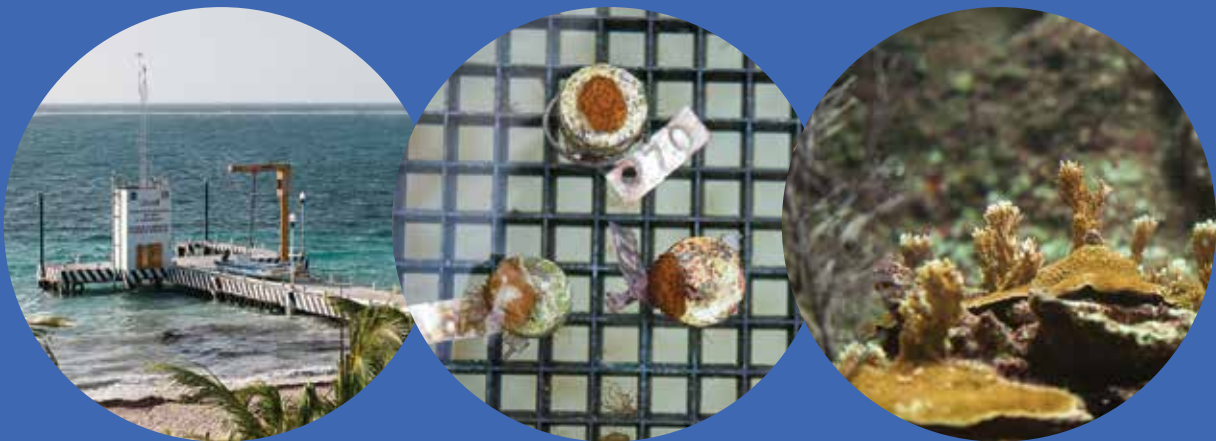


Guía práctica para la restauración con base en la producción de reclutas sexuales de corales con énfasis en *Acropora palmata*



Anastazia T. Banaszak

Miriam Schutter • Sergio D. Guendulain García

Sandra Mendoza Quiroz • Kelly Gómez Campo

Guía práctica para la restauración con base en la producción de reclutas sexuales de corales con énfasis en *Acropora palmata*

Anastazia T. Banaszak¹

Miriam Schutter^{1,2}

Sergio D. Guendulain García^{1,3}

Sandra Mendoza Quiroz^{1,3,4}

Kelly Gómez Campo^{3,5}

¹ Unidad Académica de Sistemas Arrecifales, Puerto Morelos, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México

² Dirección actual: Future4Reefs, Driemaster 26, 3904RL, Veenendaal, The Netherlands

³ Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México

⁴ Dirección actual: SECORE International

⁵ Dirección actual: Pennsylvania State University, 409 Mueller, University Park, PA, USA



ESTE MANUAL SE PREPARÓ CON EL APOYO DE LA
ALIANZA WWF-FUNDACIÓN CARLOS SLIM

DEDICATORIA

Al dream team: gracias por todo su apoyo y motivación. Sin ustedes no hubiera sido posible los avances que hemos logrado juntos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dra. Alina Szmant por enseñarnos sobre el cuidado de los primeros pasos de la reproducción de corales y a los Doctores Eugenio Carpizo Ituarte, Pedro Medina Rosas, y Daniel Gleason quienes han apoyado en impartir el curso “De la reproducción de corales a la restauración de arrecifes”.

Agradecemos a todos los alumnos, estudiantes, voluntarios y colaboradores quienes han apoyado en el trabajo de campo o en el laboratorio en los últimos 11 años.

Agradecemos el apoyo financiero de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMYL), del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con proyectos Núm. 153260, Núm. 268930 y Núm. 247765, de la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP) con proyectos Núm. PROCER/PNAPM02/01/2014 Concepto 9.2, Núm. PROCER/PNAPM02/01/2015 Concepto 9.4 y Núm. PROCER/PNAPM02/01/2016 Concepto 9.22 así como la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) con proyecto Núm. JA009, Proyecto Alianza del World Wildlife Fund – Fundación Carlos Slim, Experiencias Xcaret y SECORE International.

Agradecemos al personal del Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos, del Acuario de Experiencias Xcaret y a SECORE International por su valioso apoyo.

I. OBJETIVO Y ALCANCE DE ESTA GUÍA	9
II. ESTRATEGIAS PARA LA RESTAURACIÓN DE ARRECIFES	10
1. Introducción	
1.1. Restauración o recuperación de arrecifes	
1.2. ¿Por qué el enfoque en <i>Acropora palmata</i> ?	
1.3. Biología reproductiva: reproducción sexual y asexual	
1.4. Restauración y reclutas sexuales	
III.- RECLUTAS SEXUALES: DEL ARRECIFE AL LABORATORIO	16
2. Los preparativos para desove	
2.1. Permiso de recolecta	
2.2. Requerimientos básicos del área de trabajo	
2.3. Redes de recolecta	
2.4. Estimación de los días del desove	
3. Desove y recolecta de gametos	
3.1. Reunión de trabajo	
3.2. Trabajo de campo	
3.3. Otras estrategias para recolectar gametos de corales	
3.4. Registro de observaciones de campo	
3.5. Fertilización asistida	
3.6. Limpieza de óvulos	
4. Desarrollo embrionario: asistencia y cuidados	
4.1. Cuidado de los embriones	
4.2. Asentamiento	
4.3. Tomar una decisión: introducción o cultivo	

3	5. Cultivo de reclutas en sistemas de acuarios	
	5.1. Condiciones para el cultivo	
	5.2. Alimentación	
4	IV.- RECLUTAS SEXUALES: DEL LABORATORIO AL ARRECIFE	36
	6. Viveros Marinos	
	6.1. Traslado de reclutas y colonias juveniles al vivero	
	6.2. Monitoreo y mantenimiento	
	6.3. Trasplante de colonias juveniles al arrecife	
	7. Siembra directa	
	7.1. Selección del sitio para la siembra directa	
	7.2. Siembra asistida	
	7.3. Monitoreo	
5	V.- CASO DE ESTUDIO	42
	8.1. Selección del sitio de siembra	
	8.2. Siembra de tetrápodos	
	8.3. Monitoreo	
6	VI.-REFERENCIAS & ANEXOS	46
	Referencias	
	Anexo I. Elaboración de red para recolecta	
	Anexo II. Detección temprana de gametos	
	Anexo III. Formato para observaciones de desove en campo	
	Anexo IV. Extracción de simbiosntes e inoculación	
	Anexo V. Formato para el monitoreo de reclutas	
	Anexo VI. Glosario	
	Anexo VII. Créditos Fotográficos	

I. OBJETIVO Y ALCANCE DE ESTA GUÍA

La presente es una guía práctica que proporciona información sobre la producción y el uso de reclutas sexuales de coral para realizar restauración de arrecifes. Esta guía está dirigida a personas interesadas y /o involucradas en la restauración de arrecifes y reúne un compilado de experiencias adquiridas a lo largo de diez años por parte del equipo de trabajo bajo la responsabilidad de la Dra. Anastazia T. Banaszak en la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Durante este tiempo, se han desarrollado e implementado técnicas para la producción de reclutas sexuales de *Acropora palmata*, *Orbicella* (antes conocida como *Montastraea*) *faveolata*, *Diploria labyrinthiformis* y *Favia fragum*, empleando materiales y métodos de bajo costo y fácil acceso. Los logros obtenidos han sido gracias a la colaboración con diversas personas e instituciones nacionales e internacionales interesadas en la ecología y biología reproductiva de corales.

Aunque este protocolo se enfoca en *Acropora palmata*, que es una especie clave constructora de arrecifes en el Caribe Mexicano, provee información y herramientas que facilitan la aplicación de las técnicas en otras especies y regiones.

La información presentada, se encuentra dividida en las siguientes secciones:

- Introducción a los conceptos básicos sobre la restauración (sección II).
- Una descripción de los preparativos para el desove, la recolecta de gametos y los requerimientos para el cuidado de los corales durante las etapas tempranas del ciclo de vida (sección III).
- Estrategias de restauración con reclutas sexuales; con una etapa en un vivero marino o por siembra directa (sección IV).
- Un caso de estudio de la siembra directa (sección V).
- Un anexo con protocolos y un glosario.

9

1. INTRODUCCIÓN

1.1. RESTAURACIÓN O RECUPERACIÓN DE ARRECIFES

El término “restauración” hace referencia al proceso de asistir la recuperación de un ecosistema que ha sufrido algún proceso de degradación o daño y que evidencia un cambio respecto a la composición de especies, estructura de la comunidad, funciones ecológicas e idoneidad del ambiente físico para sostener la biota (Edwards 2010) (Figura 1). Esta asistencia puede incluir acciones pasivas o indirectas y acciones activas o directas. Las primeras involucran acciones de manejo para el control de actividades humanas que están afectando el ecosistema e impidiendo los procesos naturales de recuperación (p.ej. aguas contaminadas” entrando en las zonas de influencia de los arrecifes); mientras que las segundas involucran la intervención humana para iniciar o acelerar la recuperación física y/o biológica del ecosistema (p.ej. la crianza de corales), es decir; cuando la capacidad natural de recuperación del ecosistema está seriamente limitada, es necesario implementar otras acciones de manejo orientadas al mantenimiento y recuperación de condiciones ambientales aceptables antes de realizar cualquier intervención para que las medidas tomadas tengan alguna probabilidad de éxito (Edwards 2010).

La restauración en ambientes marinos es una estrategia derivada de técnicas de reforestación en ecosistemas terrestres. Debido a las analogías estructu-

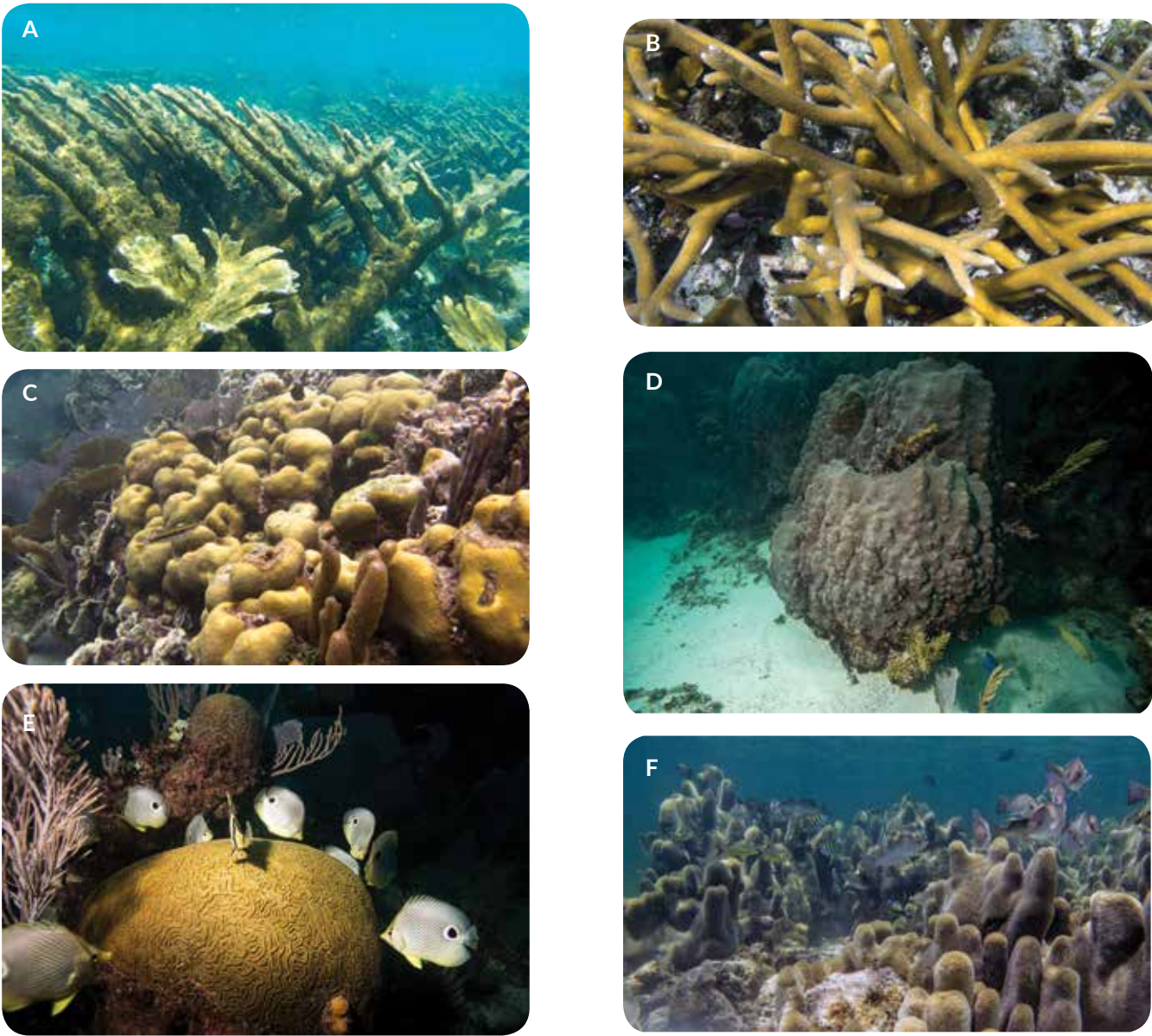
FIGURA 1. Imágenes de un arrecife degradado (izquierda) y saludable (derecha), representando las posibles rutas ante la presión de tensesores (proceso de degradación) y ante la intervención humana para acelerar su recuperación (proceso de restauración).



rales y funcionales entre bosques y arrecifes coralinos, los conceptos para la restauración de ecosistemas terrestres se han venido adaptando en el ámbito marino. La restauración de arrecifes coralinos surgió ante la creciente degradación del ecosistema, donde las medidas de restauración pasiva no han tenido la efectividad esperada (Rodríguez-Martínez *et al.* 2014).

Dada la dificultad de devolver la funcionalidad del arrecife coralino degradado de manera natural, se han implementado técnicas para la restauración activa de especies clave; una aproximación más realista hacia la conservación del ecosistema coralino (Figura 2).

FIGURA 2. Algunas especies formadoras de arrecifes que se encuentran en la lista roja de especies amenazadas (IUCN, 2014). (A) *Acropora palmata*, (B) *A. cervicornis*, (C) *Orbicella annularis*, (D) *O. faveolata*, (E) *Diploria labyrinthiformis*, (F) *Dendrogyra cylindrus*.



1.2. ¿POR QUÉ EL ENFOQUE EN ACROPORA PALMATA?

Restringida a la región del Gran Caribe (Figura 3), esta especie forma colonias ramificadas en ambientes someros de alta energía. Es uno de los corales formadores de arrecifes más importantes, por su alta tasa de crecimiento (hasta 10 cm por año; Gladfelter *et al.* 1978), altas tasas de acreción (7-15 kg $\text{CaCO}_3 \text{ m}^{-3}$ por año; Gladfelter y Gladfelter 1979) y altas tasas de fijación de carbono (fijación neta de 84-109 mg C por día; Bythell 1988). Además, proporciona hábitat para una gran cantidad de especies de invertebrados y peces (Figura 4A, Gladfelter y Gladfelter 1978), algunas de ellas de importante valor pesquero; además de proteger las costas al disipar eficientemente la energía del oleaje propia de su hábitat (Williams *et al.* 1999, Aronson y Precht 2001b). En una meta-análisis Ferreiro *et al.* (2014) mostraron que los arrecifes coralinos proveen protección reduciendo la energía del oleaje en un 97%. Sólo la cresta arrecifal reduce la mayoría de esta energía (86%).

Las poblaciones de *A. palmata* han sufrido un declive regional, atribuido principalmente a su susceptibilidad a síndromes blancos como la banda blanca (Figura 4B, Gladfelter 1982, Aronson y Precht 2001a) y perturbaciones físicas como tormentas y huracanes. Pérdidas de hasta un 95% en la cobertura del tejido coralino (Figura 4C) en algunas zonas han alarmado a diferentes grupos, teniendo en cuenta que en los registros geológicos no hay evidencia de un suceso semejante (Gladfelter 1982, Porter *et al.* 1982, Hu-

FIGURA 3. Rango de distribución de *Acropora palmata*. (●) Registros del Sistema de Información Biogeográfica del Océano (OBIS 2015, modificado por M. Schutter).



bbard *et al.* 1993, Jaap y Sargent 1993, Hughes 1994, Aronson y Precht 1997, Aronson *et al.* 2002, Bruckner *et al.* 2002, Miller *et al.* 2002, Weil *et al.* 2002).

La extensa mortalidad de *A. palmata* es sin duda un fenómeno trascendental a gran escala que genera incertidumbre sobre sus consecuencias ecológicas en el mediano y largo plazo. Ante esta problemática se han creado diferentes normas de uso y protección de la especie; así mismo, se han generado propuestas para seguir lineamientos de investigación que permitan la recuperación y mantenimiento de las poblaciones en su rango de distribución (Figura 5).

1.3. BIOLOGÍA REPRODUCTIVA: REPRODUCCIÓN SEXUAL Y ASEXUAL

En los corales, la plasticidad morfológica representa un importante valor adaptativo; las colonias grandes y masivas presentan una mayor resistencia a disturbios físicos y biológicos, implicando una longevidad. Las morfologías ramificadas, como *A. palmata*, pueden presentar una mayor extensión en la cobertura de áreas arrecifales, pero son más susceptibles a disturbios físicos. Aunque las tasas de reclutamiento sexual en corales son bajas, la habilidad para persistir como especie, tanto de las formas masivas con tasas de crecimiento bajas, como de los corales ramificados con tasas de crecimiento altas, depende del éxito de la reproducción sexual (Szmant 1986).

El coral *A. palmata* presenta reproducción asexual por fragmentación, por la cual se generan reclutas clonales de una colonia madre fragmentada. La especie también presenta reproducción sexual. Cada colonia posee la capacidad de producir óvulos y espermatozoides,

FIGURA 4. *Acropora palmata* proporciona hábitat para otras especies, contribuyendo a la biodiversidad en los sistemas arrecifales. (A) Ambiente típico de la especie, (B) síndrome blanco (caracterizado por un borde de tejido de coral sin simbioses) y (C) pérdida de cobertura viva.

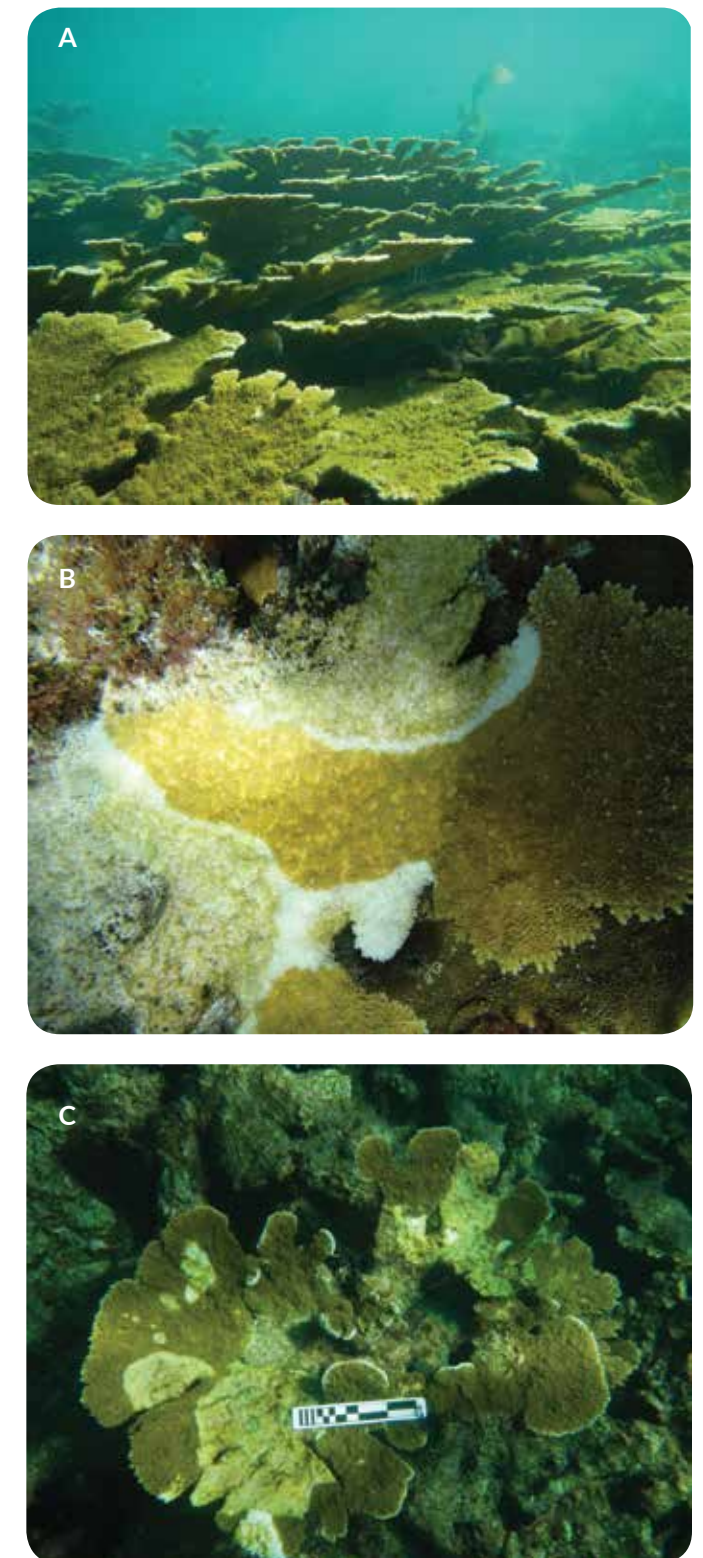
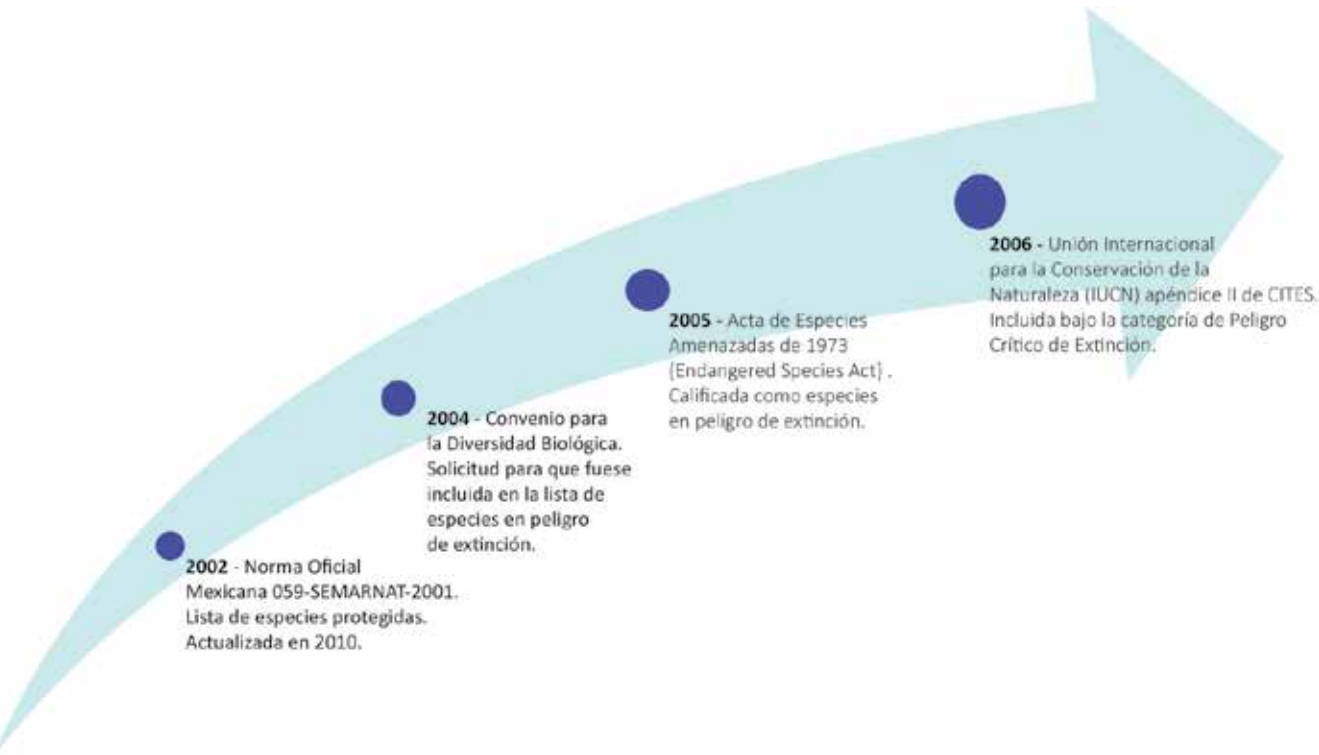


FIGURA 5. Algunas acciones legislativas creadas para la protección de la especie.



por lo que es considerada hermafrodita; anualmente se da un proceso de gametogénesis donde se desarrollan los oocitos (precursores de los óvulos) y los espermátides (precursores de los espermatozoides) (Szmant 1986). Una vez maduros los espermatozoides y óvulos forman pequeños paquetes esféricos que son liberados por las bocas de los pólipos de coral. No es posible la autofecundación en *A. palmata* (Hagedorn *et al.* 2012). Los paquetes de gametos suben lentamente a la superficie del agua debido a que contienen altas concentraciones de lípidos. En la superficie del mar, los paquetes se disgregan, por el movimiento de las olas y se combinan con gametos provenientes de otras colonias. El desarrollo embrionario y el estadio larval duran de 5 a 14 días, tiempo en el que ocurre una gran dispersión. Finalizado este periodo, se inicia el asentamiento larval; las larvas buscan un sustrato favorable al cual adherirse formando mediante metamorfosis un nuevo pólipo de coral (Szmant 1986) (Figura 6).

1.4. RESTAURACIÓN Y RECLUTAS SEXUALES

Las colonias de coral están formadas por módulos (ramets) capaces de sobrevivir independientes o en pequeños grupos. La suma de todos los ramets que derivan de un solo cigoto constituye el genet del coral. Así, un genotipo

CICLO DE VIDA DE ACROPORTA PALMATA



(genet) puede ocurrir varias veces (ramets) en una población solo como resultado de la fragmentación (Baums *et al.* 2006). La dinámica poblacional de varios corales formadores de arrecifes en el Caribe está determinada por la formación y mortalidad de ramets, ya que el reclutamiento de nuevos genets por medio del reclutamiento sexual de la larva plánula es limitado (Lirman 2000).

De forma general, las técnicas propuestas para la restauración de *A. palmata*, han girado en torno al uso de ramets y genets. La producción de ramets o clones se realiza fragmentando n-veces un genet conocido como colonia madre y se crían en acuarios, o *in situ* en lugares previamente establecidos conocidos comúnmente como viveros marinos. En ambos casos

FIGURA 6. Ciclo de vida de *A. palmata* que tiene dos etapas distintas: una sésil como coral adherido al sustrato y la otra etapa pelágica, que permite a la especie migrar y ocupar nuevos sitios.

III. RECLUTAS SEXUALES: DEL ARRECIFE AL LABORATORIO

2. LOS PREPARATIVOS PARA EL DESOVE

2.1. PERMISO DE RECOLECTA

Antes de planear o realizar cualquier actividad, es indispensable contar con los permisos de recolecta expedidos por las entidades pertinentes. En el caso particular de México los permisos para recolecta de especies listadas en la NOM-059 son otorgados por la Dirección General de Vida Silvestre de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Recordemos que en el Caribe Mexicano, *A. palmata* ha sido incluida en el listado dentro de la Norma oficial Mexicana NOM-059 (SEMARNAT 2010) como especie con protección especial, por lo que es muy importante que todos los participantes tengan conocimiento de la normativa. En el caso de las especies de coral no listadas en la NOM-059, la autoridad encargada es la Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca de SAGARPA y se debe de pedir permiso de Pesca de Fomento a través de la Dirección General de Ordenamiento Pesquero y Acuícola.

los fragmentos son adheridos artificialmente a bases y una vez pasado un periodo de recuperación, se trasplantan en el arrecife. Este método modifica la estructura clonal (al incrementar el número de clones) de la población y la distribución espacial natural de ramets en las poblaciones naturales, con consecuencias evolutivas desconocidas.

La restauración por medio de genets se logra mediante la colecta de gametos de muchas colonias, la fertilización, el desarrollo embrionario, la etapa larval y el asentamiento. El uso de corales provenientes de la reproducción sexual tiene tres ventajas principales sobre las técnicas que emplean corales provenientes de la fragmentación. En primer lugar, no hay necesidad de fragmentar colonias, lo que reduce el daño colateral en los arrecifes y colonias donantes; en segundo lugar, los corales producidos sexualmente no son clones, lo que incrementa la diversidad genética de los corales a trasplantar con resultados a largo plazo exitosos en términos de conservación de stocks genéticos de las poblaciones donantes. En tercer lugar, es posible obtener altos niveles de fertilización y asentamiento.

2.2. REQUERIMIENTOS BÁSICOS DEL ÁREA DE TRABAJO

Es fundamental contar con los requerimientos necesarios para el cuidado de corales en las primeras etapas de su desarrollo, pues es en este punto donde los organismos son más vulnerables. De manera general, son tres los requerimientos básicos con los que debe contar el área de trabajo: estaciones de trabajo, incubadoras y agua de mar filtrada.

El agua de mar es utilizada para la limpieza y el mantenimiento de corales, desde las primeras etapas de desarrollo hasta el asentamiento. Antes de usarla, el agua mar se debe filtrar a través de filtros de cartuchos de 20, 5 y 1 μm (tamaño de poro) colocados en serie y si es posible, a través de un filtro de UV (radiación ultravioleta) para finalmente ser almacenada a 28° C en un reservorio para su uso futuro (Figura 7). El agua en este sistema no se debe almacenar durante más de un par de días. Para evitar la obstrucción de los filtros y la descomposición de materia orgánica, estos se deben reemplazar y limpiar cada dos días.

Las estaciones de trabajo, son lugares preestablecidos para la manipulación de embriones y larvas. Estas deberán contar con distintos implementos que ayuden en la limpieza; mangueras de distintos calibres (0.6 – 15 mm de diámetro), pipetas de transferencia de plástico, pipetas Pasteur de vidrio, recipientes de distintos volúmenes (transparentes y con bordes lisos), cintas para marcar, marcadores, filtros de 100 y 200 μm (estos se pueden elaborar

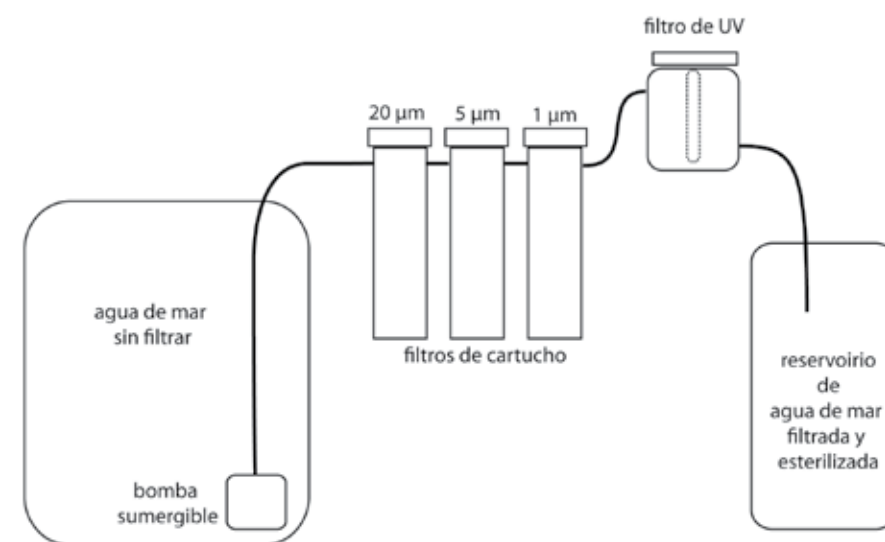


FIGURA 7. Esquema general de un sistema de filtración de agua del mar. Este sistema usa una bomba sumergible que bombea el agua desde el reservorio con agua de mar sin filtrar a los filtros de 20, 5 y 1 μm y el filtro de UV hasta el reservorio para agua de mar filtrada (La capacidad de la bomba sumergible debe coincidir con las especificaciones del filtro de UV).

FIGURA 8. Materiales en las estaciones de trabajo.



con tubos de PVC y mallas), además de jarras separadoras de grasa (“fat separators”), utilizadas en la cocina para separar las grasas de alimentos líquidos (Figura 8). Se recomienda usar recipientes transparentes para poder visualizar los gametos y embriones. Los bordes de los recipientes deben ser lisos para evitar dañar a los gametos y embriones.

En las incubadoras es donde se mantendrán a los corales durante todo su desarrollo, consisten en cajas de plástico de paredes lisas con capacidad de 90 l (aprox.). Para facilitar el drenado, se colocan válvulas en el fondo (Figura 9).

Durante las primeras fases de desarrollo la mortalidad es particularmente alta, por lo cual los cuidados son importantes y los materiales que se utilicen para el mantenimiento de los organismos deben ser lavados con abundante agua y enjuagados con agua de mar filtrada; no se debe de utilizar jabón, pues es nocivo para los embriones y larvas. Así mismo, cualquier pegamento que se utilice para la fabricación de las incubadoras o filtros, uniones de PVC etc., debe ser enjuagado con abundante agua de mar por 24 horas ya que estos pegamentos suelen ser altamente tóxicos.

2.3. REDES DE RECOLECTA

Las redes de recolecta de gametos pueden variar de tamaño así como en el diseño, no obstante todas comparten un plano general (Figura 10A, Ane-

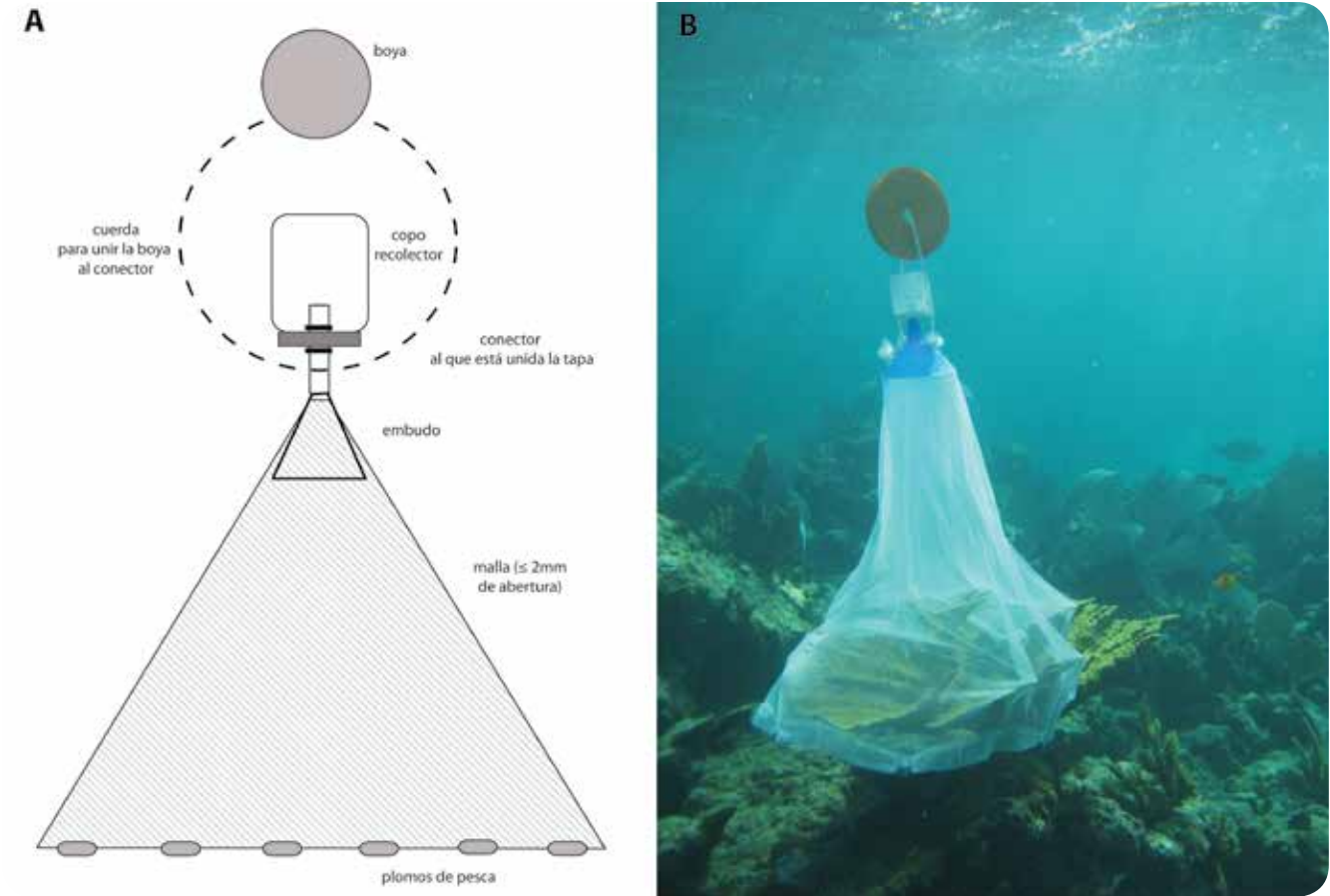
FIGURA 9. Incubadoras para el cultivo de corales en las etapas tempranas de desarrollo.



xo I Elaboración de red para recolecta); están conformadas por una malla (no mayor a 2mm de abertura para evitar pérdida de gametos) en forma de cono, la cual termina en un copo recolector. Este sistema es puesto en vertical por una boya (Figura 10B). El tamaño de la red dependerá de la talla de la colonia objetivo; sin embargo, es recomendable trabajar con redes de tamaño medio (1.5 m de alto y 90 cm de diámetro de la base), pues son prácticas en espacios reducidos tal como los que ocurren en las poblaciones de *A. palmata*.

Comúnmente, la red usa unos plomos en la base para proporcionarle estabilidad, no obstante, en condiciones de corriente alta, no presentan un “agarre” que podría dañar a la colonia, por lo que los plomos se pueden reemplazar por una cinta ajustable en la base de la red, de tal forma que la red se pueda “atar a la colonia”. El copo recolector, es un frasco invertido con rosca, el tamaño debe ser adecuado (de 200 a 250 ml) para poder manejarlo con comodidad (Figura 10). Se recomienda que los copos tengan paredes lisas para evitar dañar los gametos.

FIGURA 10. Red de recolecta de gametos de *A. palmata*. (A) Esquema general (B) Red sobre una colonia de *A. palmata*, notar que no toda la colonia está cubierta con la red.

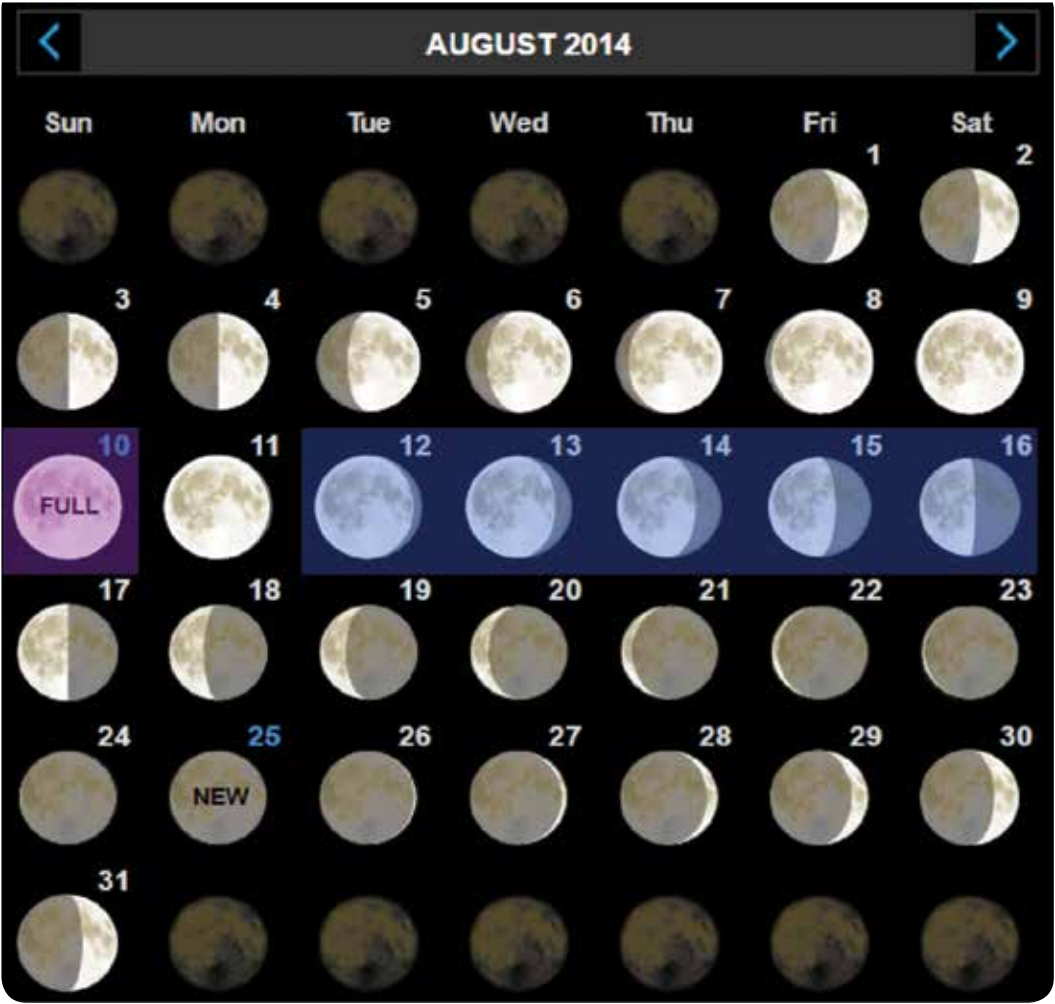


2.4. ESTIMACIÓN DE LOS DÍAS DEL DESOVE

El desove coralino de las especies de *Acropora* y *Orbicella* depende de la luna llena en los últimos meses del verano. Las predicciones de las fases lunares se encuentran disponibles en varios sitios en línea (Figura 11). Se debe asegurar que al buscar las fechas de la luna llena se adecua al sitio de desove y se toma en cuenta el horario para determinar la fecha correcta de la luna llena.

Según registros previos, *Acropora palmata* desova entre 2 y 5 noches después de la luna llena durante el verano (principalmente agosto, ocasionalmente en julio). El desove sucede aproximadamente dos horas posteriores al atardecer. Si se presentan dos lunas llenas durante el mismo mes (la segunda luna del mes conocida como “luna azul”), es posible que el desove ocurra en el mismo sitio durante ciclos lunares consecutivos. Se puede realizar una detección temprana de la presencia de oocitos, sin embargo ésta requiere acciones invasivas (ver Anexo II: Detección temprana de gametos).

FIGURA 11. Fase lunar durante el mes de agosto 2014 para la estimación de las posibles fechas de desove de *Acropora palmata*. En amarillo: luna llena; en verde: 2 a 8 noches después de la luna llena.



3. DESOVE Y RECOLECTA DE GAMETOS

3.1. REUNIÓN DE TRABAJO

Previo a las salidas de campo para la recolecta de gametos, se realiza una reunión del grupo involucrado donde se discute el plan de trabajo, se designan equipos y tareas correspondientes. Los involucrados en el trabajo de campo durante el desove, deben comprender los procedimientos que esta actividad conlleva tales como la forma de utilizar las redes de recolecta, así como el manejo de los copos recolectores. Trabajar con colonias de *A. palmata*, particularmente durante la noche requiere contar con buzos con experiencia, para evitar cualquier daño a las colonias. La estrategia de trabajo podría cambiar dependiendo del clima y las experiencias de los participantes, esta se debe discutir cada día para identificar los errores cometidos y mejorarlos para la siguiente salida de campo.

3.2. TRABAJO DE CAMPO

Realizar un reconocimiento previo al desove del sitio de trabajo durante el día, facilita la ubicación de las colonias objetivo, así como las maniobras de anclaje.

La organización de los grupos de trabajo depende tanto del número de personas así como de la experiencia de los participantes. Sin embargo, el equipo básico de trabajo en campo, puede constar de: dos buzos, encargados de colocar y quitar las redes, monitorear el desove y cambiar los copos recolectores. Dos personas en buceo libre como apoyo en superficie las cuales asisten a los buzos y transportan los copos recolectores a la embarcación. Una persona en la embarcación encargada de realizar la fecundación asistida (ver sección 3.5).

Una vez en el sitio, las redes de recolecta se organizan y se distribuyen en un parche de arena o pasto (Figura 12A). Posteriormente, los buzos colocan las redes sobre las colonias de *A. palmata* sin lastimarlas o romperlas (Figura 12B). No es necesario abarcar toda la colonia con la red, sobre todo si esto compromete la forma cónica de la red, pues los paquetes de gametos se podrían atascar en la red en lugar de ascender al copo recolector, donde se

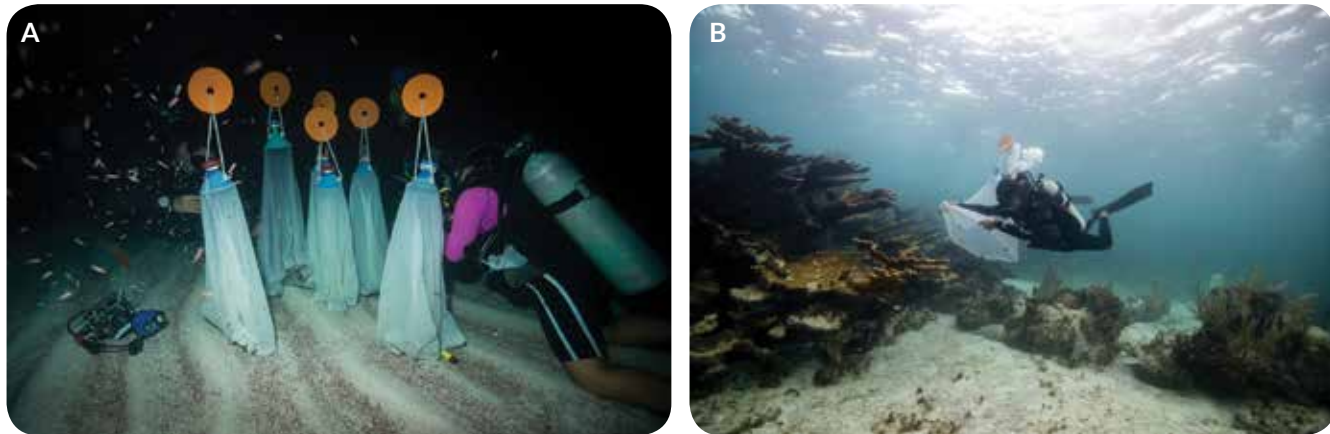


FIGURA 12. (A) Redes de recolecta distribuidas sobre un parche de arena. (B) Buzo colocando red sobre colonia de *A. palmata*.

rompen los paquetes y salen de la red. Si existe mucha corriente se pueden colocar las redes de recolecta una vez se observe el “setting” en preparación para el desove.

Alrededor de las 21:00 a 21:30 h es posible reconocer lo que en inglés se ha denominado el “setting”, es la etapa previa al desove y puede durar de minutos a una hora. Durante este tiempo se puede observar a los paquetes de gametos como pequeñas esferas rosas o naranjas en las bocas de los pólipos. Debido al tamaño de los pólipos no siempre es fácil distinguir esta etapa, no obstante la característica más evidente es una serie de puntos rosas en el centro de los pólipos (Figura 13).

Generalmente el desove ocurre de forma sincrónica en las colonias, pudiendo durar 20 minutos como mínimo, sin embargo, puede tardar hasta una hora. Los paquetes de gametos poseen una flotabilidad positiva, por lo que una vez liberados, tienden a subir por las paredes de la red y acumularse en el copo recolector. Los buzos deben reemplazar los copos una vez que estos tengan una cantidad suficiente de paquetes (relación de 1:10 entre el volumen de paquetes y el volumen del frasco (Figura 14), o transcurridos 10 minutos (aprox.) pues los paquetes pueden romperse liberando los ovulos y espermatozoides, con lo que se dificulta la fecundación asistida en la embarcación debido a la dilución del esperma.

Durante el buceo, es importante no iluminar directamente el copo recolector para evitar atraer depredadores con fototactismo positivo ya que pueden alimentarse de los paquetes de gametos.

FIGURA 13. Pólipos con la presencia de paquetes de gametos en la zona aboral (“setting”).



Las personas de apoyo en superficie (buceo libre) deberán estar pendientes del cambio de los copos recolectores; una vez retirado el copo recolector, los buzos lo entregarán a la persona de apoyo, esta a su vez proporcionará un repuesto por si la colonia continua desovando y transportará los copos colectores con paquetes a la embarcación (a la brevedad posible), evitando agitar los contenedores durante el traslado para prevenir la ruptura de los paquetes de gametos.

Materiales para el trabajo de campo

- Redes de recolecta
- Tapas para los copos colectores; tres por cada red de recolecta
- Hoja para anotar las observaciones de desove

Equipo de seguridad para buceo nocturno

- Linterna de buceo para los buzos y personas de apoyo
- Luces de identificación (cialums) para los buzos, personas de apoyo y redes

3.3. OTRAS ESTRATEGIAS PARA RECOLECTAR GAMETOS DE CORALES

El uso de redes cónicas para la recolecta de gametos es uno de los métodos más frecuentes, sin embargo es posible utilizar redes de arrastre en superficie una vez ocurrido el desove, no obstante, es necesario que ocurra un desove grande y el trabajo de limpieza post recolecta es mayor. Así mismo, unos días previos al desove es posible recolectar partes de las colonias y mantenerlas en acuarios para obtener gametos, sin embargo, al ser una práctica muy invasiva, esta es cada vez menos popular, además que debido al estrés provocado por la fragmentación, la colonia puede no desovar o bien desovar de manera prematura.

3.4. REGISTRO DE OBSERVACIONES DE CAMPO

Es importante realizar anotaciones de las observaciones durante los eventos de desove, como las condiciones de las colonias y el ambiente. Estos datos complementan la comprensión de la biología reproductiva de los corales

FIGURA 14. Cantidad aproximada de paquetes de gametos para reemplazar el copo recolector.



Los paquetes de gametos (<2mm) que contienen espermatozoides y óvulos (24-48 óvulos por paquete) son expulsados por los pólipos y debido a la alta concentración de lípidos tienden a flotar hacia la superficie del agua (Arai *et al.* 1993; Vermeij *et al.* 2006), donde finalmente se disgregan (entre 10-40 min) para que ocurra la fecundación (Sánchez *et al.* 1999).

y ayuda a la toma de decisiones para futuros desoves (ver formato sugerido en el Anexo III). Las observaciones de desove en el gran Caribe están siendo compartidas en el grupo de Facebook “CORAL SPAWNING RESEARCH” administrada por la Dra. Nicole Fogarty. Ahí se pueden compartir observaciones, además de aprender de las observaciones de otros grupos de trabajo, en otras áreas.

3. 5. FERTILIZACIÓN ASISTIDA

La fertilización asistida consiste en facilitar que los gametos de diferentes colonias se fecunden para formar nuevos individuos. Para este proceso, es necesario tener los materiales para la fertilización asistida preparados, entre los que se incluyen: recipientes de 6, 10 y 20 litros y 100 ml para realizar la mezcla de gametos, pipetas de transferencia de plástico, tamices de 2 y 3 mm de luz de malla, pisetas con agua de mar filtrada y contenedores de aproximadamente 20 litros de agua de mar filtrada (1µm) (Figura 15). Las personas involucradas en la fertilización asistida deben evitar el uso de detergentes, repelente de insectos, bloqueador solar u otros productos que pueden ser tóxicos para los gametos.

Conforme los copos recolectores con gametos sean llevados a la embarcación, se transfieren a un recipiente de 6 litros tratando de tomar el menor

FIGURA 15. Materiales requeridos para realizar la fertilización asistida.



volumen de agua posible. Si se cuenta con el suficiente tiempo, es decir la frecuencia con la que el personal de apoyo en superficie lleva los copos a la embarcación, se deben extraer los depredadores mayores a 1 cm (peces, crustáceos, gusanos, etc.) con pipetas transferencia de plástico (Figura 16A).

Una vez que los paquetes de al menos dos colonias de distinto genotipo se encuentran en el recipiente de 6 litros, se comienzan a mezclar lenta y cuidadosamente con un recipiente pequeño (Figura 16B). La acción mecánica provoca que estos se rompan liberando los espermatozoides y los óvulos, iniciando el proceso de fertilización (Figura 17A).

Durante la mezcla, los óvulos (de color rosa) pueden observarse flotando en la superficie mientras los espermatozoides se observan en la parte inferior del recipiente (coloración grisácea). La concentración de espermias recomendada para la mezcla es de 10^5 a 10^6 espermias por mililitro (Oliver and Babcock 1992), sin embargo, en campo la forma más práctica de medir la concentración de estos es por medio del color; pues si la coloración es cercana al blanco debe agregarse agua filtrada para evitar anoxia en la mezcla, la oxidación de los gametos y la polispermia (Figura 17B). El color ideal se aproxima al color de limonada.

Por lo general, los óvulos y espermias se mantienen mezclando cada 5 minutos por 20 segundos aproximadamente durante dos horas, para que la degradación de espermias y la anoxia resultante no limite la viabilidad de los óvulos fecundados (Mendoza-Quiroz, 2013, Figura 17C).

FIGURA 16. Manejo de copos de recolecta de gametos en la embarcación. (A) Personal de apoyo en superficie llevando el copo con gametos a la embarcación, se muestra la correcta posición del copo. (B) Transferencia de gametos a un contenedor de 6 l para iniciar la mezcla.

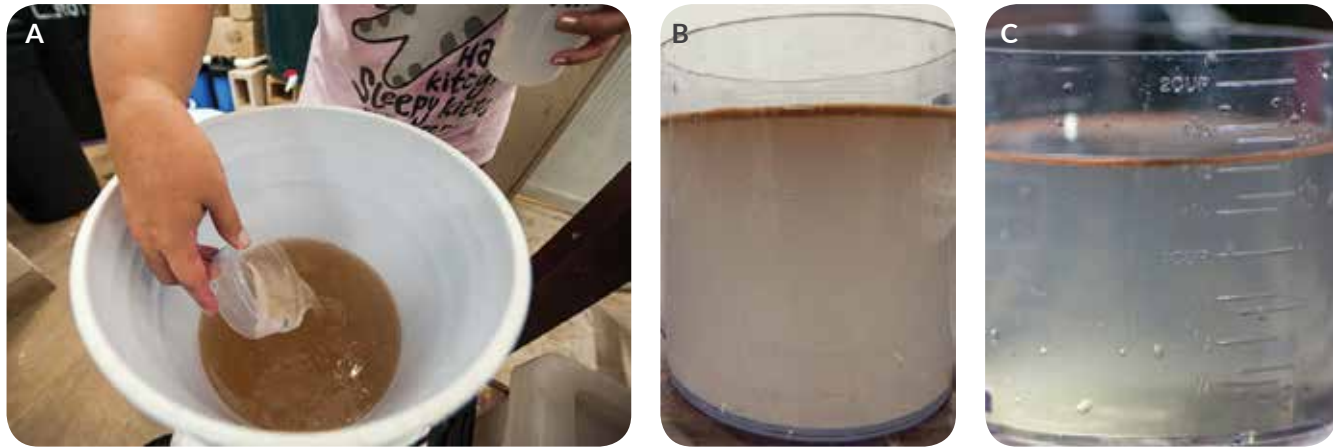


FIGURA 17. Proceso de mezcla de gametos. (A) Disgregación de paquetes de gametos. (B) Mezcla con alta concentración de espermatozoides (C) Mezcla con concentración de espermatozoides adecuada.

Materiales para la fertilización asistida (en el campo o en el laboratorio)

- Nevera de 100 l.
- Guantes de látex.
- Pipetas de transferencia de plástico.
- Recipientes de diferentes tamaños.
- Cubeta con 20 l de agua de mar filtrada.
- Tamices de 2 y 3 mm de luz de malla
- Lámparas.

3.6. LIMPIEZA DE ÓVULOS

Al degradarse los espermatozoides que no fecundaron óvulos, se favorece el crecimiento bacteriano, además de un ambiente anóxico, por tal motivo es necesario remover este excedente. Para remover el exceso de espermatozoides, fracciones de la mezcla se transfieren a una jarra separadora de grasas y se dejan reposar hasta que los óvulos se acumulen en la capa superior, debido a su flotabilidad. Con la ayuda de una pipeta de transferencia, se retiran la mayor cantidad de óvulos del orificio vertedor de la jarra separadora (Figura 18A). Posteriormente, el agua que contiene los espermatozoides se vierte por el orificio de la jarra evitando a verter los óvulos (Figura 18B). Finalmente se agrega agua de mar filtrada lentamente por los bordes de la jarra. Este proceso se repite hasta que los óvulos floten sobre agua limpia (transparente, Figura 18C). Todo el proceso debe realizarse con el mayor cuidado posible para evitar que se dañen los embriones.

Tres horas después del inicio de la fertilización, con ayuda de un microscopio estereoscópico se puede observar las primeras fases del desarrollo em-

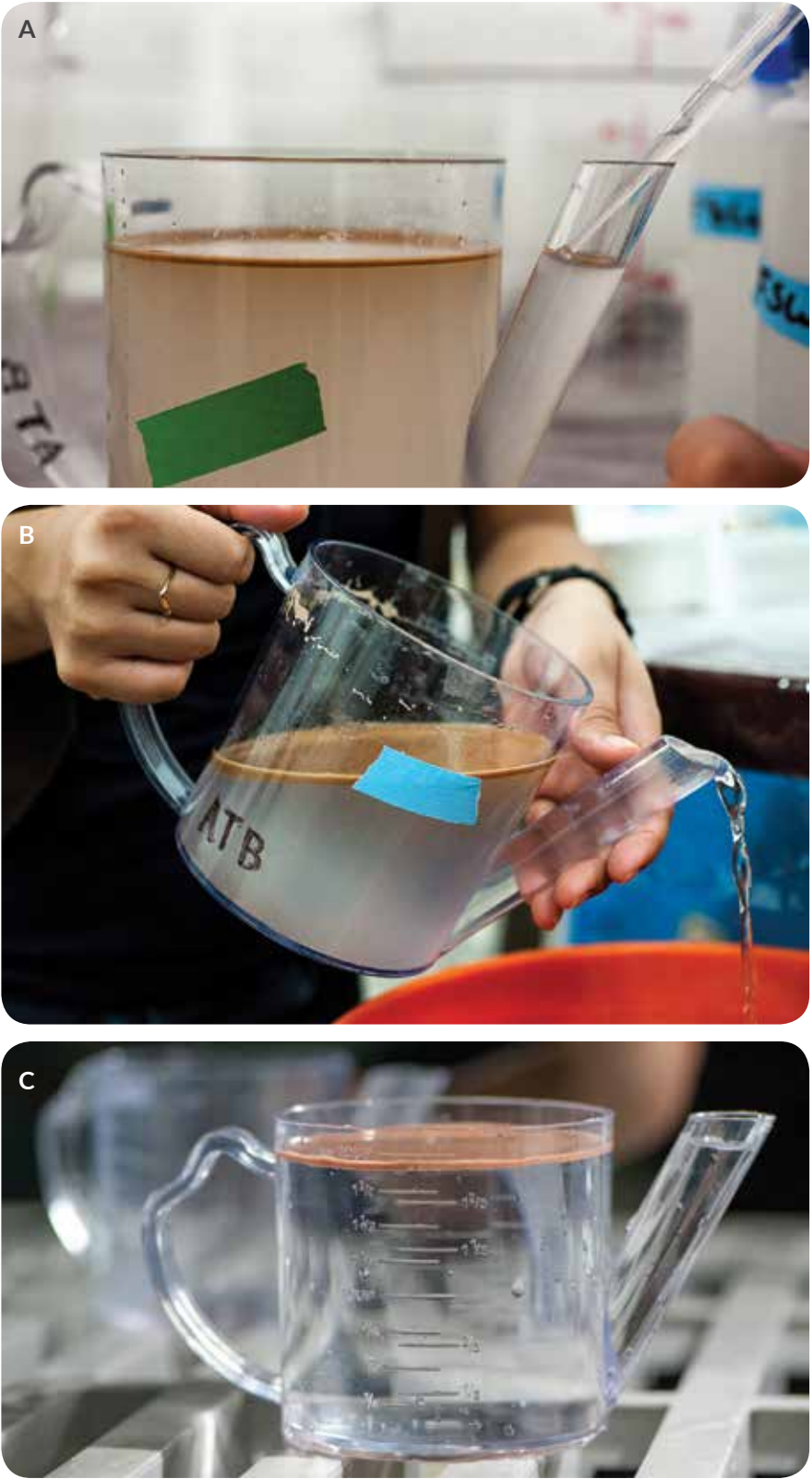


FIGURA 18. Limpieza de gametos. (A) Remoción de óvulos del orificio vertedor. (B) Eliminación de exceso de espermatozoides. (C) Apariencia de gametos limpios.

brionario; se pueden distinguir óvulos fertilizados, identificando las primeras divisiones mitóticas. El éxito de fertilización se calcula a partir de una muestra, contando los óvulos fertilizados (primera división; dos células) y los no fertilizados (aspecto redondo). Si la fertilización es menor al 70%, es

FIGURA 19. Las diferentes etapas de desarrollo vistas a través del microscopio este-reoscópico.



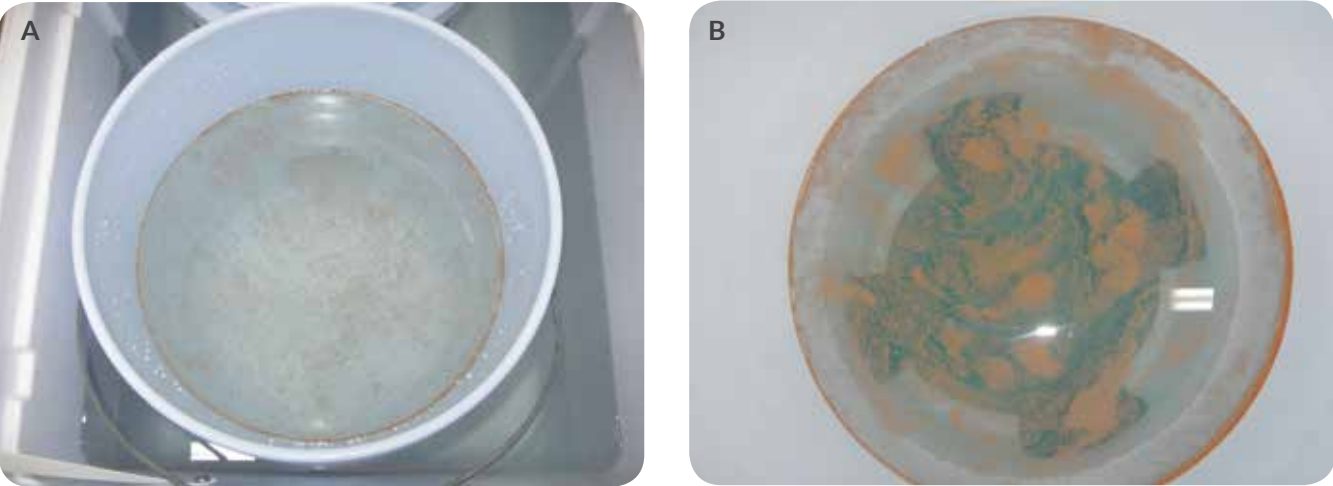
muy probable que debido a la degradación de los óvulos no fertilizados, los embriones necesitarán más cuidado durante la noche. Esto debido a que la degradación de la materia orgánica provoca contaminación que es nociva para el desarrollo de los embriones.

4. DESARROLLO EMBRIONARIO:
ASISTENCIA Y CUIDADOS

4.1. CUIDADO DE LOS EMBRIONES

Una vez realizada la limpieza, los embriones se transfieren a las incubadoras (ver sección 2.2), donde transcurre el desarrollo. Desde la primera división de los blastómeros hasta la etapa de larva plánula temprana pueden transcurrir de 20 a 32 horas (Mendoza-Quiroz, 2013) (Figura 19).

FIGURA 20. Cultivo de embriones de coral. (A) Densidad correcta de embriones. (B) Densidad alta de embriones.



Las incubadoras se deben mantener a 28°C (Randall y Szmant 2009) y con un periodo de 12 horas luz-12 horas oscuridad. Generalmente, se cultivan 300 embriones de *A. palmata* por litro o 40 embriones por cm² de superficie (Edwards 2010) (Figura 20A). La agregación de embriones en las paredes de la incubadora reduce la supervivencia (Figura 20B). Para prevenir la agregación, se debe aplicar agua de mar filtrada con una piseta de forma regular sobre las paredes.

Debido a la mortalidad asociada al desarrollo embrionario, además de la liberación de desechos durante el mismo, es necesario remover dichos desechos, además de realizar recambios parciales de agua (Figura 21A).

Los desechos sólidos de mayor tamaño pueden ser removidos del agua de las incubadoras con pipetas de transferencia de plástico. Los desechos más pequeños se remueven con ayuda de una película plástica (usada para em-pacar alimentos). La película de plástico se extiende sobre la superficie del agua de la incubadora y de la misma forma (extendida) se retira. Los desechos quedarán adheridos a esta. Finalmente se aplica agua de mar filtrada con una piseta sobre la película plástica extendida para remover a las larvas

FIGURA 21. Técnica de limpieza de dese-chos. (A) Colocación de la película plástica sobre la superficie de agua. (B) Recuperación de las larvas adheridas a la película plástica.

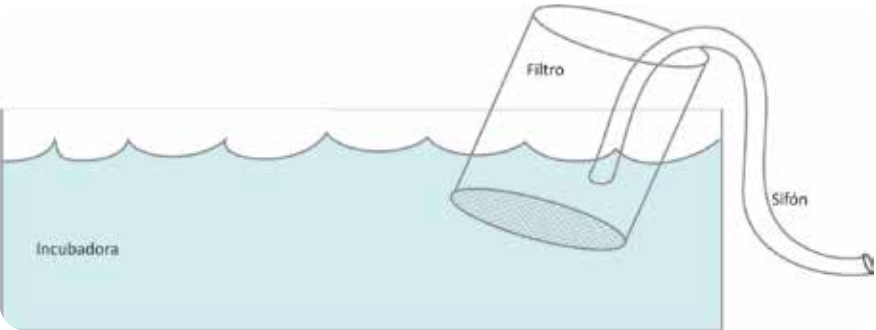


FIGURA 22. Esquema de sifón para retirar agua de las incubadoras.

adheridas (Figura 21B). Este procedimiento se repite las veces que sea necesario.

La frecuencia de los recambios de agua depende de la limpieza aparente del agua (transparencia). Generalmente se realizan cada tercer día, sin embargo de ser necesario deben realizarse diariamente. Por medio de un sifón (manguera de 5 mm diámetro, Figura 22) y un filtro (100 µm) en el extremo que hará contacto con el agua de la incubadora (sin sumergir por completo el tamiz, para prevenir la succión de las larvas), se retira del 60 al 90% del agua (Figura 22). Al mismo tiempo con una piseta, se lavan las paredes de la incubadora con agua de mar filtrada, lo que evita que los embriones y queden pegados en los bordes fuera del agua. Finalmente, se vierte agua de mar limpia por las paredes de la incubadora. En caso de crecimiento de bacterias es preferible aislar las incubadoras infectadas y utilizar materiales desechables, o interrumpir el cultivo en dicha incubadora.

4.2. ASENTAMIENTO

De tres a siete días posteriores a la fertilización, la larva plánula comienza a explorar el fondo en busca de un sustrato idóneo para su fijación, continuar con la metamorfosis y convertirse en un pólipo, dando inicio a su vida sésil. A este proceso se le conoce como asentamiento.

FIGURA 23. Bases de asentamiento.



La correcta elección del tipo de sustrato y el adecuado acondicionamiento son dos factores muy importantes para el éxito de asentamiento larval. Existen una gran variedad de tipos de sustratos. Estos pueden comprarse o ser manufacturados utilizando una mezcla de arena de mar y cemento para la construcción (proporción 50:50). En nuestro laboratorio, hemos utilizado principalmente dos tipos de sustratos; bases cilíndricas y en forma de tetrápodo (diseñado por SECORE International) ambas fabricadas por nuestro grupo de trabajo (Figura 23).

Las bases cilíndricas proveen un mayor número de lugares para el asentamiento, sin embargo la manipulación es complicada, así como los cuidados posteriores al asentamiento. Sin embargo son fáciles de producir, pues se pueden emplear moldes de tubo PVC. Mientras que las bases en forma de tetrápodo surgieron como una iniciativa de SECORE International (www.secore.org) y requieren moldes especiales para su fabricación. Estas bases resultan ser ventajosas para las actividades de restauración, pues a la vez que proveen una amplia gama de opciones de asentamiento (diferentes caras y texturas de los tetrápodos, Figura 24A), son de fácil manipulación debido al tamaño, además que la introducción de estas al arrecife es relativamente sencilla (revisar sección 7.2 Siembra asistida).

Antes de usar cualquier base para el asentamiento, es necesario realizar un acondicionamiento de las bases (Figura 24B), para lo cual, se introducen cerca de un arrecife durante 60 días. En este periodo, se formará en las bases una biopelícula, indispensable para hacer el sustrato atractivo para las larvas. Se busca que las bases de asentamiento contengan un gran número de algas calcáreas incrustantes (Figura 24C). Después del

FIGURA 24. (A) Acondicionamiento de sustratos. (B) Sustrato acondicionado. (C) base acondicionado con algas calcáreas incrustantes.



FIGURA 25. Sustratos en el fondo de la incubadora.

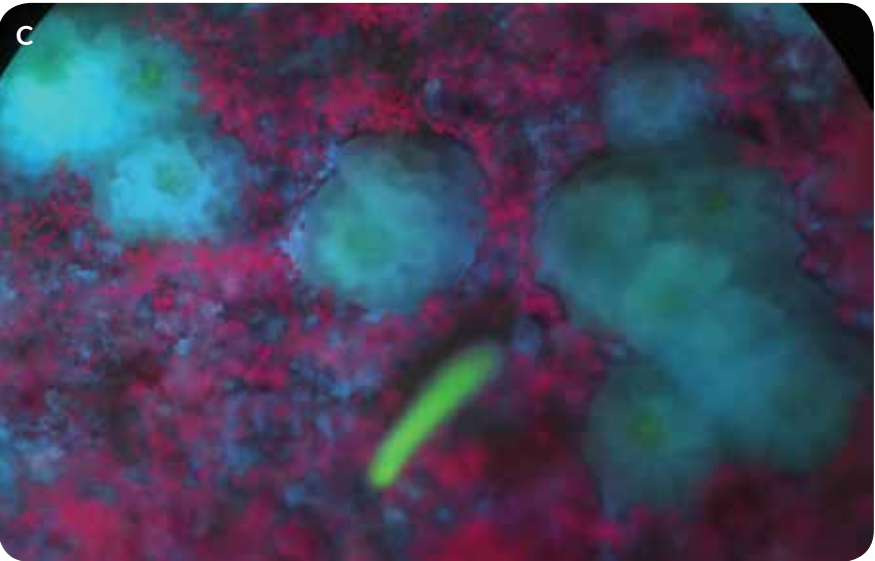
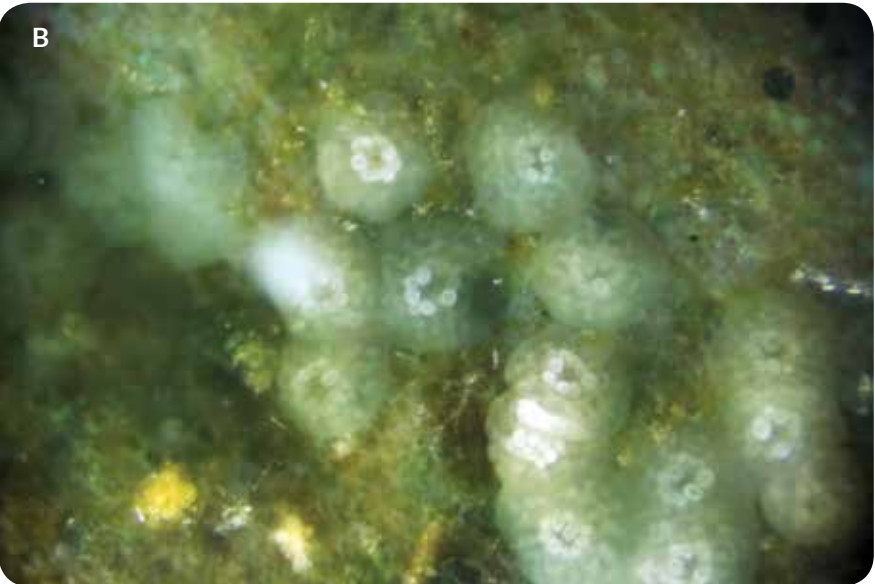


FIGURA 26. Pólipos asentados. (A) Lámpara de fluorescencia. (B) Pólipo visto con luz natural. (C) Pólipo visto con luz fluorescente.



acondicionamiento, es necesario cepillar el exceso de sedimento de las bases así como algas filamentosas y posibles depredadores como gusanos.

Generalmente el periodo de asentamiento en *Acropora palmata* ocurre alrededor de 2 a 3 días posteriores a la formación de la larva plánula (Albright *et al.* 2010, Ritson-Williams *et al.* 2010). Cuando las larvas comienzan a nadar hacia el fondo de la incubadora, es el momento ideal para introducir los sustratos para el asentamiento. Las bases deben ser colocadas en el fondo de la incubadora procurando cubrir toda la superficie de la misma. La acumulación excesiva de sustratos puede ocasionar anoxia en las primeras capas, por lo que una o dos capas de sustrato es suficiente (Figura 25). Adicionalmente, se puede proporcionar aireación suave para oxigenar el agua.



El asentamiento dura de 2 a 4 días, por lo que durante este tiempo se debe evitar la manipulación de las bases para que las larvas plánulas se fijen bien al sustrato.

Al inicio, las larvas se verán como pequeñas esferas pegadas flojamente al sustrato, posteriormente, se transformarán en círculos planos. Se puede confirmar la metamorfosis por observaciones en el microscopio estereoscópico. Los pólipos primarios también se pueden distinguir por la fluorescencia emitida utilizando una lámpara de fluorescencia (Tektite, Nightsea Bluestar) (Figura 26A, B, C).

Para fines prácticos de restauración, un mayor número de pólipos asentados, incrementará las posibilidades de contar con al menos un recluta sobreviviente por sustrato, después de 6 meses.

4.3. TOMAR UNA DECISIÓN: INTRODUCCIÓN O CULTIVO

Una vez asentadas las larvas, para fines de restauración existen tres principales maneras de proceder: el cultivo de reclutas en sistemas de acuarios, la introducción de los reclutas a viveros para su posterior trasplante al arrecife, o la siembra directa de los reclutas en el arrecife. Cada una de las opciones anteriores se aborda de forma más detallada en las secciones siguientes.

El cultivo de reclutas sexuales en acuarios puede producir tasas de supervivencia relativamente altas, debido a que se mantiene el control de factores ambientales como: luz, temperatura, salinidad y alimento, así como el control de depredadores, sobrecrecimiento de algas, sedimentación, etc. Sin embargo, resulta altamente costoso y demandante por el constante cuidado en las etapas tempranas post-asentamiento. Si se opta por esta opción es preciso inocular a los reclutas con simbios.

La inoculación con simbios se puede realizar de tres maneras; la más simple consiste en la introducción de fragmentos de coral procedentes de colonias cercanas al sitio en donde se trasplantarán finalmente los reclutas, es decir el sitio a restaurar. La segunda implica obtener fragmentos adultos de la misma especie y del mismo sitio donde se introducirán los nuevos

reclutas, extraer simbiontes e inmediatamente inocular a todos los reclutas obtenidos (ver Anexo IV: Extracción de simbionte e inoculación) y la tercera una combinación de las dos anteriores.

Por otra parte, la introducción de los reclutas a viveros para su posterior trasplante al arrecife o la siembra directa, no necesita inoculación de simbiontes ya que los reclutas pueden adquirirlos del medio natural, además de que se reducen significativamente los costos de producción.

5. CULTIVO DE RECLUTAS EN SISTEMAS DE ACUARIOS

5.1. CONDICIONES PARA EL CULTIVO

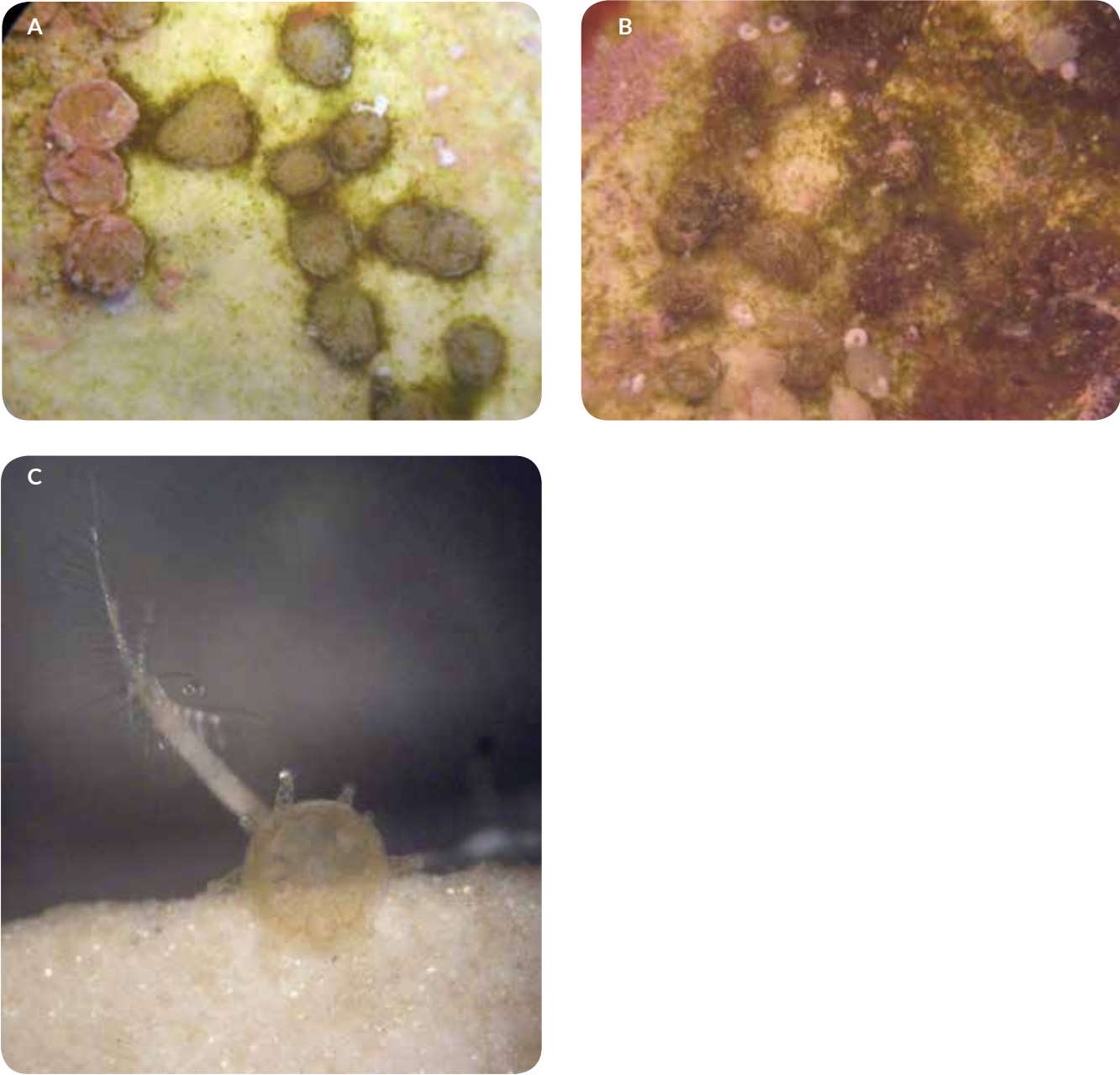
En acuarios al aire libre, la cantidad de luz incidente en los reclutas debe ser regulada por malla sombra para imitar la cantidad de luz que los corales reciben en condiciones naturales; las larvas tienden a seleccionar sitios sombreados para asentarse por lo que la luz incidente no debe exceder a $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante los primeros dos meses, posteriormente la luz incidente se puede incrementar. La temperatura del agua debe oscilar alrededor de los 28°C , con una salinidad de 35-36 PSU.

La limpieza del acuario y las bases debe realizarse una vez por semana, para evitar la formación de tapetes de algas, acumulación de sedimento y el crecimiento de otros organismos (Figura 27A, B, C). La limpieza del sedimento y/o algas sobre o alrededor de los reclutas se realiza con pinceles y de acuerdo a la fortaleza y formación del esqueleto de los reclutas se pueden ir cambiando por brochas y cepillos suaves.

5.2. ALIMENTACIÓN

Aunque los corales reciben productos de la fotosíntesis por parte de los simbiontes, es muy recomendable alimentar a los reclutas con alimento vivo, suplementos alimenticios comerciales o una mezcla de ambos. El alimento vivo se puede aplicar en varias etapas de acuerdo al tamaño de la boca del recluta; generalmente se inicia con la aplicación de rotíferos (*Brachionus plicatilis*) y posteriormente se emplea *Artemia salina* recién eclosionada. Por

FIGURA 27. Agentes causantes de la mortalidad. (A) Sobrecrecimiento de algas filamentosas y coralinas. (B) Competencia con otros organismos sésiles. (C) Depredadores.



otra parte los suplementos comerciales, son muy variados, sin embargo, todos poseen una mezcla de nutrientes para el coral así como calcio.

La alimentación se realiza durante el amanecer o el atardecer pues es cuando los pólipos se encuentran más activos. Si el volumen del acuario es muy alto, las bases se deben transferir a recipientes de menor volumen para incrementar la probabilidad de ingesta, y evitar desperdicios.

6. VIVEROS MARINOS

Los viveros marinos o “coral nurseries”, son adaptaciones de los cultivos terrestres en viveros. Ellos consisten en el uso de estructuras submarinas para el mantenimiento de corales (Rinkevich 1995, Bowden-Kerby 2001, Shafir *et al.* 2006, Shafir y Rinkevich 2008, Shaish *et al.* 2008). Existen diferentes diseños y técnicas para implementar un vivero, por lo que es importante considerar varios aspectos para elegir el sitio donde se construirá el vivero marino. Factores a considerar incluyen corrientes, sitios apropiados de anclaje, las tasas de sedimentación, presencia de herbívoros e ingresos de agua dulce y contaminantes etc. Además, se deben tomar en cuenta las necesidades particulares de la(s) especie(s) a cultivar como irradiancia, temperatura, etc., así como los costos económicos, recursos humanos y los procedimientos legales que conlleven.

En caso de que los reclutas se introduzcan dos semanas después de que ocurra el asentamiento, el uso de rejillas de plástico sujetas a las bases de concreto puede ser una alternativa (Figura 28A). Estas rejillas o jaulas protegen a los reclutas del oleaje y de depredadores. Este método requiere menor inversión económica y cuidados menores, a comparación de los cultivos en acuarios. Para las colonias juveniles, se han utilizado plataformas de concreto (50 cm de largo x 50 cm de ancho x 20 cm de alto) con soportes de PVC (2.5 cm de diámetro, 45 cm de longitud). Cada soporte cuenta con un conector (conector hembra-macho de PVC) en donde se pega el sustrato que contenga al recluta una vez que estos alcanzan los 3 cm de diámetro (Figura 28B).

6.1. TRASLADO DE RECLUTAS Y COLONIAS JUVENILES AL VIVERO

Antes de transportarlas, las colonias juveniles (mayor a 3 cm de diámetro) deben ser fijadas con plastilina epóxica a conectores de PVC (hembras) que coincidan con la medida de los conectores en los viveros. Para facilitar los monitoreos subsecuentes, se pueden etiquetar cada una de las colonias.

Para el transporte de las colonias se utiliza un contenedor que mantenga la temperatura del agua, evitando la exposición directa a la luz solar por periodos prolongados, ya que estas son las principales causas de estrés. Llegando al sitio del vivero, se realiza un recambio de agua parcial en los contenedores, para igualar la temperatura con la del sitio. Finalmente, los corales se introducen y sujetan a los conectores en las placas de concreto.

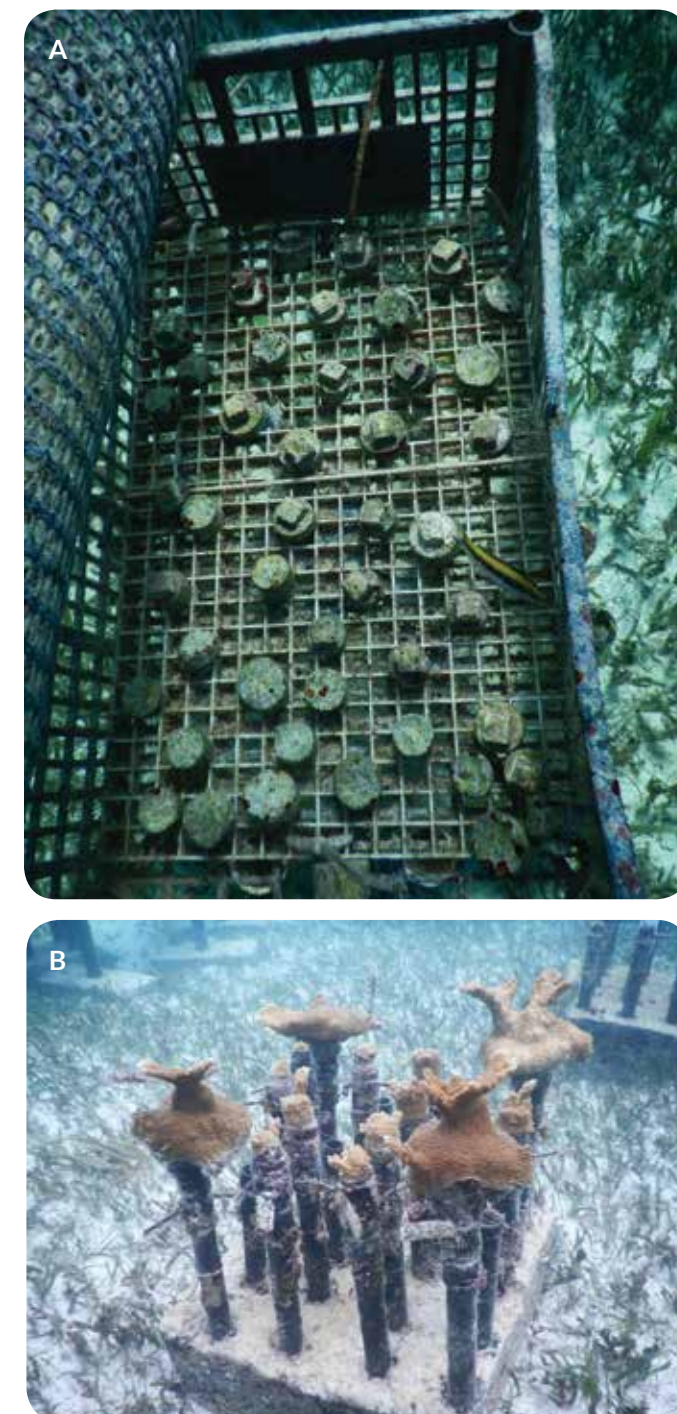
6.2. MONITOREO Y MANTENIMIENTO

Una vez que los reclutas o las colonias juveniles se encuentran en el vivero, es necesario realizar monitoreos periódicos; cada mes durante el primer año (en el caso de los reclutas), posteriormente se puede realizar cada tres o seis meses (en el caso de las colonias juveniles). Durante el monitoreo, se registra la supervivencia y crecimiento, además de realizar observaciones de sobrecrecimiento por algas, presencia de enfermedades, blanqueamiento, presencia de organismos depredadores, mortalidad parcial, recuperación de tejido vivo, y establecimiento de la simbiosis (en el caso de los reclutas sexuales).

El crecimiento puede ser medido mediante fotografías analizándolas posteriormente en programas para el análisis de imágenes (por ejemplo: el software Image J) o para las colonias juveniles, se pueden realizar medidas *in situ* del diámetro mayor y menor, la altura de la colonia, así como el número de ramas (ver Anexo IV: Formato para el monitoreo de reclutas).

De igual manera, es necesario limpiar las estructuras y base de los corales para evitar el sobrecrecimiento de algas y la presencia excesiva de sedimento.

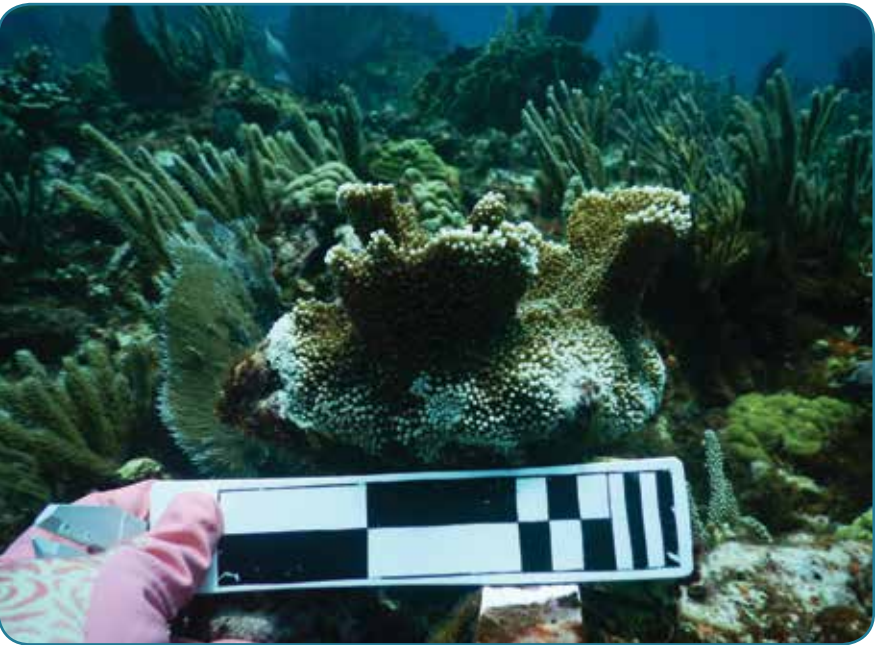
FIGURA 28. Vivero marino. (A) Reclutas en vivero marino. (B) Colonias juveniles en vivero marino.



6. 3. TRASPLANTE DE COLONIAS JUVENILES AL ARRECIFE

Los pegamentos para adherir las colonias de coral a la estructura arrecifal son diversos, sin embargo, uno de los menos costosos es la combinación de cemento con arena de mar (Figura 29). Es preferible separar las colonias trasplantadas unas de otras (2 metros). Al igual que en el vivero, es recomendable continuar con el monitoreo de las colonias, por lo que es necesario saber la localización de las mismas dentro de la estructura arrecifal.

FIGURA 29. Colonia trasplantada a un arrecife.



7. SIEMBRA DIRECTA

En la siembra directa los reclutas son introducidos al arrecife dos semanas después de ocurrido el asentamiento, lo que disminuye significativamente los costos de producción en comparación con el mantenimiento de estos en acuarios, pues una vez sembrados, no se brinda ningún tipo de cuidado a los reclutas. Por otra parte, una vez en el sitio de introducción, los reclutas no necesitan cuidados, no se realizan mantenimiento como limpieza de las bases. Para este método se utilizan las bases de asentamiento en forma de tetrápodos (ver sección 4.2), ya que esta forma facilita el anclaje de las bases en los recovecos del arrecife.

Siguiendo las indicaciones de SECORE International (www.secore.org) existen dos formas principales de sembrar: la siembra directa y la siembra asistida; la primera contempla la introducción de bases de manera aleatoria sobre la estructura arrecifal, es decir mediante buceo las bases se colocan sobre el área a restaurar sin importar demasiado dónde y cómo se coloquen. La segunda involucra el establecimiento de una parcela, seleccionada con anterioridad, así como un método de sembrado y monitoreo post siembra.

7.1. SELECCIÓN DEL SITIO PARA LA SIEMBRA DIRECTA

La densidad recomendada de siembra es de cuatro bases por metro cuadrado (esperando que al final, persista una colonia por metro cuadrado), por lo tanto, el tamaño de la parcela dependerá del número de bases que se desee introducir. Los sitios ideales para la introducción de bases son aquellos con indicios de existencia previa de la especie (*A. palmata*); es decir sitios con corales vivos y evidencia de colonias muertas, en donde sus esqueletos estén cubiertos en su mayoría por algas calcáreas incrustantes.

Los esqueletos rotos proveen grietas en donde se pueden anclar los tetrápodos. Se busca que el bentos esté cubierto en su mayoría por algas calcáreas incrustantes (cobertura mayor al 50%) ya que este grupo es el menor competidor por espacio con los corales (Figura 30). Para determinar las cober-



FIGURA 30. Ejemplo de un sitio con características idóneas para la siembra.

turas se puede utilizar el método AGRAA (Atlantic and Gulf Rapid Reef Assessment, Lang *et al.* 2010).

Otro aspecto importante, son las posibles amenazas a las cuales se encuentra sometida el área que se pretende restaurar, por ejemplo, sitios con alta incidencia de agua dulce o contaminación. Además se debe contemplar el empleo de medidas de gestión que podrían ayudar para la restauración, por ejemplo por la regulación de contaminación proveniente de aguas residuales, sedimento proveniente de escorrentía agrícola, etc.

7.2. SIEMBRA ASISTIDA

Los sustratos se transportan en rejas de plástico dentro de contenedores de agua. Una vez en el sitio de siembra se debe realizar un recambio de agua para homogeneizar la temperatura del agua del contenedor con la del ambiente. Posteriormente las rejas de plástico con los sustratos se introducen en un sitio cercano a la parcela a sembrar.

Con cuerdas previamente marcadas, se colocan transectos de 1 m de ancho sobre la parcela. Cada cuerda a su vez se encuentra marcada a cada metro a fin de cuadricular el área. Por medio de buceo autónomo, se colocan cuatro bases por metro cuadrado, asegurando las bases en las hendiduras o reovecos naturales en el arrecife y evitando los sitios con alta abundancia de macroalgas. Por medio de un cuadrante de 1 m x 1 m marcado cada 20 cm, se registra la posición de cada base. Estos carriles deben ser removidos al finalizar la siembra.

7.3. MONITOREO

Es importante realizar monitoreos continuos para evaluar el desempeño de los sustratos así como de los reclutas cada dos meses, para determinar la tasa de pérdida de bases, la cementación de estas e integración a la estructura arrecifal, así como el estado de los reclutas.

Para el monitoreo se pueden utilizar los mismos transectos utilizados para la siembra, con el fin de cuadricular la parcela. Se realiza un conteo de todas las bases en la parcela, así mismo, se evalúa un número representativo de cuadrantes al azar de 1 m² en cada transecto. En cada cuadrante se realizan anotaciones de: número de bases, posición de la base dentro del cuadrante, categoría del número de reclutas por base (0, 1-10, >10 reclutas) y cementación de la base. Es importante anotar observaciones como la presencia de reclutas con simbioses.

V. CASO DE ESTUDIO

Se obtuvieron larvas del desove ocurrido en el sitio conocido como La Bocana Chica en Puerto Morelos Quintana Roo durante agosto del 2015. Una vez que las larvas empezaron a realizar movimientos hacia el fondo de las incubadoras, se introdujeron 500 sustratos tipo tetrápodo en 10 incubadoras. Al final del asentamiento (dos semanas después de la introducción de las bases) se registraron en promedio 150 reclutas por tetrápodo. Estas bases fueron introducidas al arrecife dos semanas después del asentamiento. A continuación se presentan algunos de los resultados (Figura 31A, B).

8.1. SELECCIÓN DEL SITIO DE SIEMBRA

Para la introducción de tetrápodos, se seleccionó el sitio conocido como Picudas, dentro del Parque Nacional Arrecifes de Puerto Morelos, este sitio fue seleccionado debido a su bajo uso como destino turístico, además de sus características aparentes. De una evaluación rápida se identificó una estructura formada por esqueletos de *Acropora palmata*, lo que indica su abundancia en el pasado. Además, había presencia de algunas colonias de *A. palmata* vivas. Así mismo, de acuerdo a la evaluación de bentos realizado con el método AGRRA, se observó una alta cobertura de algas calcáreas incrustantes. Con estacas de acero inoxidable se marcaron las esquinas de una parcela de 10 m x 12 m.

8.2. SIEMBRA DE TETRÁPODOS

Las bases de asentamiento fueron transportadas de las instalaciones de la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales al sitio de Picudas en rejas de plástico dentro de contenedores con agua de mar (Figura 32 A), una vez en el sitio de siembra, las cajas fueron introducidas al mar para su posterior uso (Figura 32 B).

FIGURA 31. (A) Rango de variación de reclutas de *Acropora palmata* por bases de asentamiento, se muestra el valor promedio de reclutas por base de asentamiento, así como los valores mínimos y máximos. (B) Apariencia de reclutas asentados.

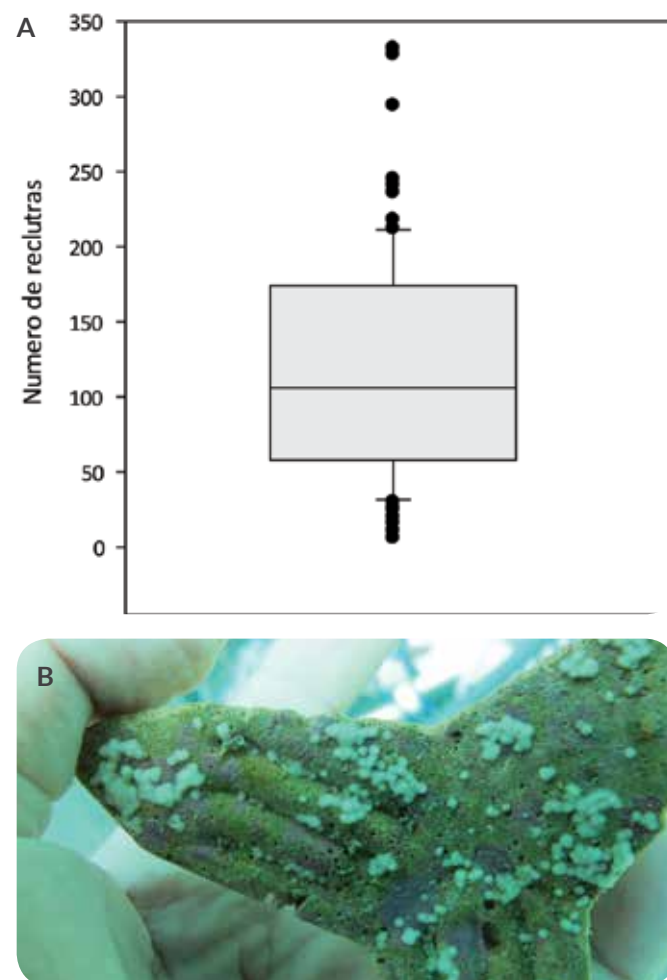


FIGURA 32. (A) Transporte de bases con reclutas. (B) Introducción de rejas con bases de asentamiento.



Con cuerdas previamente marcadas, se colocaron transectos de un metro de ancho en la parcela seleccionada, cada transecto a su vez se encontraba marcado a cada metro (Figura 33 A). Estas cuerdas fueron removidas al finalizar la siembra. Por medio de buceo autónomo, se colocaron cuatro bases por metro cuadrado, anclando cada base entre los recovecos y ranuras naturales del arrecife y evitando los sitios con alta abundancia de macroalgas (Figura 33 B y C).

8.3. MONITOREO

Se realizó un monitoreo dos meses posterior a la introducción de las 500 bases de asentamiento con la presencia de reclutas sexuales de *A. palmata*. El área se dividió en 10 transectos de 12 m x 1 m, donde se contaron todas las bases. Se evaluaron seis cuadrantes de 1 m² en cada transecto, para un total de 60 cuadrantes. Los cuadrantes fueron ubicados aleatoriamente en cada transecto a partir de la función de generación de números aleatorios (Microsoft EXCEL 2010). En cada cuadrante se realizaron anotaciones de: número de bases, categoría del número de reclutas por base (0, 1-10, >10 reclutas) y cementación de la base (Figura 34).

FIGURA 33. (A) Transectos usados para la siembra de bases. (B) Siembra de bases. (C) Detalle de base anclada a la estructura arrecifal.

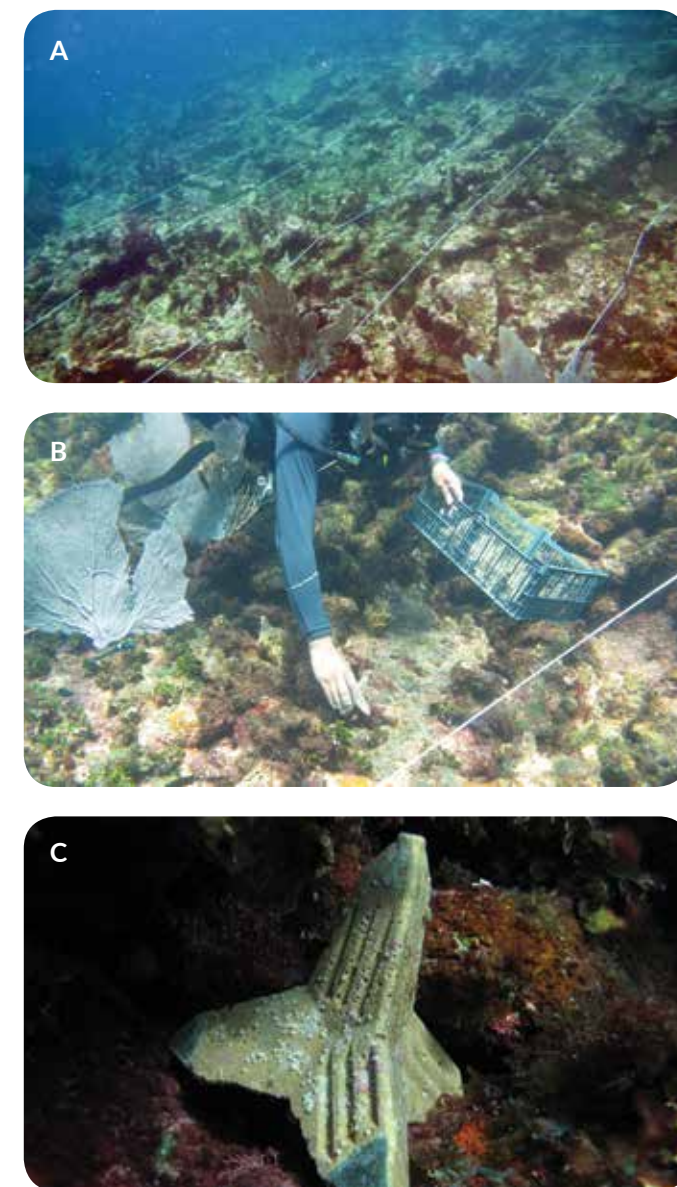
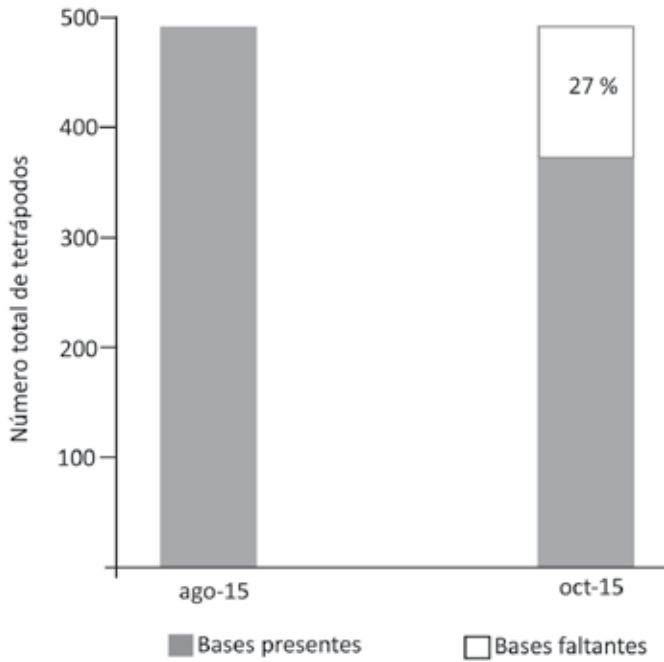


FIGURA 34. Cuadrantes evaluados durante el monitoreo de reclutas sexuales en la unidad arrecifal de Picudas, conteo de bases y reclutas en cuadrante aleatorio.



De los 492 tetrápodos con presencia de reclutas sexuales de *A. palmata*, introducidos durante agosto de 2015, se encontró un estimado de 370 bases durante octubre de 2015. El 27% (122) de las bases de asentamiento no se observaron en el área de siembra (Figura 35). Las bases de asentamiento ausentes se pudieron haber reacomodado en la estructura arrecifal ya sea entre los restos de *A. palmata* muerta, donde se forman pequeñas cuevas resultando imposible detectar/alcanzar las bases, o bien fuera del área de la parcela (120 m²), donde pudieron haber sido arrastradas a un nuevo sustrato arrecifal por efecto de las corrientes.

FIGURA 35. Número de tetrápodos de asentamiento en la guardería de la unidad arrecifal de Picudas en la fecha de introducción (agosto de 2015) y la fecha de monitoreo (octubre de 2015).



A partir de las estimaciones realizadas del número de bases por unidad de área, se obtuvo que de las 4 bases por m² (DE=0.9) sembradas en agosto de 2015, en octubre de 2015 se registraron 3 bases por m² (DE=1.5). El máximo número de bases por m² fue de 7 durante agosto y 10 durante octubre. A nivel general, una base por m² no fue encontrada (Figura 36).

La categorización de número de reclutas por base de asentamiento se realizó con la finalidad de tener una aproximación de la mortalidad/supervivencia de reclutas. Durante la siembra o introducción en agosto de

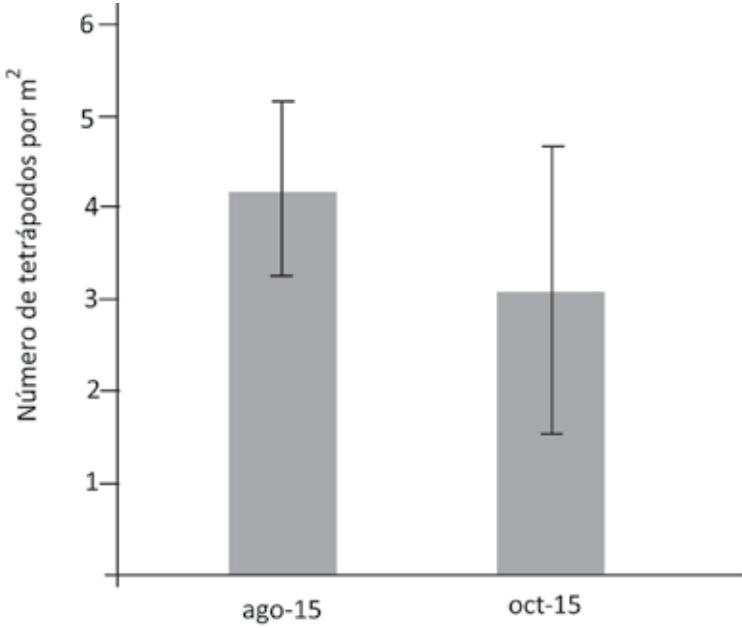
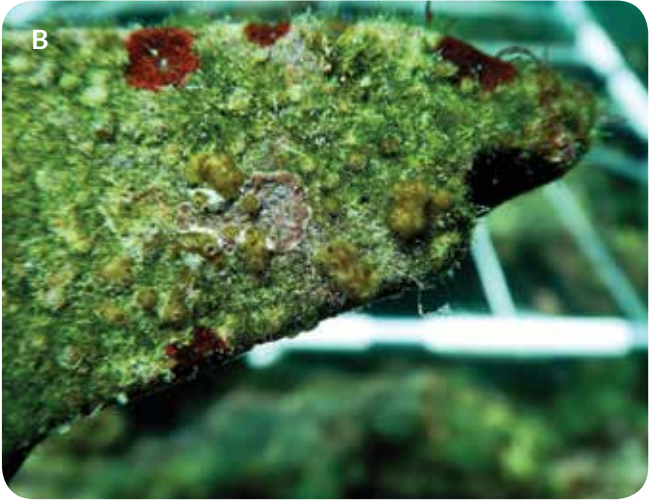
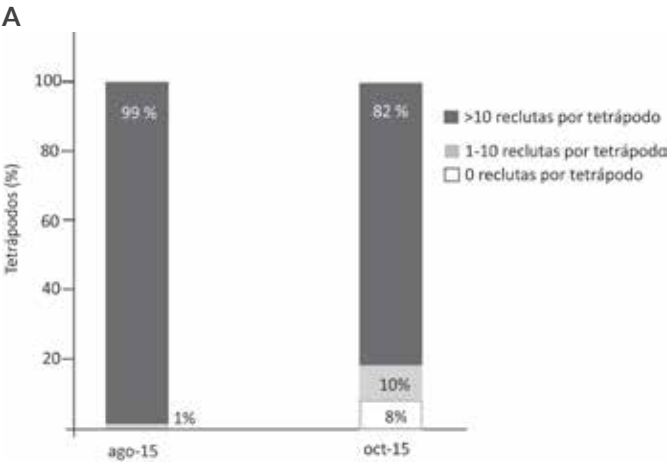


FIGURA 36. Número de tetrápodos de asentamiento por unidad de área (m²). Se muestra la media aritmética y la desviación estándar. (N=60 cuadrantes de 1m²).

2015, en el 99% de las bases de asentamiento se observaron más de 10 reclutas por base. El 1% restante correspondió a la categoría de 1-10 reclutas por base. Durante la evaluación de octubre de 2015, en el 82% de las bases se encontraron más de 10 reclutas por base, en el 10% de las bases se contaron entre 1-10 reclutas por base, y en el 8% de las bases no se observaron reclutas (Figura 37A).

Las bases de asentamiento donde no se encontraron reclutas de *A. palmata*, por lo general se observaron cubiertas total o parcialmente por cianobacterias, *Dictyota* sp. y otros tipos de algas no calcáreas incrustantes. Además, se observaron reclutas con pigmentación (presencia de simbios) y sin pigmentación aparente (Figura 37B). Ninguna de las bases de asentamiento evaluadas se observó cementada al arrecife.

FIGURA 37. (A) Cantidad de bases de asentamiento (%) en cada grupo categorizado de acuerdo al número de reclutas por base que se observaron. (B) Reclutas con simbios.



REFERENCIAS

- Albright R., Mason B., Miller M., Langdon C. 2010. Ocean acidification compromises recruitment success of the threatened Caribbean coral *Acropora palmata*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 107: 20400–20404.
- Arai T., Kato M., Heyward A., Ikeda Y., Lizuka T. T., Maruyama T. 1993. Lipid composition of positively buoyant eggs of reef building corals. Coral Reefs 12: 71–75.
- Aronson R. B., Precht W. F. 1997. Stasis, biological disturbance and community structure of a Holocene coral reef. Paleobiology 23: 326–346.
- Aronson R. B., Precht W. F. 2001a. White-band disease and the changing face of Caribbean coral reef. Hydrobiology 460: 25–38.
- Aronson R. B., Precht W. F. 2001b. Evolutionary paleoecology of Caribbean reef corals. 171–233. In: Allmon W. D., Bottjer D. J. (Eds). Evolutionary Paleocology: The Ecological Context of Macroevolutionary Change. Columbia University Press, New York.
- Aronson R. B., Precht W. F., Toscano M. A., Koltes K. H. 2002. The 1998 bleaching event and its aftermath on a coral reef in Belize. Marine Biology 141: 435–447.
- Baird A. H., Gilmour J. P., Kamiki T. M., Nonaka M., Pratchett M. S., Yamamoto H., Yamasaki H. 2006. Temperature tolerance of symbiotic and non-symbiotic coral larvae. Proceedings of the 10th International Coral Reef Symposium, Okinawa, pp. 38–42.
- Baums I. B., Miller M. W., Hellberg M. E. 2006. Geographic variation in clonal structure in a reef building Caribbean coral, *Acropora palmata*. Ecological Monographs 76(4): 503–519.
- Bowden-Kerby A. 2001. Low-tech coral reef restoration methods modeled after natural fragmentation processes. Bulletin of Marine Science 69: 915–931.
- Bruckner A. W., Aronson R. B., Bruckner R. J. 2002. Endangered acroporid corals of the Caribbean. Coral Reefs 21: 41–42.
- Bythell J. C. 1988. A total nitrogen and carbon budget for the elkhorn coral *Acropora palmata* (Lamarck). Proceedings of the 6th International Coral Reef Symposium (Australia) 2: 535–540.
- Edwards A. J. 2010. Reef Rehabilitation Manual. Coral Reef Targeted Research & Capacity Building for Management Program: St Lucia, Australia. 166 pp.
- Ferrario F., Beck M. W., Storlazzi C. D., Micheli F., Shepard C. C., Airoidi, L. 2014. The effectiveness of coral reefs for coastal hazard risk reduction and adaptation. Nature Communications 5:3794 doi: 10.1038/ncomms4794 (2014).
- Gladfelter W. B. 1982. White-band disease in *Acropora palmata*: implications for the structure and growth of shallow water reefs. Bulletin of Marine Science 32: 639–643.
- Gladfelter W. B., Gladfelter E. H. 1978. Fish community structure as a function of habitat structure on West Indian patch reefs. Revista de Biología Tropical 26: 65–84.
- Gladfelter W. B., Gladfelter E. H. 1979. Growth and total carbonate production by *Acropora palmata* on a windward reef. In: Environmental Studies of Buck Island Reef National Monument, St. Croix, US Virgin Islands, Vol. II. US Department of the Interior, National Park Service, U.S. Virgin Islands, Chapter 3.
- Gladfelter E. H., Monahan R. K., Gladfelter W. B. 1978. Growth rates of five reef-building corals in the northeastern Caribbean. Bulletin of Marine Science 28: 728–734.
- Hagedorn M., Carter V., Martorana K., Paresa M. K., Acker J., Baums I. B., Borneman E., Brittsan M., Byers M., Henley M., Laterveer M., Leong J.-A., McCarthy M., Meyers S., Nelson B. D., Petersen D., Tierisch T., Cuevas Uribe R., Woods E., Wildt D. 2012. Preserving and Using Germplasm and Dissociated Embryonic Cells for Conserving Caribbean and Pacific Coral. PLoS ONE 7(3): e33354. doi:10.1371/journal.pone.0033354

- Hubbard D. K, Gladfelter E. H, Bythell J. C. 1993. Comparison of biological and geological perspectives of coral-reef community structure at Buck Island, U.S Virgin Islands. 201-207. In: R.N. Ginsburg (Ed.): Proceedings of the Colloquium on Global Aspects of Coral Reefs. Health, Hazards and History. University of Miami, Miami. 420 pp.
- Hughes T. P. 1994. Catastrophes, phase shifts, and large-scale degradation of a Caribbean coral reef. *Science*. 265: 1547-1551.
- IUCN. 2014. The International Union for Conservation of Nature (IUCN) red list of threatened species. <http://www.iucnredlist.org/search>. (Consultado: 2016).
- Jaap W.C., Sargent F. J. 1993. The status of the remnant populations of *Acropora palmata* (Lamarck, 1816) at Dry Tortugas National Park, Florida, with a discussion of possible causes of changes since 1881. In: Ginsburg, R.N. (Ed.), Global Aspects of Coral Reefs. University of Miami, Miami, pp. 101-104.
- Lang J. C., Marks K. W., Kramer P. A., Kramer P. R., Ginsburg R. N. 2010. AGRRA protocols version 5.4. Atlantic and Gulf Rapid Reef Assessment Program, Florida, USA.
- Lirman D. 2000. Fragmentation in the branching coral *Acropora palmata* (Lamarck): growth, survivorship, and reproduction of colonies and fragments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 251: 41-57.
- Mendoza-Quiroz S. 2013. Etapas tempranas de desarrollo y asentamiento del coral *Montastraea faveolata* (Ellis & Solander 1786), del arrecife de Puerto Morelos, Quintana Roo. México. Tesis de Licenciatura. Universidad del Mar Campus Puerto Ángel, Oaxaca.
- Miller M. W., Bourque A. S., Bohnsack J. A. 2002. An analysis of the loss of acroporid corals at Looe Key, Florida, USA: 1983-2000. *Coral Reefs* 21: 179-182.
- OBIS. 2015. Distribution records of *Acropora palmata* (Lamarck, 1816) [Dataset] (Available: Ocean Biogeographic Information System. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. <http://www.iobis.org>. Accessed: 2016-04-18)
- Oliver J., Babcock R. 1992. Aspects of the fertilization ecology of broadcast spawning corals: sperm dilution effects and in situ measurements of fertilization. *Biological Bulletin* 183: 409-417.
- Porter J., Battey J., Smith G. 1982. Perturbation and change in coral reef communities. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 79: 1678- 1681.
- Randall C. J., Szmant A. M. 2009. Elevated temperature affects development, survivorship, and settlement of the elkhorn coral, *Acropora palmata* (Lamarck 1816). *Biological Bulletin* 217: 269-82.
- Rinkevich B. 1995. Restoration strategies for coral reefs damaged by recreational activities: the use of sexual and asexual recruits. *Restoration Ecology* 3: 241-251.
- Ritson-Williams, R., Paul V. J., Arnold S. N., Steneck R. S. 2010. Larval settlement preferences and post-settlement survival of the threatened Caribbean corals *Acropora palmata* and *A. cervicornis*. *Coral Reefs*, 29, 71-81.
- Rodríguez-Martínez R. E., Banaszak A. T., McField M. D., Beltrán-Torres A. U., Álvarez-Filip L. 2014. Assessment of *Acropora palmata* in the Mesoamerican Reef System. *PLoS ONE* 9(4): e96140. doi:10.1371/journal.pone.0096140
- Sánchez J. A., Alvarado E. M., Gil M. F., Charry H., Arenas O. L., Chasqui L. H. & García R. P. 1999. Synchronous mass spawning of *Montastraea annularis* (Ellis & Solander) and *Montastraea faveolata* (Ellis & Solander) (Faviidae: Scleractinia) at Rosario islands, Caribbean coast of Columbia. *Bulletin of Marine Science* 65: 873-879.
- SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. 30 de diciembre de 2010. México.
- Shafir S., Rinkevich B. 2008. The underwater silviculture approach for reef restoration: an emergent aquaculture theme. In: Schwartz S. H. (Ed.). *Aquaculture research trends*. 1st Ed. New York: Nova Scientific Publishers, Inc. pp. 279-295.

Shafir S., Van Rijn J., Rinkevich B. 2006. Steps in the construction of an underwater coral nursery, an essential component in reef restoration acts. *Marine Biology* 149: 679–687.

Shaish L., Levy G., Gomez E., Rinkevich B. 2008. Fixed and suspended coral nurseries in the Philippines: establishing the first step in the “gardening concept” of reef restoration. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 358: 86–97.

Szmant A. M. 1986. Reproductive ecology of Caribbean reef corals. *Coral Reefs* 5: 43–53.

Tytler E. M., Spencer P. D. 1983. A method of isolating clean and viable zooxanthellae by density gradient centrifugation. *Limnology and Oceanography* 28(6): 1266–1268.

Vermeij M. J. A., Forgarty N. D., Miller M. W. 2006. Pelagic conditions affect larval behavior, survival, and settlement patterns in the Caribbean coral *Montastraea faveolata*. *Marine Ecology Progress Series* 310(2): 119–128.

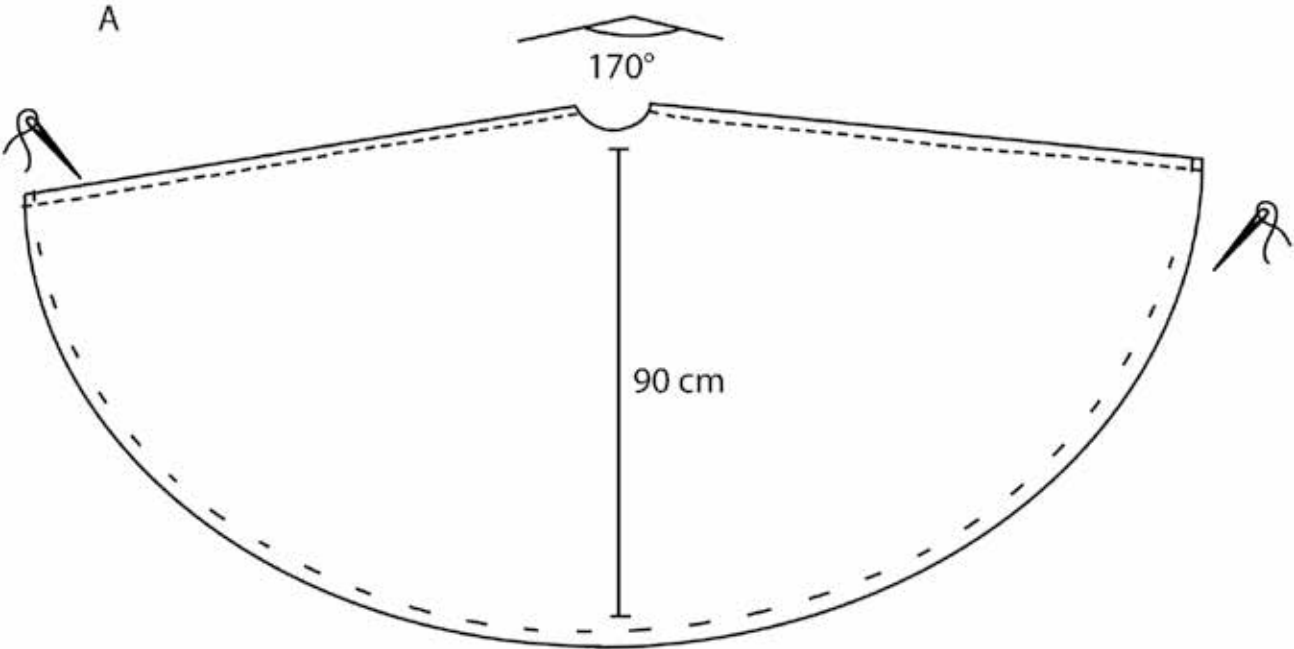
Weil E., Hernández-Delgado E. A., Bruckner A., Ortiz A. L., Nemeth M., Ruiz H. 2002. Distribution and status of acroporid populations in Puerto Rico. Pp. 67–94 in: Bruckner A. W. (Ed.). *Proceedings of the Caribbean Acropora Workshop: potential application of the U.S. endangered species act as a conservation strategy*. University of Miami. Miami. 184 pp.

Williams E. H. Jr., Bartels P. J. & Bunkley-Williams L. 1999. Predicted disappearance of coral-reef ramparts: A direct result of major ecological disturbances. *Global Change Biology* 5: 839–845.

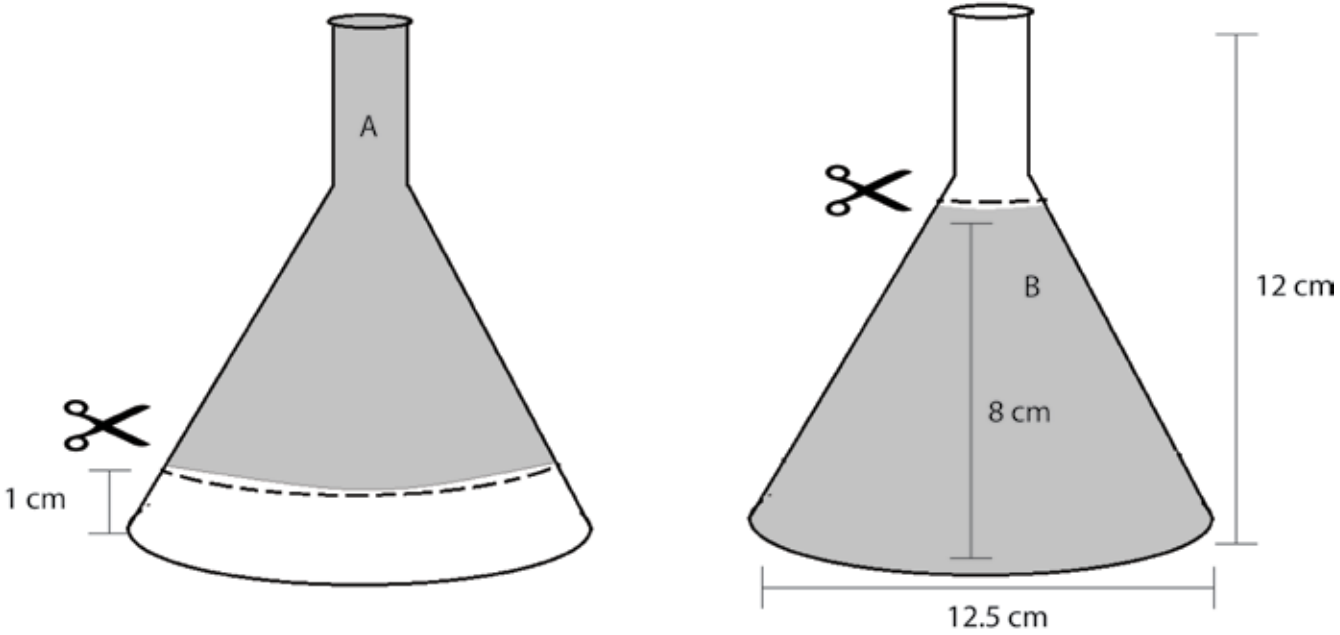
ANEXO I. ELABORACIÓN DE RED PARA RECOLECTA

La tela de malla se corta de acuerdo al diagrama de la Figura I.1 A, es posible usar un molde para agilizar el proceso Figura I.1 B. Posteriormente se pliega y cose el borde circular, finalmente, se unen (cosen) los extremos para formar el cono.

FIGURA I.1 (A) Molde para cortar la tela de malla. (B) Uso de molde para cortar la red.



La parte superior de la red se fabrica con un par de embudos (12.5 cm de alto por 12 de diámetro de la base). Los embudos se cortan como lo indica



Posteriormente, se lija la cara exterior del embudo A y la cara interior del embudo B. Finalmente, se introduce el embudo A en la red, se cubre con pegamento PVC, así como la cara interior del embudo B y se inserta el embudo B de tal forma que la red quede entre los dos embudos (Figura I.3) y se deja secar por 24 horas.



FIGURA I.2. Dos embudos utilizados para la parte superior de la red, la línea punteada indica el corte. La parte de los embudos que se utiliza es la parte sombreada.

FIGURA I.3. Proceso de pegado de embudos. (A) Aplicación de pegamento a embudo A y red. (B) Aplicación de pegamento a la cara interior del embudo B. (C) Ensamble del embudo A, la red y el embudo B (D) Aspecto final.



Posteriormente, se recorta el cuello de una botella de PET (politereftalato de etileno) y la parte superior de la tapa de la botella como se muestra en el esquema de la figura I.4

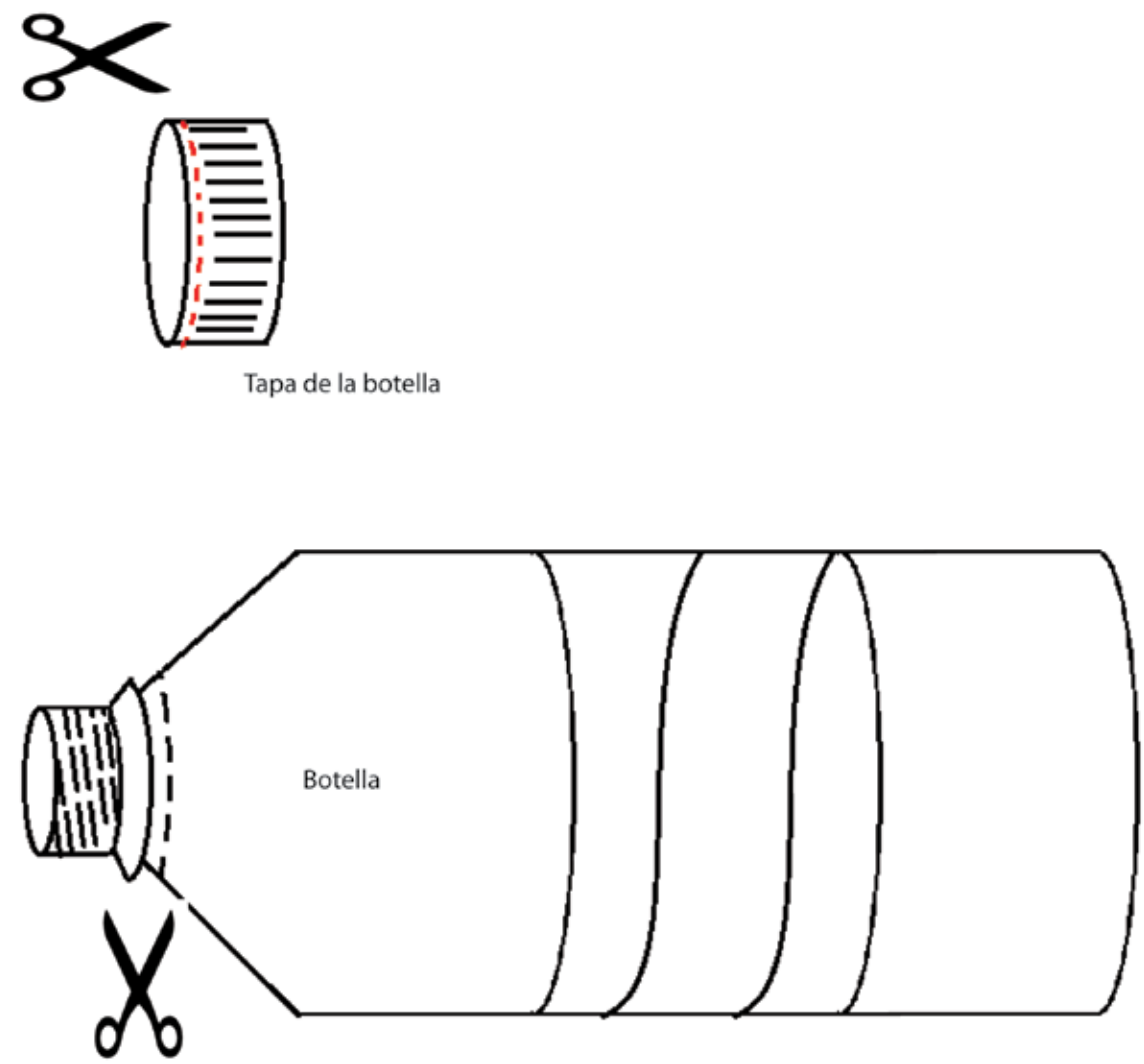
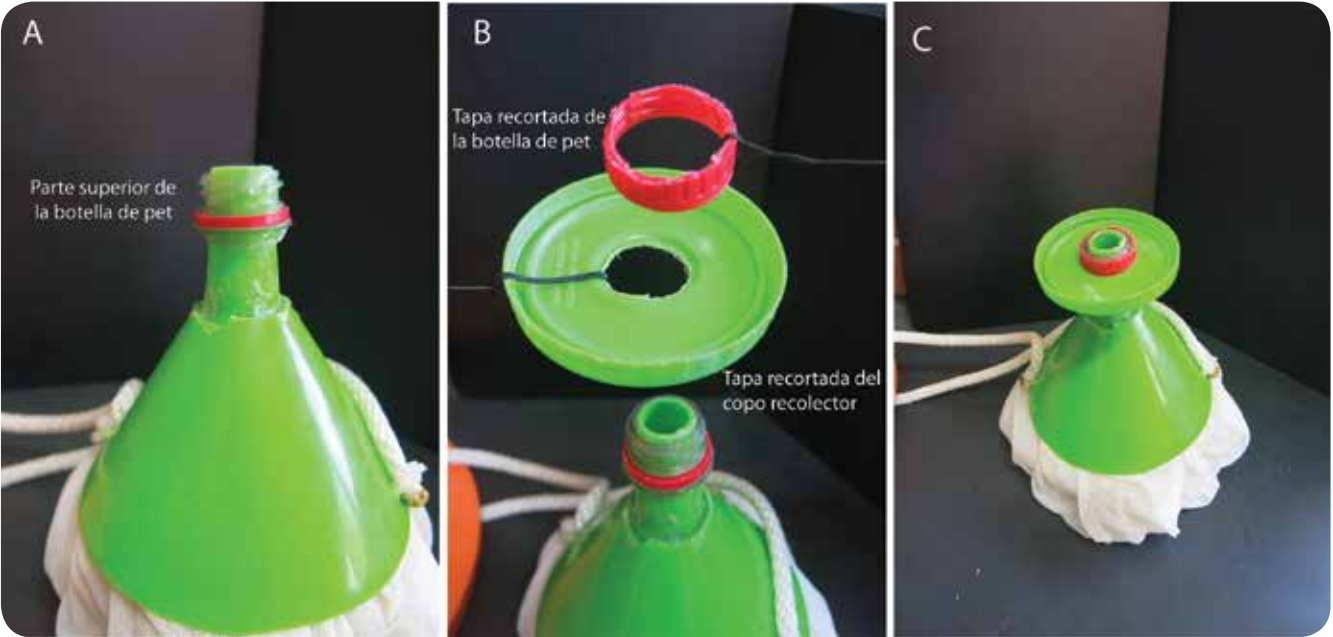


FIGURA I.4. Esquema del corte de la botella PET. Se utiliza la parte superior de la botella y la tapa.

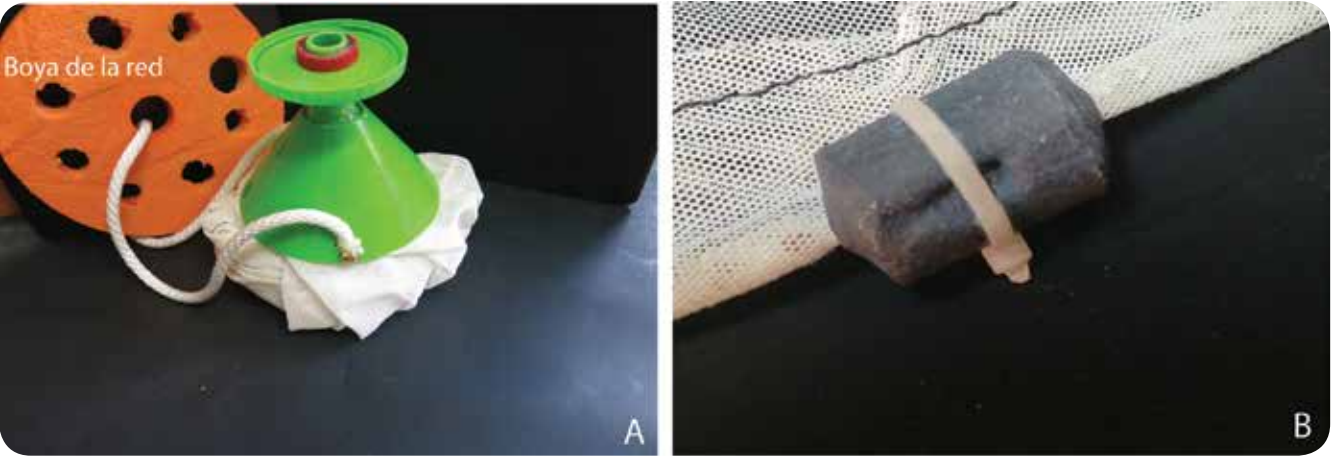
FIGURA I.5. Ensamble de la tapa del copo recolector a la red. (A) Pegado de la parte superior de la botella de PET al embudo. (B) Ensamble de la tapa del copo recolector y aseguramiento con la tapa de la botella de PET. (C) Aspecto final.



La parte superior de la botella se pega en el embudo como lo muestra la figura I. 5 A y finalmente, se ensambla la tapa del copo recolector en la parte superior de la botella ajustándola con la tapa de la misma (Figura I.5 B, C).

Para finalizar la red, mediante una cuerda sujeta al embudo, se coloca una boya para mantener en vertical a la red una vez que se encuentre en el agua (Figura I.6 A). Así mismo, se colocan ocho plomos (600 g cada uno aproximadamente) de manera equidistante en la parte inferior de la red (Figura I. 6 B).

FIGURA I.6. (A) Boya de la red (B) Detalle de un plomo en la parte inferior de la red.



ANEXO II.- DETECCIÓN TEMPRANA DE GAMETOS

Aproximadamente un mes antes de que el desove ocurra es posible detectar y seleccionar las colonias de *A. palmata* que potencialmente desovarán, no obstante esta detección implica acciones invasivas. Con un alicate para uñas se cortan al menos tres fragmentos (1 cm²) de diferentes partes de la colonia procurando evitar el borde de crecimiento de la colonia (orilla de las ramas), pues generalmente esta parte no produce gametos. Al realizar cada corte se debe observar ambos lados del corte, la presencia de oocitos es evidente; se pueden apreciar como pequeñas esferas de color rosa. Los fragmentos cortados pueden ser revisados con ayuda de un microscopio estereoscópico. Es recomendable tomar muestras de por lo menos 10 colonias para calcular el porcentaje de colonias que pueden desovar en el sitio.

FIGURA II.1. Observación en campo de la presencia de gametos en *Acropora palmata*, Detalle de la detección de gametos en campo.



ANEXO III. FORMATO PARA OBSERVACIONES DE DESOVE EN CAMPO

Fecha:		Sitio:	
Observador:			
Hora de la puesta del sol		Hora de inicio del "setting"	
Hora del inicio del monitoreo		Hora de inicio del desove	
Profundidad		Hora del fin del desove	
Área aproximada de monitoreo		Núm. colonias que desovaron	
Especies monitoreadas		Hora del fin del monitoreo	
Núm. colonias monitoreadas			
Observaciones:			

ANEXO IV. EXTRACCIÓN DE SIMBIONTES E INOCULACIÓN

La metodología utilizada para la extracción de *Symbiodinium* spp. fue modificada a partir de la descrita por Tytler y Spencer (1983) y la técnica usada por Baird *et al.* (2006). El tejido de coral se remueve del esqueleto con agua de mar filtrada (1 µm) y aire a presión a través de un aerógrafo (Airbrush, USA). Se recomienda utilizar la menor cantidad de agua posible para facilitar el resto del proceso. Posteriormente, la solución obtenida se homogeneiza (por 3 minutos aprox.) por medio de un homogeneizador de tejidos de vidrio. Se toma una muestra del extracto homogeneizado y se observa con ayuda del microscopio para observar si las células simbiotes han sido separadas del tejido coralino.

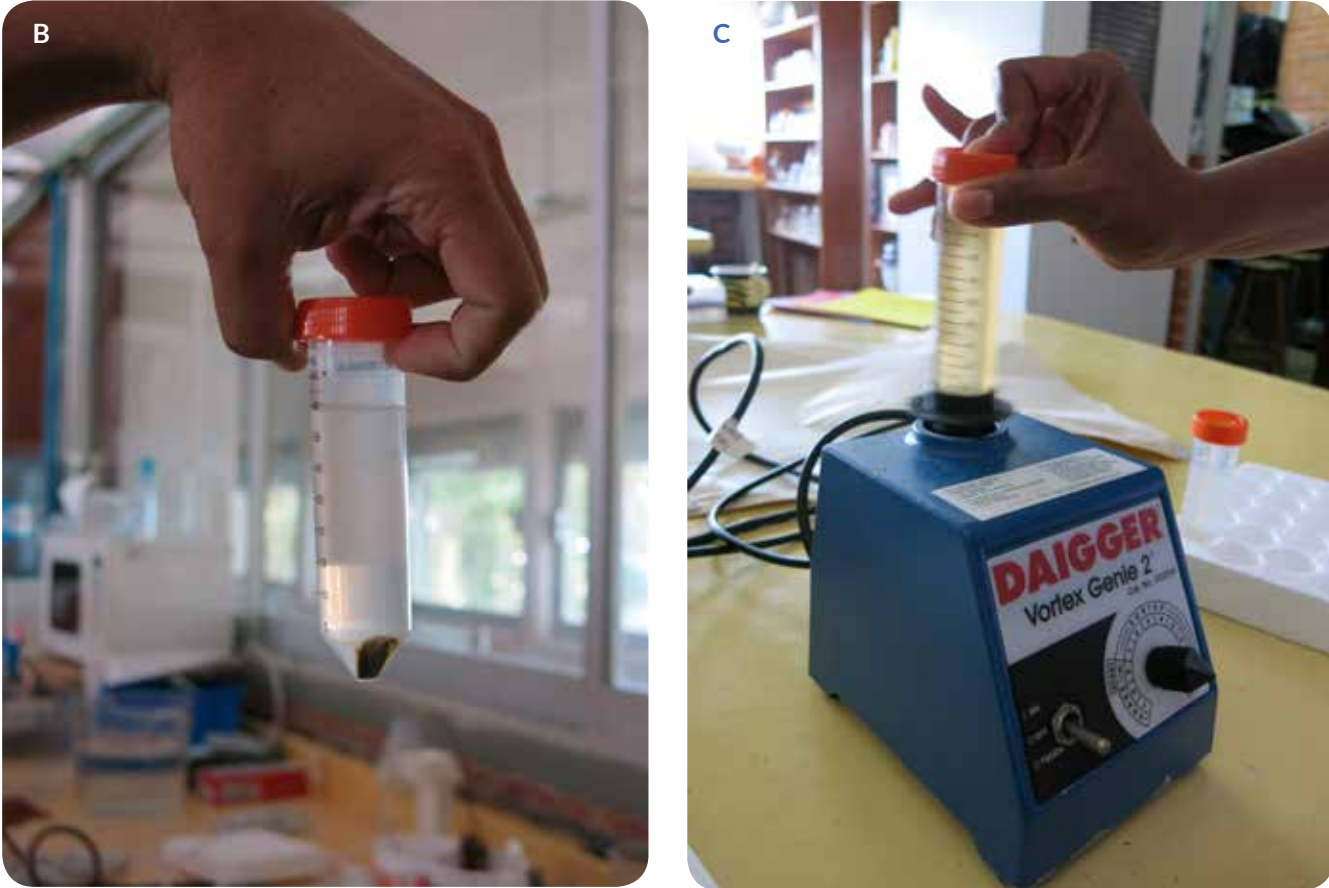
FIGURA IV.1. (A) Ejemplo de la remoción de tejidos con el aerógrafo. (B) Tejido de coral homogeneizado.



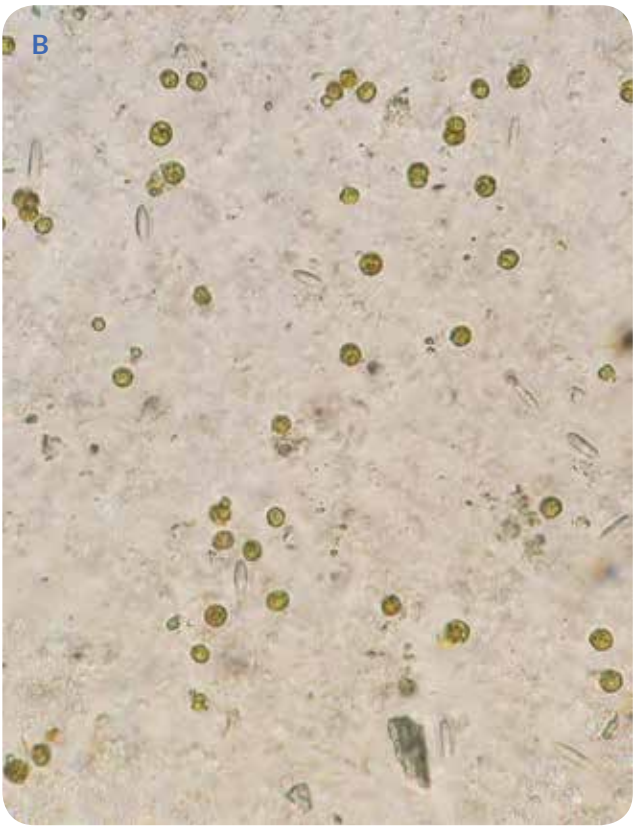
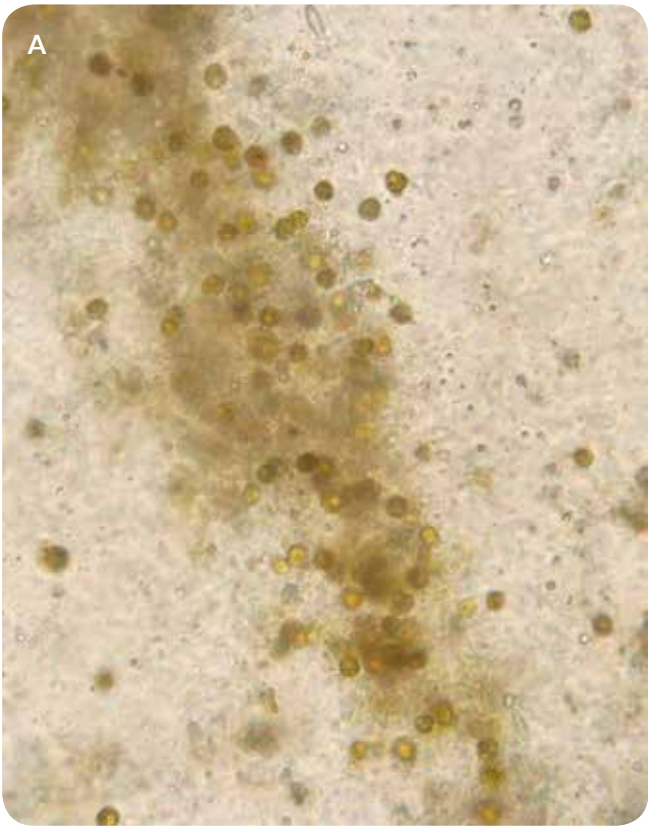
Una vez homogeneizado, el extracto se transfiere a tubos Falcon de 50 ml y se centrifuga a 5000 rpm/ 5 min, el sobrenadante se desecha y el pellet se lava con 30 ml de agua de mar filtrada (1 µm) utilizando un vortex. El pellet se disuelve en el agua de mar filtrada. El lavado del pellet se repite 3 veces.



FIGURA IV.2. (A) Tejido homogenizado transferido a tubos Falcon. (B) Extracto centrifugado. (C) Lavado del pellet.



Finalmente, el extracto se resuspende en un volumen de agua de mar filtrada aproximadamente 5 veces el volumen del extracto y se mide el volumen total de la suspensión. La concentración de células simbiotes de esta suspensión se determina mediante conteos (por triplicado) utilizando un he-



mocitómetro. Con estos datos se puede calcular la densidad de simbiontes por mililitro de suspensión.

La inoculación se lleva a cabo directamente en los sistemas de cultivo (incubadoras), para lo cual se disminuye el volumen de agua. La concentración para la inoculación es de 1×10^5 a 1×10^6 células por ml. Después de 72 horas se debe monitorear el resultado de la inoculación mediante una lámpara de fluorescencia (Tektite, Nightsea Bluestar); los reclutas inoculados mostrarán una fluorescencia roja debido a la clorofila *a* contenida en los simbiontes, mientras que los reclutas no infectados mostrarán una verde debido a las “proteínas verde fluorescentes” (GFPs por sus siglas en inglés). Si no se observa infección a los 5 días, es necesario repetir el procedimiento.

FIGURA IV.3. (A) Tejido de coral antes de ser homogeneizado y lavado. (B) Simbiontes después de la extracción.

ANEXO V. FORMATO PARA EL MONITOREO DE RECLUTAS

Fecha:							
Sitio:							
N. Recluta	D1	D2	H	NR	MP (%)	Sobrecrecimiento	Observaciones
MP % = Mortalidad parcial (5,25,50,75,95)						D1: Diámetro mayor	
						D2: Diámetro menor	
Sobrecrecimiento						H: Altura de la colonia	
TAS = Tapete de alga con sedimento						NR: número de ramas	
CCA = Algas coralinas							
Fil = Algas filamentosas							

ANEXO VI. GLOSARIO

ACONDICIONAMIENTO DEL SUSTRATO: Adecuación que se hace al sustrato cuando es inmerso en agua de mar durante algún tiempo, para que se desarrolle una biopelícula sobre el mismo y promover el asentamiento de larvas de invertebrados marinos.

ASENTAMIENTO: Etapa en la que la larva busca un sitio adecuado para fijarse, durante el cual se adhiere por el extremo aboral a un sustrato.

BIOPELÍCULA: : Colonización de bacterias, diatomeas y otros microorganismos sobre superficies naturales o artificiales.

CAPACIDAD DE FECUNDACIÓN: Característica que posee el espermatozoide para poder fecundar un óvulo.

DESARROLLO IRREGULAR: Anomalías presentes durante el desarrollo de algunos embriones, que incluyen el crecimiento exagerado de blastómeros y la ausencia del patrón característico en el desarrollo de la especie.

DIVERSIDAD GENÉTICA: La variedad de alelos y genotipos presentes en una población, se refleja en las diferencias morfológicas, fisiológicas y de comportamiento entre individuos y poblaciones.

EMBRIÓN: Fase temprana de desarrollo de los huevos fecundados hasta la aparición de la larva. Su desarrollo ocurre en la columna de agua, sin presentar movimientos propios.

ESPERMÁTIDES: Precursores inmaduros de los espermatozoides.

ESPERMATOZOIDE: Célula reproductora masculina, móvil y flagelada, destinada a la fecundación del óvulo.

FECUNDACIÓN: También llamada singamia, es el proceso en el que el óvulo y el espermatozoide se fusionan durante la reproducción sexual para crear un nuevo individuo con un genoma derivado de ambos progenitores. Da inicio a la del embrión y se le denomina cigoto.

FECUNDACIÓN ASISTIDA: Consiste en facilitar la fecundación de células sexuales para formar nuevos individuos.

FERTILIZACIÓN: El proceso mediante el cual se inicia la reproducción sexual comenzando con la conjunción de dos células, cada una con su parte de información genética.

FOTOTACTISMO POSITIVO: Respuesta positiva a un estímulo lumínico, provocando atracción al mismo.

GAMETOS: Célula germinal madura que participa en la fecundación, los gametos femeninos son los óvulos y los masculinos son los espermatozoides.

GENET: Ensamblaje de colonias genéticamente idénticas que son descendientes de un mismo organismo ancestral.

GENOTIPO: Conjunto de los genes que existen en el núcleo celular de cada individuo

INOCULACIÓN: Proveer dinoflagelados simbioses al cultivo de reclutas recién asentados con el fin de que se introduzcan, reproduzcan y crezcan dentro del tejido del coral.

JUVENIL: Fase de desarrollo, después de la metamorfosis, donde el organismo no ha alcanzado la madurez sexual, el tamaño y la forma adulta.

LARVA: Periodo del desarrollo embrionario posterior a la organogénesis y que precede al asentamiento y/o la metamorfosis en una gran diversidad de fila de organismos marinos. En Cnidarios se le denomina plánula y se

caracteriza su forma alargada, ciliada y por nadar con su parte aboral hacia el frente, además de su búsqueda característica de sustrato en el momento del asentamiento.

METAMORFOSIS: Transformación que experimentan determinados animales en su desarrollo biológico y que afecta no solo a su forma sino también a sus funciones y su modo de vida; es típica de los poliquetos, equinodermos, insectos, crustáceos y anfibios.

OOCITOS: Precursores inmaduros de los óvulos.

ÓVULO: Célula sexual o gameto femenino, esférico e inmóvil, destinada a ser fecundada por el espermatozoide.

ÓVULO NO FECUNDADO: Óvulo que no ha sido penetrado por un espermatozoide y cuya reacción acrosomática no haya iniciado.

PAQUETES DE GAMETOS: Conjunto de sacos que contienen espermatozoides y huevos compactados, que por el alto contenido de lípidos tienen una flotabilidad positiva. Coloración naranja o rosada.

POBLACIÓN: Conjunto de individuos de la misma especie que comparten un área geográfica y tienen la posibilidad de cruzarse o reproducirse entre ellos.

PÓLIPO: Es una de las dos estructurales del filo Cnidaria. Consiste en un saco contráctil, fijado a un sustrato por el extremo aboral (basal) mientras que por el extremo oral posee un orificio (boca y ano) rodeado de tentáculos.

PÓLIPO LIBRE: Fase de desarrollo en la que la larva plánula realiza su metamorfosis en la columna de agua formando un pólipo, puede vivir ahí durante algún tiempo, hasta la reversión de la metamorfosis y su asentamiento o muerte.

PÓLIPO PRIMARIO: Es el primer pólipo que se forma por el asentamiento

de la larva y a partir del cual inicia el desarrollo de la colonia.

POTENCIAL DE FECUNDACIÓN: De los espermatozoides es la capacidad estructural y fisiológica que poseen estas células sexuales que incrementa la probabilidad de fecundación del óvulo.

RAMET: Colonia fisiológicamente distinta y funcional, que pueden sobrevivir independiente, pero que hace parte de un genet.

RECLUTA: Pólipo formado posterior al asentamiento de la larva sobre un sustrato.

RECLUTAMIENTO: Es el proceso que implica que los nuevos organismos pasen a formar parte de la comunidad arrecifal.

RESTAURACIÓN: Modificación de una cosa para ponerla en el estado o estimación que antes tenía.

SETTING: Etapa inmediatamente previa al desove, durante la cual la colonia se prepara para liberar los paquetes de gametos, mismos que se observan en las bocas de los pólipos de manera evidente. Usualmente el Setting tiene una duración de unos cuantos minutos a una hora.

TASA DE FERTILIZACIÓN: Es el número de oocitos con división celular entre el número total de la muestra (huevos con división celular más huevos no fertilizados).

ANEXO VII. CRÉDITOS FOTOGRÁFICOS

Portada: Paul Selvaggio (Izq), Sandra Mendoza Quiroz (Cen),
Anastazia Banaszak (Der)

Figura 1: Sergio Guendulain García, Kelly Gómez Campo

Figura 2A: Kelly Gómez Campo

Figura 2B: Mariana Gudiño

Figura 2C: Agustín Israel Cruz Ortega

Figura 2D: Paul Selvaggio

Figura 2E: Agustín Israel Cruz Ortega

Figura 2F: Paul Selvaggio

Figura 3: OBIS, 2015

Figura 4A: Sandra Mendoza Quiroz

Figura 4B: Sandra Mendoza Quiroz

Figura 4C: Sandra Mendoza Quiroz

Figura 6: Sergio Guendulain García, Sandra Mendoza Quiroz,
Anastazia Banaszak, Modificado por Miriam Schutter

Figura 7: Miriam Schutter

Figura 8: Sandra Mendoza Quiroz

Figura 9: Sinna Loeschke

Figura 10A: Miriam Schutter

Figura 10B: Christian Voolstra

Figura 11: Miriam Schutter

Figura 12A: Paul Selvaggio

Figura 12B: Paul Selvaggio

Figura 13: Sandra Mendoza Quiroz

Figura 14: Paul Selvaggio

Figura 15: Anielka Martínez Banaszak

Figura 16: Anielka Martínez Banaszak

Figura 17A: Paul Selvaggio

Figura 17B: Paul Selvaggio

Figura 17C: Paul Selvaggio

Figura 18A: Paul Selvaggio

Figura 18B: Paul Selvaggio

Figura 18C: Paul Selvaggio

Figura 19: Randall and Szmant 2009

Figura 20A: Genoveva Molina Molina

Figura 20B: Genoveva Molina Molina

Figura 21A: Sandra Mendoza Quiroz

Figura 21B: Sandra Mendoza Quiroz

Figura 22: Miriam Schutter

Figura 23: Sergio Guendulain García

Figura 24A: Sergio Guendulain García

Figura 24B: Sandra Mendoza Quiroz

Figura 24C: Sandra Mendoza Quiroz

Figura 25: Sandra Mendoza Quiroz

Figura 26A: Sandra Mendoza Quiroz

Figura 26B: Sandra Mendoza Quiroz

Figura 26C: Sandra Mendoza Quiroz

Figura 27A: Sandra Mendoza Quiroz

Figura 27B: Sandra Mendoza Quiroz

Figura 27C: Sandra Mendoza Quiroz

Figura 28A: Sandra Mendoza Quiroz

Figura 28B: Sandra Mendoza Quiroz

Figura 29: Sandra Mendoza Quiroz

Figura 30A: Sergio Guendulain García

Figura 30B: Sergio Guendulain García

Figura 31A: Sergio Guendulain García

Figura 31B: Sergio Guendulain García

Figura 32A: Sergio Guendulain García

Figura 32B: Sergio Guendulain García

Figura 33A: Sergio Guendulain García

Figura 33B: Eduardo Ávila Pech

Figura 33C: Sergio Guendulain García

Figura 34: Sandra Mendoza Quiroz

Figura 35: Sergio Guendulain García

Figura 36: Sergio Guendulain García

Figura 37A: Sergio Guendulain García

Figura 37B: Sandra Mendoza Quiroz

Figura I.1: Sergio Guendulain García

Figura II.1A: Sergio Guendulain García

Figura II.1B: Sergio Guendulain García

Figura II.2: Sergio Guendulain García

Figura II.3A: Sergio Guendulain García

Figura II.3B: Sergio Guendulain García

Figura II.3C: Sergio Guendulain García

Figura II.3D: Sergio Guendulain García

Figura II.4: Sergio Guendulain García

Figura II.5A: Sergio Guendulain García

Figura II.5B: Sergio Guendulain García

Figura II.5C: Sergio Guendulain García

Figura II.6A: Sergio Guendulain García

Figura II.6B: Sergio Guendulain García

Figura IV.1A: Sergio Guendulain García

Figura IV.1B: Sergio Guendulain García

Figura IV.2A: Sergio Guendulain García

Figura IV.2B: Sergio Guendulain García

Figura IV.2C: Sergio Guendulain García

Figura IV.3A: Sergio Guendulain García

Figura IV.3B: Sergio Guendulain García

