



UNIVERSIDAD DEL MAR

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INFLUENCIA AMBIENTAL SOBRE LA ACTIVIDAD REPRODUCTIVA
Y LA CONCENTRACIÓN TISULAR DE ALGUNOS METABOLITOS DE
COLONIAS DE *Pocillopora damicornis* (Linnaeus 1758) (Anthozoa:
Scleractinia) EN LA COSTA DE OAXACA, MÉXICO

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL
GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS: ECOLOGÍA MARINA

PRESENTA

Biol. Mar. Denise Aracely Zavala Casas

DIRECTOR

Dr. Francisco Benítez Villalobos

Puerto Ángel, Oaxaca, México

Agosto, 2021

RESUMEN

Pocillopora damicornis es una especie de coral dominante en los arrecifes del Pacífico oriental. No obstante, los estudios concernientes a la biología de la especie son escasos. En el presente estudio se obtuvo una perspectiva general de las fluctuaciones anuales (2010-2012) de las concentraciones tisulares de clorofila *a* (CTchl *a*), clorofila *c* (CTchl *c*) y lípidos (CTI) además del porcentaje de colonias con actividad reproductiva (%CAR) en cuatro arrecifes de la costa de Oaxaca. Después del tratamiento pertinente al tejido, se extrajo la clorofila con acetona al 90%, los lípidos con cloroformo-metanol y se ejecutaron las técnicas histológicas de rutina I y II para evaluar la condición reproductiva. A partir de imágenes satelitales se obtuvieron los valores de temperatura superficial del mar (TSM); radiación fotosintéticamente activa (PAR₀); y coeficiente de atenuación difusa (CAD₄₉₀) como indicador de la turbidez. El fotoperiodo se estimó como la diferencia entre las horas aparentes del amanecer y atardecer. Se ejecutó una descomposición espectral Census II de las series temporales de todas las variables analizadas. Se elaboró una matriz de correlación entre variables biológicas vs variables ambientales con los componentes estacionales de las series. Los valores más altos de TSM, PAR₀ y fotoperiodo se presentaron durante los meses de abril a agosto y los mayores valores del CAD₄₉₀ se obtuvieron durante los meses de diciembre a febrero. Los mayores valores de la CTchl *a* se registraron en el periodo octubre-diciembre mientras que en el caso de la CTchl *c* los valores oscilaron pronunciadamente durante todo el año, siendo ligeramente mayores de mayo a diciembre. Los valores promedio más elevados de la concentración tisular de lípidos en las colonias del área de estudio se presentaron de julio a noviembre y se observó una disminución de forma oscilante durante el resto del año. La actividad reproductiva se encontró directamente correlacionada con la TSM (0.85), fotoperiodo (0.92) y PAR (0.44) y resultó inversamente correlacionada con el CAD₄₉₀ (-0.84). Dichas correlaciones podrían ser resultado de a) la influencia que el ambiente ejerce en la fisiología de las colonias a través del efecto que dichas variables tienen en el presupuesto energético de las colonias o b) a mecanismos de sincronización ambiental que garanticen condiciones adecuadas de supervivencia a las larvas. Del resto de las variables biológicas únicamente la CTchl *a* presentó una correlación significativa con la PAR (-0.48). Los cambios estacionales de las variables ambientales analizadas, o de algunas otras cercanamente relacionadas, podrían inducir cambios en el tipo de alimentación dominante de las colonias (autótrofo vs heterótrofo), lo que a su vez tendría repercusiones en la actividad metabólica y reproductiva de las colonias. Para poder identificar dichas asociaciones es importante mejorar la resolución en tiempo y espacio del monitoreo de variables biológicas y ambientales.

Palabras clave: *Pocillopora*, reproducción, lípidos, clorofila

DEDICATORIA

**A mi abuelo, por detonar mi gusto por la educación
constante.**

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo de Investigación Científica Básica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) que proporcionó el financiamiento necesario para la realización de este trabajo a través del proyecto 80228 “Entendiendo los procesos que garantizan la perpetuidad de los sistemas arrecifales. Reproducción, reclutamiento, supervivencia y conectividad de corales arrecifales en la costa de Oaxaca” a cargo del Dr. Andrés López Pérez.

A la Beca CONACYT Nacional que me proporcionó el financiamiento necesario para gastos personales durante mi permanencia en el posgrado.

A todas las personas que contribuyeron a este proyecto en el trabajo de campo y laboratorio.

A mi director, revisores y jefe del posgrado por la disposición que tuvieron para que pudiera retomar este proceso después de una larga pausa.

A Eugenio que me recibió en el Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo (IIO-UABC) para hacer una estancia muy enriquecedora. A la Beca Mixta para Movilidad Nacional que me permitió sufragar los gastos de dicha experiencia.

A los docentes de la maestría en Ecología Marina: Pedro, Andrés, Francisco, Lalo, Cristóbal, Vicente y Auxilio, cuya voz transmitía lo mismo pasión por la geología que enorme generosidad y calidez. De todos ustedes atesoro aprendizajes no solo académicos sino humanos.

A mi grupo de posgrado por hacer que las largas jornadas de trabajo en la sala B fueran más llevaderas.

A Julia y Francisco por recibirme en su hogar en Ensenada.

A mi familia, por su enorme paciencia y constante apoyo. Por recibirme con los brazos abiertos siempre que necesito cobijo.

Lista de tablas y figuras

Tablas

Tabla 1. Matriz de correlación entre componentes estacionales de variables biológicas y ambientales.....	31
--	----

Figuras

Figura 1. Ubicación de las localidades de estudio.....	9
Figura 2. Esquema del plano de corte de los pólipos de <i>P. damicornis</i>	18
Figura 3. Temperatura superficial del mar.....	27
Figura 4. Radiación fotosintéticamente activa (PAR_0).	28
Figura 5. Coeficiente de atenuación difusa (CAD_{490nm}).....	29
Figura 6. Fotoperiodo.	30

CONTENIDO

Lista de tablas y figuras	vi
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
3. Justificación	6
4. Hipótesis	7
5. Objetivos	8
5.1. Objetivo general.....	8
5.2. Objetivos particulares	8
6. Material y método	9
6.1. Área de estudio.....	9
6.2. Trabajo de campo.....	12
6.3. Trabajo de laboratorio.....	13
6.4. Trabajo de gabinete.....	20
7. Resultados	23
7.1. Variables biológicas: metabolitos y actividad reproductiva.	23
7.2. Variables ambientales: Temperatura, PAR, CAD y fotoperiodo.....	27
7.1. Relación entre variables ambientales y biológicas.	31
8. Discusión	32
9. Conclusiones	39
10. Referencias	40

1. Introducción

Un arrecife es una estructura viva que se mantiene a sí misma al nivel medio del mar por la calcificación biogénica de una variedad de taxa (Atkinson 2011). Los arrecifes coralinos son aquéllos en los que los corales pétreos proporcionan la mayoría de la estructura del hábitat del arrecife. Estos ecosistemas se caracterizan por ser altamente biodiversos y productivos, además de ser importantes para la sociedad debido a los bienes y servicios que proporcionan (Richmond 1997, Aramburu-Vizcarra *et al.* 2008).

El crecimiento esquelético, la reproducción, respiración y excreción de los corales escleractinios son procesos fisiológicos que demandan una gran cantidad de energía. Para poder satisfacer dicha demanda, los corales utilizan dos fuentes principales de energía, la que proviene de los fotosintatos que les proveen algas simbióticas de la familia Symbiodiniaceae que se localizan en la gastrodermis de su tejido (Palardy *et al.* 2005, Ferrier-Pagès *et al.* 2011, Camp *et al.* 2020) y la que se deriva de la ingestión de plancton y otras partículas. En condiciones ideales de irradiancia y temperatura, el aporte de fotosintatos de las algas (glicerol, azúcares, ácidos orgánicos, amino ácidos, lípidos y ácidos grasos poliinsaturados) satisface la mayoría de los requerimientos nutricionales de su hospedero (Muscatine 1990, Veron 1995, Titlyanov y Titlyanova 2002, Venn *et al.* 2008) pero, a través de la alimentación heterótrofa, obtienen el nitrógeno, fósforo y otros nutrientes que no son proporcionados por los fotosintatos translocados del simbiote (Ferrier-Pagès *et al.* 2011). En los últimos años se ha elucidado y entendido que los corales poseen un microbioma que, además de

las microalgas, incluye bacterias, arqueas, hongos y virus, formando un sistema complejo denominado holobionte. El microbioma tiene gran influencia en el mantenimiento de la homeostasis entre los corales y las microalgas y es sensible a los cambios ambientales (Peixoto *et al.* 2017, Zhang *et al.* 2021).

Además del crecimiento esquelético, la reproducción de los corales constructores de arrecifes o hermatípicos, es uno de los procesos críticos de los cuales depende la persistencia de dichos arrecifes (Richmond 1997). En general, estos animales son capaces de reproducirse tanto asexual como sexualmente (Gleason y Hofmann 2011). La reproducción asexual está destinada principalmente al crecimiento colonial mediante la gemación o fisión de los individuos o pólipos, mientras que la reproducción sexual involucra la producción de gametos, su fertilización y el desarrollo de una larva plánula que usualmente es planctónica (Harrison y Wallace 1990, Richmond 1997, Veron 2000).

En la actualidad, los arrecifes coralinos enfrentan grandes amenazas derivadas de la actividad antropogénica mundial (e.g. aumento de temperatura y acidificación del océano). En consecuencia, un número considerable de esfuerzos de investigación se han enfocado a la caracterización de los efectos que estas presiones tienen sobre la biología de los corales escleractinios. Sin embargo, se ha detectado que hay carencias significativas en el conocimiento de la respuesta que estos organismos tienen a las variaciones naturales del ambiente (Hochberg *et al.* 2006). Bajo este contexto, el presente estudio pretende identificar la influencia que tienen algunos factores ambientales sobre la concentración tisular de algunos metabolitos y de la actividad reproductiva

sexual del coral escleractinio *Pocillopora damicornis* en cuatro comunidades arrecifales de la costa de Oaxaca.

2. Antecedentes

Debido a la importancia que tiene la reproducción de los corales escleractinios en la permanencia de los arrecifes que construyen, es uno de los aspectos de su biología que mayor atención ha recibido. En el caso particular del coral *P. damicornis* los estudios acerca de su reproducción iniciaron hace casi un siglo en la Gran Barrera Arrecifal (e.g. Marshall y Stephenson 1933) y, a partir de entonces, han proliferado en casi todas las regiones en donde se distribuye la especie. No obstante, hasta principios de la década de los 90's estas investigaciones se encontraron dirigidas principalmente a la descripción de los patrones reproductivos de la especie. En el Indo-Pacífico (occidente de Australia), Pacífico occidente (Gran Barrera Arrecifal, Micronesia, Filipinas, Taiwán y Japón) y Pacífico central (Hawái), se encontró que, la fecundación de los gametos de *P. damicornis* ocurre principalmente de manera interna (Stimson 1978, Harriot 1983, Richmond y Jokiel 1984, Stoddart y Black 1985, Ward 1992, Permata *et al.* 2000, Fan *et al.* 2002, Villanueva *et al.* 2008). En contraste, en el Pacífico oriental no se han observado larvas plánulas en el tejido de *P. damicornis*, pero sí espermatozoides y ovocitos maduros zooxantelados, por lo que se infiere que la especie libera sus gametos al medio y en consecuencia la fecundación ocurre en la columna de agua (Glynn *et al.* 1991, Chávez-Romo y Reyes-Bonilla 2007, Zavala-Casas 2013, Castrillón-Cifuentes *et al.* 2015, Santiago-Valentín *et al.* 2018).

La relación de la actividad reproductiva de las colonias de *P. damicornis* con factores ambientales es un aspecto que, en general, se encuentra poco estudiado. La mayoría de las investigaciones realizadas en la región han señalado a la temperatura como una variable que puede llegar a afectar el avance del ciclo gametogénico de las colonias (e.g. Chávez-Romo y Reyes-Bonilla 2007, Carpizo-Ituarte *et al.* 2011, Rodríguez-Troncoso *et al.* 2011) pero, en muy pocos trabajos se incluyen otras variables ambientales o no se encuentran asociaciones significativas con las mismas (e.g. Castrillón-Cifuentes *et al.* 2015). Santiago-Valentín *et al.* (2018) realizaron un estudio regional en el que buscaron explicar la variación de algunos parámetros reproductivos de las tres principales especies constructoras de arrecifes en el Pacífico Oriental Tropical (POT) a partir de las fluctuaciones de ciertas variables ambientales. Encontraron que, para *P. damicornis* en esta región, el mejor predictor de la actividad reproductiva es el número de horas diarias de luz, aunque señalan que, en general, los corales del POT están influenciados por numerosos factores ambientales que se consideran estresantes para las colonias, tales como la alternancia de las temporadas de lluvias y secas y las condiciones interanuales del evento El Niño-Oscilación del Sur (ENSO).

Por otra parte, la forma en la que se relaciona la reproducción con el resto de las actividades metabólicas de las colonias de la especie aún no se conoce con precisión. El único estudio al respecto lo realizó Ward (1995) quien determinó que las diferencias geográficas en los patrones reproductivos descritos anteriormente influyen de forma importante en el balance energético de las colonias, pues el costo de la reproducción es mayor para aquellas que

incubaban las larvas dentro de su tejido, lo que se traduce en una disminución considerable de la concentración tisular de lípidos.

Otros estudios han monitoreado las fluctuaciones de algunos metabolitos tanto en condiciones de variación ambiental natural como en condiciones de estrés. Hernández-Urraca (2010) encontró que, en el Pacífico sur mexicano las concentraciones tisulares de algunos metabolitos de las colonias de *P. damicornis* (lípidos, clorofila a, clorofila c) alcanzan sus máximos valores en la temporada cálida y que la temperatura y la irradianza son, probablemente, los factores ambientales que mayor impacto tienen en su variación estacional. Por otra parte, Rodríguez-Troncoso *et al.* (2010) encontraron que, la primera respuesta de las colonias frente al estrés térmico es un aumento de la producción lipídica, sin embargo, cuando los aumentos de temperatura son abruptos y sostenidos, los lípidos se agotan como reserva energética y la simbiosis zooxantelar puede llegar a desintegrarse de manera inmediata (Rodríguez-Troncoso *et al.* 2010).

3. Justificación

Dentro del estudio de la fisiología coralina aún no existen estudios que realicen un seguimiento simultáneo del metabolismo de las colonias y de su actividad reproductiva. Considerando la importancia de *P. damicornis* como especie constructora de arrecifes en la costa sur del Pacífico mexicano, es relevante conocer las fluctuaciones estacionales de la actividad reproductiva y de metabolitos clave de las colonias de la especie, así como evaluar la forma en que se ven influenciadas por factores ambientales.

4. Hipótesis

Se espera que las fluctuaciones de la actividad reproductiva y las concentraciones tisulares de metabolitos de las colonias de *P. damicornis* reflejen la estacionalidad de las condiciones ambientales de la región, con mayores concentraciones de clorofila en la época fría y mayores porcentajes de lípidos y actividad reproductiva en la época cálida. Se espera que la temperatura superficial del mar y la radiación fotosintéticamente activa sean las variables ambientales que mayor impacto tengan sobre las variables biológicas.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Estimar la influencia de la variación de factores ambientales sobre las fluctuaciones temporales de la actividad reproductiva y la concentración tisular de metabolitos en colonias de *Pocillopora damicornis* de cuatro localidades costeras de Oaxaca, México, durante el periodo mayo 2010-mayo 2012.

5.2. Objetivos particulares

- Caracterizar y analizar la variación temporal del porcentaje de colonias con actividad reproductiva (%CAR), porcentaje de lípidos totales y concentración de clorofila a y c en el tejido de colonias de *P. damicornis*.
- Analizar la relación entre la variación temporal de la temperatura superficial del mar (TSM), radiación fotosintéticamente activa superficial (PAR₀), coeficiente de atenuación difusa (CAD₄₉₀) y fotoperiodo con el porcentaje de colonias con actividad reproductiva (%CAR) y concentración de lípidos, clorofila a y c en el tejido de colonias de *P. damicornis*.

6. Material y método

6.1. Área de estudio

La recolección de muestras se realizó en las bahías de Estacahuite, Riscalillo, Cacaluta y La Entrega en el límite occidental del Golfo de Tehuantepec (GT) (Fig. 1). Los arrecifes de esta zona son de tipo bordeante, someros (2-10 m), con coberturas coralinas desde el 30 hasta el 90%. En el área de estudio los arrecifes poseen un carácter monogénérico pronunciado debido a la dominancia de *Pocillopora* spp. (Glynn y Leyte-Morales 1997; Reyes-Bonilla y Leyte-Morales 1998; Reyes-Bonilla 2003).

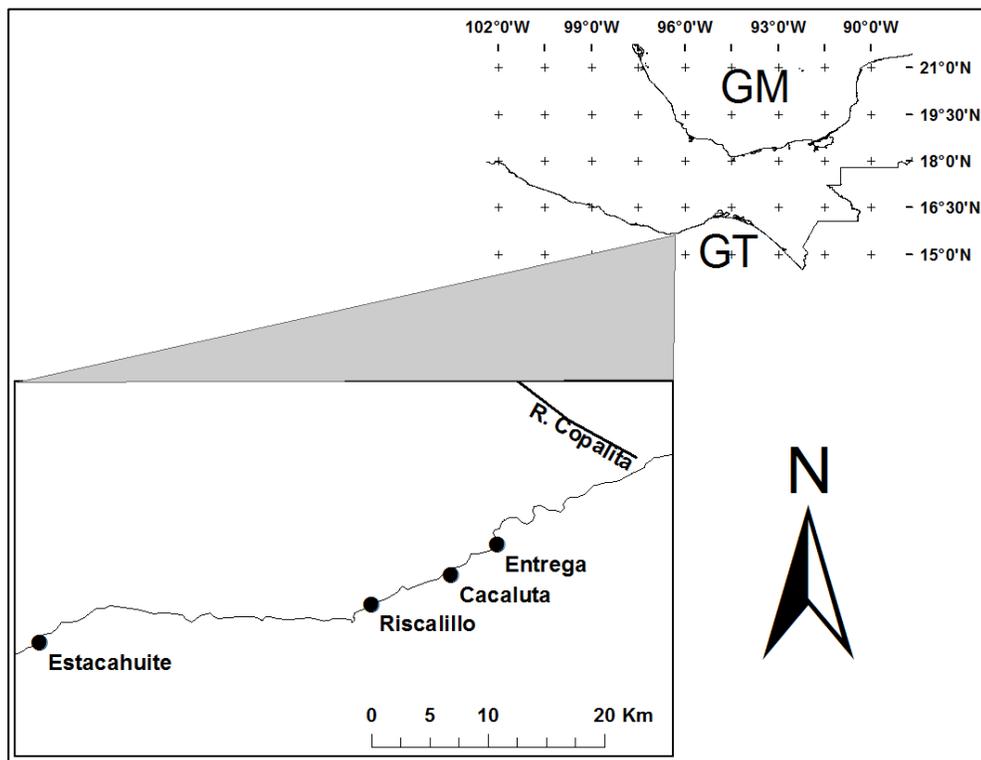


Figura 1. Ubicación de las localidades de estudio en el margen occidental del Golfo de Tehuantepec (GT), Oaxaca, México. GM: Golfo de México.

Una de las principales características del Golfo de Tehuantepec y del resto del Pacífico oriental tropical es la variabilidad de los vientos a lo largo del año (Trasviña y Barton 1997). Esta característica propicia, en parte, que en la costa de Oaxaca el clima de la región sea cálido, subhúmedo, con lluvias en verano y porcentajes de lluvia en invierno menores al 5% anual (García 1973), por lo que es posible distinguir dos temporadas denominadas lluvias y secas.

Durante los meses de diciembre a abril (secas) soplan, a través de pasos de montaña y de manera perpendicular a la costa, vientos intensos comúnmente conocidos como “*Nortes*” (Trasviña y Barton 1997, Pennington *et al.* 2006, Willet *et al.* 2006). El forzamiento del viento propicia en el océano, a nivel de mesoescala, un enfriamiento por mezcla turbulenta, surgencias por bombeo de Ekman y la generación de grandes giros anticiclónicos (Lavín *et al.* 1992; Trasviña y Barton 1997; González-Silvera *et al.* 2004, Willet *et al.* 2006).

Las surgencias inducidas por el viento y la mezcla cerca de la superficie aportan nutrientes que favorecen una concentración alta de clorofila a lo largo del eje del viento. Los giros propician que el área rica en clorofila se extienda hasta 1000 Km fuera de la costa. Los aspectos anteriores destacan al Golfo de Tehuantepec como una de las zonas más fértiles del Pacífico oriental (Pennington *et al.* 2006, Willet *et al.* 2006).

En lo que a la circulación oceánica respecta, la Corriente Costera de Costa Rica (CCCR) se extiende, en promedio, hasta el Golfo de Tehuantepec, en donde cambia de dirección alejándose de la costa (Kessler 2006; Trasviña y Barton 2008; Barton *et al.* 2009).

A nivel de mesoescala, el valor promedio de la temperatura superficial en

el Golfo de Tehuantepec se encuentra entre 28 y 29° C (Fiedler y Talley 2006). En el ciclo anual de la TSM en el Pacífico este ecuatorial y en particular en el Golfo de Tehuantepec el forzamiento del viento juega un papel muy importante pues determinan la variación anual de la profundidad de la capa mezclada (Chen *et al.* 1994). El impacto de los vientos de paso de montaña en la variabilidad intra e interanual de la TSM es mayor en esta región que en otras de características oceanográficas similares (*e.g.* Golfo de Papagayo) (Sun y Yu 2006, Karnauskas 2007). Cuando soplan los nortes, las temperaturas son considerablemente menores que en el resto del año (Chen *et al.* 1994, Sun y Yu 2006, Karnauskas 2007). A esta escala, los vientos tehuanos pueden disminuir la temperatura superficial del centro del golfo hasta 8°C en cuestión de horas, sin embargo, este enfriamiento puede no alcanzar el extremo oeste del GT (Barton *et al.* 1993) en donde la zona de estudio se encuentra localizada.

En trabajos realizados durante la última década en arrecifes de la zona, se reportan temperaturas promedio alrededor de los 27° C con mínimos cercanos a los 23.5° C y máximos entre 29.9 y 31° C (Hernández-Urraca 2010, Benítez-Villalobos *et al.* 2013)

6.2. Trabajo de campo

6.2.1. Selección, recolecta y fijación de organismos

Durante el periodo comprendido entre mayo del 2010 y mayo de 2012, se realizaron 18 inmersiones con buceo autónomo en las cuatro localidades de estudio. Se empleó un cincel para desprender dos ramas a un máximo de cinco colonias de *P. damicornis*. Las ramas tenían entre 2.5 y 6 cm de longitud y las colonias se eligieron al azar entre aquéllas que tenían como mínimo 15 cm de diámetro para asegurar que eran colonias adultas funcionalmente reproductivas (Stoddart y Black 1985).

Durante el buceo, las ramas se colocaron en una bolsa plástica hermética previamente etiquetada. Una vez en la embarcación, una rama de cada colonia se dividió en dos partes de manera longitudinal. Cada parte se guardó en bolsas plásticas separadas dentro de una bolsa negra que se conservó sin agua marina y dentro de una hielera durante el resto del muestreo. Una parte de esta rama se destinó al análisis de pigmentos fotosintéticos y la otra a la estimación de la concentración de lípidos. Las ramas restantes se traspasaron a bolsas de malla sintética (8x5 cm) y se fijaron con formol salino al 10% (Sakai 1998).

Las muestras se trasladaron al Laboratorio de Histología de la Universidad del Mar, aquéllas que serían destinadas a la extracción de lípidos y clorofila se mantuvieron en congelación hasta su procesamiento y las muestras que se fijaron con formol salino al 10% se mantuvieron a temperatura ambiente y se transfirieron a alcohol al 70% después de 24 hrs.

6.3. Trabajo de laboratorio

6.3.1. Cuantificación de lípidos

Como primer paso, las muestras se fijaron con formol al 4% 24 hrs. Se procedió a la descalcificación del esqueleto con ácido acético al 10% durante un periodo similar, en el cual se monitoreó el burbujeo de CO₂ causado por la reacción del ácido y el carbonato. Se realizó un cambio de ácido acético cuando se detectaba que cesaba el burbujeo y aún se observaban restos de esqueleto en las muestras. Una vez finalizada la descalcificación, el tejido se separó de cualquier resto calcáreo y se dividió cada muestra en dos frascos de vidrio (25 mL) lo más equitativamente posible. Previamente se había registrado el peso de dichos frascos para lo cual se etiquetaron y secaron en una estufa a 60°C por 12 hrs. para que mantuvieran un peso constante. Se enfriaron en un desecador durante una hora y se pesaron rápidamente en una balanza analítica (peso 1). Una vez que se colocó el tejido descalcificado en los frascos, estos fueron nuevamente secados y pesados tal como se describió para obtener nuevamente el peso (peso 2).

La cuantificación de la concentración de lípidos en el tejido coralino se ejecutó según el método de Folch *et al.* (1957). Se adicionó 15 ml de cloroformo-metanol (2:1 v/v) a cada frasco. Transcurridos como mínimo diez minutos, se agregaron 5 ml de KCl al 0.88% para inducir la precipitación de los lípidos y, en consecuencia, la formación de dos capas: una fase superior acuosa y otra inferior que contenía los lípidos extraídos. Se usó una pipeta Pasteur para extraer, con mucho cuidado, la fase superior acuosa y de esta manera aislar en el frasco la fase lipídica. Se procedió a “lavar” la fase lipídica con 10 ml de una

mezcla de metanol y agua (1:1) y se extrajo nuevamente la fase acuosa. Este último paso se repitió en dos ocasiones. Con la finalidad de remover los restos de tejido se filtró la mezcla con filtros de 11 μm . El filtrado se recibió en un frasco limpio previamente etiquetado, secado y pesado de igual forma que los anteriores (Peso 3). El frasco que previamente contuvo al filtrado se enjuagó con la mezcla de metanol y agua (1:1) para recuperar la mayor cantidad de extracto posible. Por último, se extrajo la fase acuosa y mediante evaporación se eliminó el remanente de disolvente en la fase lipídica, para lo cual se utilizó un baño maría que fue monitoreado constantemente para que nunca rebasara los 60°C de temperatura. Una vez que se evaporó todo el disolvente, y en los frascos quedó únicamente una costra de lípidos, se secaron y pesaron por última ocasión (Peso 4). La concentración tisular de lípidos (CTI) de cada colonia se obtuvo dividiendo el peso de los lípidos (peso 4 menos peso 3) entre el peso de la biomasa (peso 2 menos peso 1).

6.3.2. Cuantificación de la concentración de clorofila

Para la determinación de la concentración tisular de clorofilas *a* (CTchl *a*) y *c* (CTchl *c*) de cada colonia, el tejido se separó del esqueleto calcáreo mediante un chorro a presión de agua marina filtrada mientras se sostenía la muestra dentro de una bolsa plástica. La mezcla resultante se colocó en un tubo para centrifuga de 45 ml y el esqueleto se guardó para el cálculo posterior de su área. Se procedió a homogeneizar la mezcla durante aproximadamente un minuto y después se centrifugó a 4500 rpm durante 5 min. Con mucho cuidado se retiró de los tubos tanto sobrenadante como fuera necesario para que permanecieran solamente 5 ml (volumen de la muestra). Se procedió a agitar la mezcla con un

mezclador de vórtice durante aproximadamente 15s. Rápidamente se tomaron 3 alícuotas de 300 μ l (volumen de la submuestra) cada una y se colocaron en tubos para microcentrífuga.

Los tubos de 300 μ l se sometieron a un pulso de centrifugación a 11 000 rpm. Posteriormente se les retiró el sobrenadante y para lavar la pastilla resultante se agregó 1 ml de agua destilada y se procedió a centrifugar nuevamente a 11 000 rpm durante un pulso, proceso que se ejecutó por duplicado. Después de retirar el sobrenadante, se adicionaron 950 μ l de acetona fría y se centrifugaron tal como se hizo anteriormente. A continuación, se retiró la acetona y se conservó en otro tubo previamente etiquetado. Al tubo con la pastilla se le agregaron 50 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO) y se agitó el tubo en el mezclador de vórtice durante 10 segundos aproximadamente. Una vez agitado el tubo, se le regresó la acetona que fue retirada previamente y se conservó a -4°C . Entre 12 y 24 hrs después de la extracción se procedió a realizar la lectura de absorbancia del extracto (vol. 1 ml) a las longitudes de onda 630, 664 y 675 nm en un espectrofotómetro. Antes de la lectura se aplicó un pulso de centrifugación.

Para la estimación de la concentración de clorofila a y c en el extracto se emplearon las ecuaciones dicromáticas de Jeffrey y Humprey's (1975) para diatomeas y algas cafés.

$$C_{E,a} = 11.47 * (Abs\ 664 - Abs\ 750) - 0.4 * (Abs\ 630 - Abs\ 750)$$

$$C_{E,c} = 24.36 * (Abs\ 630 - Abs\ 750) - 3.73 * (Abs\ 664 - Abs\ 750)$$

En donde:

$C_{E,a}$ = Concentración de clorofila a

$C_{E,c}$ = Concentración de clorofila c

Abs = Absorbancias a las longitudes de onda 630, 664 y 750 nm

La estimación de la concentración de los pigmentos por unidad de área ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$Dens\ Chl = \frac{C_E * V_E * V_M}{V_{SM} * PO * A} * 10^{-3}$$

En donde:

$Dens\ Chl$ = Densidad de clorofila por unidad de área.

C_E : Concentración de clorofila a o c en el extracto que se midió en la celda (mg/L).

V_E : Volumen del extracto (L)

V_M : Volumen de toda la muestra (L)

V_{SM} : Volumen de la submuestra

PO : Paso óptico de la celda (cm).

A : Área del esqueleto (cm^2)

6.3.3. Estimación del área

El área de cada una de las muestras empleadas se calculó mediante una versión modificada del método de la parafina (Holmes 2008), el cual consiste en sumergir cada uno de los esqueletos en un baño de parafina derretida a 65°C durante dos segundos. Pasados los dos segundos, el esqueleto se sacudió con un solo movimiento firme para escurrir el exceso de parafina. Se ejecutó este proceso para todas las muestras y se fueron colocando en recipientes con divisiones previamente etiquetadas. Se procedió a pesar y registrar los pesos de todos los esqueletos. Se repitió todo el procedimiento para colocar una segunda capa de parafina sobre los esqueletos. El área del esqueleto se determinó con la curva de calibración empleada por Hernández-Urraca (2010) en la que asocia el peso de la segunda capa de parafina a un área determinada. El peso de la segunda capa se obtuvo como la diferencia entre el peso del esqueleto con las dos capas menos aquél con una sola capa.

6.3.4. Determinación de la actividad reproductiva

Para separar el tejido coralino del esqueleto calcáreo, las ramas fueron descalcificadas con una solución de ácido acético al 10% por 24 hrs (Sakai 1998). Posteriormente, el tejido se enjuagó en agua corriente, se colocó en casetes de inclusión y se conservó en alcohol etílico al 70% hasta su procesamiento histológico.

La deshidratación, aclaración, infiltración e inclusión del tejido se realizó con modificaciones a las técnicas propuestas por Drury y Wallington (1967) y Benítez-Villalobos *et al.* (2012) (Anexo I), para lo cual se empleó un procesador automático de tejidos Leica® TP102 y un incluidor de tejidos Leica® EG1160. El

tejido se incluyó en bases plásticas de tal forma que una cara lateral de la rama quedara como frente de corte. Lo anterior con la finalidad de seccionar la mayor cantidad posible de pólipos y que el plano de corte fuera transversal al eje oral-aboral de los mismos (Fig. 2).

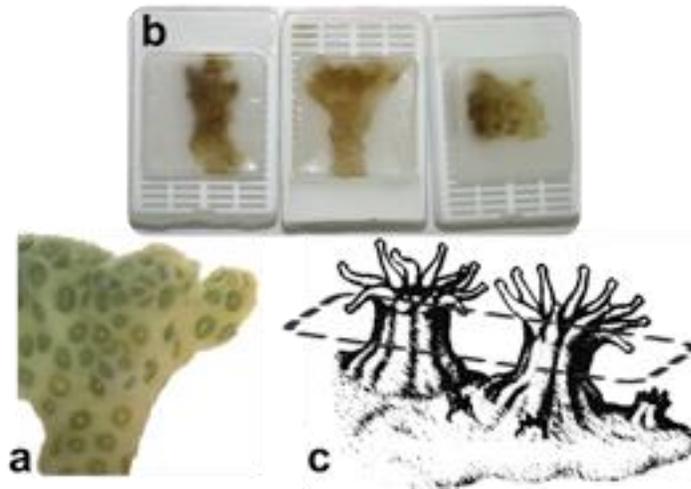


Figura 2. Esquema del plano de corte de los pólipos de *P. damicornis*. a) Rama aún con el esqueleto, b) orientación del tejido descalcificado dentro de los cubos de parafina y c) plano de corte transversal al eje oral-aboral de los pólipos (Modificado de Ruppert y Barnes 1994).

Se empleó un microtomo de rotación semi automático marca Leica® RM 2145, se hicieron de cuatro a cinco cortes seriados en posición transversal con un grosor de 5 μm . Se obtuvieron tres series por cada muestra, con una separación de 80 μm entre ellas. Los cortes seriados se recogieron en un portaobjetos de vidrio, se les agregó unas gotas de alcohol etílico al 40% (Luna 1968, Prophet *et al.* 1995) y se trasladaron a una tina de flotación con una temperatura aproximada de 35°C para que se estiraran por completo. Se recogieron con un nuevo portaobjetos previamente untado con albúmina de

Mayer y se colocaron en una platina térmica (Fisher Scientific: 260205) a aproximadamente 30°C, por media hora, para eliminar el exceso de agua. Finalmente, se trasladaron a un horno a 37°C por 24 hrs para secarlas por completo y asegurar la adherencia del tejido al portaobjetos (Drury y Wallington 1967, Prophet *et al.* 1995).

Para la tinción se empleó la técnica regresiva de Hematoxilina de Harris-Eosina (HHE) que se detalla en la Tabla 3 y que da como resultado núcleos celulares teñidos de azul a negro (basofílico) y el citoplasma de tonos rosados (acidofílico) (Howard y Smith 1983). Es importante mencionar que para neutralizar los restos de ácido acético que pudieron permanecer en el tejido después de la descalcificación, las laminillas se dejaron reposar en carbonato de litio al 1% durante cuatro horas después de haber sido hidratadas (Tabla 3). Finalmente, las preparaciones fueron selladas con resina sintética.

Por último, con un microscopio Olympus modelo CX21FS1 se realizó una revisión exhaustiva de un corte de cada laminilla y se registró el número de colonias con células sexuales masculinas y/o femeninas en cualquier estadio de desarrollo. No se estableció un mínimo de pólipos con gametos para considerar a una colonia como reproductivamente activa. El porcentaje mensual de colonias con actividad reproductiva (%CAR) se calculó como la proporción de colonias con gametos en relación con el total de colonias recolectadas en el mes.

6.4. Trabajo de gabinete

6.4.1. Obtención del fotoperiodo

El valor diario de horas luz (fotoperiodo), se calculó como la diferencia entre la hora aparente del atardecer y del amanecer, las cuales fueron estimadas para la región de Puerto Ángel de acuerdo con lo indicado por Stull (2000) (Anexo I). Se promediaron los valores de fotoperiodo de los quince días anteriores a cada fecha de recolecta y se obtuvo un valor mensual único para toda el área de estudio.

6.4.1. Obtención de TSM, PAR₀ Y CAD₄₉₀

La información sobre la temperatura superficial del mar (TSM), radiación fotosintéticamente activa superficial (PAR₀) y el coeficiente de atenuación difusa a la longitud de onda de 490nm (CAD₄₉₀), se obtuvo a partir de imágenes satelitales generadas por el sensor remoto Aqua a bordo de la plataforma MODIS. Las imágenes fueron obtenidas de la OceanColor Web (<http://oceancolor.gsfc.nasa.gov/>), con un nivel de procesamiento L3. Para ambas variables se obtuvieron las imágenes correspondientes a 8 días anteriores a la fecha de muestreo y con el software WIMSoft[®] se elaboraron compuestos de esas imágenes. Se extrajo la información correspondiente a cada una de las localidades de estudio y se promediaron para obtener un valor único para toda el área de estudio.

En el caso de la PAR₀, el algoritmo estima la radiación fotosintéticamente activa diaria que alcanza la superficie del océano. La PAR₀ se define como el

flujo de energía cuántico del sol en un rango espectral de 400-700 nm expresada en Einstein·m⁻²·día⁻¹.

6.4.2. Análisis de la relación entre las variables biológicas y ambientales

A partir de los promedios mensuales de cada una de las variables biológicas y ambientales se construyó una serie de tiempo para cada una de ellas. Las series de tiempo están constituidas por varios componentes que, si bien no se pueden ver de manera directa, existen y pueden separarse de la serie original. Los componentes de una serie de tiempo son: factor estacional, tendencia, ciclo y factor irregular (Makridakis *et al.* 1998). Se ejecutó en el software Statistica[®], la descomposición de las series de tiempo a través del método Census I. Se empleó el modelo aditivo según el cual el valor de la serie temporal en cualquier instante es igual a la suma de los valores correspondientes a los cuatro componentes.

$$Y_t = TC_t + E_t + I_t$$

En donde:

Y_t : Valor de la serie temporal en el tiempo t.

TC_t : La tendencia-ciclo representa la unión de la tendencia secular y el factor cíclico de la serie de tiempo.

E_t : Factor estacional en el tiempo t.

I_t : Valor del movimiento irregular en el tiempo t.

Para obtener un valor cuantitativo de las similitudes o diferencias en las fluctuaciones estacionales de las variables ambientales vs variables biológicas, se realizó una matriz de correlación con los componentes estacionales obtenidos.

7. Resultados

En los gráficos de todas las variables biológicas y ambientales se observa una alternancia de temporadas con valores altos y bajos. La mayoría de las series temporales (TSM, PAR, fotoperiodo, clorofilas *a* y *c*, lípidos y %CAR) presentan sus valores mayores en el periodo de marzo a octubre y los valores menores de noviembre a febrero. En el contexto de estacionalidad de la región, los valores más altos del año de clorofilas *a* y *c* temperatura, lípidos, %CAR, PAR y fotoperiodo se registraron en la época de lluvias (mayo a noviembre). En el caso del CAD₄₉₀ los mayores valores coinciden principalmente con la época de secas (diciembre a abril). Este comportamiento se refleja con mayor claridad en la componente estacional de cada una de las series de tiempo.

7.1. Variables biológicas: metabolitos y actividad reproductiva.

Los promedios mensuales de clorofila *a* oscilaron entre 0.9 (enero 2011) y 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (octubre 2010) (Fig. 3) y los de la clorofila *c* entre 1.4 (enero 2011) y 16.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (diciembre 2010) (Fig. 4). El componente estacional de ambas series temporales varió de forma similar durante el periodo de estudio, con dos valores máximos de junio a diciembre y dos mínimos de enero a mayo. Si bien las series temporales de ambos pigmentos son muy oscilantes, en el componente estacional correspondiente a la clorofila *a* se distingue con mayor claridad un periodo de valores bajos (enero a mayo) y uno de valores altos (junio a diciembre) (Fig. 3).

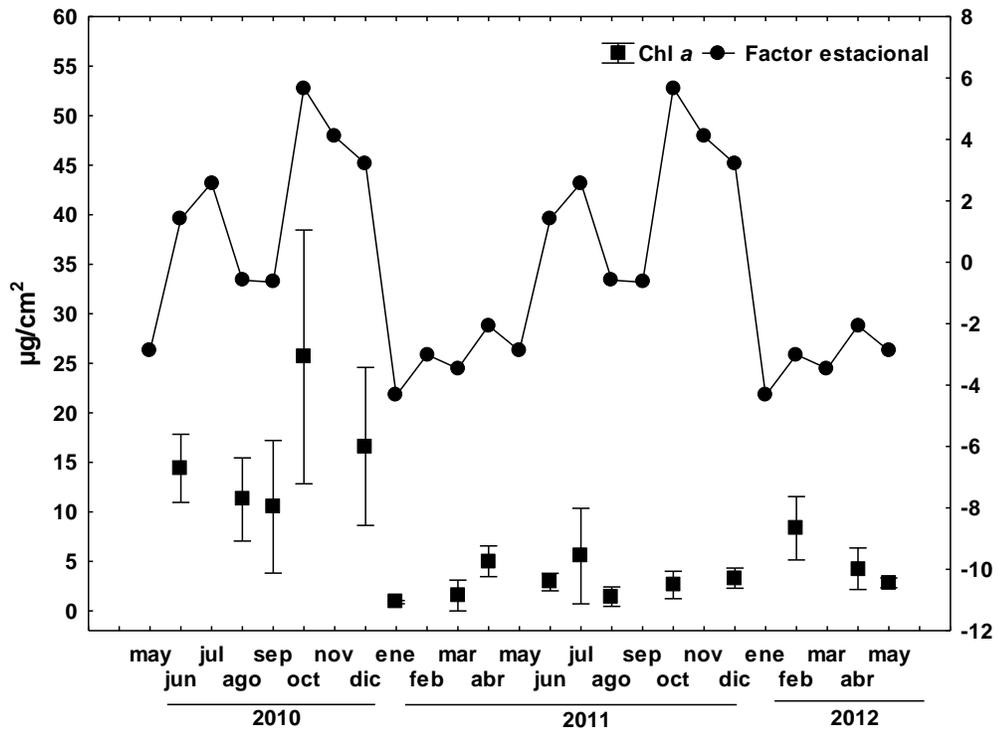


Figura 3. Concentración tisular de clorofila a. ● Factor estacional y -■- media ± IC (95%).

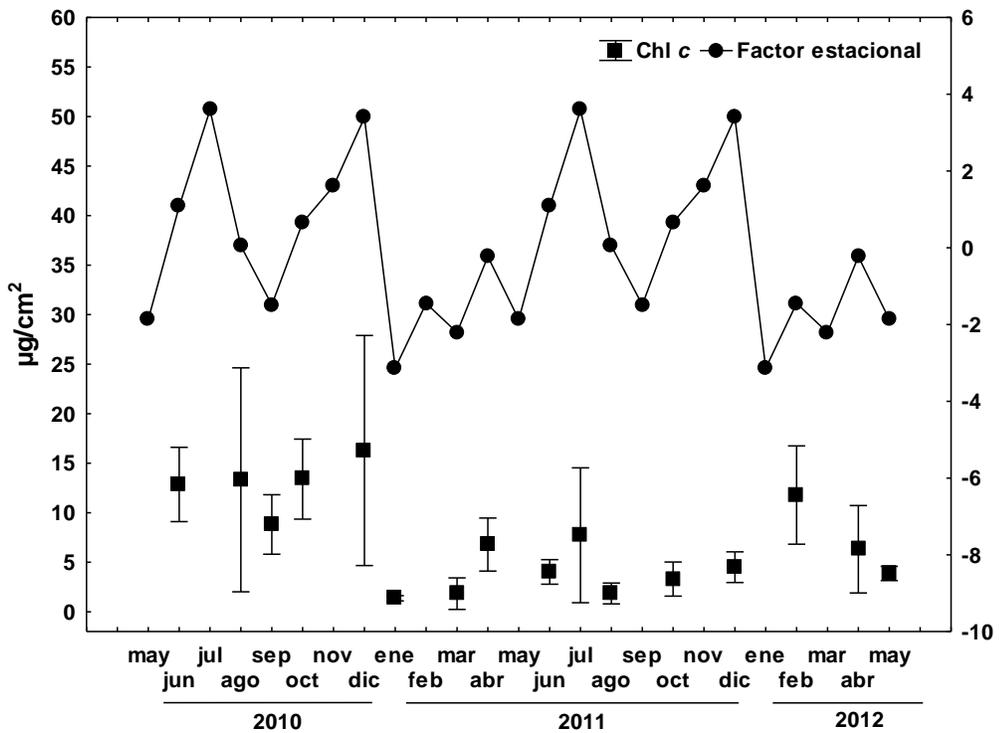


Figura 4. Concentración tisular de clorofila c. ● Factor estacional y -■- media ± IC (95%).

La concentración tisular promedio mensual de lípidos osciló aproximadamente entre 20% (febrero 2012) y 50% de la biomasa coralina (octubre 2010) (Fig. 5). No obstante, a lo largo de la componente estacional existieron oscilaciones, se encuentran claramente diferenciados del resto del año dos periodos con valores máximos de julio a noviembre.

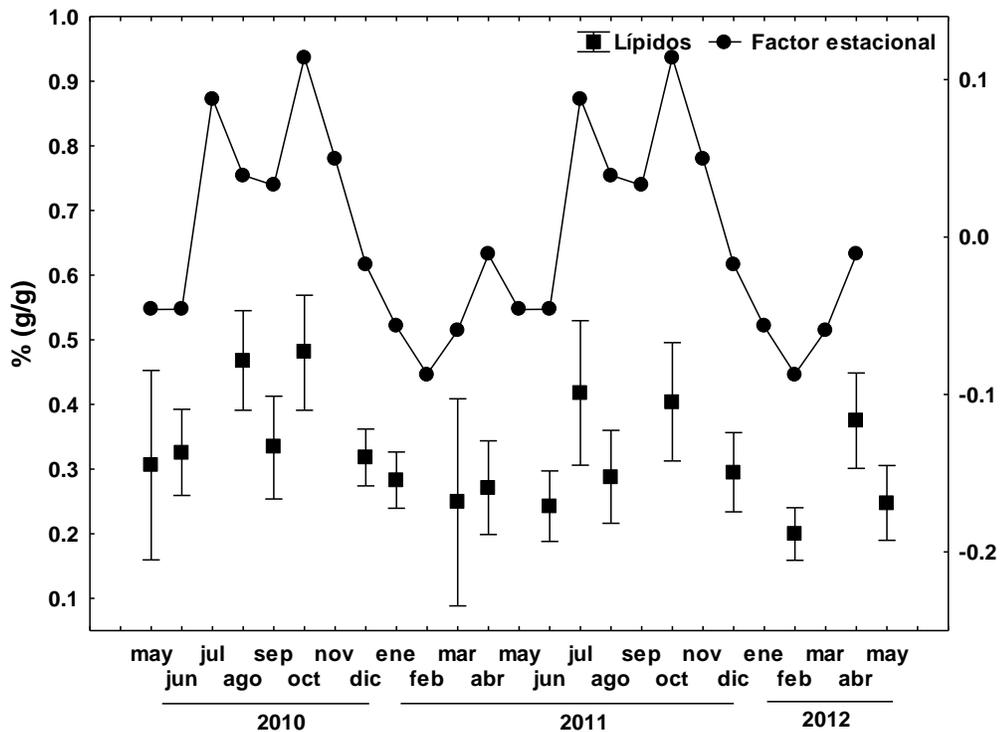


Figura 5. Concentración tisular de lípidos. ● Factor estacional y -■- media ± IC (95%).

A grandes rasgos, la actividad reproductiva se concentró en el periodo de mayo a agosto (Fig. 6). Los valores máximos se observaron en mayo de 2010 y mayo de 2012 (%CAR <60%) mientras que valores mínimos se registraron en diciembre 2010, abril y marzo 2011 (%CAR≈0.05%). Únicamente en diciembre 2011 y febrero 2012 no se registró actividad reproductiva. Las oscilaciones en

las que alternan valores bajos y altos del %CAR se aprecian con mayor claridad en el componente estacional (Fig. 6).

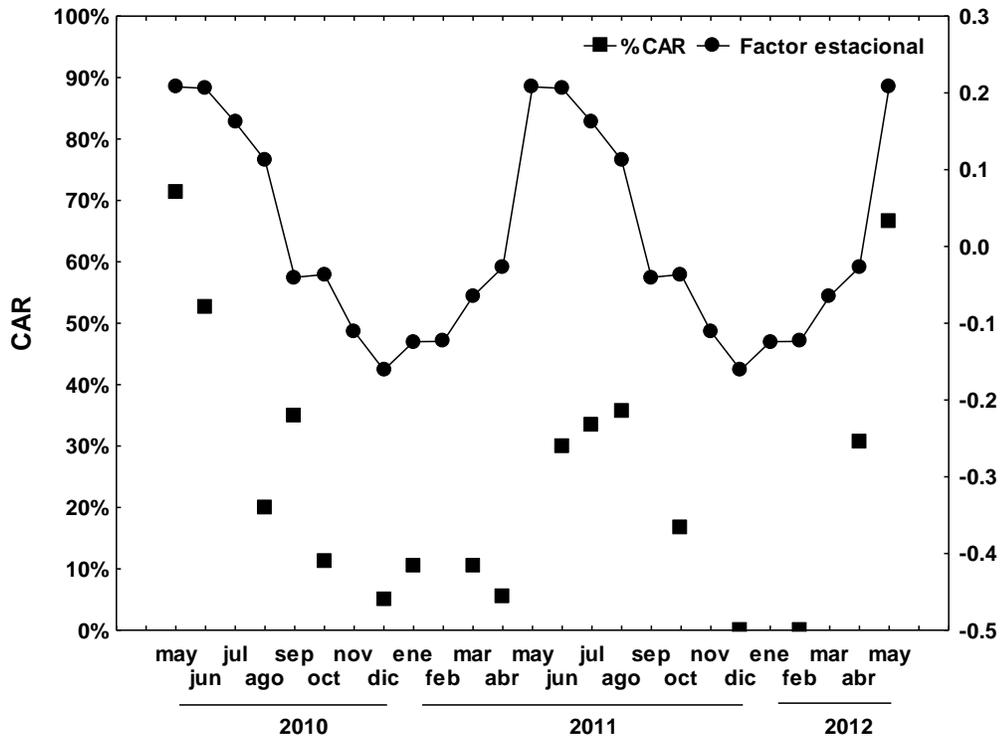


Figura 6. Colonias con actividad reproductiva en toda el área de estudio. Porcentaje promedio mensual y factor estacional.

7.2. Variables ambientales: temperatura, PAR, CAD y fotoperiodo

La temperatura promedio (Fig. 7), osciló entre 25 y 30°C con los máximos valores en mayo 2010, junio 2011 y mayo 2012 y los menores durante los meses octubre y diciembre 2010, enero, marzo y diciembre 2011 y febrero 2012 (<26.5 °C). En la componente estacional de esta serie temporal se aprecia que el periodo del año con aguas más cálidas es de mayo a agosto y de noviembre a marzo la temperatura disminuye considerablemente.

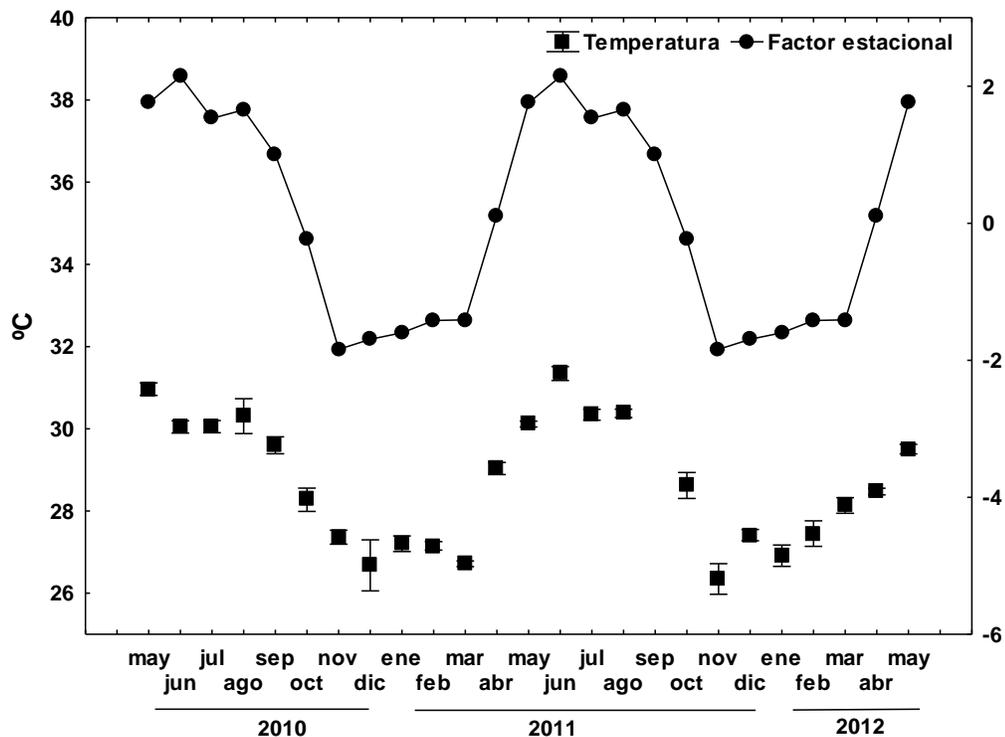


Figura 7. Temperatura superficial del mar. ● Factor estacional y -■- media \pm IC (95%).

En lo que a la PAR respecta, los mayores niveles de irradiancia se obtuvieron en abril de 2011 y 2012 (ca. 55 Einsteins·m⁻²·dia⁻¹) (Fig. 8) y los menores en agosto y diciembre 2010 y septiembre, octubre y diciembre 2011

(<41.5 Einsteins·m⁻²·dia⁻¹). En la componente estacional, el valor más elevado de irradiancia se encontró entre marzo y mayo y, durante el resto del año, los valores fluctúan sin que haya un periodo definido de valores bajos.

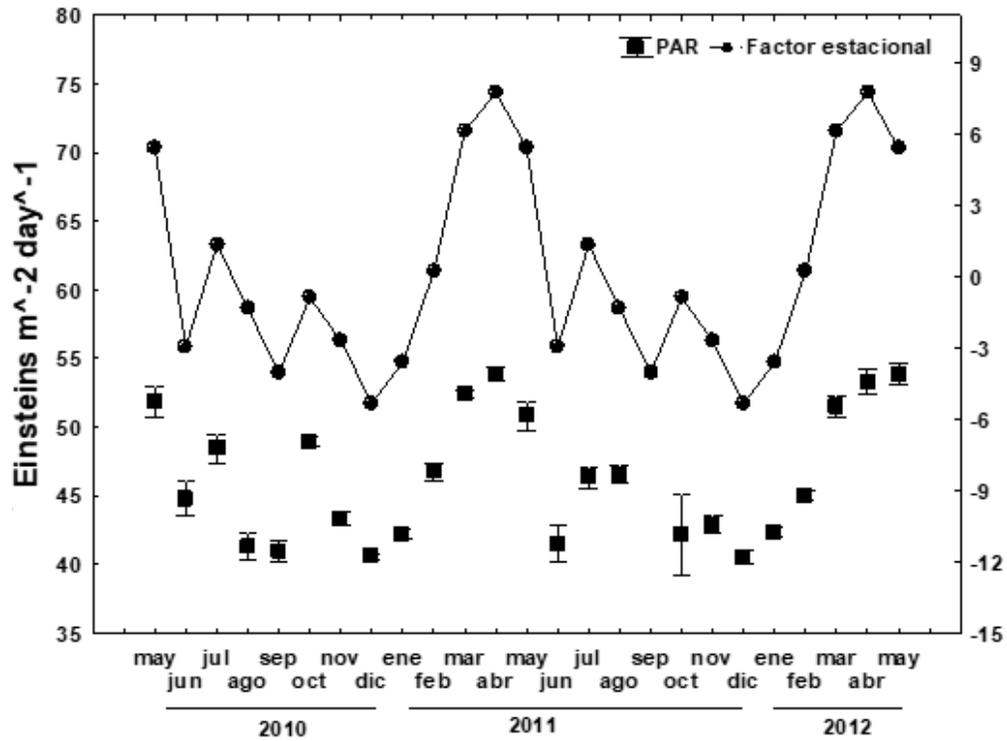


Figura 8. Radiación fotosintéticamente activa (PAR₀). ● Factor estacional y ■ media ± IC (95%).

Contrario al resto de las variables analizadas, el coeficiente de atenuación difusa a 490 nm presentó los valores promedio menores durante julio, agosto y septiembre 2011 (<0.50) y los mayores durante diciembre 2010 y febrero 2012 (>0.3) (Fig. 9). La dispersión de los datos durante noviembre a marzo es mayor que en el resto del año. En la componente estacional, el periodo de valores altos es oscilante mientras que el periodo de valores bajos se distingue claramente como una línea de valores casi constantes (Fig. 5)

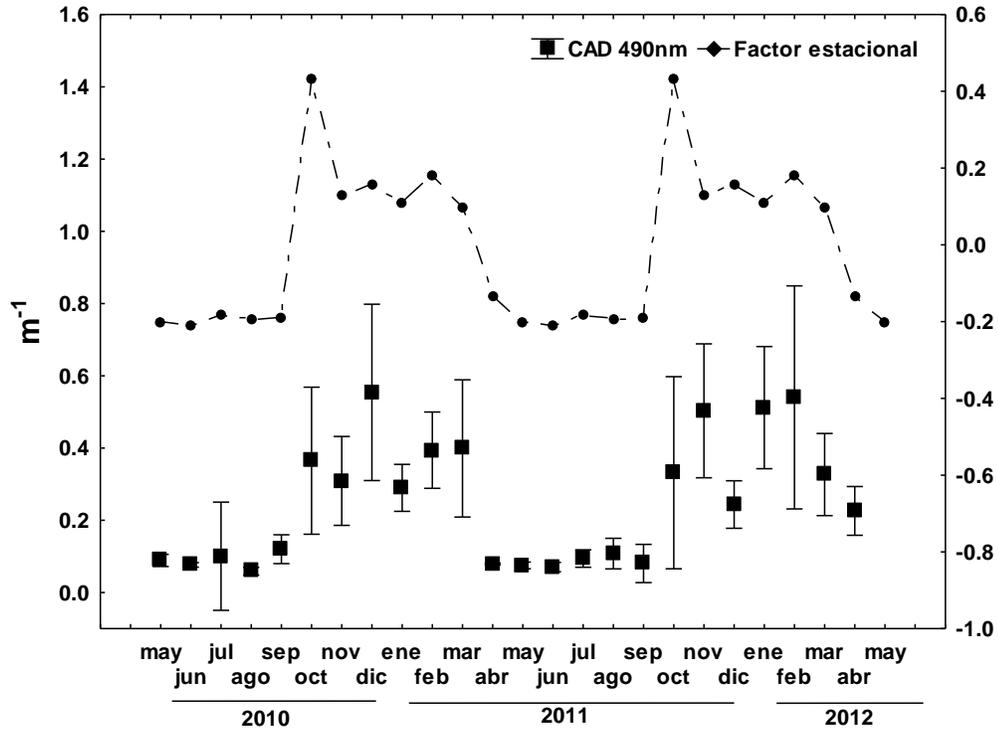


Figura 9. Coeficiente de atenuación difusa (CAD 490nm). ● Factor estacional y - ■- media ± IC (95%).

La serie de tiempo del fotoperiodo y su respectiva componente estacional son las más similares entre sí (Figura 10). El mínimo promedio de horas luz del año (11.12 hrs) para la latitud del área de estudio se registró en el mes de diciembre y a partir de ese mes los valores promedio mensuales aumentaron progresivamente hasta alcanzar un máximo de 13 hrs luz en el mes de junio (Fig. 10).

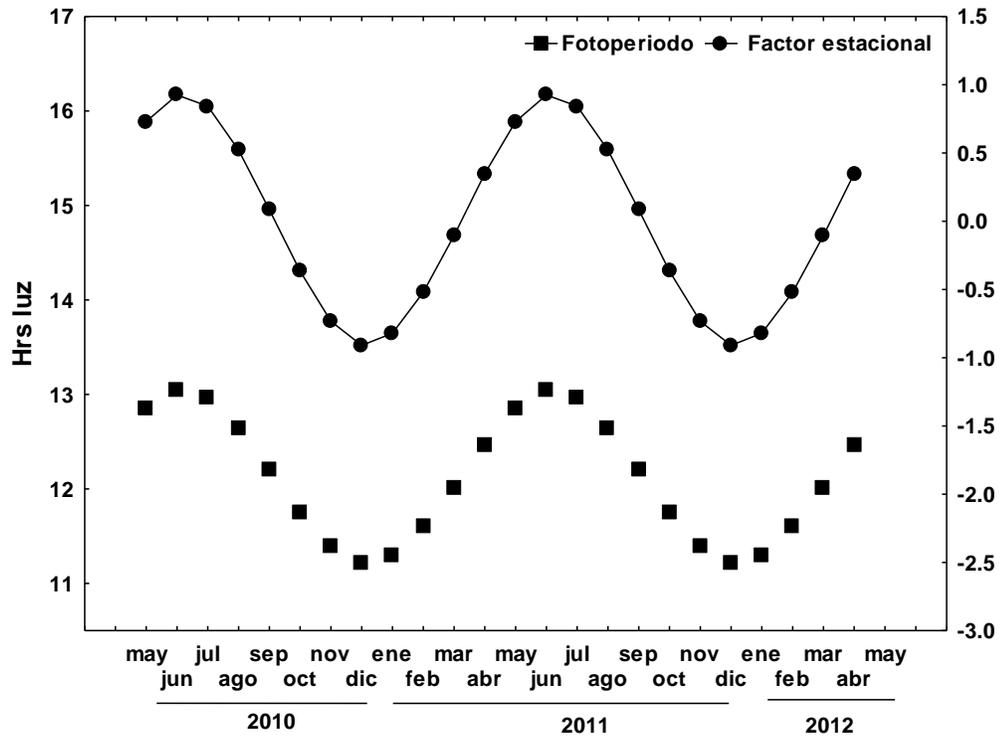


Figura 10. Fotoperiodo. ● Factor estacional y -■- media ± IC (95%).

7.1. Relación entre variables ambientales y biológicas.

La matriz de correlación evidenció correspondencias significativas en una minoría de comparaciones pareadas (Tabla 1). La CTchl *a* resultó modestamente correlacionados con la PAR. El %CAR mostró una asociación directamente proporcional a la TSM, la PAR y el fotoperiodo e inversamente proporcional con el CAD. La CTchl *c* y el % de lípidos no tuvieron correlaciones significativas con ninguna de las variables ambientales consideradas.

Tabla 1. Matriz de correlación entre componentes estacionales de variables biológicas y ambientales. Las correlaciones significativas se muestran en negritas. TSM: Temperatura superficial del mar; CAD₄₉₀: Coeficiente de Atenuación Difusa a 490 nm; PAR: Radiación fotosintéticamente activa CTchl *a* y *c*: Concentración tisular de clorofilas *a* y *c*; %CAR: Porcentaje de colonias activas reproductivamente.

	CTchl <i>a</i>	CTchl <i>c</i>	% Lípidos	% CAR
TSM	0.03	0.08	0.3	0.85
CAD ₄₉₀	0.07	-0.01	-0.29	-0.84
PAR	-0.48	-0.28	-0.3	0.44
Fotoperiodo	-0.14	0.06	0.02	0.92

8. Discusión

Las fluctuaciones anuales de la temperatura, PAR y fotoperiodo están determinadas en primer lugar por la intensidad de la radiación solar que alcanza la superficie de la atmósfera terrestre. A su vez, dichas variables ambientales dependen del ángulo con el que los rayos de sol inciden sobre la tierra en determinada latitud y estación del año (Wright *et al.* 1997, Stull 2000). Considerando lo antes mencionado, las fluctuaciones estacionales de estas variables fueron congruentes para la posición geográfica del área de estudio, con valores máximos de abril a agosto y que disminuyeron durante el resto del año. Las nubes, gases y aerosoles y la misma superficie del océano absorben y/o reflejan la radiación solar que atraviesa la atmósfera hasta alcanzar la superficie del océano (insolación) y merman considerablemente su intensidad. Es por esta razón que las fluctuaciones estacionales de la TSM y PAR₀ no son tan definidas como aquéllas del fotoperiodo.

Estudios realizados durante la última década en sitios del corredor arrecifal Puerto Ángel-Huatulco reportan valores puntuales de temperatura entre 23 y 25.5°C en los meses de noviembre a febrero y entre 24 y 31° C de marzo a octubre (Hernández-Urraca 2010, Benítez-Villalobos *et al.* 2013). Aunque la fluctuación estacional de esta variable en este trabajo coincide con lo reportado en dichos estudios, la discordancia en la magnitud de los valores de temperatura puede obedecer a la resolución de las fuentes de información empleada. En los trabajos mencionados la temperatura se midió *in situ* mientras que en el presente estudio la información se obtuvo de imágenes satelitales con celdas de 4 x 4 km.

Al contrario de las variables antes mencionadas, el CAD₄₉₀ fluctuó de forma inversa a lo esperado. Granja-Fernández y López-Pérez (2008) monitorearon las tasas de sedimentación en arrecifes de la zona y encontraron que, a nivel regional, dichas tasas están estrechamente relacionadas a la precipitación pluvial de la zona pues el arrastre de sedimentos al mar por escorrentías genera altos valores de turbidez en la temporada de lluvias. En la serie de tiempo del CAD₄₉₀ se aprecia claramente que los valores mayores se presentaron aproximadamente en la temporada de secas (octubre-febrero). Considerando que en el presente trabajo el CAD₄₉₀ se emplea como un indicador de la turbidez de la columna de agua, la falta de coincidencia con el trabajo antes mencionado puede obedecer nuevamente a la diferencia en la escala a la cual se realizaron u originaron las mediciones. Si bien sobre la línea de costa, en donde se encuentran la mayoría de los arrecifes de la zona, el aporte de sedimentos por escorrentía o de otras fuentes puede aumentar considerablemente los valores de CAD₄₉₀, a una escala de 4km (resolución de las imágenes satelitales utilizadas) este aporte de sedimentos no impacta el CAD₄₉₀ con la misma magnitud que otros factores lo hacen durante la temporada de secas. Durante la temporada de secas el aumento de la turbidez puede deberse a la productividad primaria alta característica de esta temporada (Pennington *et al.* 2006).

El intervalo de concentración promedio mensual de clorofila *a* (0.9-25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) y *c* (1.4-16.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) en el tejido de *P. damicornis* es menor al reportado para esta y otras especies en la misma área de estudio. Hernández-Urraca (2010) reportó concentraciones de 20 a 48 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (clorofila *a*) y 100-300 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (clorofila *c*) para esta especie; Guendulain-García (2010) encontró

concentraciones en un intervalo 10-40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (clorofila a) y 2-10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (clorofila c) para *Pavona gigantea* y Galván-Rowland (2010) reportó concentraciones de 20 a 55 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (clorofila a) y 100-300 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (clorofila c) en colonias de *P. panamensis*.

Las diferencias entre las concentraciones de pigmentos reportadas para este estudio y aquéllas reportadas en los trabajos mencionados anteriormente pueden explicarse, en parte, por diferencias interespecíficas en estrategias de fotoaclimatación. De acuerdo con varios autores (Iglesias-Prieto *et al.* 2004; Fitt *et al.* 2009; Hennige *et al.* 2009), las diferentes estrategias de fotoaclimatación que presentan diferentes comunidades de Symbiodiniaceae son particulares de cada especie y de la profundidad en la que se desarrollan. En los arrecifes de Oaxaca, especies como *P. damicornis* y *P. panamensis* coexisten en profundidades similares mientras que *P. gigantea* se encuentra, en promedio, a unos pocos metros de mayor profundidad. Lo anterior resulta congruente con los valores de concentración de clorofila a observados en este trabajo y en aquéllos realizados en la zona anteriormente con estas especies. No obstante, las diferencias en concentración de clorofila c reportadas en este trabajo son solo similares a las reportadas para *P. gigantea* y muy distantes de las reportadas para *P. panamensis* e incluso para *P. damicornis*. No se puede dejar de señalar que el método de extracción de pigmentos en los estudios mencionados difiere del que se utilizó en este trabajo. El protocolo ejecutado en esta investigación excluye de la cuantificación de concentración total de pigmentos, aquéllos que provienen de las algas que se encuentran en el esqueleto del coral, es decir, de las algas endolíticas.

A pesar de las similitudes gráficas en las fluctuaciones de las variables biológicas y ambientales, la matriz de correlación realizada evidencia que, de los pigmentos fotosintéticos, únicamente la clorofila *a* tiene una correlación significativa con la PAR₀ (-0.48). Que la fluctuación estacional de la clorofila *a* haya resultado inversamente proporcional a aquélla de la PAR₀ puede deberse a que los endosimbiontes del tejido de colonias de *P. damicornis* experimenten fotoinhibición de la fotosíntesis en los meses con los mayores niveles de PAR. En especies como *Stylophora pistillata* y *Acropora microphthalma* se ha encontrado que, un flujo de fotones de 600 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($\sim 51.84 \text{ Em}^{-2}\text{d}^{-1}$) desencadena este fenómeno (Smith *et al.* 2005). Los niveles de PAR durante los meses cálidos fueron superiores a este umbral. Adicionalmente, los meses en los que se registraron niveles altos de PAR₀, también fueron los meses más bajos de CAD, por lo que eso pudo haber reforzado esa respuesta.

Los porcentajes promedio mensuales de lípidos totales en el tejido de *P. damicornis* del corredor arrecifal Puerto Ángel-Huatulco son similares a los reportados para esta misma zona dos años atrás por Hernández-Urraca (2010) (25-43%) y los encontrados en otras localidades como Hawái, (28-41 %) y Panamá (0.59%) (Stimson 1987 y Glynn 1985). No obstante, son mayores a aquéllos encontrados por Rodríguez-Troncoso *et al.* (2010) en colonias de bahía Banderas en condiciones de campo (4-18%) y corales sanos en laboratorio ($\sim 6-16\%$). La diferencia con los resultados de estos últimos autores puede deberse a la diferencia latitudinal de las zonas de estudio.

En corales, como en cualquier otro organismo, los lípidos tienen diversas funciones (e. g. estructural, de reserva, reguladoras, etc.), sin embargo, los

lípidos de almacenamiento pueden representar entre 46 y 73% de los lípidos totales (Harland *et al.* 1993). Teniendo esto en consideración, el hecho de que la componente estacional de esta variable indique que de junio a diciembre se registran porcentajes mayores que el resto del año, puede deberse a que en estos meses existió un excedente de dichas reservas en varias de las colonias analizadas. Lo anterior pudo ser favorecido no solamente por factores extrínsecos (e.g. condiciones ambientales), sino también por factores intrínsecos (proporción de ácidos grasos obtenidos de la dieta, de la fotosíntesis algal, de la síntesis en el tejido animal, identidad y diversidad de los simbioses) (Harland *et al.* 1993, Cooper *et al.* 2011).

Determinar la composición y origen de las reservas lipídicas y/o la interacción de parámetros biológicos dentro de una misma colonia son objetivos que van más allá de aquéllos delineados en el presente estudio. Sin embargo, podemos mencionar que las fluctuaciones del porcentaje de lípidos en tejido fueron muy similares a aquéllas de las clorofilas y uno de los valores más bajos de esta variable ocurre en los mismos meses en que se observa el valor máximo de la actividad reproductiva, por lo que, en alguna(s) de las colonias, un alto porcentaje de lípidos pudo ser resultado de una mayor translocación por parte de los simbioses y un bajo porcentaje de esta variable consecuencia de la producción y posible liberación de gametos a la columna de agua.

En un estudio realizado en el Pacífico colombiano, Castrillón-Cifuentes *et al.* (2015) señalaron a la salinidad como una variable que podría ejercer control sobre la reproducción de las colonias de *P. damicornis* a través de la osmorregulación. Por otra parte, Zavala-Casas (2013) registró correlaciones

significativas del %CAR en esta especie, con la TSM, PAR y CAD y, al igual que Santiago-Valentín *et al.* (2018), señala que dichas correlaciones podrían deberse a las implicaciones que tienen esas variables en la fisiología de las colonias, particularmente en la productividad de las microalgas simbiotas. Por otra parte, la correlación con el fotoperiodo podría ser explicada por cuestiones de sincronización con condiciones ambientales que sean favorables para la supervivencia de las larvas. En este sentido, Benítez-Villalobos y Martínez-García (2012) sugieren que las corrientes predominantes en la temporada lluviosa podrían favorecer la retención de larvas cerca de la costa lo que explicaría que se hayan observado picos de actividad reproductiva en varias especies de invertebrados de la zona durante esa temporada.

En el presente trabajo, los valores promedio mensuales de las variables fisiológicas no presentaron correlaciones significativas con las variables ambientales. Estos resultados podrían explicarse si consideramos la velocidad de respuesta a los cambios ambientales que tienen cada una de las variables cuantificadas en el holobionte. Los corales escleractinios se caracterizan por poseer un alto grado de flexibilidad biológica que les permite aclimatarse a escenarios ambientales cambiantes (Gates, 1999). En particular para *P. damicornis* se ha encontrado que los tiempos de respuesta a diversos factores de estrés se dan en pocas horas o días dependiendo de la intensidad del estímulo (Lesser 1996, Rodríguez-Troncoso *et al.* 2010), es decir, la concentración de pigmentos y el porcentaje de lípidos en un momento dado no es resultado de las condiciones ambientales de ese momento en particular. Si bien los valores promedio mensuales de variables ambientales aquí

considerados corresponden a un periodo de 8 días anteriores a la fecha de recolección de las muestras, la variabilidad de la concentración de pigmentos y del porcentaje de lípidos en las colonias analizadas puede ser resultado de variaciones en los parámetros ambientales a una escala temporal mayor o menor.

Los cambios estacionales de las variables ambientales analizadas o de algunos otros parámetros ambientales cercanamente relacionados, podrían inducir cambios en el tipo de alimentación dominante de las colonias (autótrofo vs heterótrofo) que, a su vez, tendrían repercusiones en la actividad metabólica y reproductiva de las colonias. López-Pérez *et al.* (2016) sugieren que la alimentación heterótrofa podría representar una fuente importante de energía para las colonias de *P. damicornis* en esta región, al menos en condiciones de estrés térmico ocasionado por eventos ENSO. Para poder identificar el porcentaje del presupuesto energético que el coral obtiene de cada tipo de alimentación o más aún la variabilidad fisiológica del holobionte completo con respecto a las condiciones ambientales, es importante mejorar la resolución en tiempo y espacio del monitoreo de todas las variables.

El presente estudio cumple el objetivo de dar una aproximación de las fluctuaciones mensuales promedio de las colonias en la zona de estudio. Para obtener más información sobre las interacciones entre variables biológicas es necesario rediseñar la metodología, aumentando la resolución temporal con muestreos menos espaciados o incluso, en condiciones controladas de laboratorio.

9. Conclusiones

- Los valores más altos de TSM, PAR₀ y fotoperiodo se presentaron durante los meses de abril a agosto. En el caso de la temperatura y el fotoperiodo, el periodo de valores altos abarca varios meses, principalmente durante el mayo a agosto mientras que el intervalo de valores elevados de PAR₀ es solamente de tres meses durante marzo a mayo.
- Los mayores valores del CAD₄₉₀ se obtuvieron durante los meses de diciembre a febrero y se redujeron considerablemente durante el resto del año.
- Los mayores valores de la CTchl a se registraron en el periodo octubre-diciembre mientras que en el caso de la CTchl c los valores oscilaron pronunciadamente durante todo el año, siendo ligeramente mayores de mayo a diciembre.
- Los valores promedio más elevados de la concentración tisular de lípidos en las colonias del área de estudio, se presentaron de julio a noviembre y se observó una disminución de forma oscilante durante el resto del año.
- La actividad reproductiva en términos del % CAR promedio se intensificó en el periodo de mayo a agosto y disminuyó durante el resto del año. En algunos meses de la temporada de secas no se registró actividad reproductiva.
- La actividad reproductiva se encuentra directamente correlacionada con la TSM, fotoperiodo y PAR está inversamente correlacionada con el CAD₄₉₀.

10. Referencias

- Aramburu-Vizcarra G, Calderón-Aguilera L, Chávez-Ortiz E, Cupul-Magaña A, de Jesús-Navarrete A, González-Gándara C, Herrero-Pérezrul D, Iglesias-Prieto R, López-Pérez A, Pérez-España H, Reyes-Bonilla H, Carricart-Ganivet JP. 2008. La importancia de los arrecifes de coral. *Ecofronteras* 34:2-5.
- Atkinson, M.J. 2011. Carbon fluxes of coral reefs. En: Hopley, D. (eds.) *Encyclopedia of Modern Coral Reefs: Structure, Form and Process*. Springer Science, 181-185 pp.
- Barton ED, Argote ML, Brown J, Kosro PM, Lavín MF, Robles JM, Smith RL, Trasviña A, Velez HS. 1993. Supersquirt: Dynamics of the Gulf of Tehuantepec, Mexico. *Oceanography*, 1: 23-30.
- Barton ED, Lavín MF, Trasviña A. 2009. Coastal circulation and hydrography in the Gulf of Tehuantepec, Mexico, during winter. *Cont. Shelf Res.* 29(2):485-500.
- Benítez-Villalobos F, Aguilar-Duarte C, Ávila-Poveda OH. 2013. Reproductive biology of *Ophiocoma aethiops* and *Ophiocoma alexandri* (Echinodermata: Ophiuroidea) from Estacahuete Bay, Oaxaca, Mexico. *Aqua. Biol.* 17:119-128.
- Benítez-Villalobos F, Ávila-Poveda OH, Gutiérrez-Méndez I S. 2013. Reproductive biology of *Holothuria fuscocinerea* (Echinodermata: Holothuroidea) from Oaxaca, Mexico. *Sexuality and Early Development in Aquatic Organisms*. 1:13-24.
- Benítez-Villalobos F, Martínez-García M. 2012. Reproductive biology of the starfish *Pharia pyramidatus* (Echinodermata: Asteroidea) from the Mexican Tropical Pacific. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 92(6):1409-1418.
- Camp EF, Kahlke T, Nitschke MR, Varkey D, Fisher NL, Fujise L, Goyen S, Hughes DJ, Lawson CA, Ros M, Woodcock S, Xiao K, Leggat W, Suggett DJ. 2020. Revealing changes in the microbiome of Symbiodiniaceae under thermal stress. *Environ Microbiol*, 22: 1294-1309.

- Carpizo-Ituarte E, Vizcaíno-Ochoa V, Chi-Barragán G, Tapia-Vázquez O, Cupul-Magaña AL, Medina-Rosas P. 2011. Evidencia de reproducción sexual en los corales hermatípicos *Pocillopora damicornis*, *Porites panamensis* y *Pavona gigantea* en Bahía Banderas, Pacífico mexicano. *Ciencias Marinas* 37:97-112.
- Castrillón-Cifuentes A, Muñoz CG, Zapata F. 2015. Reproductive patterns of the coral *Pocillopora damicornis* at Gorgona Island, Colombian Pacific Ocean, *Marine Biology Research*, 11(10):1065-1075.
- Chávez-Romo H, Reyes Bonilla H. 2007. Reproducción sexual del coral *Pocillopora damicornis* al sur del Golfo de California, México. *Ciencias Marinas* 33:495-401.
- Chen D, Busalacchi AJ, Rothstein LM. 1994. The roles of vertical mixing, solar radiations, and wind stress in a model simulation of the sea surface temperature seasonal cycle in the tropical Pacific Ocean. *Amer. Geophys. Un.* 99(C10): 20345-20359.
- Cooper TF, Lai M, Ulstrup KE, Saunders SM, Flematti GR, Radford B. 2011. *Symbiodinium* Genotypic and Environmental Controls on Lipids in Reef Building Corals. *PLoS ONE* 6(5): e20434.
- Drury RA, Wallington EA. 1967. Carleton's histological techniques, 4a ed., Oxford University Press, Londres, 432 p.
- Enríquez S, Méndez E, Iglesias-Prieto R. 2005. Multiple scattering on coral skeletons enhances light absorption by symbiotic algae. *Limn and Oceano* 50(4): 1025-1032.
- Fan TY, Li JJ, Le SX, Fang LS. 2002. Lunar periodicity of larval release by pocilloporid corals in Southern Taiwan. *Zoological Studies* 41:288-294.
- Ferrier-Pagès C, Hoogenboom M, Houlbrèque F. 2011. The role of plankton in coral trophodynamics. En: Dubinsky Z, Stambler N (Eds) *Coral reefs: An ecosystem in transition*. Springer Dordrecht Heidelberg, Londres, New York, 215-229 pp.
- Fiedler PC, Talley LD. 2006. Hydrography of the eastern tropical Pacific: A review. *Prog. Oceanogr.* 69:143-180.

- Fitt WK, Gates RD, Hoegh-Guldberg O, Bythell JC, Jatkari A, Grottoli AG, Gomez M, Fisher P, Lajaunesse TC, Pantos O, Iglesias-Prieto R, Franklin DJ, Rodrigues LJ, Torregiani JM, van Woesik R, Lesser MP. 2009. Response of two species of Indo-Pacific corals, *Porites cylindrica* and *Stylophora pistillata*, to short-term thermal stress: The host does matter in determining the tolerance of corals to bleaching. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 373: 102-110.
- Folch J, Lees M, Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226:497-509
- Gates RD, Edmunds PJ. 1999. The physiological mechanisms of acclimatization in Tropical Reef Coral. *Amer. Zool.* 39:30-43.
- Galván-Rowland LE. 2010. Determinación de lípidos totales, biomasa, pigmentos y densidad de zooxantelas en colonias de *Porites panamensis* presentes en Bahías de Huatulco durante el periodo de junio del 2007 a junio del 2008. Tesis de Licenciatura. Universidad del Mar. Puerto Ángel, México 56.
- García E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación de Köpen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana), UNAM, Distrito Federal, 264 p.
- Gleason DF, Hofmann DK. 2011. Coral larvae: from gametes to recruits. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 408: 42-57.
- Glynn PW, Gassman NJ, Eakin CM, Cortes J, Smith DB, Guzman HM. 1991. Reef coral reproduction in the eastern Pacific: Costa Rica, Panama, and Galapagos Islands (Ecuador): I. Pocilloporidae. *Mar. Biol.* 109:355-368.
- Glynn PW, Leyte-Morales GE (1997) Coral reefs of Huatulco, West México: reef development in upwelling Gulf of Tehuantepec. *Rev. Biol. Trop.* 45:1033-1047.
- González-Silvera A, Santamaria-del-Angel E, Millán-Nuñez R, Manzo-Monroy H. 2004. Satellite observations of mesoscale eddies in the Gulfs of Tehuantepec and Papagayo (Eastern Tropical Pacific). *Deep-Sea Research II* 51:587-600.

- Guendulain-García SD. 2010. Variación de la densidad de zooxantelas, concentración de pigmentos, biomasa y porcentaje de lípidos en tejidos de *Pavona gigantea* Verril, 1896 en Bahías de Huatulco. Tesis de Licenciatura. Universidad del Mar. Puerto Ángel, México.
- Harland AD, Navarro JC, Spencer P, Fixter LM. 1993. Lipids of some Caribbean and Red Sea corals: total lipid, wax esters, triglycerides and fatty acids. *Mar. Biol.* 117:113-117.
- Harriot VJ. 1983. Reproductive seasonality, settlement, and post-settlement mortality of *Pocillopora damicornis* (Linnaeus), at Lizard Island, Great Barrier Reef. *Coral Reefs* 2:151-157.
- Harrison P, Wallace CC. 1990. Reproduction, dispersal and recruitment of scleractinian corals. En: Dubinsky Z (Ed). *Coral Reefs ecosystems*, Vol. 25. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 133-207 pp.
- Hernández-Urraca V. 2010. Determinación de biomasa, lípidos totales, pigmentos y densidad de zooxantelas en colonias de *Pocillopora damicornis* (Linnaeus, 1758). Tesis de Licenciatura. Universidad del Mar, Puerto Ángel, México.
- Hennige SJ, Suggett DJ, Warner ME, McDougall KE, Smith DJ. 2009. Photobiology of *Symbiodinium* revisited: bio-physical and bio-optical signatures. *Coral Reefs* 28:179-195.
- Hochberg E, Apprill A, Atkinson M, Bidigare R. 2006. Bio-optical modeling of photosynthetic pigments in corals. *Coral Reefs* 25(1): 99-109.
- Holmes G. 2008. Estimating three-dimensional surface areas on coral reefs. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 365:63-73.
- Howard DW, Smith CS. 1983. Histological techniques for marine bivalve mollusks. NOAA Technical Memorandum NMFSF/NEC-25. Woods Hole Massachusetts, 97 p.
- Iglesias-Prieto R, Beltrán VH, LaJeunesse TC, Reyes-Bonilla H, Thome PE. 2004. Different algal symbionts explain the vertical distribution of dominant reef corals in the eastern Pacific. *Proc. R. Soc. Lond.* 271: 1757-1763.

- Jeffrey SW, Humphrey GF. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Bioch. Phys.* 167: 191-194.
- Karnauskas KB. 2007. Interannual variability of sea surface temperature in the Eastern Tropical Pacific Ocean and central american rainfall. Tesis de doctorado. University of Maryland, College Park.
- Kessler W. 2006. The circulation of the eastern tropical Pacific: A review. *Prog. Oceanogr.* 69:181-217.
- Lavín MF, Robles JM, Argote ML, Barton ED, Smith R, Brown J, Kosro M, Trasviña A, Vélez-Muñoz HS, García J. 1992. Física del Golfo de Tehuantepec. *Ciencia y Desarrollo* 18: 97-108.
- Lesser M. 1996. Elevated temperatures and ultraviolet radiation cause oxidative stress and inhibit photosynthesis in symbiotic dinoflagellates. *Limnol. Oceanogr.* 41(2):271-283.
- López-Pérez A, Guendulain-García S, Granja-Fernández R, Hernández-Urraca V, Galván-Rowland L, Zepeta-Vilchis R and López-López D. 2016. Reef Community Changes Associated with the 2009–2010 El Niño in the Southern Mexican Pacific. *Pacific Science* 70(2): 175-190.
- Luna LG. 1968. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3^a ed. McGraw-Hill, New York, 258 p.
- Makridakis S, Wheelwright SC, Hyndman R.J. 1998. Forecasting: Methods and applications, 3^a ed. John Wiley and Sons, 656 p.
- Marshall SM, Stephenson TA. 1933. The breeding of reef animals, Part 1. The corals. *Scient. Rep. Gt. Barrier Reef Exped.* 3(8):219-245.
- Muscantine L. 1990. The role of symbiotic algae in carbon and energy flux in reef corals. En: Dubinsky Z (Ed). Coral Reefs ecosystems, Vol. 25. Elsevier Science Publishers B.V, Amsterdam, 75-88 pp.
- Palardy JE, Grottoli AG, Matthews KA. 2005. Effects of upwelling, depth, morphology and polyp size on feeding in three species of Panamanian corals. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 300: 79-89.

- Peixoto RS, Rosado PM, Leite DCA, Rosado AS y Bourne DG. 2017. Beneficial Microorganisms for Corals (BMC): Proposed Mechanisms for Coral Health and Resilience. *Front. Microbiol.* 8:341.
- Pennington JT, Mahoney KL, V.S. K, Kolber DD, Calienes R, Chavez FP. 2006. Primary production in the eastern tropical Pacific: A review. *Prog. Oceanogr.* 69: 285-317.
- Permata WD, Kinzie III RA, Hidaka M. 2000. Histological studies on the origin of planulae of the coral *Pocillopora damicornis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 200:191-200.
- Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. 1995. Métodos histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP), Washington, 400 p.
- Reyes-Bonilla H. 2003. Coral reefs of the Pacific coast of México. En: Cortés J (Ed). *Latin American Coral Reefs*. Elsevier, Amsterdam, 331- 349 pp.
- Reyes-Bonilla H, Leyte-Morales GE. 1998. Corals and coral reefs of the Puerto Angel region, west coast of México. *Rev. Biol. Trop.* 46:679-681.
- Richmond R. 1997. Reproduction and recruitment in corals: Critical links in the persistence of reefs. En: Birkenland C (Ed). *Life and Death of Coral Reefs* Chapman & Hall, New York, 175-197 pp.
- Richmond RH, Jokiel P. 1984. Lunar periodicity in larva release in the reef coral *Pocillopora damicornis* at Enewetak and Hawaii. *Bull. Mar. Sci.* 34:280-287.
- Rodríguez-Troncoso AP, Carpizo-Ituarte E, Cupul-Magaña A.L. 2010. Differential response to cold and warm water conditions in *Pocillopora* colonies from the Central Mexican Pacific. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 391: 57-64.
- Rodríguez-Troncoso AP, Carpizo-Ituarte E, Leyte-Morales GE, Chi-Barragán G, Tapia-Vásquez O. 2011. Sexual reproduction of three coral species from the Mexican South Pacific. *Marine Biology* 158:2673-2683.
- Ruppert E, Barnes RD. 1994. *Invertebrate zoology*. 6a ed. Saunders College Publishing, Harcourt Brace and Company, Florida, 1100 p.

- Sakai K. 1998. Effect of colony size, polyp size, and budding mode on egg production in a colonial coral. *Biological Bulletin* 195: 319-325.
- Santiago-Valentín JD, Colley SB, Glynn PW, Cupul-Magaña AL, López-Pérez RA, Rodríguez-Zaragoza FA, Benítez-Villalobos FB, Bautista-Guerrero E, Zavala-Casas DA, Rodríguez-Troncos AP. 2018. Regional and species specific sexual reproductive patterns of three zooxanthellate scleractinian corals across the Eastern Tropical Pacific. *Mar Ecol.* 39:e12497.
- Smith DJ, Sugget DJ, Baker NR. 2005. Is photoinhibition of zooxanthellae photosynthesis the primary cause of thermal bleaching corals. *Glob Chan Biol* 11:1-11.
- Stimson JS. 1978. Mode and Timing of reproduction in Some Common Hermatypic Corals of Hawaii and Enewetak. *Marine Biology* 48:173-184.
- Stoddart JA, Black R. 1985. Cycles of gametogenesis and planulation in the coral *Pocillopora damicornis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 23:153-164.
- Stull R. 2000. Meteorology for scientist and engineers, 2a ed. Pacific Grove, California, 502 p.
- Sun F, Yu JY. 2006. Impacts of Central America gap winds on the SST annual cycle in the eastern Pacific warm pool. *Geophys. Res. Lett.* 33:1-4.
- Titlyanov EA, Titlyanova TV. 2002. Reef-building corals-symbiotic autotrophic organisms: 1. General structure, feeding pattern, and light-dependent distribution in the shelf. *Russ. J. of Mar. Biol.* 28: S1-S15.
- Trasviña A, Barton ED. 1997. Los "Nortes" del Golfo de Tehuantepec: la circulación costera inducida por el viento En: Lavín MF (Ed). Contribuciones a la Oceanografía Física en México, Monografía 3. Unión Geofísica Mexicana, 25-46 pp.
- Trasviña A, Barton ED. 2008. Summer circulation in the Mexican tropical Pacific. *Deep-Sea Research I*, 55:587-607.
- Venn AA, Loram JE, Douglas AE. 2008. Photosynthetic symbioses in animals. *J. Exp. Mar. Biol.* 59 (5):1069-1080.
- Veron JEN. 1995. Corals in space and time: Biogeography and evolution of the Scleractinia. Cornell University Press, Ithaca, 321 p.

- Veron JEN. 2000. Corals of the world, vol. I. Australian Institute of Marine Science, Townsville, 450 p.
- Villanueva RD, Yap HT, Montaña MN. 2008. Timing of planulation by pocilloporid corals in the northwestern Philippines. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 370:111-119.
- Ward S. 1992. Evidence for broadcast spawning as well as brooding in the scleractinian coral *Pocillopora damicornis*. *Mar. Biol.* 112:641-646.
- Ward S. 1995. Two patterns of energy allocation for growth, reproduction and lipid storage in the scleractinian coral *Pocillopora damicornis*. *Coral Reefs*14: 87-90.
- Willet CS, Leben RR, Lavín MF. 2006. Eddies and Tropical Instability Waves in the eastern tropical Pacific: A review. *Prog. Oceanog.* 69: 218-238.
- Wright JM, Colling A, Bearman G. 1997. Seawater: its Composition, Properties and Behaviour, 2a ed. Elsevier Ltd. 162 p.
- Veron JEN. 1995. Corals in space and time: Biogeography and evolution of the Scleractinia. Cornell University Press, Ithaca, 321 p.
- Veron JEN. 2000. Corals of the world, vol. I. Australian Institute of Marine Science, Townsville, 450 p.
- Zavala-Casas DA. 2013. Reproducción sexual de *Pocillopora damicornis* (Linnaeus 1758) (Anthozoa:Scleractinia) en la costa de Oaxaca, México. Tesis de Licenciatura. Universidad del Mar, Puerto Ángel, México.
- Zhang Y, Yang Q, Ling J, Long L, Huang H, Yin J, Wu M, Tang X, Lin X, Zhang Y, Dong J. 2021. Shifting the microbiome of a coral holobiont and improving host physiology by inoculation with a potentially beneficial bacterial consortium. *BMC Microbiol* 21:130, <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02167-5>

ANEXO I: Técnica histológica de rutina I y II

Técnica empleada para la deshidratación, aclaración, infiltración e inclusión del tejido de *P. damicornis*, modificada de Drury y Wallington (1967) y Benítez-Villalobos *et al.* (2012).

Proceso	Reactivo	Tiempo (min)	Repeticiones
Deshidratación	Etanol 80%	30	1
	Etanol 90%	30	1
	Etanol 96%	30	2
	Etanol 100%	30	2
Aclaración	Citri-Solv ¹	45	2
Infiltración	Paraplast ² a 60°	30	2
Inclusión	Paraplast ² a 60°		

¹Sustituto no tóxico de xileno

²Parafina altamente purificada®

Preparación a la tinción y proceso de tinción regresiva Hematoxilina de Harris-Eosina (HHE) modificada de Drury y Wallington (1967).

Proceso	Reactivo	Tiempo (min)	Repeticiones	
Remoción del Paraplast	Citri-Solv ¹	5	2	
	Etanol 100%	5	2	
Hidratación	Etanol 96%	5	2	
	Etanol 90%	5	2	
	Etanol 80%	5	1	
	Etanol 70%	5	2	
	Carbonato de litio (LiCO ₃) 1% *	4 hrs	1	
	Agua destilada	5	2	
	Tinción	Hematoxilina de Harris	7	1
		Agua Corriente	5 seg	1
Alcohol ácido		2 seg	1	
Carbonato de litio (LiCO ₃) 1%		1	1	
Agua destilada		5	1	
Eosinaalcohólica		15	1	
Agua corriente		5 seg	1	
Deshidratación	Etanol 96%	5	2	
	Etanol 100%	5	2	
Sellado y montaje	Citri-Solv	5	2	
	Resinasintética			

¹Sustituto no tóxico de xileno

*Para neutralizar el ácido utilizado durante la descalcificación