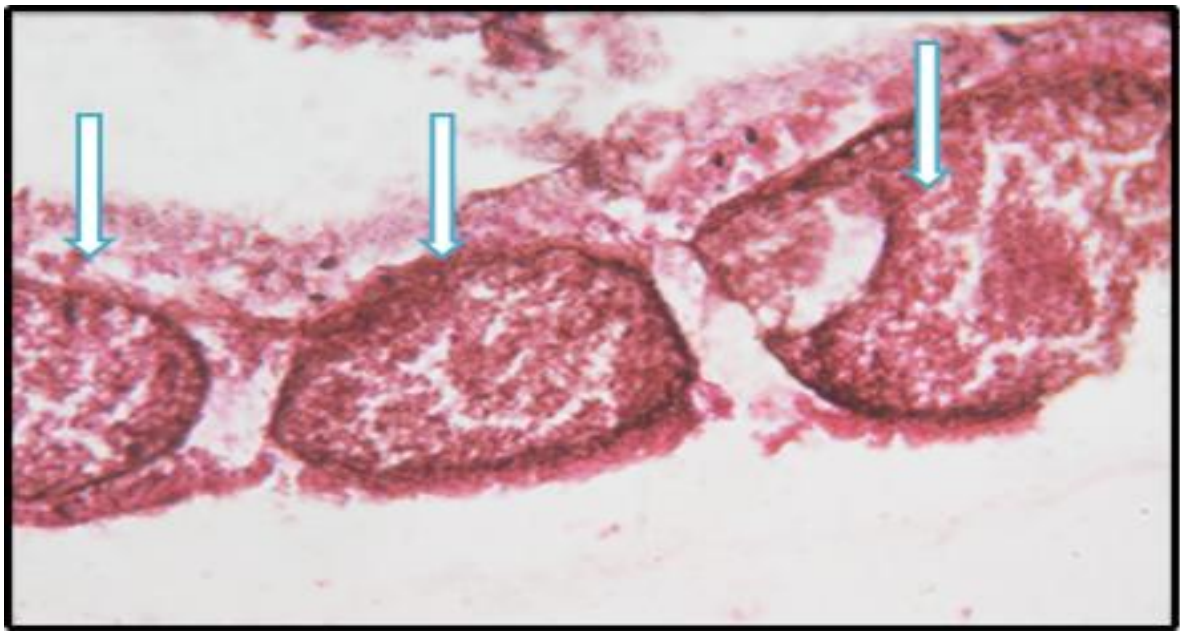




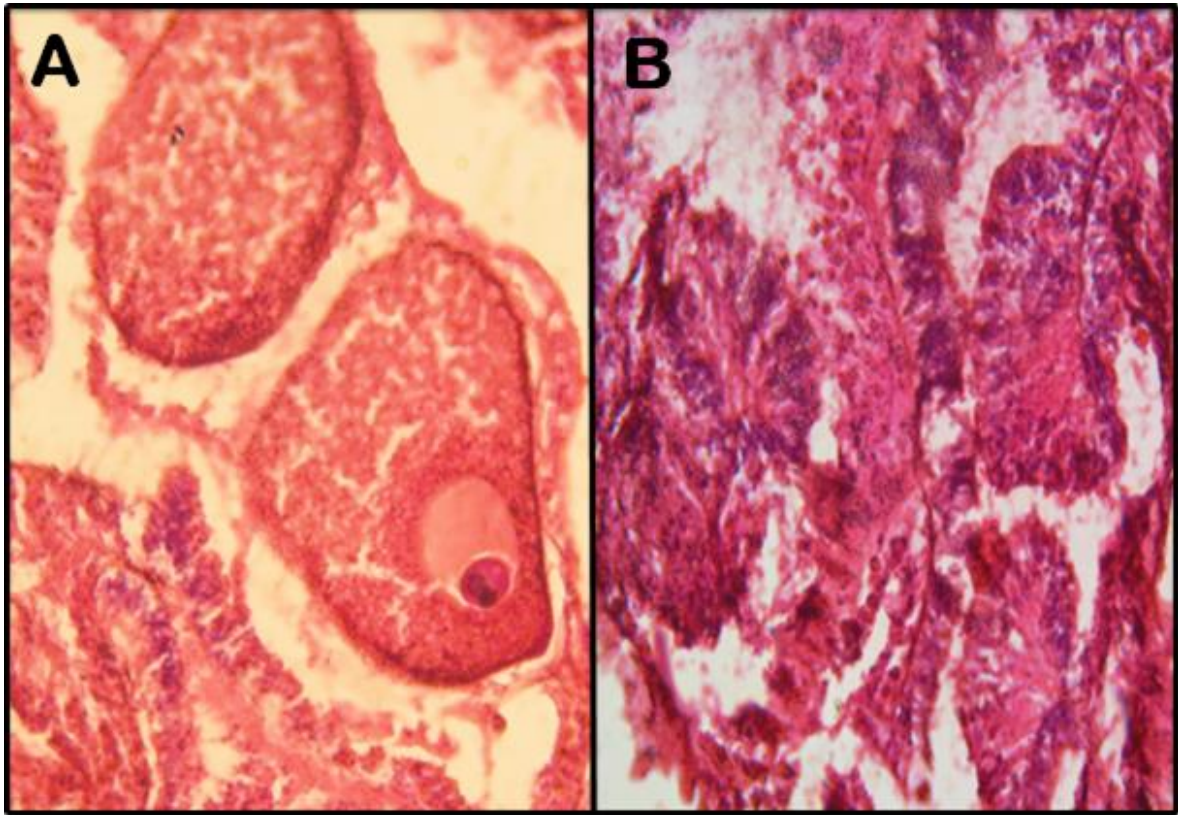
**Figura 29:** A) espermario que ha presentado un cambio en su tamaño con respecto a los meses anteriores, aumento (40x).

---

**Imágenes de la colonia “A” de Abril de 2014:** el aumento en la talla de los gametos femeninos de manera general no fue tan elevado en esta colonia como el mes pasado, las tallas máximas en los óvulos fue de 420 – 480  $\mu$ , sin embargo si existió un aumento en el número de óvulos que elevaron su talla (Figura 30) y las proporciones de óvulos con respecto a los espermátios que pueden llegar a ser considerados como maduros o muy próximos a esta etapa ha comenzado a homogenizarse (Figura 31 A y B).

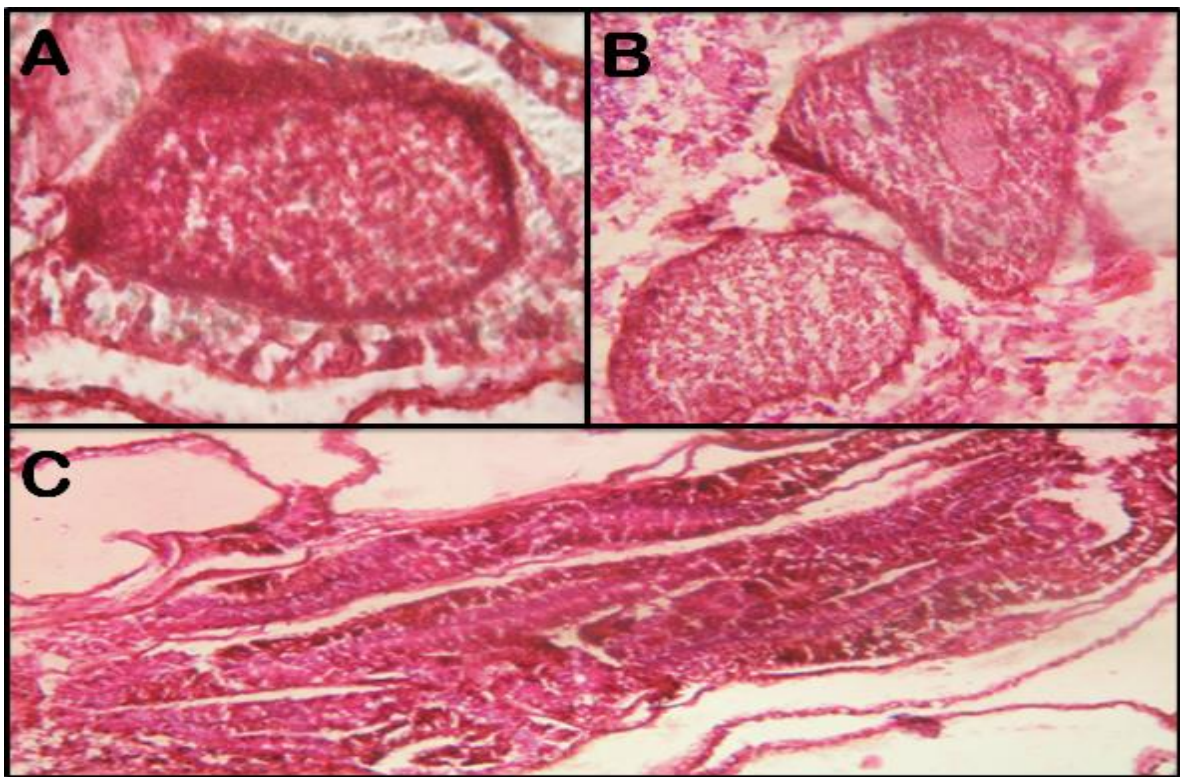


**Figura 30:** ovario con tres óvulos (flechas blancas) de tallas parecidas (420 – 480  $\mu$ ) y consideradas como muy próximas a su estado de madurez, aumento (40x).



**Figura 31:** A) dos óvulos de tallas relativamente iguales ( $420 - 480 \mu$ ) consideradas como muy próximas a su estado de madurez, se puede observar en uno de ellos el centriolo. B) sacos espermáticos, aumentos (40x).

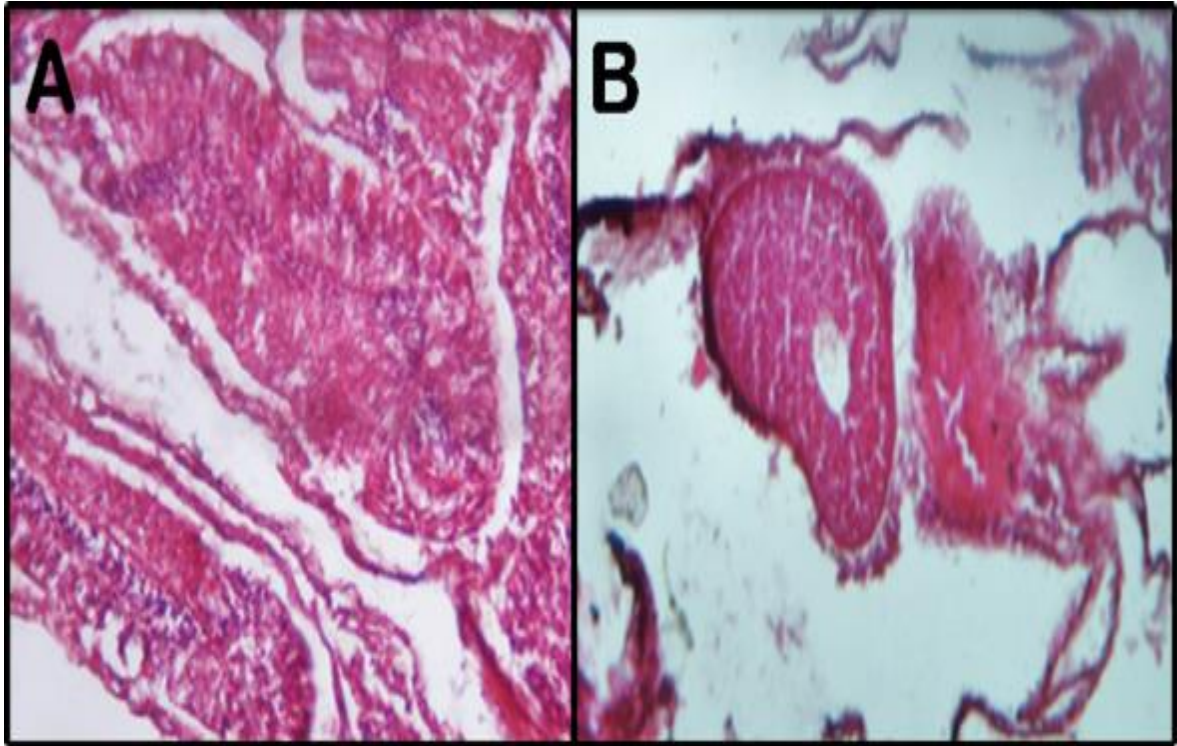
**Imágenes de la colonia “B” de Abril de 2014:** la condiciones observadas en esta colonia fueron muy parecidas a las de la colonia A puesto que también existió un aumento muy pequeño en el tamaño de las gónadas femeninas con respecto al mes anterior, las tallas máximas de los óvulos durante este mes fueron de 420 – 460  $\mu$ . Los gametos masculinos también han presentado un aumento en sus tallas muy pequeño y poco considerable y la proporción de gametos tanto femeninos como masculinos considerados como próximos al estado de madurez comienza a ser igual (Figura 32).



**Figura 32:** A y B) óvulos de tallas relativamente iguales (420 – 460  $\mu$ ) y consideradas como muy próximas a su estado de madurez, se puede observar en uno de ellos el centriolo dentro del cuadro B, C) espermátios que claramente han aumentados sus tallas y próximos al estado de maduración, aumento (40x).

---

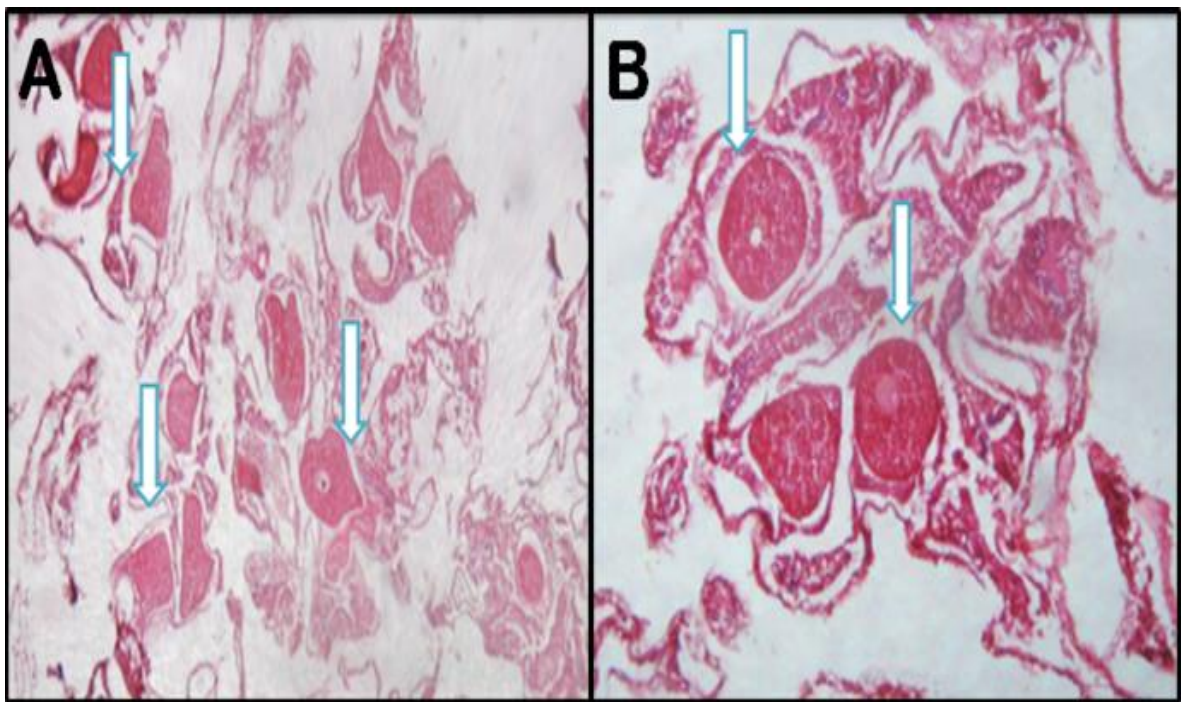
**Imágenes de la colonia “C” de Abril de 2014:** del mismo modo que ha ocurrido en los meses anteriores, el tamaño en las gónadas sigue aumentando de forma un poco retrasada con respecto a las muestras A y B pero su desarrollo es de manera constante y se observa una homogenización entre el número de espermários considerados como maduros o próximos a este estado y el número de óvulos con estas mismas características, las tallas máximas de éstas gónadas durante este mes fueron de 380 - 440  $\mu$  (Figura 33).



**Figura 33:** A) espermários con tallas parecidas al mes anterior (380-440 $\mu$ ) C) ovulo aumentado en tallas (440 $\mu$ ) y próximo al estado de maduración, aumento (40x).

---

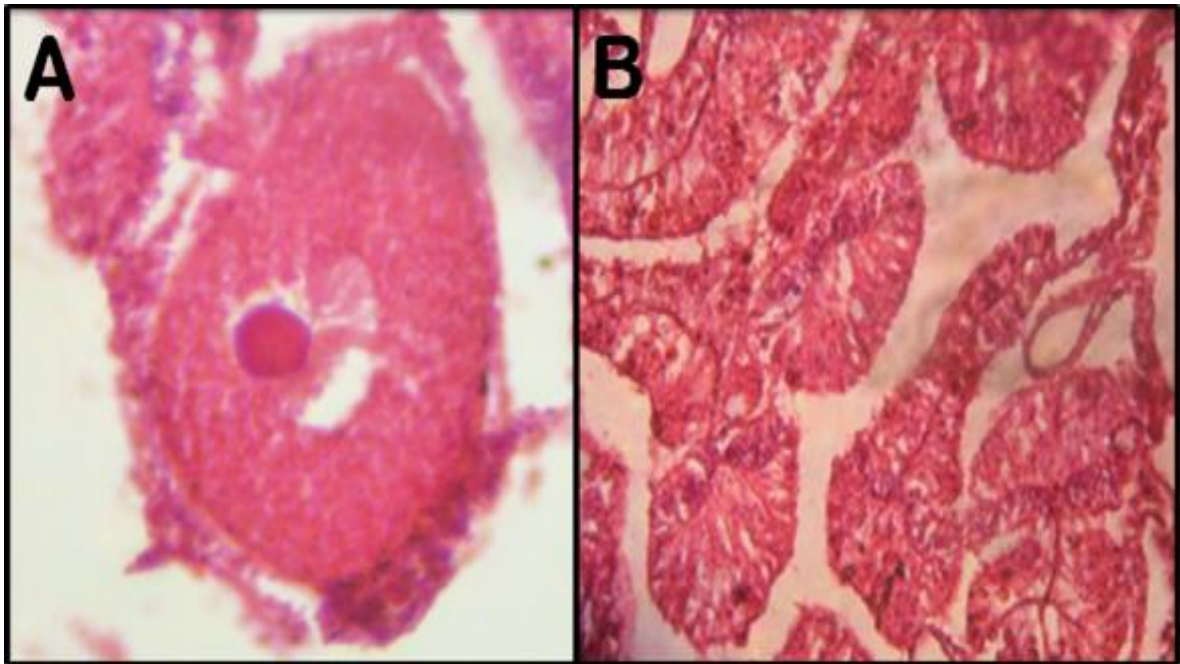
**Imágenes de la colonia “A” de Mayo de 2014:** durante este mes el aumento en las tallas de los gametos femeninos ha llegado a ser muy elevada con respecto a sus inicios y las condiciones muy homogéneas entre los gametos femeninos y masculinos considerados como maduros en cuanto a estructura y tamaño (Figura 34). A estas alturas podría considerarse a los gametos femeninos y masculinos de al menos esta colonia como iguales a los que se encuentran ya en estado de maduración, las tallas máximas de los óvulos registradas en esta colonia fueron de 475 – 520  $\mu$ .



**Figura 34:** A y B) óvulos (flechas blancas) y espermátios con tallas muy parecidas a las registradas durante el evento de reproducción del año anterior (475-550  $\mu$ ), aumentos (10x).

---

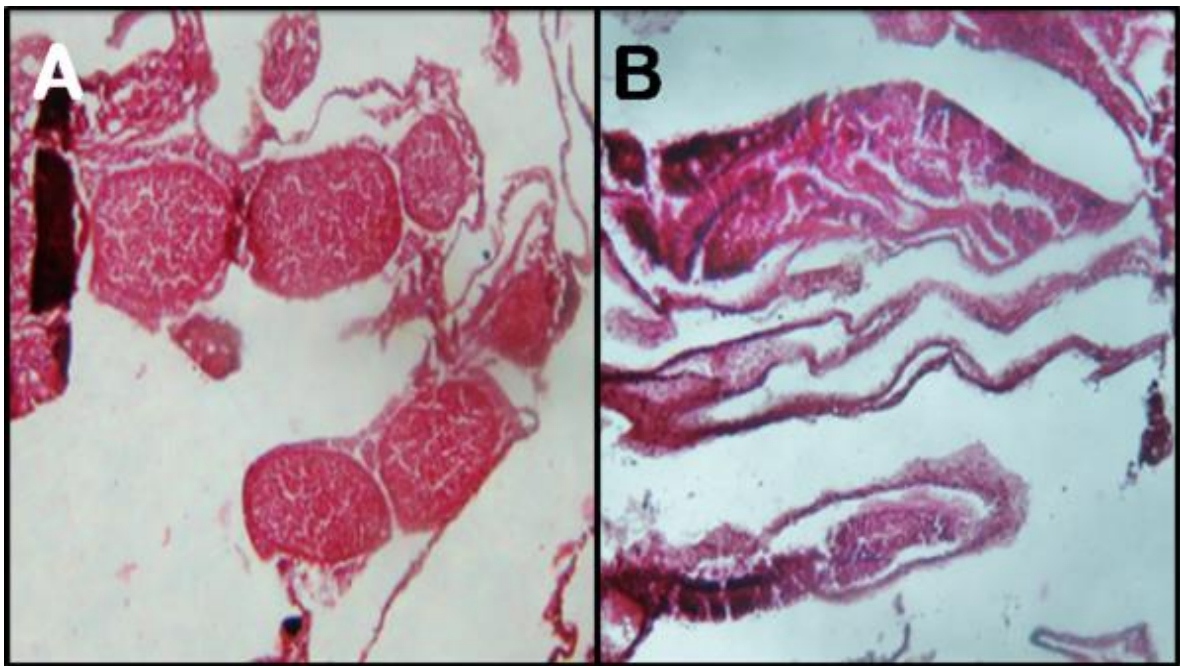
**Imágenes de la colonia “B” de Mayo de 2014:** durante este mes por primera vez se observaron diferencias con respecto a la colonia A que a la fecha habían presentado condiciones muy similares en las tallas de sus gónadas, pues el aumento en las tallas para los gametos femeninos principalmente pero también masculinos parece haberse quedado suspendido puesto que las imágenes (Figura 35) muestran tallas muy similares a las presentadas en esta colonia un mes atrás, estas tallas máximas en los óvulos fue de 400 – 450  $\mu$ .



**Figura 35:** A y B) óvulos y espermários con tallas (400-450  $\mu$ ) consideradas como iguales a las encontradas un mes atrás en esta misma colonia, aumento (40x).

---

**Imágenes de la colonia “C” de Mayo de 2014:** en este mes el tamaño de los óvulos observados si tubo cambios evidentes en lo que a tallas se refiere, al menos con respecto a los gametos femeninos pues aunque el aumento en las tallas de estos gametos estuvo presentes durante todos los meses anteriores, el cambio durante este mes fue evidente presentando tallas máximas de 450 – 500  $\mu$ , tallas muy parecidas a las de la colonia A como lo muestra la Figura 36. Los gametos masculinos fueron considerados como bajos en el aumento de talla pero si muy cercanos a la maduración.

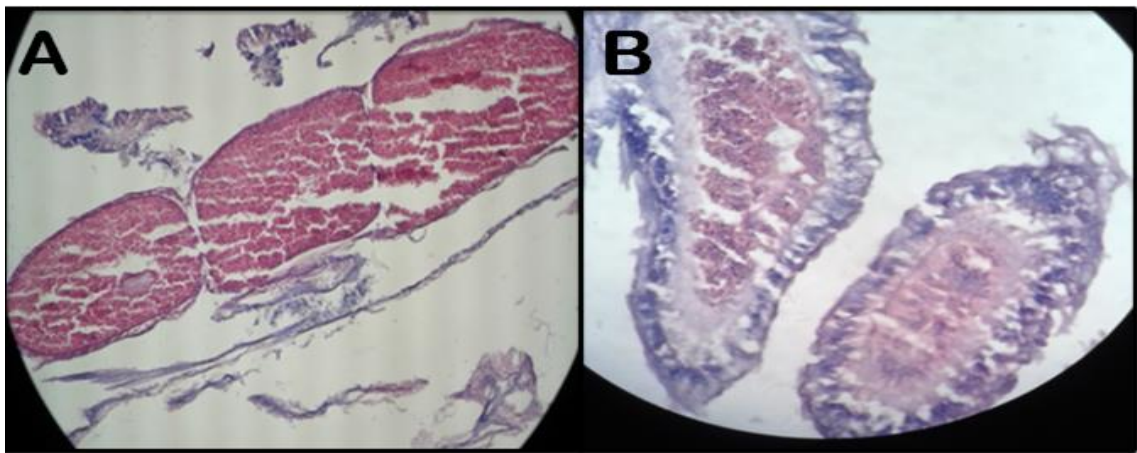


**Figura 36:** A) ovarios con tres óvulos cada uno, mismos que presentan tallas distintas individualmente (450-500  $\mu$ ). B) espermarios, aumentos (10x).



---

**Imágenes de la colonia “A” de julio de 2014:** el tamaño de los gametos femeninos y masculinos parecen a simple vista mantenerse estables con respecto al mes anterior, las tallas máximas para los óvulos fue de 550 – 625  $\mu$  (Figura 37). Los espermários se pueden apreciar muy fácilmente durante este mes y los óvulos se pueden identificar incluso sin la necesidad del microscopio ni de cortes histológicos (Figura 38).



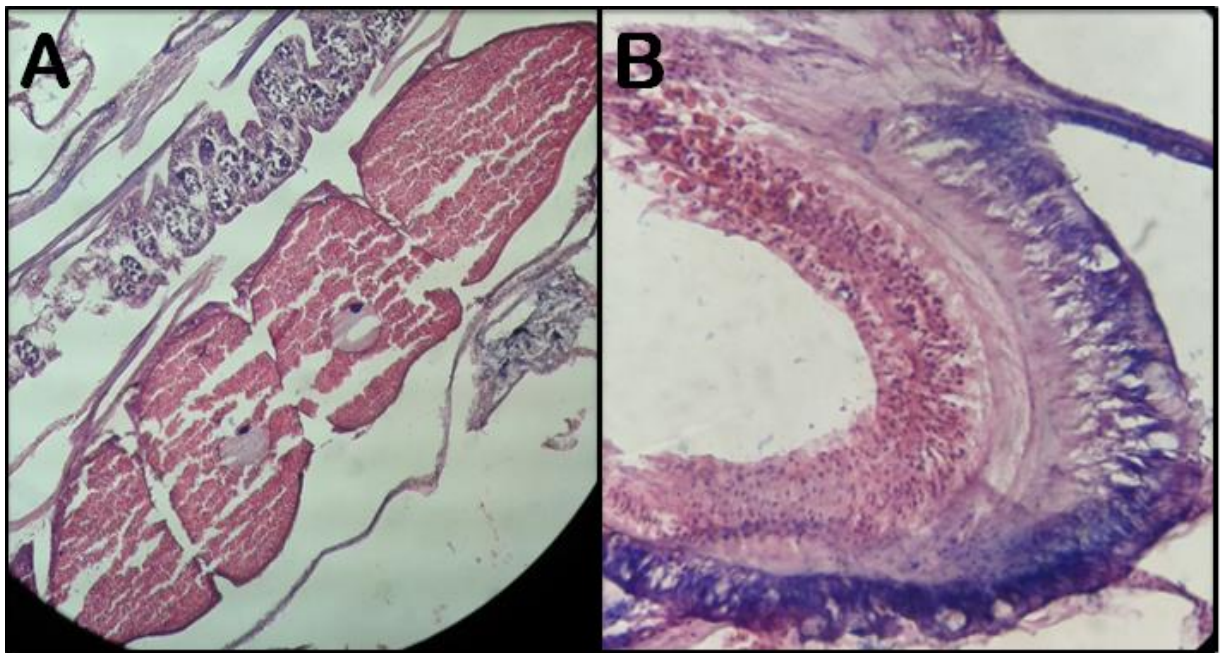
**Figura 37:** A) ovario con tres óvulos que se pueden apreciar fácilmente debido a sus tallas (550 – 625  $\mu$ ), lo mismo ocurre con B) tratándose de dos sacos espermários. Estas imágenes son representativas de las condiciones observadas en esta colonia para este mes, aumentos (40x).



**Figura 38:** A') óvulos en tallas suficientes para que se puedan apreciar sin ayuda del microscopio (625  $\mu$  aproximadamente).

---

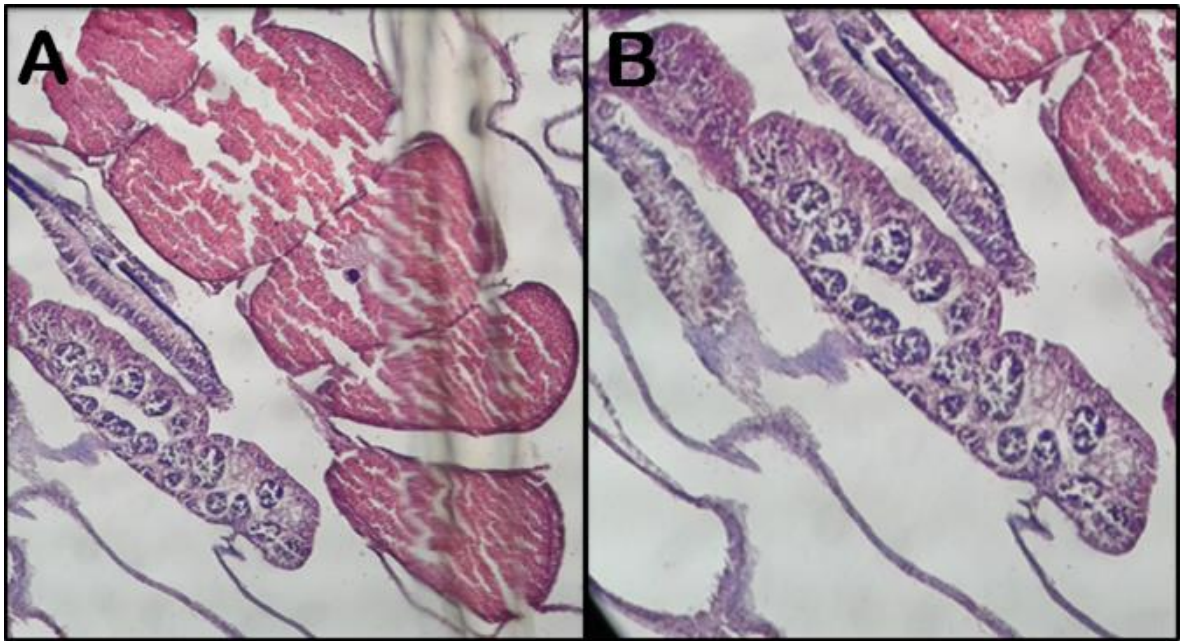
**Imágenes de la colonia “B” de julio de 2014:** las condiciones en cuanto a tallas vuelven a ser muy parecidas a las que se observan en la colonia A tal y como sucedía anteriormente alcanzando máximas de 550 – 620  $\mu$ . Los óvulos y los espermários se pueden observar con toda facilidad en los cortes histológicos observados como se muestra en las imágenes (Figura 39).



**Figura 39:** A) ovario con cuatro óvulos en lo que parece ser, son sus tallas máximas (550 – 620  $\mu$ ) igual que B) donde se observa un saco espermático, aumentos (40x).

---

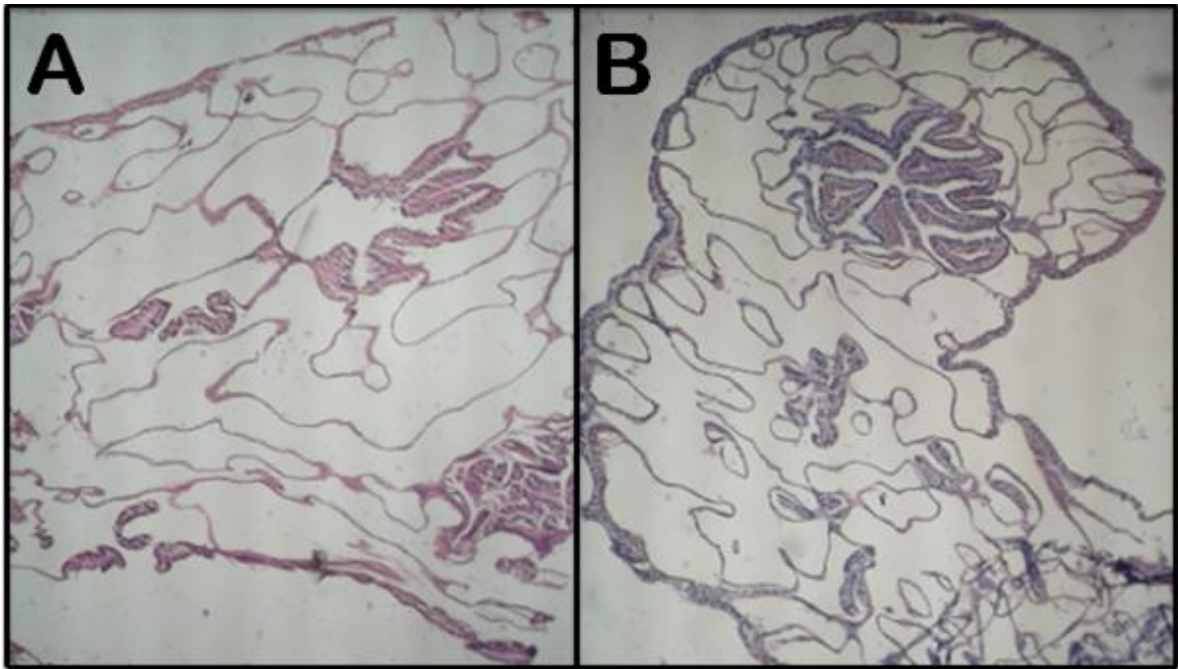
**Imágenes de la colonia “C” de julio de 2014:** en esta colonia y a pesar de ser la última en la que se observó la presencia de gametos femeninos después del desove, ambos tipos de gametos ya se encuentran en las mismas tallas y condiciones que las colonias A y B presentan (Figura 40), con tallas máximas de 550 – 600  $\mu$  observándose ambos tipos de gametos con la misma facilidad que en las colonias de coral antes mencionadas.



**Figura 40:** A) ovario con cinco óvulos en donde se le puede observar el centriolo al gameto central, B) saco espermiario, aumentos (40x).

---

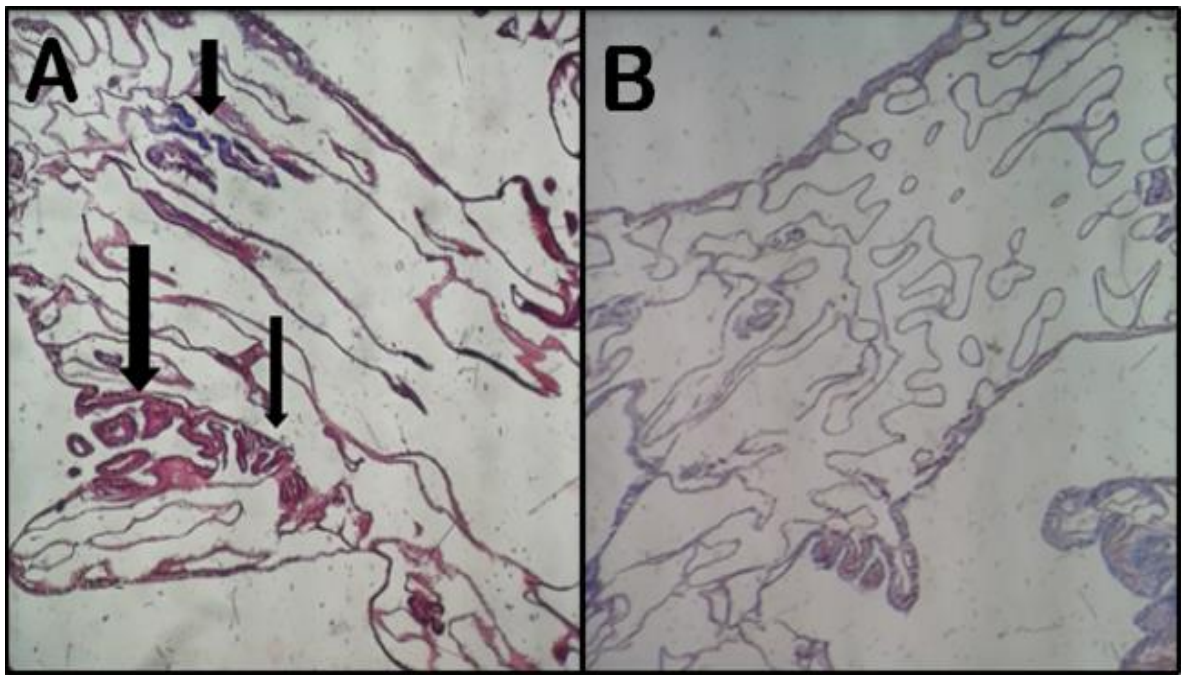
**Imágenes de la colonia “A” de Agosto de 2014:** después del evento de reproducción al parecer todos los gametos femeninos fueron expulsados y la mayoría de los gametos masculinos, como se puede observar en la Figura 41 parte A y B en donde solo se observa el tejido de los pólipos sin ningún tipo de gameto aparente ni estructuras o tejidos similares.



**Figura 41:** A y B) tejido sin gametos. Estas imágenes son representativas de toda la muestra, aumentos (4x).

---

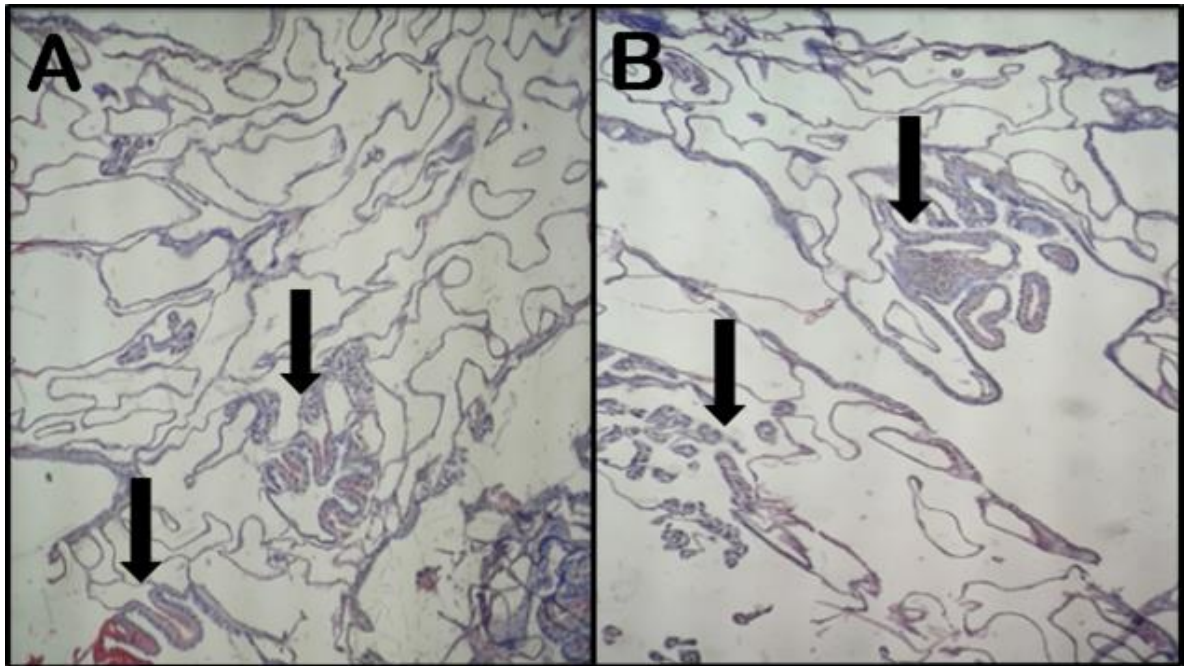
**Imágenes de la colonia “B” de Agosto de 2014:** al igual que ocurrió en A las muestras observadas solo mostraron tejido sin gametos aparentes como se muestra en la parte B de la Figura 42, solo en algunos casos se observó la presencia de lo que parecen estructuras similares a espermários como lo indican las flechas en la parte A de la Figura, no se observó ningún gameto femenino.



**Figura 42:** A) aparentes espermários rodeados de tejido (flechas negras). B) tejido sin ningún tipo de gametos, aumentos (4x).

---

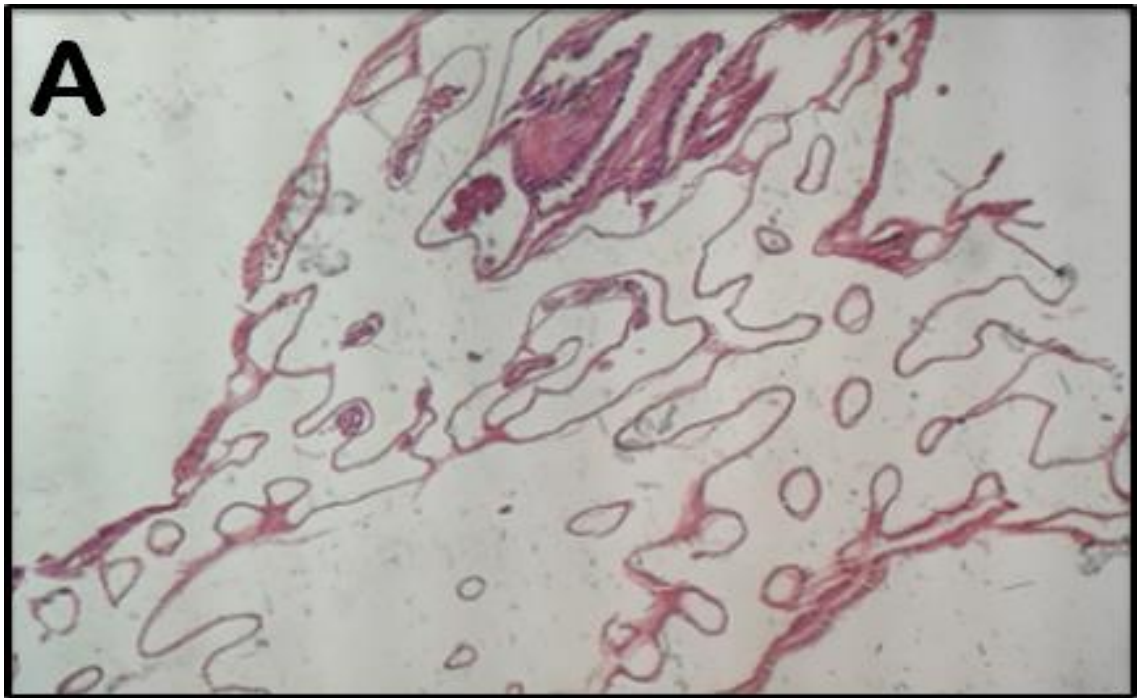
**Imágenes de la colonia “C” de Agosto de 2014:** es en esta colonia en donde se observaron lo que parecían gametos masculinos y restos de ellos con mayor frecuencia, sin embargo en tallas pequeñas como se muestra en la Figura 43 en donde hay dos imágenes distintas (A y B) con posibles espermários señalados con las flechas negras. Ambas imágenes son representativas de las condiciones que se presentaron en todos los cortes histológicos de las muestras durante este mes.



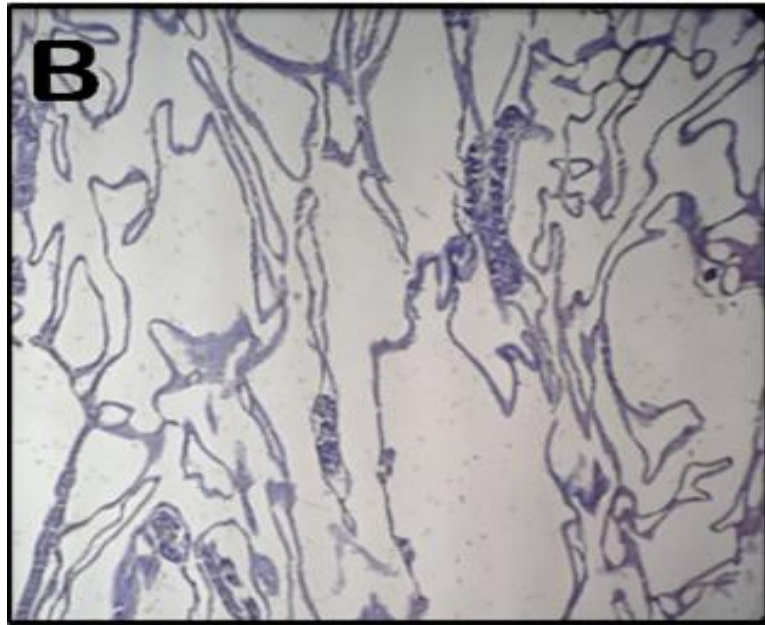
**Figura 43:** A y B) tejido con posibles gametos masculinos (flechas negras) en tallas visiblemente más pequeñas a las encontradas previamente al evento de reproducción, aumento (10x).

---

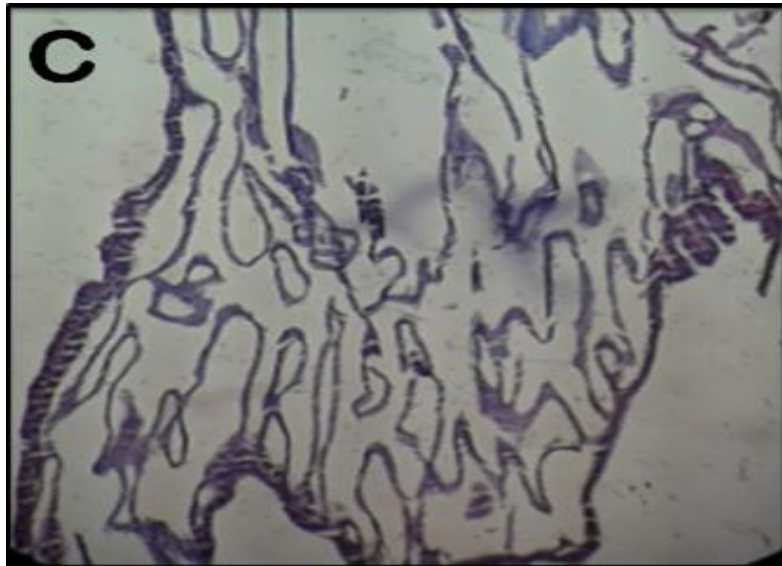
**Imágenes de las colonias “A, B y C” de Octubre de 2014:** estas muestras fueron colectadas con la única finalidad de repetir el muestreo durante el mismo mes del año anterior y confirmar los mismos resultados, los cuales fueron efectivamente muy similares pues al igual que en el año anterior los gametos femeninos son totalmente ausentes en todas las muestras de las tres colonias de corales, se puede observar el corte transversal de un pólipo entero sin ningún rastro de gametos femenino, sin embargo si se encontraron lo que parecen ser restos de espermários (Figura 44), las condiciones no fueron diferentes para las colonias B y C (Figuras 45 y 46).



**Figura 44:** A) imagen representativa de las condiciones de la colonia A en donde los gametos femeninos son totalmente ausentes, aumento (4x).



**Figura 45:** B) imagen representativa de las condiciones de la colonia B en donde los gametos femeninos son totalmente ausentes, se observan restos de gametos masculinos, aumento (4x).

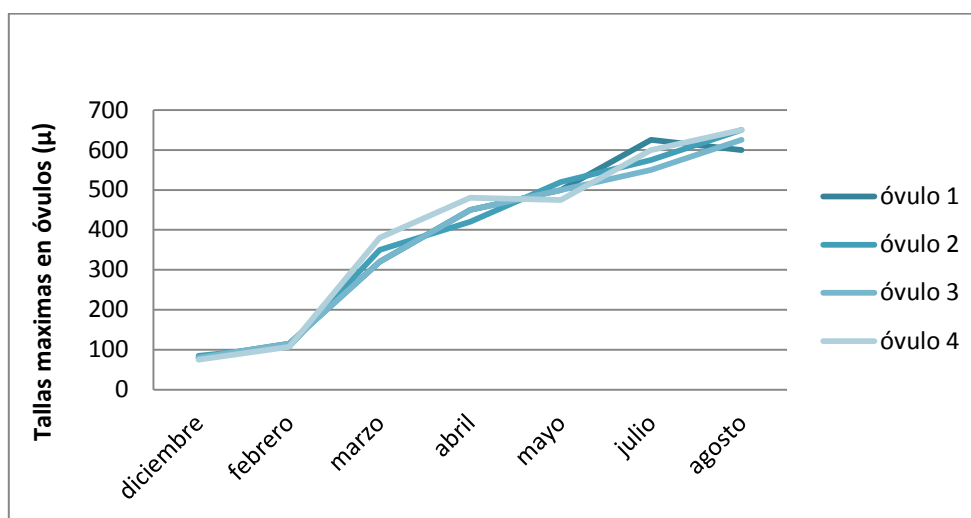


**Figura 46:** B) imagen representativa de las condiciones de la colonia C en donde los gametos femeninos son totalmente ausentes pero se observan restos de gametos masculinos, aumento (4x).

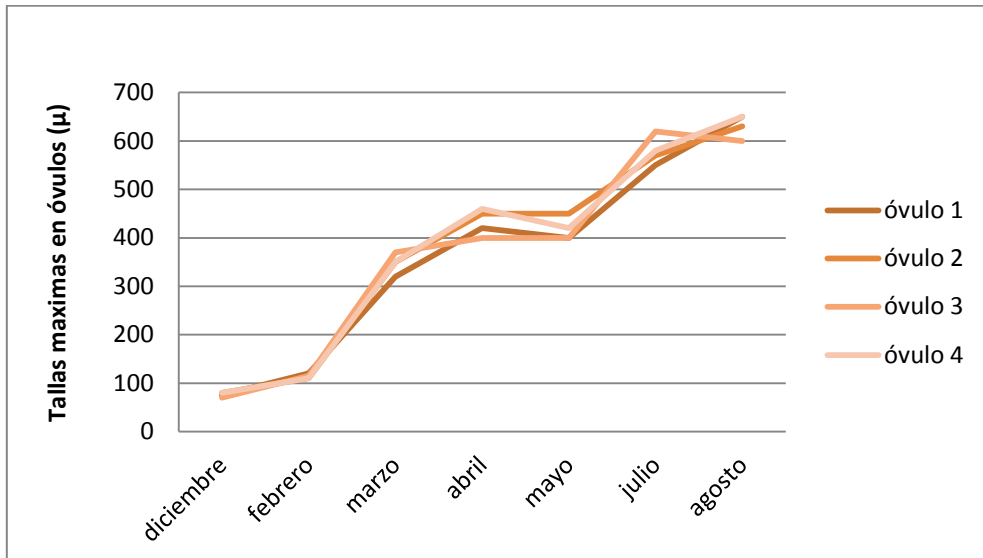


## 5.2 Ciclo reproductivo en gametos femeninos (óvulos)

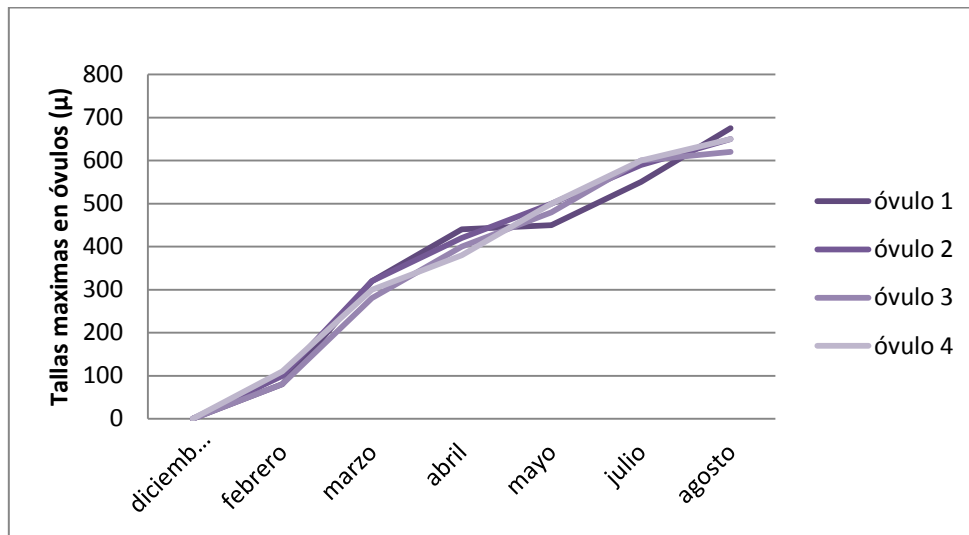
En las Figuras 47 a 49 se observa que el ciclo reproductivo en los gametos femeninos de *A. palmata* es anual y que los óvulos alcanzan su máxima talla (600 a 675  $\mu$ ) en el mes de agosto y para el mes de septiembre todas las gónadas femeninas y la mayoría de las masculinas han desaparecido, lo que indica que es en este periodo cuando se lleva a cabo el desove y evento de reproducción. El nuevo grupo de óvulos inmaduros (menores a 100  $\mu$ ) aparece en diciembre, este nuevo grupo de gónadas crece a un ritmo más o menos constante durante los próximos 8 meses siguientes que culmina en agosto al alcanzar sus tallas máximas repitiéndose nuevamente el ciclo. Es solo en el periodo febrero-marzo que se aprecia un aumento más elevado en las tallas de los óvulos de las 3 colonias con respecto al resto del ciclo reproductivo de las mismas.



**Figura 47:** Desarrollo en micras de las gónadas femeninas en la colonia A durante el muestreo. Las 4 líneas pertenecen a 4 tallas máximas medidas en distintos óvulos.



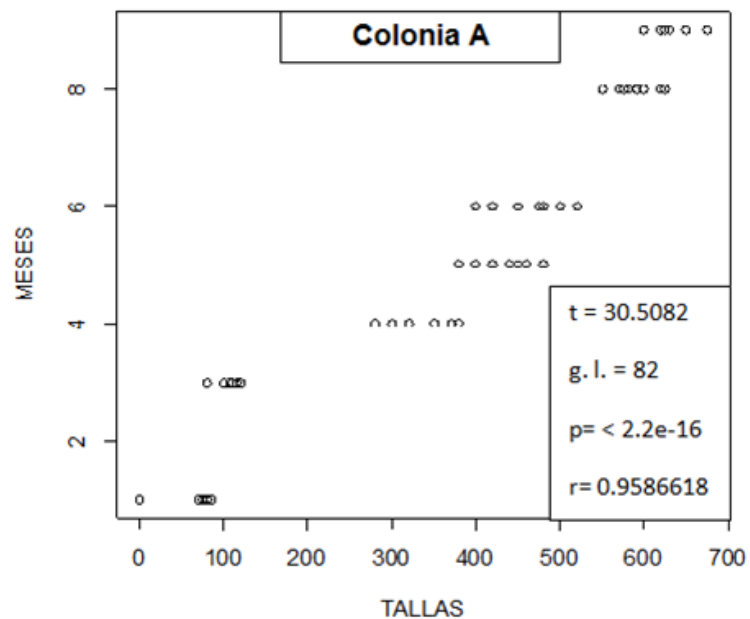
**Figura 48:** Desarrollo en micras de las gónadas femeninas en la colonia B durante el muestreo. Las 4 líneas pertenecen a 4 tallas máximas medidas en distintos óvulos.



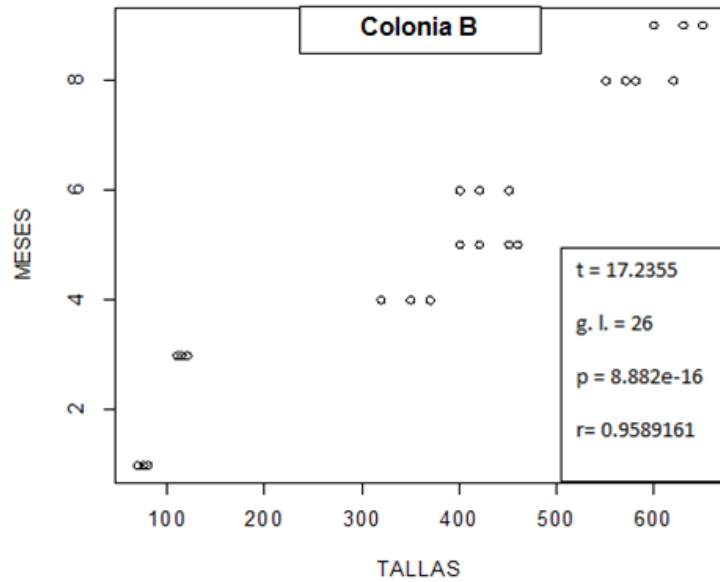
**Figura 49:** Desarrollo en micras de las gónadas femeninas en la colonia C durante el muestreo. Las 4 líneas pertenecen a 4 tallas máximas medidas en distintos óvulos.

### 5.3 Correlación tallas-meses en los óvulos

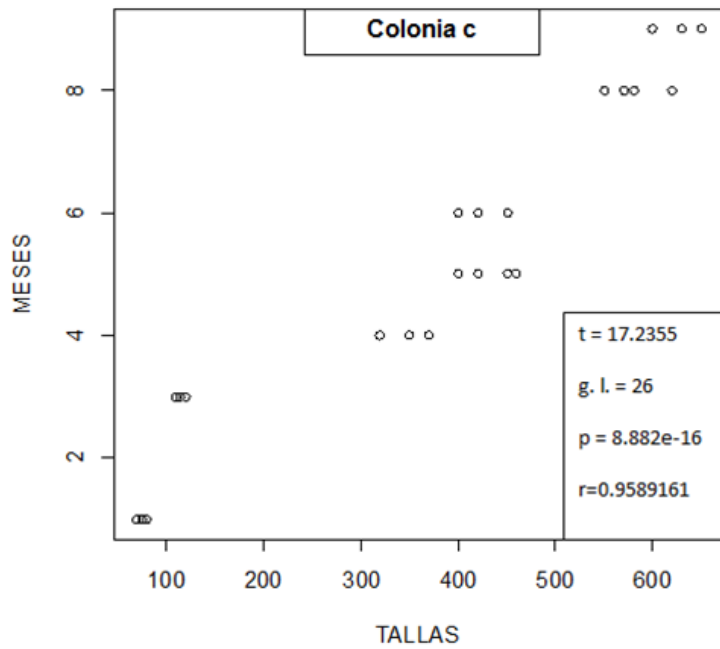
A partir del análisis en las gráficas de desarrollo de las gónadas femeninas (Figuras 50 a 53) se deduce claramente la periodicidad anual del ciclo reproductivo de *A. palmata*, asimismo se observa que existen diferencias significativas ( $p = < 0.05$ ) entre las tallas de los gametos femeninos y los meses en que éstas tallas se presentan, esto ocurre en las tres colonias. En cuanto al coeficiente de correlación ( $r$ ) de manera general para las tres colonias fue  $r = 0.9586618$  (Figura 53) lo que indica que el grado de relación existente entre ambas variables (TALLAS, MESES) es excelente, sabiendo que: 1= perfecta; 0.9-1 excelente; 0.8-0.9= buena (Pech, J. M. 2015).



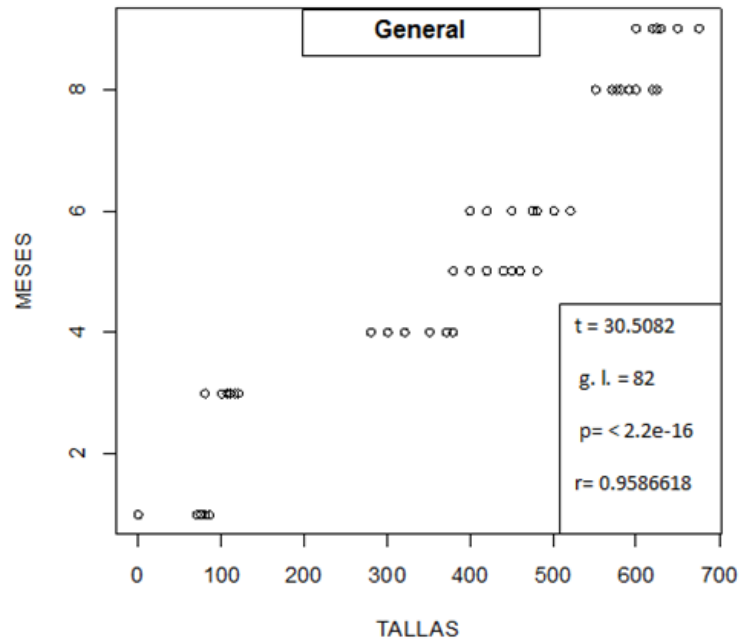
**Figura 50:** Correlación de Pearson Producto-Momento entre TALLAS y MESES de la colonia A.



**Figura 51:** Correlación de Pearson Producto-Momento entre TALLAS y MESES de la colonia B.



**Figura 52:** Correlación de Pearson Producto-Momento entre TALLAS y MESES de la colonia C.



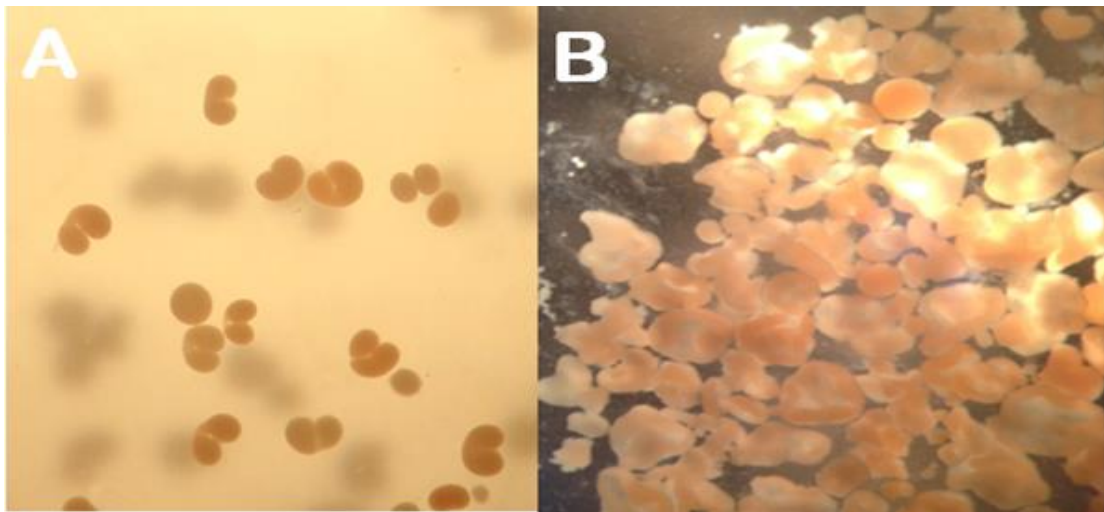
**Figura 53:** Correlación general de Pearson Producto-Momento entre TALLAS y MESES de las colonias A, B y C.

#### 5.4 Crio-preservación de embriones

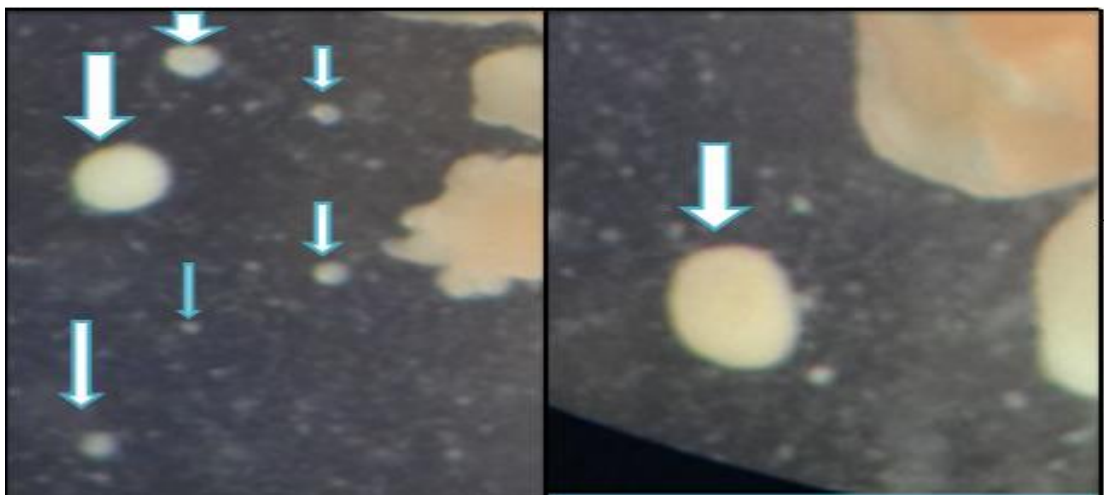
Tras el descongelar de las muestras en donde se encontraban los embriones (Figura 54 A) éstas fueron observadas y analizadas detenidamente, encontrándose que efectivamente existió una supervivencia de algunos embriones en cada uno de los crio-tubos después de ser sometidos a la técnica de crio-preservación (Figura 54 B), aunque los porcentajes de supervivencia no pudieron ser cuantificados claramente fueron muy bajos con respecto al material biológico que no se conservó , de manera inesperada se encontraron células sexuales sin fecundar en perfecto estado (Figura 55), espermatozoides mayormente, que bien

---

pueden ser utilizadas para una fecundación artificial en condiciones de laboratorio o extraer material genético, esto con el mismo fin de conservar la viabilidad de la *A. palmata* como especie.



**Figura 54:** A) embriones de una y dos células previos a la técnica de crio-preservación, B) grupo de embriones encontrados posteriores a la técnica de crio-preservación.



**Figura 55:** óvulos (flechas blancas) encontrados en las muestras después de ser sometidos a la técnica de crio-preservación.

---

## VI. Discusión

Las muestras de coral de aproximadamente 2 cm<sup>2</sup> extraídas y utilizadas durante todo este estudio fueron completamente descalcificadas con una solución de ácido acético diluido al 10% en agua destilada en un lapso máximo de 28 horas, algunos autores como Bravo , (comunicación personal), descalcifican muestras de esta misma especie de coral utilizando EDTA diluido al 10% en agua destilada haciendo recambios cada 12 horas tomándole un lapso de 7 días aproximadamente para la total descalcificación de un fragmento de aproximadamente 2cm<sup>2</sup> de *A. palmata*, argumentando un buen resultado en el tejido obtenido para su posterior análisis histológico, en este estudio primeramente se utilizó esta metodología pero se optó por utilizar ácido acético debido a que los resultados obtenidos fueron los mismos pero con un menor tiempo y esfuerzo.

Los óvulos de *A. palmata* alcanzan su máxima talla (600 a 675  $\mu$ ) en el mes de agosto, y para el mes de septiembre todas las gónadas femeninas han desaparecido, lo que indica que es en este periodo cuando se lleva a cabo la reproducción y el desove en esta zona, el nuevo grupo de óvulos inmaduros (apenas superiores a las 70  $\mu$ ) se hace evidente en el mes de diciembre quedando totalmente ausentes en las tres colonias muestreadas durante un lapso aproximado de 3 meses lo que indica un posible periodo de reposo (muy típico en ciclos gametogénicos) (Giese y Pearse, 1974) en las gónadas femeninas.

---

El hecho de que sea un grupo de óvulos recién observado en diciembre, tres meses después del evento de reproducción tanto en la colonia A como B y que sea de tamaño pequeño y definido disminuye la posibilidad de que se trate de óvulos en reabsorción, proceso comúnmente observado poco antes, durante y poco después de la reproducción en otras especies de corales (Grigg, 1970). Este nuevo grupo de gónadas, crece a un ritmo más o menos constante durante los siguientes 8 meses aproximadamente hasta el próximo desove, que culmina en agosto al alcanzar la talla máxima, repitiéndose nuevamente el ciclo y confirmándose el mismo como un ciclo de gametogénesis anual el cual ya se tenía reportado en distintos estudios (Wallace, 1985; Babcock *et al.*, 1986; Kenyon, 1992).

El que en la gran mayoría de las muestras analizadas de las tres colonias se encontraran los dos tipos de gametos (femeninos y masculinos) y que ambos presentaron un desarrollo muy parecido confirman que *A. palmata* es una especie hermafrodita simultánea que libera sus gametos tanto óvulos como espermatozoides de manera simultánea a la columna de agua en donde se lleva a cabo una fertilización externa (Szmant, 1986), esto último es congruente con este estudio pues en ninguna muestra se observaron ni embriones en segmentación ni plánulas en los cortes histológicos hechos a los pólipos, aún al llegar el periodo de máxima actividad reproductiva.



---

En cuanto a la época de reproducción, la mayoría de las especies de coral en el Caribe liberan sus gametos de manera sincronizada entre colonias de una misma especie a finales del verano, pero parecer esta sincronización no existe entre especies (Szmant, 1986). La sincronización, en la reproducción sexual de los corales, lo es todo. Entre más sincronía exista hay mayor oportunidad de que se efectúe la fertilización y proliferación. Así mismo, entre más gametos existan en la columna de agua, la probabilidad de que estos sean devorados en su totalidad por los depredadores, disminuye.

En particular, las especies del género *Acropora* presentan dos eventos reproductivos al año, siendo uno entre julio y agosto, y otro tardío en septiembre (SEMARNAT, 2011.) siempre unas noches después de la luna llena de estos meses, lo cual concuerda con nuestros resultados teniéndose confirmado a agosto de 2014 como el mes en el que ocurrió el evento de reproducción, cuatro días después de la luna llena. Entre otros factores en los que la luna llena influye en la reproducción de estos corales podría encontrarse el que en este lapso de tiempo es cuando se lleva a cabo el periodo de mareas muertas más ligero, lo que ocurre durante los cuartos menguantes, cuando las corrientes tienden a ser más débiles por lo que es muy probable que este sea uno de los principales factores pues esto permite que los gametos (óvulos y espermas) permanezcan juntos por más tiempo, incrementando las probabilidades de fertilización.

---

Si la temperatura del agua es cálida, como suele suceder en agosto, se incrementa la vida de los gametos, así como la habilidad natatoria del esperma, lo que eleva la tasa de fertilización por lo que este podría ser otro de los principales factores que influyen en que el evento de reproducción ocurra durante los lapsos ya mencionados y muy probablemente esto suceda de noche para evitar los depredadores, los huevecillos, ricos en grasa, serían fácilmente devorados durante el día. De noche, pocos organismos son capaces de tomar ventaja de este evento anual. Así que, la buena sincronización, compañía receptiva, la tibieza de las aguas y la obscuridad, incrementan las probabilidades reproductivas. Entre la lista de las especies que aprovechan esta misma noche para reproducirse, se encuentran: peces, invertebrados, esponjas, poliquetos, equinodermos, crustáceos y moluscos que seguramente aprovechan las condiciones ya mencionadas.

Ninguna de las tres colonias muestreadas se encontró sexualmente inactiva durante la época de reproducción, lo que podría sugerir que una vez alcanzada la madurez sexual por una colonia, ésta permanece activa reproductivamente por tiempo indeterminado, esta teoría también ha sido aplicada a otras especies de corales como es el caso de *Plexura homomalla*, en donde se concluyó que al alcanzar la talla/edad de madurez sexual las colonias de este coral, las cuales son dioicas, permanecen sexualmente activas por tiempo indeterminado (Ch, 1981).

El pico de reproducción tan marcado que presenta *A. palmata* en el desarrollo de sus óvulos en las tres colonias muestreadas (Figuras 47 a 49), que se presente

---

una sincronía en la aparición de las gónadas femeninas en el mes de Diciembre en la colonia A y B, así como el hecho de que existan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las tallas de los óvulos y los meses en que estas tallas se presentaron en las tres colonias y que se demostrara mediante un análisis estadístico un coeficiente de correlación excelente entre ambas variables ( $r = 0.9588$ ), indica la intervención de factores de control exógeno en la regulación de las actividades reproductivas de *A. palmata*.

Estudios como el presente trabajo sobre la conservación del genoma mediante técnicas nuevas e innovadoras como lo es la crio-preservación de embriones y gametos de corales tales como *A. palmata* quien se encuentra en peligro de extinción son esenciales por distintos motivos como el hecho de que la larva plánula de los corales presenta una alta mortalidad, mayor al 90%, debido a depredación y mortalidad natural principalmente, antes de asentarse y llegar al proceso de metamorfosis (Goreau *et al.*, 1981), además los estudios sobre reclutamiento sexual en las especies de *Acropora sp.* en el Caribe muestran 2 situaciones problemáticas: Primero, una densidad de juveniles baja en comparación con otras especies; Segundo una densidad baja de juveniles en comparación con los adultos (Porter, 1987) y aunque *A. palmata* puede reproducirse de manera asexual mediante fragmentación, la reproducción de este tipo solo representa un incremento de biomasa, pero no contribuye a la variabilidad genética, mientras que la reproducción sexual implica la creación de nuevos genotipos (genetos) (*sensu* Hughes, 1989), es decir nuevos individuos

---

genéticos que aportan la variabilidad genética necesaria para responder a los procesos evolutivos.

## VII. Conclusión

- El coral *A. palmata* tiene un ciclo reproductivo y de gametogénesis anual en el cual el desarrollo de sus óvulos comienza en diciembre con tallas de 70 a 85  $\mu$  de donde parte un desarrollo gradual y semi-constante durante los próximos 8 meses aproximadamente hasta llegar a su talla máxima de 600 a 670  $\mu$  durante el evento de desove y reproducción desde donde comenzara el ciclo nuevamente.
- Las gónadas femeninas parecen tener un periodo de reposo de aproximadamente 3 meses posteriores al evento de reproducción (septiembre, octubre y noviembre) en donde no producen ningún gameto femenino (óvulos), los gametos masculinos (espermários) parecen no tener ese periodo pues estuvieron presentes durante todo el ciclo anual.
- Las especies del género *Acropora* presentan dos eventos reproductivos al año, siendo uno entre julio y agosto, y otro tardío en el mes de septiembre, en la mayoría de las poblaciones, esta

---

liberación sincrónica de gametos ocurre unos días después de la luna llena de estos 3 meses. Para el arrecife “en medio” de Tuxpan Veracruz en donde se realizó en presente estudio se confirmó que dicho evento reproductivo ocurrió en agosto 4 días después de la luna llena.

- *A. palmata* es una especie hermafrodita simultánea con fecundación externa pues ambos tipos de gametos (femeninos y masculinos) se encontraron dentro de los cortes histológicos de los pólipos, así mismo no se encontró ningún rastro de embriones ni plánulas dentro de los mismos cortes.
- Se encontraron diferencias significativas entre las tallas de los óvulos de las tres colonias y los meses en que estas se presentaron con lo que se probó que existe una correlación entre ambas variables, lo que aunado con otros factores como la sincronía en la aparición de los óvulos indica la intervención de factores de control exógeno en la regulación de las actividades reproductivas de *A. palmata*.
- La técnica de crio-preservación pareció ser más exitosa para mantener un banco de germoplasma del organismo en cuestión,

---

puesto que existieron pocos embriones que resultaron intactos después de ser sometidos a este procedimiento pero si se encontraron células sexuales sin fecundar las cuales contienen el material genético necesario para realizar nuevas investigaciones y pueden ser conservados por tiempo indeterminado conservando así su ADN.

### **7.1 Recomendaciones**

Para futuros trabajos sobre reproducción sexual o con gametos de *A. palmata* se ha observado que para esta especie, las tasas de fecundación está directamente relacionadas con el tamaño de las colonias, de modo que las colonias más grandes tienen una mayor fecundidad (Soong y Lang, 1992; Padilla, 1996). En México se tiene reportado un promedio de 3.5 a 4 huevos por pólipo en colonias grandes, mientras que colonias medianas tienen 1.5 huevos por pólipo, encontrando que colonias con un área de tejido vivo menor a 1,000 cm<sup>2</sup> no han madurado sexualmente (Padilla, 1996), por lo que la extracción de las muestras debe ser en colonias que superen esta medida.

---

## VIII. Aplicación práctica del trabajo

La caracterización de cualquier organismo así como de sus ciclos, entre ellos el reproductivo, aporta información valiosa que nos ayuda a una mejor comprensión del mismo. Lo cual cobra mayor relevancia si se trata de especies con una importancia elevada por proveer una serie de bienes y servicios tanto para los seres humanos como para el ambiente en el cual se encuentra, tal y como es el caso de *A. palmata*, siendo en México una especie en peligro de extinción, con una tasa de reproducción sexual muy baja y que además sus poblaciones se han reducido en más de un 80% en tan solo los últimos 30 años, debido a actividades humanas y al blanqueamiento de sus colonias (Biodiversidad Mexicana, 2011).

El presente trabajo es el primero en el área de estudio y la región que registra una caracterización mediante una serie de imágenes, mediciones y análisis estadístico el ciclo reproductivo completo de la gametogénesis en óvulos y espermatozoides de *A. palmata*. Gracias al mismo ahora se tiene conocimiento de las tallas reales de dichos gametos y en que temporalidad se presentan las mismas para la zona de estudio, lo cual es información útil para aquellos que deseen abordar temas valiosos en el área de conservación de esta y otras especies de corales en peligro, temas como la fecundación artificial bajo condiciones controladas con distintos fines, extracción de material genético y toma de muestras de los mismos gametos.

---

Los bancos de germoplasma son sitios de conservación de material biológico por excelencia, cuyo objeto es la conservación de la biodiversidad, son recintos claves para evitar que se pierda la diversidad genética por la presión de factores ambientales, físicos, biológicos y las actividades humanas (Herrera, 2013).

Desastres naturales, inundaciones, sequías, plagas u otras alteraciones constituyen siempre pérdidas irreparables a nivel biológico que no solo afectan al ambiente sino a diversas actividades humanas. Por ello, ahora México a través de la colaboración interinstitucional entre academia, gobierno y representantes de las organizaciones de la sociedad civil cuenta con distintos bancos de germoplasma, entre los cuales se encuentran el Banco de Germoplasma del Maíz en el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), Veracruz; Banco Nacional de Germoplasma Vegetal (Bangev) en la Universidad Autónoma Chapingo, Estado de México; Banco de Germoplasma del Maíz en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Coahuila; Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Jalisco; Depositario Nacional de *Opuntia sp.* (nopal) en la Universidad Autónoma Chapingo, Estado de México y el Banco de Germoplasma del CICY en Yucatán, quien se suma en un esfuerzo de conservación, a esta lista de bancos de germoplasma, los cuales son considerados como refugios para las especies (DICYT, 2012).



---

Sin embargo la mayoría de estos bancos se enfocan en la conservación de semillas, las cuales poseen un valor biológico, histórico, económico, político y social fundamentales para aquilatar debidamente la riqueza biológica de México y su vinculación con los grupos humanos que habitan las diferentes regiones culturales del país; Sin embargo la implementación de bancos de germoplasma de organismos marinos de vital importancia, como las distintas especies de corales que se encuentran amenazadas en nuestro país, a estas áreas de conservación aún es casi nula. La técnica de crio-preservación utilizada en el presente estudio ha demostrado ser efectiva para la conservación de gametos (óvulos y espermatozoides) viables y por consiguiente del germoplasma (información genética) en el coral *A. palmata* y podría ser utilizada en distintas especies de organismos, por lo que los bancos de germoplasma en México deberían considerar seriamente en adoptar esta técnica con el fin de ampliar su espectro en la conservación de especies terrestres y marinas.

---

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- Acropora Biological Review Team. 2005. Atlantic Acropora Status Review Document. Report to National Marine Fisheries Service, Southeast Regional Office. Miami, Fl.152 pp.
- Babcock, R. C., Bull, G. D., Harrison, P. L., Heyward, A. J., Oliver, J. K., Wallace, C. C., y Willis, B. L. 1986. Synchronous spawnings of 105 scleractinian coral species on the Great Barrier Reef. *Mar. Ecol.*, 99:379-394.
- Barnes, R. S. K., y Hughes, R. N. 1988. An introduction to Marine Ecology. Blackwell Scientific publications. 2nd. Edition. 351pp.
- Biodiversidad Mexicana. 2011 [actualizado el 5 de mayo d 2011]. Página Electrónica  
([http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/especies\\_priori/fichas/corales/coralAstaAlce.html](http://www.biodiversidad.gob.mx/especies/especies_priori/fichas/corales/coralAstaAlce.html))
- Bravo, G. N. 2013. La apoptosis inducida por el efecto del estrés genotóxico en la viabilidad de *Acropora palmata*. Tesis de Licenciatura, Universidad Veracruzana, Tuxpan, México.
- Bryant, D., Burke, L., McManus, J.W. y Spalding, M. 1998. Reefs at Risk. A map-based indicator of threats to the world's coral reefs. World Resources Institute. Washington, D. C, USA. 57 pp.
- Bruckner, A. W. 2002. Proceedings of the Caribbean Acropora Workshop: Potential Application of the U.S. Endangered Species Act as a Conservation Strategy. NOAA Technical Memorandum NMFS-OPR-24, Silver Spring, MD. Miami Florida. 199 pp
- Costa, F. C., Sassi, R., Amaral, D. y Fernandez, J. 2004. Population density and photosynthetic pigment content in symbiotic dinoflagellates in the brazillian scleractinian coral *Montastraea cavernosa* (Linnaeus, 1767). *Brazilian Journal of Oceanography*, 2: 93-99.
- Ch. E. M.,. 1981. Ciclo reproductivo, proporción sexual y fecundidad del coral blando *plexaura homomalla* (esper.) en el mar caribe mexicano. (octocoralla: *plexauridae*). Tesis Doctoral. UNAM, México.
- DICYT. 2012 [Actualizado el 1 de marzo de 2012] Página electrónica  
(<http://www.dicyt.com/noticias/un-refugio-para-las-especies-el-banco-de-germoplasma-del-cicy>)

- 
- Giese, A. C. y Pearse, J. S. 1974. Reproduction of Marine Invertebrates. Introduction: General Principles. In: Giese, A. C. y Pearse, J. S. (Eds.). Academic Press Inc. New York. 149 p. Vol. I.
- Goreau, N. I., Goreau, T.J., Hayes, R. L. 1981. Settling, survivorship and spatial aggregation in planulae and juveniles of the coral *Porites porites* (Pallas). Bull Mar Sci 31: 424-435
- Gladfelter, W. B. y Gladfelter E. H. 1978. Fish community structure as a function of habitat structure on West Indian patch reefs. Rev. Biol. Trop. 26 (supl.1): 65-84.
- Grigg, R. W.,- 1970. Ecology and population dynamics of the gorgonians. *Muricea californica*, *M. fruticosa*. Ph. D. Thesis. Univ. of California at San Diego 1970. 261 pp.
- Hagedorn, M., Carter, V., Martorana, K., Malia, K., Acker, J., Iliana, B., Borneman, E. Brittsan, M., Byers M., Henley, M., Laterveer. M., Leong, J., McCarthy, M., Meyers, S., Brian, D., Petersen, D., Tiersch, T., Cuevas, R., Woods, E., Wildt, D. 2012. Preserving and Using Germplasm and Dissociated Embryonic Cells For Conserving Caribbean and Pacific Coral [Actualizado el 8 de marzo de 2012]. página electrónica (<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0033354#pone-0033354-g007>)
- Herrera, G., (Banco de Germoplasma). 2013. [Actualizado el 4 de Noviembre de 2013] página electrónica (<http://www.cicy.mx/Sitios/Germoplasma/>)
- Hughes, R. N. 1989. A functional Biology of Clonal Animals. Capman and Hall. London-New York. 331pp.
- Hughes, T. P, Baird, A. H., Bellwood, D. R., Card, M., Connolly, S. R., Folke, C., Grosberg, R., Hoegh-Guldberg, O., Jackson, J. B. C., Kleypas, J., Lough, J. M., Marshall, P., Nyström, M., Palumbi, S. R., Pandolfi, J. M., Rosen, B. y Roughgarden, J. 2003. Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs. *Science* 301, 929- 933.
- Itzkowitz, M. 1977. Spatial organization of the Jamaican damselfish community. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 28:217-241.
- Jordán-Dahlgren, E. y Rodríguez-Martínez, R. E. 1998. Post-hurricane initial recovery of *Acropora palmata* in two reefs of the Yucatan Peninsula, Mexico.

---

Bull. Mar. Sci. 63:213-228.

Jordán-Dahlgren, E. y Rodríguez-Martínez, R. E. 2003. The Atlantic coral reefs of Mexico. pp 497. En: Latin American Coral Reefs. Cortés, J. (ed.) Elsevier Press, Amsterdam.

Jordán-Dahlgren, E. y Rodríguez-Martínez, R. E. 2004. Coral Diseases in Gulf of México Reefs Cap. 4:105-118. *In:*, Coral health and Disease. Rosenberg, E. y Loya, Y. (ed.). Springer- Verlag. Springer Berlin.

Kenyon, J. C. 1992. Sexual reproduction in Hawaiian *Acropora*. *Coral Reefs*, 11:37-43.

Lirman, D. 1999. Reef fish communities associated with *Acropora palmata*: Relationships to benthic attributes. Bull. Mar. Sci. 65:235-252.

Maruri-Cruz, M. 2009. Evaluación del estado poblacional de *Acropora palmata* (Lamarck, 1816) en el arrecife Enmedio, Tuxpan, Veracruz. Tesis de Licenciatura, Universidad Veracruzana. Tuxpan, Veracruz.

NOM-059-SEMARNAT-2010. 2010.,- Diario Oficial de la Federación.

Padilla, C. y Lara, M. 1996. Efecto del tamaño de las colonias en el crecimiento de *Acropora palmata* en Puerto Morelos, Quintana Roo, México. *Hidrobiológica* 6(1-2): 17-24.

Pech, J.M. 2015. Estadística Inferencial. Universidad Veracruzana. Tuxpan, Ver. 127 pp.

Porter, J. W. 1987. Species profiles: Life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (south Florida) – Reef-building corals. US Fish Wildl Serv Biol Rep 82(11.73), US Army Corp of Engineers, TR EL-82-4, 23 p

R version 3.0.0 (2013-04-03) -- "Masked Marvel" Copyright (C) 2013 The R Foundation for Statistical Computing Platform: i386-w64-mingw32/i386 (32-bit)

Richmond, R. H. 1993. Coral reefs: present problems and future concerns resulting from anthropogenic disturbance. *American Zoologist* 33, 524-536.

- 
- Rodríguez-Martínez, R. E., Banaszak, A. T., y Jordán-Dahlgreen, E. 2001. Necrotic patches affect *Acropora palmata* (Scleractinia: Acroporidae) in the Mexican Caribbean. *Dis. Aquat. Org.* 47:229-234.
- SEMARNAT. 2011. Programa de Acción para la Conservación de las Especies: Corales cuerno de ciervo (*Acropora cervicornis*) y cuerno de alce (*Acropora palmata*). [actualizado el 1 de diciembre de 2011]. Pagina electrónica. [http://www.conanp.gob.mx/pdf\\_especies/PACE%20Acroporas%20-1.pdf](http://www.conanp.gob.mx/pdf_especies/PACE%20Acroporas%20-1.pdf)
- Szmant, A. M. 1986. Reproductive ecology of Caribbean reef corals. *Coral Reefs*, 5:43-53.
- Soong K. y Lang, J. C. 1992. Reproductive integration in coral reefs. *Biol Bull* 183: 418-431.
- Tunell, J. W., Chávez, A. E. y Withers, K. 2010. Arrecifes Coralinos del Sur del Golfo de México. Ed. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Instituto Politécnico Nacional. México. 360 pp.
- Tunnell, J. W. 1992. Natural versus human impacts to Southern Gulf of Mexico coral-reef resources. *Proc. 7th Int. Coral Reef Symp.*, Guam 1: 300-306.
- Veron, Jen. 2000. *Corals of the world Vol. 1.* Australian Institute of Marine Science. Ed. Mary Stafford-Smith. 451 pp.
- Woodley, J. D., Bone, D., Buchan, K., Bush, P., De Meyer, K., Garzón-Ferreira, J. Gayle., P., Gerace., D. T., Grober Dunsmore, R., Kein, E., Koltés, K., Losada, F., McField, M. D., McGrath, T., Mendes, J. M., Nagelkerken, I., Ostrander, G., Pors, L. P. J. J., Rodríguez, A., Rodríguez, R., Ruíz-Rentería, F., Smith, G., Tscirky, J., Alcolado, P., Bonair, K., García, J. R. Galdes, F. X., Guzman, H., Parker, C. y Smith, S. R. 1997. Studies on Caribbean Coral Bleaching 1995-96. *Proc 8th Intl Coral Reef Symp.* Panamá.
- Wallace, C. C. 1985. Reproduction, recruitment and fragmentation in nine sympatric species of the coral genus *Acropora*. *Mar. Biol.*, 88:217-233.
- Wallace, C. C., Babcock, R. C., Harrison, P. L., Oliver, J. K. y Willis, B. L. 1986. Sex on the reef: mass spawning of corals. *Oceanus*, 29:38-42.
- Woodley, J. D., Bone D., Buchan, K., Bush. P., De Meyer, K., Garzón-Ferreira, J. Gayle, P., Gerace, D. T., Grober Dunsmore, R., Kein, E., Koltés, K., Losada, F., McField, M. D., McGrath, T., Mendes, J. M. Nagelkerken, I., Ostrander, G., Pors, L. P. J. J., Rodríguez, A., Rodríguez, R., Ruíz-Rentería, F., Smith, G., Tscirky, J., Alcolado, P., Bonair, K., García, J. R. Galdes, F. X., Guzman, H.,

---

Parker, C. y Smith, S. R. 1997. Studies on Caribbean Coral Bleaching 1995-96. Proc 8th Intl Coral Reef Symp 1: 673-678. Panamá 1996.

## **X. ANEXOS**

### **9.1 Protocolo de desmineralización**

Se utiliza ácido acético Glacial  $\text{CH}_3\text{COOH}$  al 10 %, su preparación es de la siguiente manera:

- 100 ml de  $\text{CH}_3\text{COOH}$
- 900 ml de Agua destilada

Se mezclan ambos líquidos y se obtiene ácido acético al 10%

- Los corales se colocan en 500 ml de este ácido para cada dos muestras de aproximadamente 2 cm<sup>2</sup>.
- Se dejan reposar durante 24 horas, una vez transcurrido el tiempo se reemplaza todo el ácido acético para una desmineralización total y se mantienen las muestras en este ácido por 4 horas más.
- una vez que se obtiene el tejido totalmente desmineralizado se coloca en formol al 4% para fijarlo o se procede directamente al método de inclusión en parafina.

---

## 9.2 Protocolo para la inclusión en parafina.

Con el tejido previamente fijado y descalcificado se procede a lo siguiente:

- se enjuaga cada una de las muestras con agua destilada por 5 minutos
- se colocan en alcohol al 50% durante una hora
- se colocan en alcohol al 70% durante una hora
- se colocan en alcohol absoluto (etanol) durante una hora
- se colocan en una solución 1:1 de alcohol- xileno durante una hora
- se coloca en xileno puro durante una hora, mientras transcurre esta ultima hora se calienta la parafina en una parrilla a 60°C hasta quedar totalmente liquida, lo cual ocurre en aproximadamente una hora
- Se pasan a una solución 1:1 de Xileno - Parafina durante una hora en una incubadora a una temperatura de 60°C
- Se pasan a una solución 1:2 de Xileno – Parafina durante una hora en una incubadora a una temperatura de 60°C.
- Se colocan en Parafina pura y se colocan en una incubadora a una temperatura de 60°C y se dejan reposar durante 12 horas.
- Se colocan en los moldes para el micrótomo para cortes en parafina

- 
- Se montan las muestras en las rejillas según el tipo de cortes que se deseen obtener y se procede a realizar los cortes.

### **9.3 Protocolo para realizar los cortes histológicos en un micrótomo LEICA RM2125RTS para cortes en parafina**

Con las muestras previamente preparadas mediante el método de inclusión en parafina se procede a lo siguiente:

- Se montan las muestras en las rejillas con la ayuda de un encendedor que permita derretir la parafina hasta que la muestra queda totalmente adherida a la rejilla y no se desprenda a la hora de realizar los cortes.
- Con las muestras bien adheridas se proceden a realizar los primeros cortes hasta obtener muestras resistentes y sin romperse.
- Los cortes se realizaron en 3 secciones de cada una de las muestras: la parte inicial, la parte central y la parte final obteniendo por lo menos 3 muestras de cada una de esas partes, con un total de 9 muestras de cortes por cada muestra de cada colonia. Se obtuvieron un total de 135 muestras de cortes histológicos.
- Cuando se considera que un corte es apto para su conservación se coloca con mucho cuidado y con la ayuda de un pincel en un recipiente con agua de la llave a una temperatura de 55°C con la



---

finalidad de que la muestra quede lo más estirada posible y su observación será más fácil.

- Con la ayuda de un porta objetos previamente recubierto con poli-L-isina, para que las muestras se adhieran con facilidad se recoge la muestra del agua
- Una vez obtenidos los cortes histológicos en nuestros porta objetos se procede a la tinción hematoxilina - eosina

#### **9.4 Protocolo para la tinción hematoxilina - eosina**

Procedimiento:

- Desparafinar las muestras por medio de Xileno durante 20 minutos
- Colocar en alcohol absoluto (etanol) durante 10 minutos
- Sumergir los portaobjetos en Hematoxilina durante 3-5 minutos
- Lavar con agua de la llave 2 veces por 5 minutos
- Deshidratar en etanol al 50% durante 3 minutos
- Deshidratar en etanol al 70% durante 3 minutos
- Sumergir los porta objetos en Eosina durante 15 segundos
- Deshidratar en alcohol absoluto durante 3 minutos
- Aclarar en xileno al 100% durante 5 minutos
- Montaje final con el cubre objetos por medio de resina

---

## 9.5 Toma de imágenes

Para la toma de imágenes de los cortes histológicos en parafina teñidos con hematoxilina-eosina que se muestran en el presente trabajo se utilizó una cámara “Canon Power Shot A490” de 10 Mpx y se examinaron las muestras en un microscopio compuesto “Nikon eclipse E100” de la siguiente manera:

- Se examinaron cada una de las muestras teñidas; esto se hizo por orden de meses, primero las de febrero hasta llegar al mes de junio.
- Se buscaron encontrar gametos tanto femeninos como masculinos a saber óvulos o sacos de óvulos y espermatozoides o espermarios en las muestras.
- Cuando se encontraron dichos gametos se procedió a analizarlos con las distintas lentes con las que el microscopio cuenta: 4X, 10X y 40X, esta última lente resultó ser la mejor de todas para obtener imágenes nítidas que se requerían por lo que el uso del aumento 100X con aceite de inmersión no fue necesaria.
- Con los gametos identificados se procedió a la captura de imágenes a diferentes aumentos y posteriormente al análisis de datos y su interpretación.



Director de tesis

Dr. Rodrigo Cuervo González

