



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTADE DE CIENCIAS

**Efecto de diferentes dietas sobre la regeneración
tisular en *Dendrophyllia cornigera* (Lamarck, 1816)**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Cristina Gutiérrez Zárate

Master Interuniversitario en Biología Marina

Curso 2014 - 2015

Junio de 2015

Resumen

Dendrophyllia cornigera (Lamarck, 1816) es una especie de coral escleractinio de agua fría que se encuentra a profundidades de (30-) 200-800 m. Al tratarse de una especie ahermatípica, la heterotrofía es su principal vía de captación de energía. Por otro lado, posee la capacidad de regenerar el tejido vivo que recubre su esqueleto. Esta capacidad es vital para la integridad y supervivencia de las colonias.

En este trabajo, se estudió el efecto de diferentes tipos de dieta (*Artemia salina* adulta congelada, caballa, mejillón y pienso) sobre la capacidad de regeneración tisular en *D. cornigera*. Para ello, se puso en marcha una instalación acuariológica donde se dotó al material biológico de las condiciones necesarias para su mantenimiento. La capacidad de regeneración tisular se estudió mediante el cálculo de la Tasa de Regeneración Tisular (expresada en mm²/día), que mostró diferencias significativas entre los diferentes grupos de dieta (p=0.001). Por otro lado, se representó la Superficie Regenerada de cada tipo de dieta frente al tiempo transcurrido. Por último, se realizó un seguimiento fotográfico de las colonias para obtener un registro visual de la capacidad de regeneración tisular.

Los resultados mostraron que la dieta compuesta de *Artemia salina* adulta congelada fue la que arrojó valores más elevados de Tasa de Regeneración Tisular, así como una recuperación de superficie más rápida que el resto de dietas. Este estudio supone un acercamiento a las técnicas que pueden ser empleadas para la recuperación de corales de agua fría en ambientes controlados.

Palabras clave: *Dendrophyllia cornigera*, Regeneración Tisular, Dieta, Corales de Agua Fría.

Abstract

Dendrophyllia cornigera (Lamarck, 1816) is a scleractinian, cold-water coral species that can be found in depths from (30-) 200-800 m. As it is an ahermatipic species, heterotrophy is its main mechanism of energy intake. On the other hand, it has the capacity to regenerate the living tissue that covers its skeleton. This capacity is vital for the integrity and survival of the colonies.

In this essay, the effect that different diets (frozen adult *Artemia salina*, mackerel, mussel and feed) could cause on the capacity of tissue regeneration in *D. cornigera* was studied. For that purpose, an aquariologic system was set up, where the biological material was provided with all the necessary conditions for its maintenance. The capacity of tissue regeneration was analyzed via Tissue Regeneration Rate (mm^2/day), which showed significant differences between the different groups ($p=0.001$). Besides, Regenerated Surface of each diet group vs time was represented. Lastly, a photographic monitoring of the colonies was made to obtain a visual register of the capacity of tissue regeneration.

The results showed that the diet consisted of frozen adult *Artemia salina* generated the highest values of Tissue Regeneration Rate, additionally to create the fastest regeneration of surface. This study means an approach to the techniques that can be used to recover cold-water corals in controlled environments.

Keywords: *Dendrophyllia cornigera*, Tissue Regeneration, Diet, Cold-Water Corals.

Índice

1	Introducción	1
1.1	Corales de agua fría	1
1.1.1	Heterotrofia.....	1
1.1.2	Distribución	2
1.2	<i>Dendrophyllia cornigera</i> (Lamarck, 1816)	2
1.2.1	Distribución	3
1.2.2	Características generales.....	3
1.3	Regeneración tisular	5
1.4	Justificación	6
2	Objetivos	6
3	Metodología	7
3.1	Instalación acuariológica y control de calidad del agua	7
3.2	Material biológico.....	8
3.3	Preparación de las dietas	9
3.4	Análisis de la capacidad regeneración tisular	10
3.5	Análisis estadístico	12
3.5.1	Generación de las bases de datos.....	12
3.5.2	Análisis del efecto de la dieta en la Tasa de Regeneración Tisular.....	12
3.6	Seguimiento fotográfico	13
4	Resultados	14
4.1	Mantenimiento de <i>Dendrophyllia cornigera</i> en condiciones de acuario.....	14
4.2	Efecto de la dieta en la Tasa de Regeneración Tisular	14
4.3	Evolución de la regeneración tisular según el tipo de dieta.....	16
4.4	Seguimiento fotográfico	17
5	Discusión.....	20
6	Conclusiones	22
	Bibliografía.....	23

1 Introducción

1.1 Corales de agua fría

Los corales de agua fría son organismos de gran importancia ecológica dentro de ambientes profundos oceánicos. Estos son capaces de construir redes complejas de arrecife, cuya diversidad es comparable a la de los arrecifes de zonas tropicales. Por ello, los arrecifes de corales de agua fría son considerados como zonas de alta biodiversidad béntica (Carlier *et al.*, 2009; Naumann *et al.*, 2011). Pueden actuar como refugio, zona de cría y de alimentación a muchas especies que habitan en altas profundidades, incluyendo a peces de importancia comercial. Sin embargo, están siendo afectados por amenazas de origen antropogénico como la pesca de arrastre, explotaciones de gas y petróleo o, de un modo indirecto, por la acidificación de los océanos y el calentamiento global (Carlier *et al.*, 2009; Movilla *et al.*, 2014).

1.1.1 Heterotrofia

Los corales de agua fría no están asociados con dinoflagelados simbióticos (como las zooxantelas), los cuales tienen una gran importancia para cubrir las demandas metabólicas gracias a la fotosíntesis. A los corales que no poseen esta propiedad se les denomina ahermatípicos. Se cree que estos corales dependen exclusivamente de su heterotrofia por medio de la captación de materia orgánica suspendida en el medio (Naumann *et al.*, 2011).

El conocimiento actual de su ecología alimentaria es muy reducido debido a la dificultad de acceso a hábitats oceánicos profundos y, por tanto, a la limitación a estudios *in situ* no invasivos (Naumann *et al.*, 2011). Es por ello que existe un número reducido de estudios cuantitativos y sólo unos pocos estudios han podido obtener evidencia visual de los mecanismos de suministro de alimento de arrecifes de corales fríos *in situ* (Carlier *et al.*, 2009; Davies *et al.*, 2009).

La dieta de estos corales se compone de una gran variedad de fuentes de alimento como fitodetritus, fitoplancton y mesozooplancton (calanoides y copépodos) o bacterias (Gori *et al.*, 2013; Ferrier-Pagès *et al.*, 2003). Sin embargo, aún no se conoce la proporción en que la materia orgánica particulada y el zooplancton contribuyen a su dieta (Carlier *et al.*, 2009). En condiciones de laboratorio se confirmó su capacidad de capturar partículas tanto vivas como muertas. Sin embargo, no existe aún información

sobre la capacidad de captura de partículas más pequeñas como el picoplancton, nanoplancton o materia orgánica disuelta (Gori *et al.*, 2013).

1.1.2 Distribución

La distribución de los corales de agua fría está relacionada con una serie de factores bióticos y abióticos como la temperatura y densidad del agua, regímenes de corrientes de agua, saturación de aragonita, concentración de oxígeno, presencia de un sustrato adecuado y aportes de nutrientes (Gori *et al.* 2014).

Desde un punto de vista geográfico, la distribución de los corales de agua fría depende directamente de la ocurrencia de elevaciones topográficas y fuertes corrientes (Carlier *et al.*, 2009). La interacción entre corrientes, olas internas y topografía genera unas condiciones capaces de evitar el enterramiento debido a la deposición de sedimento y de transportar partículas de detritus digerible (Freiwald, 2003). Este proceso se produce debido a que disipan la energía en la capa límite entre el sedimento y el agua y crean unas condiciones adecuadas para el desarrollo de comunidades bentónicas donde predominan corales de agua fría (Freiwald, 2003; Davies *et al.*, 2009). Algunos de los enclaves que reúnen estas condiciones topográficas son cañones, pendientes o montes submarinos (Davies *et al.*, 2009).

1.2 *Dendrophyllia cornigera* (Lamarck, 1816)

El coral amarillo de agua fría *Dendrophyllia cornigera* pertenece al orden de los escleractinios (corales pétreos o corales duros) (Tabla 1) y fue por primera vez descrito por Lamarck en 1816.

Filum	Cnidaria
Clase	Anthozoa
Subclase	Hexacorallia
Orden	Scleractinia
Familia	Dendrophylliidae
Género	Dendrophyllia
Especie	<i>Dendrophyllia cornigera</i>

Tabla 1: Clasificación sistemática de *D. cornigera*.

1.2.1 Distribución

La distribución de esta especie está detallada por Zibrowius (1980): en el Atlántico, se puede encontrar desde el suroeste de Irlanda hasta las islas de Cabo Verde mientras que el Mediterráneo la alberga tanto en su zona oriental como occidental. Su hábitat en el Atlántico es, sobretodo, el borde de la plataforma continental y de fondos batiales superiores, donde esta especie forma grandes masas, sola o asociada a *Lophelia pertusa* y *Madrepora oculata* (Castric-Fey, 1996).

Generalmente puede encontrarse a profundidades de 200 a 800 m pero pueden encontrarse hasta los 30 m de profundidad. Este remontamiento de una especie típicamente batial ocurre en la ría de Vigo, donde se puede encontrar a 60 m de profundidad debido a la presencia de afloramientos (Castric-Fey, 1996; Zibrowius, 1980).

1.2.2 Características generales

Las colonias de cnidarios comprenden una serie de unidades modulares denominadas pólipos, correspondiéndose cada uno de ellos con un individuo (Brusca *et al.*, 1990). En los corales escleractinios, el esqueleto es extracelular y se sitúa bajo la base del tejido del coral (Barnes, 1990).

Las colonias de *D. cornigera* son muy variables: desde pequeñas ramificaciones de coralitos (esqueletos individuales de cada pólipo) hasta formas arborescentes como resultado de una elongación más acentuada de un coralito principal (Zibrowius, 1980). Los pólipos que comprenden la colonia suelen tener un diámetro de entre 2 y 4 cm (Movilla *et al.*, 2014).

En la estructura de un pólipo se pueden diferenciar dos regiones: la región oral (que está en contacto con el medio exterior) y la región aboral (en contacto con el esqueleto). El tejido de cada una de estas regiones se divide en dos capas (endodermo y ectodermo), separadas por una capa de fibra de colágeno llamada mesoglea (Hickman *et al.*, 2008).

En la región oral se encuentran los tentáculos huecos que rodean el disco oral. En los hexacorales, el número de tentáculos es múltiple de seis. En el disco oral, el tejido se invagina formando la boca y la faringe, que desciende hasta la cavidad gastrovascular (Figura 1) (Hickman *et al.*, 2008).

Entre la región oral y la aboral se sitúa la cavidad gastrovascular, donde tiene lugar el intercambio de nutrientes. En los hexacorales, está subdividida en septos en un número múltiple de seis (Allemand *et al.*, 2011).

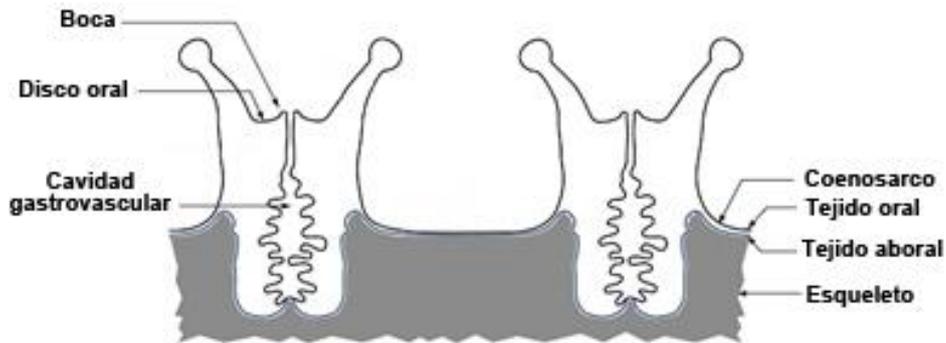


Figura 1: Anatomía de dos pólipos de un hexacoral y del coenosarco que los une (modificado de Vidal-Dupiol *et al.*, 2009).

Los pólipos que conforman una colonia están interconectados por una lámina de conexión de tejido vivo, denominada coenosarco, que se extiende por encima del esqueleto de la colonia. Esta lámina surge del pliegue hacia afuera de la pared del cuerpo del pólipo (del ectodermo oral y aboral) y está conectada con los pliegues equivalentes de otros pólipos. La lámina de tejido vivo está delimitada por el ectodermo oral y el aboral, entre los cuales se encuentra la mesoglea. Entre estos tejidos existe una red de canales gastrovasculares limitados por el endodermo oral y el aboral. Estos canales se corresponden a la extensión de la cavidad gastrovascular de cada pólipo y hacen posible la conexión entre ellos. Por otro lado, en el ectodermo aboral se encuentran las células calicoblásticas, responsables de la formación del esqueleto (Figura 2) (Barnes, 1990; Allemand *et al.*, 2004).

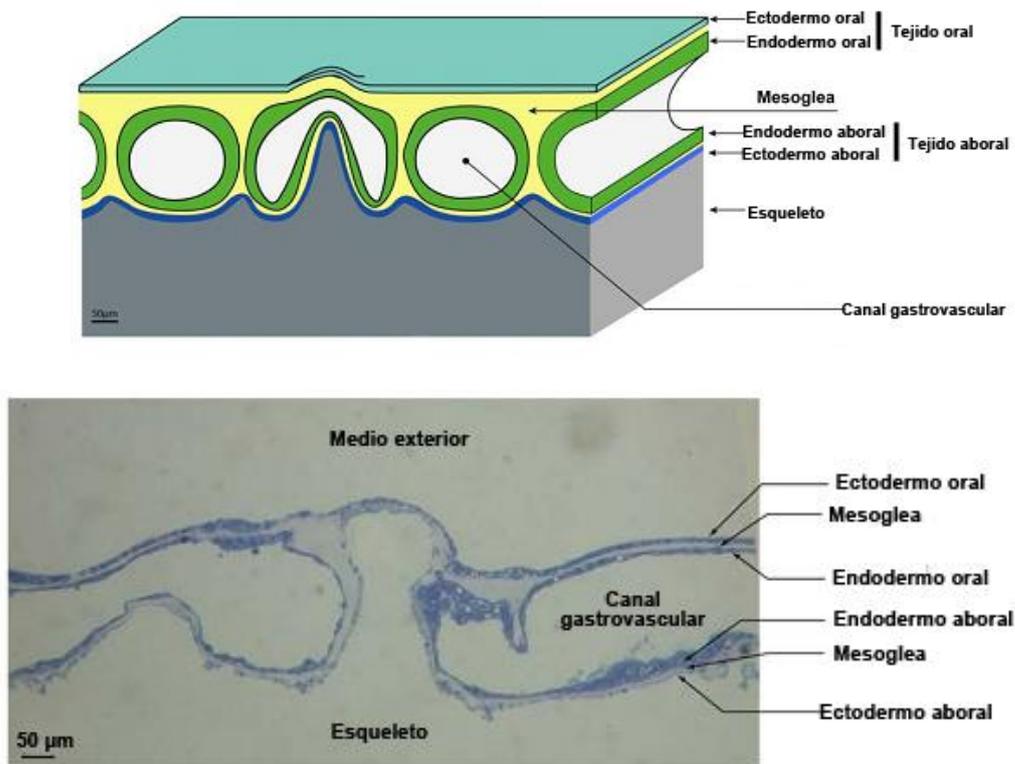


Figura 2: Estructura del coenosarco que cubre el esqueleto de un hexacoral (imagen superior) y corte histológico del coenosarco (imagen inferior) (modificado de Allemand *et al.*, 2004).

1.3 Regeneración tisular

La regeneración tisular es la formación de una nueva capa de tejido en zonas de esqueleto desprovisto de la capa de tejido vivo que lo rodea. El proceso de regeneración se realiza a partir del tejido que rodea la lesión (Meesters *et al.*, 1994). La mayoría de especies que comprenden los metazoos poseen esta capacidad de regeneración en mayor o menor medida, la cual depende de factores como la especie, morfología o tipo de daño infligido. (Kramarsky-Winter y Loya, 2010).

En los corales escleractinios, la regeneración tisular es un proceso necesario para preservar la vida y la integridad de la colonia (Horwitz y Fine, 2014). Si no, la mortalidad de los pólipos conlleva a una mortalidad parcial de la superficie de la colonia (Meesters *et al.*, 1994).

La regeneración, al tener un papel importante en la supervivencia de la colonia, necesita grandes cantidades de energía y se cree que tiene prioridad frente a otras funciones como el crecimiento, respiración o la resistencia a enfermedades (Meesters *et al.*, 1994, Horwitz y Fine, 2014).

Para muchas especies, la velocidad de este proceso es vital ya que restaura las funciones de los pólipos (alimentación, reproducción o almacenamiento) y minimiza el riesgo de invasión de otros organismos como algas o esponjas perforadoras (Horwitz y Fine, 2014; Meesters *et al.*, 1994; Bak y Steward-Van Es, 1980).

1.4 Justificación

Dada la importancia de la preservación de los corales de agua fría y a sus crecientes amenazas, es necesario analizar técnicas para su recuperación (Freiwald, 2003). Ya que es complicado el manejo *in situ* de corales de agua fría debido a la profundidad de su hábitat, es de interés analizar qué variables hay que tener en cuenta para ejecutar técnicas de recuperación de estos corales en ambientes controlados.

Por otro lado, debido a que la regeneración tisular tiene prioridad frente a otras funciones vitales y es necesaria para la integridad y supervivencia de la colonia (Meesters *et al.*, 1994), es importante estudiar esta capacidad y explorar formas de potenciarla.

Finalmente, dado que el estudio tuvo lugar en las instalaciones del Aquarium Finisterrae, es de gran interés para la entidad analizar si una dieta compuesta por elementos más comunes en los canales principales de mercado puede promover valores regeneración tisular elevados. De esta manera, se podría mejorar la accesibilidad y rentabilidad de la dieta utilizada para el mantenimiento y recuperación de esta especie en ambientes controlados.

2 Objetivos

Los objetivos del presente estudio son los siguientes:

- 1- Mantener individuos de *D. cornigera* en condiciones de acuario adecuadas para su manejo y estudio.
- 2- Evaluar si el tipo de dieta afecta a su capacidad de regeneración tisular.
- 3- Determinar qué dietas promueven una mayor regeneración tisular para esta especie.
- 4- Analizar la evolución de la regeneración tisular según el tipo de dieta.
- 5- Monitorizar esta capacidad mediante un seguimiento fotográfico.

3 Metodología

3.1 Instalación acuariológica y control de calidad del agua

El estudio fue realizado en una de las salas de cuarentena del Aquarium Finisterrae (A Coruña) equipada con un circuito semicerrado de agua de mar. Se estableció una temperatura de $12^{\circ}\text{C}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$, similar a la que se encuentra la especie en condiciones naturales (Castric-Fey, 1996), la cual estaba regulada por medio de un enfriador conectado al circuito. Este circuito contaba además con un espumador de proteínas (“Skimmer”) y un sistema seriado de filtros de cartucho que filtraba el agua del circuito hasta $5\ \mu\text{m}$.



Figura 3: Tanque de la instalación acuariológica.

Los tanques en los que se colocaron las colonias tenían una capacidad de 80 litros y contaban con una entrada de agua con una válvula reguladora y un aireador. Por otro lado, cada tanque contaba con dos bombas de recirculación (con un caudal de 10 L/min) enfrentadas para generar una corriente capaz de evitar la sedimentación del alimento. El agua salía de cada tanque por rebose en superficie y se colectaba mediante un tubo de desagüe para su posterior recirculación (Figura 3).

Por último, dado que la luz en el hábitat natural de esta especie es limitada o nula, los tanques se recubrieron con un plástico negro y se taparon con una tapa de poliestireno expandido. De esta manera, se evitó que la luz de la sala durante el manejo pudiese afectar al comportamiento del material biológico.

La calidad del agua de la instalación se evaluó periódicamente mediante el análisis de una serie de variables fisicoquímicas: temperatura, pH, salinidad, oxígeno disuelto, concentración de compuestos nitrogenados (nitrato, nitrito y amonio) y concentración de calcio.

La temperatura, pH, salinidad (‰) y oxígeno disuelto (% saturación) se midieron diariamente utilizando el equipo multiparamétrico HACH HQ40d.

Los compuestos nitrogenados (nitratos, nitritos y amonio) se analizaron semanalmente, usando para ello un espectrofotómetro HACH DR/5000: para el nitrato (NO_3^-) se utilizó el método de emisión UV, para el nitrito (NO_2^-) el método de diazotización y para el amonio (NH_4^+) el método de salicilato. Estos valores se expresaban como mg/L.

Por último, la concentración de Calcio, expresada como ppm Ca^{+2} , se midió semanalmente mediante el método de titulación con EDTA.

3.2 Material biológico

Los ejemplares de *Dendrophyllia cornigera* con los que se realizó este estudio se encontraban inicialmente en las instalaciones del Aquarium Finisterrae y se componían de 8 colonias que contenían un número total de 73 pólipos. Este material presentaba inicialmente un evidente deterioro del tejido que recubría su esqueleto.

La temperatura a la que el material biológico se encontraba inicialmente era de 14°C y, al trasladarse a la sala donde se había dispuesto la instalación acuariológica, se procedió a la aclimatación térmica las colonias. La temperatura se redujo paulatinamente hasta 12°C, temperatura a la que estaba regulado el circuito de agua de la instalación.

Posteriormente, para colocar las colonias y mantenerlas erguidas, a cada colonia se le adhirió una base de metacrilato redonda usando adhesivo bicomponente Araldit y un taco brida. Por otro lado, se dispusieron unas bases de piedra (previamente limada para evitar arañazos en el tanque y lavada para eliminar posibles contaminantes) con unos agujeros de 9 mm de diámetro para que encajasen dentro los tacos adheridos a cada colonia. Además, se asignó a cada colonia un número de identificación, utilizando etiquetas de poliéster.

Durante tres semanas, todas las colonias se mantuvieron bajo la misma dieta (*Artemia salina* en forma de nauplio vivo recién eclosionado) para su estimulación. La toma se producía deteniendo la circulación de agua durante dos horas, durante las cuales se les suministraba el nauplio. Una vez transcurrido este tiempo, se reanudaba la circulación.

Pasado este plazo, las colonias fueron repartidas en cuatro tanques a razón de dos colonias por tanque, de modo que el número total de pólipos en cada uno de ellos fuese similar (18-19 pólipos).

3.3 Preparación de las dietas

En este estudio, cada tratamiento consistió en la asignación y suministro de un determinado tipo de dieta, diferente en cada tanque, como única forma de alimentación.

Para analizar qué tipo de alimento podrían ingerir los ejemplares de esta especie, se realizó un examen previo en el que se probaron diferentes fuentes de alimento. Finalmente, se escogieron cuatro dietas y se asignaron a los distintos tanques (Tabla 2): *Artemia salina* adulta congelada (en adelante, Artemia), caballa (*Scomber scombrus*), mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) y una dieta de origen artificial a base de pienso (GEMMA Diamond).

Tanque	Dieta	Nº de pólipos
1	Artemia	18
2	Caballa	18
3	Mejillón	18
4	Pienso	19

Tabla 2: Distribución de cada tipo de dieta en tanques y número inicial de pólipos que contenían.

La preparación diaria de cada dieta fue la siguiente: 12g de Artemia; 175g de una papilla que consistía en una suspensión de caballa triturada en agua (en adelante, Caballa); 150g de papilla consistente en suspensión de mejillón triturado en agua (en adelante, Mejillón) y 55g de pienso. Para aumentar las posibilidades de captura de los pólipos y asegurar la eficiencia de la toma de alimentos, la cantidad de alimento suministrada estaba concentrada muy por encima de lo que pudiesen ingerir las colonias.

La Artemia se obtenía de placas congeladas de 500 g que se utilizaban durante la rutina de alimentación del Aquarium. Estas placas, según el fabricante (3F Frozen Fish Food), contienen un 5% de proteínas, 1% de lípidos, 0.9% de fibra y 0.8% de cenizas.

Para preparar la Caballa, se usaban varias piezas de caballa troceada y sin espinas a las que se les añadía agua de mar, que posteriormente fueron trituradas y coladas. El resultado de ambas preparaciones se distribuía en bolsas zip (12.5 x 8 cm) que se mantenían congeladas, sirviendo como medida de ración diaria. El contenido nutricional de la caballa utilizada, según los análisis del Aquarium, era de 14.1% de proteínas, 10.8% de lípidos, 8% de hidratos de carbono, 3.4% de cenizas y 68.6% de humedad.

Para preparar Mejillón se empleó un proceso idéntico, pero utilizando mejillón cocido congelado. El valor nutritivo del mejillón utilizado era de 18.45% de proteínas, 2.7% de lípidos y 3.18% de carbohidratos (Base de Datos Española de Composición de Alimentos).

El pienso empleado pertenecía a la marca GEMMA Diamond 0.8 de la casa Skretting. Este tipo de pienso está específicamente diseñado para el crecimiento de peces juveniles. El tamaño de partícula, según el fabricante, varía entre 530-830 μm de diámetro y tiene un contenido de 52% de proteínas, 20% de lípidos, 11% de cenizas y 0.5% de fibra.

Para asemejar la toma de alimentos a las condiciones naturales de la especie, el alimento se vertía en cada tanque, que permanecía durante dos horas sin circulación mientras la corriente generada por las bombas de caudal situadas en su interior evitaba su sedimentación. Este proceso se repetía cinco veces por semana.

3.4 Análisis de la capacidad regeneración tisular

El proceso de regeneración tisular se evaluó mediante el análisis del crecimiento del tejido vivo (o coenosarco) de cada pólipo. Esta regeneración se calculó mediante la medición de la longitud comprendida entre el inicio de la ramificación de cada pólipo y la base de su tejido vivo. Al irse regenerando el tejido vivo y cubriendo el esqueleto del pólipo, esta distancia fue disminuyendo. Una vez que el tejido vivo se regeneró por completo, la distancia medida alcanzó un valor de cero, ya que el tejido había recubierto enteramente la estructura del pólipo.

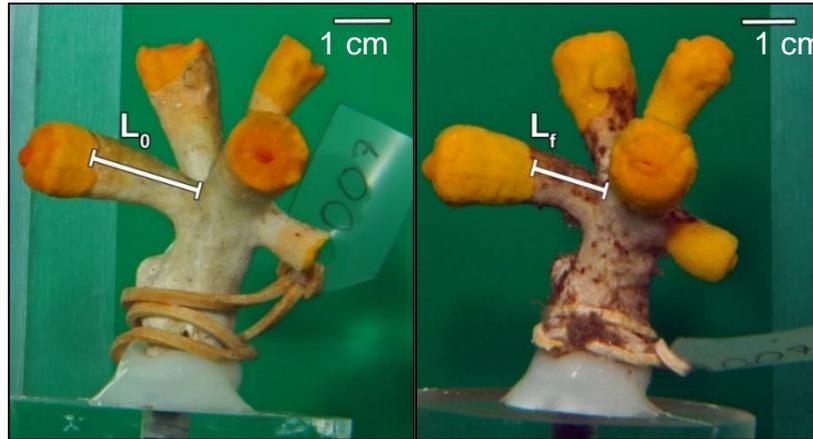


Figura 4: Proceso de regeneración tisular de un pólipo de *D. cornigera*. L_0 y L_f se corresponden a las medidas del segmento dañado en el momento inicial y final del estudio respectivamente.

Para la identificación de la longitud a medir en cada pólipo, se crearon fichas de cada colonia numerando cada pólipo y situando el tramo a medir. Para la medida, se utilizó un calibre de plástico con una precisión de ± 1 mm. Las mediciones se realizaron cada dos semanas y durante 210 días.

Con el fin de evitar interferencias causadas por el tamaño del pólipo (diámetro) en el análisis de la capacidad de regeneración tisular, se calculó la superficie de tejido regenerado. Para ello, se midió el diámetro de cada pólipo y se asumió una forma cilíndrica de los pólipos y un crecimiento uniforme del tejido vivo.

Para analizar la capacidad de regeneración tisular de los pólipos de *D. cornigera* se definieron dos variables sobre las que se centraría el análisis estadístico de este estudio y se calcularon a partir de las siguientes fórmulas:

- **Superficie Regenerada:** se define como la superficie total de tejido, expresada en mm^2 , que se ha regenerado en un pólipo durante un determinado periodo de tiempo.
- **Tasa de Regeneración Tisular:** se refiere a la superficie de tejido que se regenera en un pólipo durante un determinado periodo de tiempo. En este caso, $\text{mm}^2/\text{día}$.

$$\text{Superficie Regenerada (mm}^2\text{)} = S_0 - S_f = \pi \times \emptyset \times L_0 - \pi \times \emptyset \times L_f = \pi \times \emptyset \times (L_0 - L_f)$$

$$\text{Tasa de Regeneración Tisular (mm}^2\text{/día)} = \frac{\text{Superficie Regenerada}}{T_f}$$

En donde \emptyset significa diámetro de cada pólipo y está expresado en mm; L_0 y L_f la longitud medida inicial y final respectivamente (mm); T_f el tiempo transcurrido hasta la completa regeneración tisular o hasta el final del experimento, expresado en días; y S_0 y S_f la superficie por regenerar inicial y final respectivamente, expresada en mm^2 .

3.5 Análisis estadístico

3.5.1 Generación de las bases de datos

Para el análisis de los datos y la realización de los cálculos, se usó el programa Microsoft Excel 15.0 (Microsoft Professional Plus 2013), mientras que para el análisis estadístico se usó el paquete estadístico IBM SPSS 21.0.

Para evitar errores en los análisis, se excluyeron una serie de datos del conjunto inicial. Estos incluían a los pólipos que perdieron por completo el tejido durante el estudio (n=2), los que nacieron en este estudio (n=2) y los que presentaban inicialmente un recubrimiento total del tejido vivo (n=5).

Por otro lado, se fueron retirando del estudio aquellos pólipos que iban recuperando por completo el tejido vivo que los rodeaba. Es decir, para un pólipo que hubiese recuperado por completo su tejido vivo durante el experimento, los valores de superficie recuperada abarcaron únicamente hasta el momento en que se recuperó por completo y no existían valores para el tiempo restante del estudio.

De esta manera, al representar gráficamente los valores de superficie regenerada frente al tiempo transcurrido, un tramo de la gráfica con pendiente 0 indicaba que no se regeneró tejido vivo. En caso de haber mantenido los datos anteriores, el hecho de tener un valor de pendiente 0 podría inducir a confusión entre los casos en los que los pólipos no consiguen regenerar su tejido vivo y los pólipos que están totalmente recuperados.

3.5.2 Análisis del efecto de la dieta en la Tasa de Regeneración Tisular

Para analizar si el tipo de dieta afectaba significativamente al proceso de regeneración tisular, se realizaron los correspondientes test estadísticos. Como paso previo, se comprobó si los grupos de datos cumplían las propiedades de normalidad, homocedasticidad, linealidad e independencia.

Con el fin de cumplir estas propiedades, los datos fueron sometidos a una serie de transformaciones (Ln, Log₁₀, raíz cuadrada, inversa, etc.). Para analizar la homocedasticidad de los datos, se utilizó el test de Levene y para la normalidad, los test de Kolmogorov- Smirnov y Shapiro-Wilk.

Posteriormente, se procedió a analizar si existía una diferencia de medias significativa entre los diferentes grupos de datos según la dieta. Para ello se usó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para muestras independientes. La ventaja de usar este test no sólo recae en que no es necesaria las condiciones de los test paramétricos, si no

en que no se pierde tamaño de muestra al no tener que transformar los datos, como podría resultar al aplicar logaritmos a valores de 0. Este test formulaba la hipótesis nula de que el tipo de dieta no influía en la distribución de la Tasa de Regeneración Tisular entre los grupos.

Para poder comparar la diferencia entre los grupos y, por tanto, qué tipo de dieta ofrecía una Tasa de Regeneración Tisular significativamente diferente, se realizó el test de la U de Mann-Whitney (junto con la W de Wilcoxon). Este test no paramétrico revela si hay diferencias significativas entre dos grupos, por lo que se realizaron un total de seis contrastes para comparar los grupos dos a dos. El test formulaba una hipótesis nula de que el tipo de dieta no influía en la Tasa de Regeneración Tisular entre dos grupos.

3.6 Seguimiento fotográfico

Con el fin de registrar visualmente los cambios producidos en las colonias debido a la regeneración tisular, se realizó un seguimiento fotográfico de las mismas. Para ello se usó un tanque al que se le acoplaron dos planchas de metacrilato verde (para favorecer el contraste con el blanco y amarillo de las colonias) una en la base y otra en la pared posterior. Para contar con una referencia métrica, se adhirió una escala en la pared posterior.

Las fotografías se realizaron utilizando una cámara Canon EOS 7D con un objetivo EFS 15-85 mm, un flash externo Canon Speedlite 580EX, una antorcha Tokura TM-700 y un trípode Manfrotto 128RC (Figura 5). Este proceso se repetía cada dos semanas. Posteriormente, las fotografías fueron corregidas y editadas utilizando el software Adobe Photoshop CS5 (Seimert, 2010).

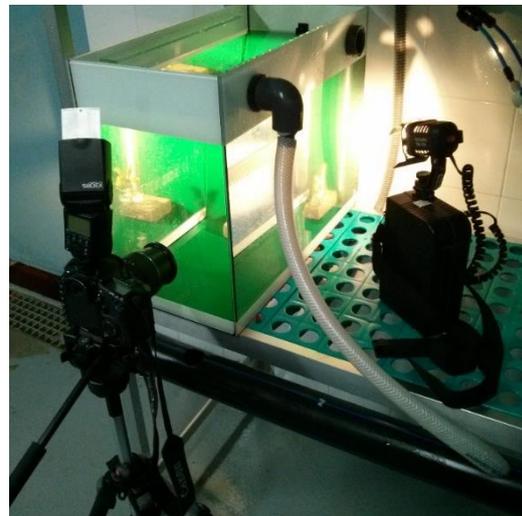


Figura 5: Sistema de seguimiento fotográfico.

4 Resultados

4.1 Mantenimiento de *Dendrophyllia cornigera* en condiciones de acuario

Durante el estudio, los ejemplares se mantuvieron erguidos, fijos y no se observó que el continuo manejo afectase a su comportamiento o desarrollo. La instalación acuariológica permitió el desarrollo del material biológico, aportando unas condiciones más adecuadas para el mantenimiento de esta especie que las instalaciones donde se encontraba anteriormente. Esta mejora en las condiciones se pudo observar gracias a la apertura normal de los pólipos una vez vertido el alimento, al nacimiento de nuevos pólipos y al inicio del proceso de regeneración tisular en el material biológico.

Durante las primeras semanas del estudio, el tejido de dos pólipos desapareció por completo causando la mortalidad de los mismos. Estos pertenecían al grupo de la Caballa y presentaban inicialmente graves daños en el tejido que comprendía la boca del pólipo. Por otro lado, durante el estudio se formaron dos nuevos pólipos: uno en el tratamiento de Artemia y otro en el de Mejillón.

4.2 Efecto de la dieta en la Tasa de Regeneración Tisular

En el tiempo transcurrido durante el experimento, seis pólipos recuperaron por completo el tejido vivo necesario para cubrir el esqueleto. De estos, tres pertenecían al grupo de Artemia y tres al Mejillón.

Los resultados del análisis descriptivo inicial de la Tasa de Regeneración Tisular según el tipo de dieta están reflejados en la Tabla 3 y en la Figura 6. Se puede observar que el tamaño de muestra es similar en cada grupo y que existen valores de cero y negativos para la Tasa de Regeneración Tisular.

Por otro lado, los valores de desviación típica, así como los límites del intervalo de confianza para la media (95%) representan una gran variabilidad en cada grupo de datos. En el diagrama de cajas cabe destacar que existen valores atípicos para todos los grupos excepto para la dieta de pienso.

Tasa De Regeneración Tisular ($\text{mm}^2/\text{día}$)

Dieta	N	Media	IC (95%)		Desv.tip.	Mínimo	Máximo
			Inf.	Sup.			
Artemia	16	0.87	0.48	1.26	0.73	0.13	2.87
Caballa	16	0.27	0.06	0.48	0.40	0	1.35
Mejillón	17	0.44	0.17	0.71	0.52	-0.30	1.80
Pienso	17	0.17	0.07	0.27	0.19	0	0.63

Tabla 3: Valores descriptivos de la Tasa Regeneración Tisular ($\text{mm}^2/\text{día}$) según el tipo de dieta. Se muestra el recuento total de pólipos para cada tipo de dieta (N), el intervalo de confianza para la media IC (95%) con sus límites inferior y superior, la desviación típica y los valores máximos y mínimos.

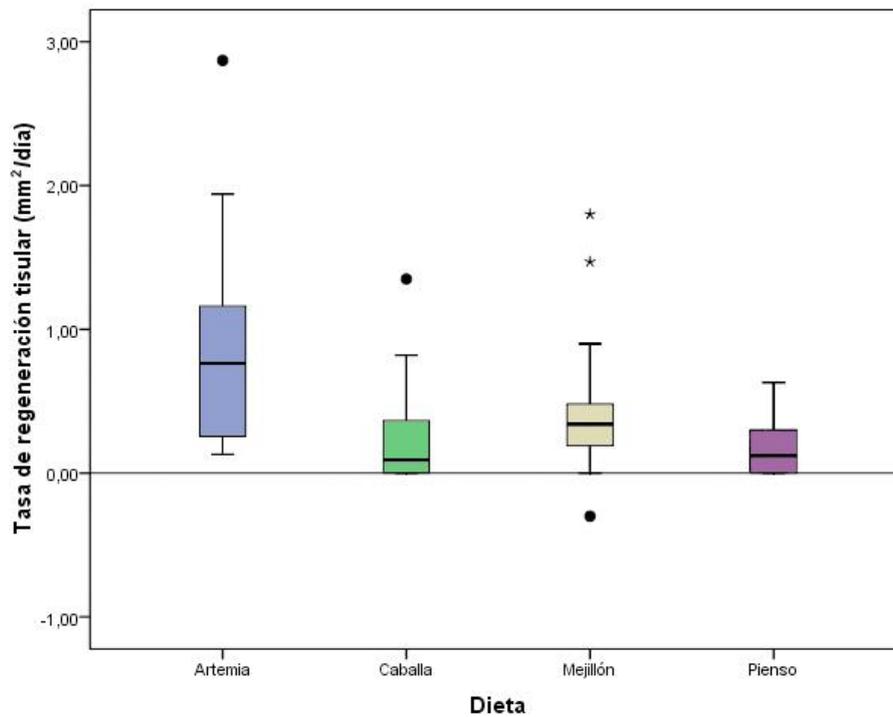


Figura 6: Diagrama de cajas de la Tasa De Regeneración Tisular ($\text{mm}^2/\text{día}$) según el tipo de dieta

El test de Kruskal-Wallis arrojó un p-valor de 0.001. Por tanto, se rechazó la hipótesis nula y se demostró, aceptando la hipótesis alternativa, que la dieta tiene un efecto significativo en la distribución de la Tasa de Regeneración Tisular entre los grupos.

p-valor	Artemia	Caballa	Mejillón	Pienso
Artemia				
Caballa	0.004**			
Mejillón	0.074	0.108		
Pienso	<0.001**	0.925	0.052	

Tabla 4: Resultado de los test de la U de Mann-Whitney entre cada tipo de dieta. Los datos indican el p-valor obtenido en el test. (**) significativo para $\alpha=0.01$.

En la Tabla 4 se muestran los resultados de los test de la U de Mann-Whitney, observándose que existen diferencias significativas entre la dieta de Artemia y de Pienso ($p<0.001$) y entre la dieta de Artemia y de Caballa ($p=0.004$). Por otro lado, no se observan diferencias significativas entre el resto de los grupos.

4.3 Evolución de la regeneración tisular según el tipo de dieta

En la gráfica de la Figura 7 se representa el proceso de regeneración de la superficie en cada tratamiento a lo largo del tiempo del estudio. Nótese que la pendiente de cada línea se corresponde con la Tasa de Regeneración Tisular para ese periodo de tiempo.

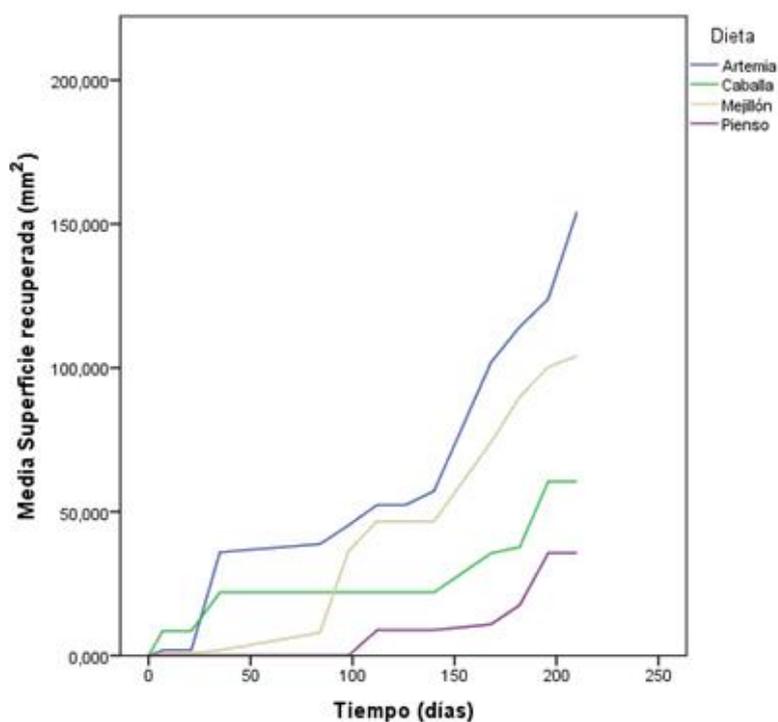


Figura 7: Evolución de la media de la superficie recuperada (mm^2) a lo largo del tiempo (días) según el tipo de dieta. Las líneas representan la media de la superficie recuperada de cada dieta para cada momento de medición del estudio.

En primer lugar, cabe destacar que la dieta de Artemia es la que permitió una mayor superficie regenerada que el resto de dietas a partir de los 30 días del estudio. Sin embargo a la dieta del Mejillón, pese a ser la segunda con mayor superficie regenerada, le supuso más tiempo comenzar a regenerar su superficie hasta que, a partir de los 80 días, este proceso se acelera.

Por otro lado, la dieta de Caballa es la primera en mostrar resultados de la regeneración tisular. Sin embargo, durante aproximadamente 110 días, no se observaron signos de regeneración. Posteriormente, se experimentó una cierta regeneración y al final del estudio no se observaron nuevos cambios en la superficie regenerada.

Finalmente, el tratamiento con la dieta de Pienso no mostró ningún signo de regeneración tisular hasta los 110 días del experimento y la cantidad de superficie regenerada fue la menor entre todas las dietas durante todo el estudio.

4.4 Seguimiento fotográfico

El seguimiento fotográfico de cada colonia se compuso de 11 imágenes que abarcaban un periodo total de 178 días (desde el día 29 al 207 del estudio). En las Figuras 8 y 9, se muestran cinco imágenes obtenidas de cada colonia durante los días 29, 80, 123, 179 y 207 del estudio. Las flechas muestran la regeneración de tejido vivo y cómo este va recubriendo ciertas partes del esqueleto.

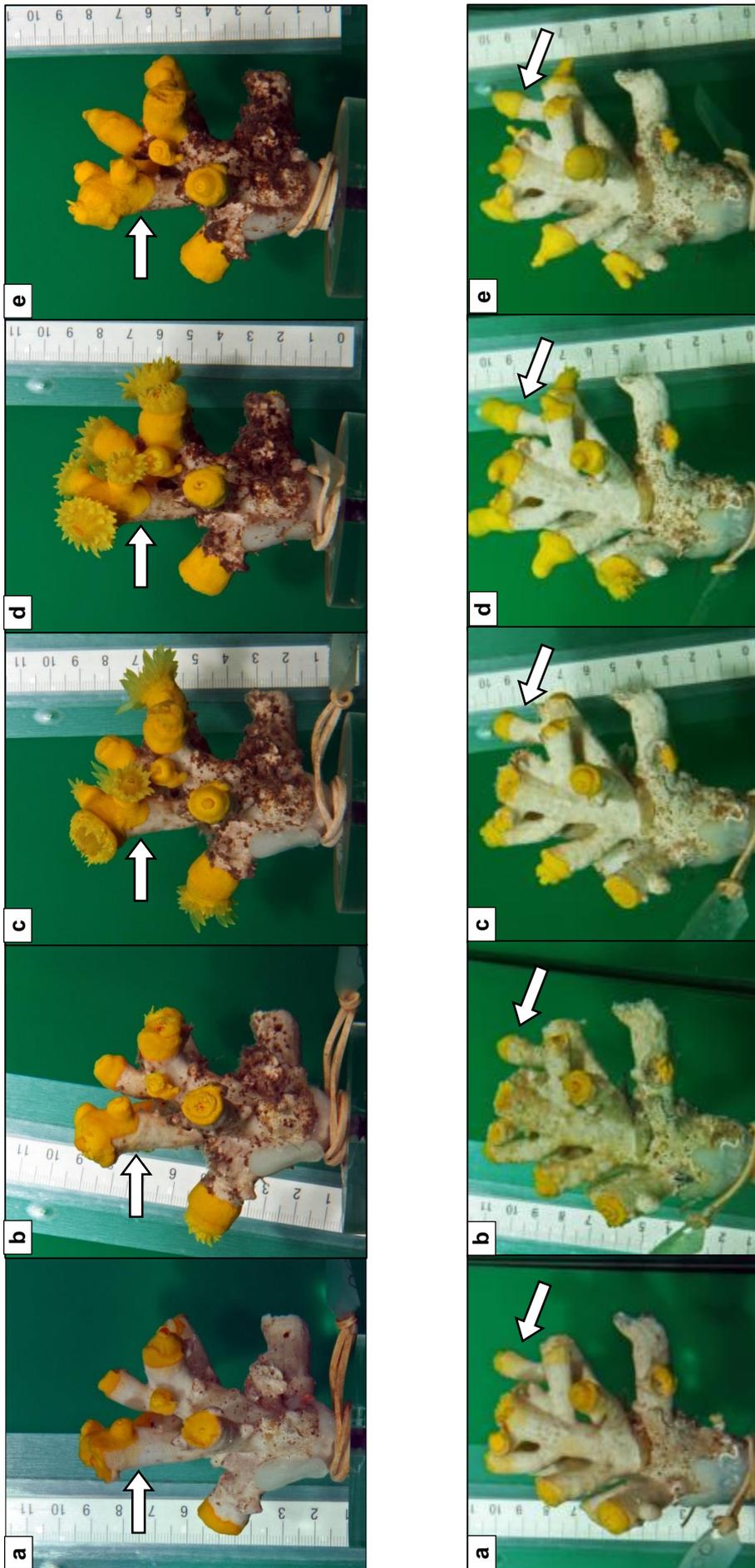


Figura 8: Colonias sometidas a la dieta de Artemia (fila superior) y Caballa (fila inferior) durante los días 29 (a), 80 (b), 123 (c), 179(d) y 207(e) del estudio.

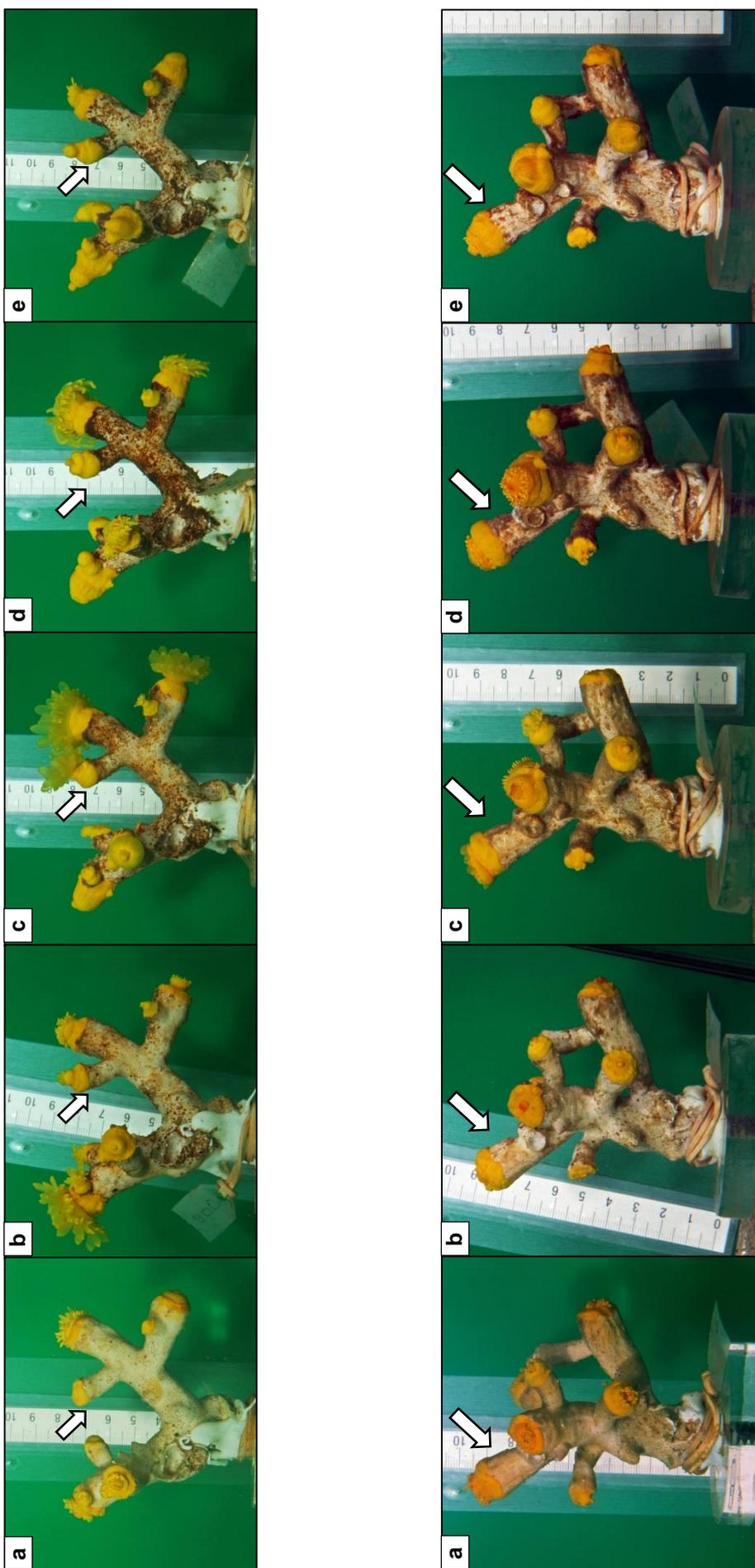


Figura 9: Colonias sometidas a la dieta de Mejillón (fila superior) y Piense (fila inferior) durante los días 29 (a), 80 (b), 123 (c), 179(d) y 207(e) del estudio.

5 Discusión

La puesta en marcha de la instalación acuariológica, así como la preparación del material biológico para su manejo y el protocolo de alimentación llevado a cabo en este trabajo suponen un acercamiento a las técnicas que pueden ser empleadas para la recuperación de corales de agua fría en ambientes controlados.

En este estudio se demostró que el tipo de dieta ejerce un efecto significativo sobre la Tasa de Regeneración Tisular ($p=0.001$). Estos resultados corroboran el hecho de que, en corales ahermatípicos, la alimentación es la vía principal para cubrir la demanda energética de los procesos vitales tales como la regeneración tisular (Naumann *et al.*, 2011).

La dieta formada por *Artemia salina* adulta congelada fue la que obtuvo valores superiores y significativamente diferentes a las dietas de a base de caballa y de pienso. En la dieta a base de mejillón no se observaron diferencias significativas con ninguna de las dietas.

Por otro lado, analizando la evolución de la regeneración de tejido vivo, se observa que la dieta a base de mejillón es el segundo tipo de dieta en ofrecer mejores resultados, una vez pasados los primeros meses (80 días). Por lo tanto, a pesar de no observarse diferencias significativas entre las dietas basadas en mejillón y *Artemia salina* adulta congelada, esta última ofrece mejores valores a corto plazo ya que el proceso de regeneración tisular es más rápido.

Gracias al seguimiento fotográfico que se realizó en este estudio, se dispone un apoyo visual de la capacidad de regeneración tisular y facilita la comparación de este proceso entre colonias sometidas a diferentes tipos de dieta.

El estudio realizado muestra la capacidad de regeneración tisular de *D. cornigera* según el tipo de dieta. Ya que los resultados obtenidos en este trabajo están limitados por la cantidad de material biológico disponible, así como de la duración del mismo, sería interesante, para aumentar su representatividad, realizar un estudio con una mayor cantidad de material biológico.

Del mismo modo, sería de interés un estudio durante un periodo de tiempo más largo. De esta manera, se podría estudiar con más detalle la evolución de la superficie regenerada y analizar el proceso de regeneración tisular experimentada en cada pólipo hasta su completa regeneración.

Este trabajo es el primero en el que se analiza la capacidad de regeneración tisular de *Dendrophyllia cornigera* y en el que se estudia el efecto de la dieta en este proceso. Otros estudios han analizado esta capacidad en corales pertenecientes a aguas tropicales (Kramarsky-Winter y Loya, 2010; Horwitz y Fine, 2014; Meesters *et al.*, 1997; Bak y Steward-Van, 1980), por lo que sería de gran interés realizar una comparación de la capacidad de regeneración tisular entre corales de agua fría y corales tropicales. Por otro lado, Naumann *et al.* (2013) y Gori *et al.* (2014) demostraron el aumento en el crecimiento y metabolismo que experimentaba *D. cornigera* en temperaturas cercanas a su umbral térmico superior (16°C). Es por ello que sería interesante un futuro análisis del efecto de la temperatura en la capacidad de regeneración tisular en *D. cornigera*.

Por último, para tener un conocimiento más amplio sobre la preferencia en la dieta de esta especie y poderlo aplicar a las técnicas de recuperación de ejemplares de la misma, este trabajo se podría ampliar ensayando otros tipos de dieta y realizando un análisis exhaustivo sobre el contenido nutricional de cada una de ellas. Del mismo modo, sería interesante analizar el efecto de otros posibles factores en la alimentación como son el tamaño, forma o consistencia de la partícula.

6 Conclusiones

- Las técnicas utilizadas en este estudio para el mantenimiento, manejo y alimentación de *Dendrophyllia cornigera* han demostrado ser eficaces y suponen un acercamiento a los métodos que pueden ser empleados para la recuperación y establecimiento de corales de agua fría en ambientes controlados.
- El tipo de dieta afecta significativamente a la capacidad de regeneración tisular de esta especie, siendo las dietas compuestas de *Artemia salina* adulta congelada y mejillón las que ofrecen los mejores resultados. La primera dieta aparentemente ofrece una mayor regeneración tisular pese a no existir diferencias significativas entre las dos.
- Sería interesante un estudio sobre la capacidad de regeneración tisular más detallado sobre *Dendrophyllia cornigera* y otros corales de agua fría para tener un conocimiento más amplio sobre esta capacidad.

Bibliografía

- Allemand, D., Ferrier-Pagès, C., Furla, P., Houlbrèque, F., Puverel, S., Reynaud, S., Tambutté, É. & Zoccola, D. (2004). Biomineralisation in reef-building corals: from molecular mechanisms to environmental control. *Comptes Rendus Palevol*, 3(6), 453-467.
- Allemand, D., Tambutté, É., Zoccola, D. & Tambutté, S. (2011). Coral calcification, cells to reefs. In *Coral reefs: an ecosystem in transition* (pp. 119-150). Springer Netherlands.
- Bak, R. P., & Steward-Van Es, Y. (1980). Regeneration of superficial damage in the scleractinian corals *Agaricia agaricites*, *F. purpurea* and *Porites astreoides*. *Bulletin of Marine Science*, 30(4), 883-887.
- Barnes, R.D. (1990). *Zoología de los invertebrados*. Interamericana McGraw-Hill. México.
- Brusca, R. C., & Brusca, G. J. (1990). *Invertebrates* (Vol. 2). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Carlier, A., Le Guilloux, E., Olu, K., Sarrazin, J., Mastrototaro, F., Taviani, M. & Clavier, J. (2009). Trophic relationships in a deep Mediterranean cold-water coral bank (Santa Maria di Leuca, Ionian Sea). *Marine Ecology Progress Series*, 397, 125-137.
- Castric-Fey, A. (1996). Le scléactiniaire *Dendrophyllia cornigera* en eau peu profonde, à Ouessant (Bretagne, Atlantique NE) en l'absence de barrière thermique. *Oceanologica acta*, 19(6), 665-671.
- Davies, A. J., Duineveld, G. C., Lavaleye, M. S., Bergman, M. J., van Haren, H. & Roberts, J. M. (2009). Downwelling and deep-water bottom currents as food supply mechanisms to the cold-water coral *Lophelia pertusa* (Scleractinia) at the Mingulay Reef Complex. *Limnology and Oceanography*, 54(2), 620-629.
- Ferrier-Pagès, C., Witting, J., Tambutté, E. & Sebens, K. P. (2003). Effect of natural zooplankton feeding on the tissue and skeletal growth of the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. *Coral Reefs*, 22(3), 229-240.
- Freiwald, A. (2003). Reef-forming cold-water corals. In *Ocean margin systems* (pp. 365-385). Springer Berlin Heidelberg.

- Gori, A., Grover, R., Orejas, C., Sikorski, S. & Ferrier-Pagès, C. (2013). Uptake of dissolved free amino acids by four cold-water coral species from the Mediterranean Sea. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 99, 42-50.
- Gori, A., Reynaud, S., Orejas, C., Gili, J. M. & Ferrier-Pagès, C. (2014). Physiological performance of the cold-water coral *Dendrophyllia cornigera* reveals its preference for temperate environments. *Coral Reefs*, 33(3), 665-674.
- Hickman, C. P., Roberts, L. S. Keen. SL, Larson, S., l'Anson, H. & Eisenhour, D.J. (2008). *Integrated principles of zoology*.
- Horwitz, R. & Fine, M. (2014). High CO₂ detrimentally affects tissue regeneration of Red Sea corals. *Coral Reefs*, 33(3), 819-829.
- Kramarsky-Winter, E. & Loya, Y. (2000). Tissue regeneration in the coral *Fungia granulosa*: the effect of extrinsic and intrinsic factors. *Marine Biology*, 137(5-6), 867-873.
- Meesters, H. W. G., Noordeloos, M. & Bak, R. P. M. (1994). Damage and regeneration links to coral growth in the reef-building coral *Montastrea annularis*. *Marine Ecology-Progress Series*, (112), 119-128.
- Meesters, E. H., Pauchli, W. & Bak, R. P. M. (1997). Predicting regeneration of physical damage on a reef-building coral by regeneration capacity and lesion shape. *Oceanographic Literature Review*, 7(44), 728.
- Movilla, J., Orejas, C., Calvo, E., Gori, A., López-Sanz, À., Grinyó, J., Domínguez-Carrió, C. & Pelejero, C. (2014). Differential response of two Mediterranean cold-water coral species to ocean acidification. *Coral Reefs*, 33(3), 675-686.
- Naumann, M. S., Orejas, C. & Ferrier-Pagès, C. (2013). High thermal tolerance of two Mediterranean cold-water coral species maintained in aquaria. *Coral Reefs*, 32(3), 749-754.
- Naumann, M. S., Orejas, C., Wild, C. & Ferrier-Pagès, C. (2011). First evidence for zooplankton feeding sustaining key physiological processes in a scleractinian cold-water coral. *The Journal of experimental biology*, 214(21), 3570-3576.
- Seimert, W. (2010). Adobe Photoshop CS5. mitp/bhv.

Vidal-Dupiol, J., Adjeroud, M., Roger, E., Foure, L., Duval, D., Mone, Y., Ferrier-Pagès, C., Tambutte, É., Tambutte, S., Zoccola, D., Allemand, D. & Mitta, G. (2009). Coral bleaching under thermal stress: putative involvement of host/symbiont recognition mechanisms. *BMC physiology*, 9(1), 14.

Zibrowius, H. (1980). Les Scléactiniaires de la Méditerranée et de l'Atlantique nord-oriental. *Mémoires de l'Institut océanographique, Monac.*