



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO PRELIMINAR DE LOS HONGOS MARINOS
ASOCIADOS A *Pacifigorgia* sp. DEL ARRECIFE DE
LAS ISLAS MARIETAS, BAHÍA DE BANDERAS,
NAYARIT, MÉXICO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

MARÍA CRISTINA MEDINA ORTIZ



DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARÍA DEL CARMEN AUXILIO GONZÁLEZ VILLASEÑOR

2005

m. 347875



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:
"Estudio preliminar de los hongos marinos asociados a Pacifigorgia sp.
del arrecife de las Islas Marietas, Bahía de Banderas, Nayarit, México".
realizado por Medina Ortiz María Cristina
con número de cuenta 09810515-7 , pasante de la carrera de Biología
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

- Director de Tesis
Propietario Dra. María del Carmen Auxilio González Villaseñor *María C. González*
- Propietario Dr. Teófilo Herrera Suárez *T. Herrera*
- Propietario Dr. Joaquín Cifuentes Blanco *J. Cifuentes*
- Suplente M. en C. Guadalupe Vidal Gaona *G. Vidal Gaona*
- Suplente Dr. Sigfrido Sierra Galván *Sigfrido Sierra Galván*

Consejo Departamental de Biología

[Signature]
M. en C. Juan Manuel Rodríguez-Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Dedicatoria

A Dios, por concederme la vida

A mis padres, por todo lo que me han dado

A mi hermano, por estar siempre conmigo

A mis abuelos, porque siempre los recuerdo

A toda mi familia

Agradecimientos

A Dios, a mi papá, a mi mamá, a mi hermano Arturo, a mis abuelos, a toda mi familia, primas, primos, tíos; gracias por el inmenso amor que me han brindado, sin ustedes no hubiera podido llegar hasta este punto de mi vida.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Dra. María del Carmen González por haberme introducido al mundo de los hongos y por toda su guía, consejos, confianza, paciencia e incondicional apoyo.

Al Dr. Teófilo Herrera, al Dr. Joaquín Cifuentes, a la M. en C. Lupita Vidal y al Dr. Sigfrido Sierra, por haberme apoyado en todo momento y por haber enriquecido este trabajo con todos sus consejos profesionales.

A todas y cada una de las personas que laboran en la Facultad de Ciencias y en el Instituto de Biología de la UNAM, gracias Allan, M. en C. Elvira, Victor, Sami, Lety, Silvia.

Al M. en C. Pedro Medina de la Universidad de Guadalajara.

Agradezco a la maestras Carmen Loyola y Berenit Mendoza por tomar gran parte de las fotografías con calidad profesional para ilustrar esta tesis.

Gracias a todos mis maestros y amigos de la primaria y secundaria por brindarme lo mejor de cada uno de ellos.

A todos mis profesores y amigos de la carrera y el taller: Biodiversidad en Hongos.

A todos y cada uno de mis amigos de la carrera por haber compartido conmigo momentos de alegría y tristeza que serán inolvidables.

Agradezco a cada persona que de manera directa o indirectamente hicieron posible la realización de este trabajo.

Resumen

En México, la micobiota asociada a los organismos arrecifales se encuentra poco estudiada, en particular, los hongos microscópicos asociados a corales. En fechas recientes se ha reportado a *Aspergillus sydowii* como agente causal de la aspergilosis en el octocoral *Gorgonia* sp. El único antecedente de México es el de Bruno *et al.* (2003) quienes reportaron una posible aspergilosis en *Gorgonia ventalina* y *G. flabellum* del arrecife Akumal en el mar Caribe. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo de tesis fue valorar de manera preliminar la abundancia de los hongos marinos asociados al octocoral *Pacifigorgia* sp., para lo cual se siguió el método de Morrison-Gardiner (2002) modificado. En la Cueva de la Burbuja del arrecife de las Islas Marietas situada al noroeste de Bahía de Banderas se tomó una muestra vía SCUBA compuesta por 6 submuestras del coral abanico de mar *Pacifigorgia* sp. y se transportaron al laboratorio a 4 °C. Como parte de la metodología se llevó a cabo un estricto control negativo y positivo. En el laboratorio, dichas submuestras se cortaron en pedazos de 0.5 cm² y se desinfectaron superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 0.06% y agua de mar artificial estéril. Después, cinco cajas de Petri con medio de cultivo harina de maíz agua de mar con una mezcla de antibióticos, se inocularon con 4 pedazos del tejido del coral de cada submuestra. Las cajas se incubaron durante 25 días y todos los hongos que crecieron se aislaron e identificaron. Se obtuvieron 12 aislamientos: un ascomicete, 10 anamorfos y uno no determinado que formó solamente micelio estéril septado. Los géneros que se registraron son: *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Emericella*, *Epicoccum* y *Penicillium*. Los hongos dominantes pertenecen al género *Aspergillus* con 4 especies y un teleomorfo. *A. japonicus*, *A. ochraceus*, *A. terreus*, *A. versicolor* y *Emericella* sp. En este estudio *A. versicolor* y *Emericella* sp. se aislaron del tejido necrosado de coral. Las especies restantes se aislaron del tejido aparentemente sano. Este trabajo es la primera contribución al conocimiento de la biodiversidad de los hongos microscópicos asociados a los corales de los arrecifes de México.

Contenido

Pág.

	Dedicatoria	
	Agradecimientos	
	Resumen	
	Contenido	
1	Introducción	1
	1.1 Formulación del problema	1
	1.2 Objetivo de la investigación	3
	1.3 Justificación de la investigación	3
2	Antecedentes	6
	2.1 Antecedentes históricos	6
	2.2 Hongos marinos de corales	7
	2.3 Aspergilosis de corales	13
	2.4 Importancia de las comunidades arrecifales	17
3	Materiales y Métodos	19
	3.1 Descripción del área de estudio	19
	3.2 Realización del muestreo	22
	3.3 Procesamiento de las submuestras en el laboratorio	25
	3.4 Aislamiento, identificación y conservación de los hongos	26
	3.5 Análisis de los datos	33
4	Resultados	36
	4.1 Abundancia de la microbiota asociada a <i>Pacifigorgia</i> sp.	36
	4.2 Resultados de los controles	36
	4.3 Descripción e ilustración de los hongos	40
5	Discusión	62
	5.1 Microbiota asociada a <i>Pacifigorgia</i> sp.	62
	5.2 Controles de la investigación	67
6	Conclusiones	68
7	Literatura citada	70
	Apéndices	77

1 Introducción

1.1 Formulación del problema

Los hongos son un grupo de organismos que se encuentra muy diversificado en la Tierra. No sólo han sido capaces de invadir ambientes aéreos y terrestres, sino que, incluso los podemos encontrar en el ambiente marino (Kohlmeyer y Kohlmeyer, 1979).

Se han dado varias definiciones de hongo marino y se basan principalmente en su habilidad para crecer en el agua del mar (Johnson y Sparrow, 1961). Hughes (1975) define a un hongo marino como aquel capaz de producir generaciones sucesivas a través de medios sexuales y asexuales en aguas oceánicas, estuarios o en sustratos intersticiales.

Un hongo marino no se puede definir con bases estrictamente fisiológicas por lo que se usa una definición ecológica; un hongo marino obligado es el que crece y esporula exclusivamente en un hábitat estuarino o marino; mientras que un hongo marino facultativo es aquel que proviene del agua dulce o de un ambiente terrestre y puede crecer (e incluso esporular) en el mar (Kohlmeyer, 1974). Estas definiciones son las que se aceptan más ampliamente (Hyde *et al.*, 2000).

La mayoría de los hongos que se encuentran en ambientes marinos son microscópicos, esto se debe quizá a su adaptación a las condiciones del medio, por ejemplo la presión hidrostática (Kohlmeyer y Kohlmeyer, 1979).

Muchos de los hongos aislados de ambientes marinos, se consideran geohongos, es decir, hongos de origen terrestre que se han adaptado al medio marino. Dichos hongos son

frecuentemente aislados a partir de un amplio número de organismos marinos presentes tanto en localidades cercanas como alejadas de la costa (Morrison-Gardiner, 2002).

Los océanos, al contrario de los continentes, proveen ambientes estables con pocos cambios en cuanto a la temperatura y la salinidad. En el mar abierto, se encuentran principalmente levaduras u hongos inferiores asociados a organismos planctónicos o animales pelágicos y por ahora, no se han encontrado formas de vida libre. En las zonas litorales se concentran los sustratos orgánicos, tales como algas, plantas de pantano y animales que proporcionan nutrimentos a los hongos marinos (Kohlmeyer y Kohlmeyer, 1979).

Se encuentran registrados formalmente 444 especies de hongos marinos y muchas más faltan por ser descubiertas y descritas. El número anterior incluye 360 especies de ascomicetes pertenecientes a 177 géneros; 10 especies en 7 géneros pertenecientes a los basidiomicetes y 74 especies en 51 géneros pertenecientes a los hongos mitospóricos. El grupo de hongos más común es el de los ascomicetes, y representan el 81% de todos los hongos marinos. Aproximadamente las 444 especies de hongos filamentosos se consideran obligadas o facultativas capaces de crecer y reproducirse en aguas salinas o salobres (Hyde *et al.*, 2000).

Kohlmeyer y Volkmann-Kohlmeyer (1991) registraron 161 géneros de hongos marinos obligados, con un total de 321 especies. Durante una década posterior, 74 géneros más se han descrito con 123 nuevas especies (Hyde *et al.*, 2000).

El número de especies marinas descritas hasta el momento resulta extremadamente bajo si lo comparamos con las especies terrestres y cabe señalar que su área de distribución es de tres cuartas partes del mundo (Kohlmeyer y Kohlmeyer, 1979).

Al comparar las cifras de las especies terrestres con las especies marinas que se han descrito, es obvio que estas últimas han recibido menor atención.

Con respecto a los hongos marinos de los arrecifes, se conoce poco a nivel mundial a pesar de las diversas funciones ecológicas que desarrollan los hongos en ese ambiente. En México, únicamente existe un trabajo relacionado con el tema llevado a cabo en el litoral del Caribe por Bruno *et al.*, (2003).

Por lo que, la presente investigación es una contribución preliminar al estudio de la biodiversidad de los hongos marinos asociados a los corales de los arrecifes del litoral del Pacífico mexicano y como consecuencia, también representa una importante adición al conocimiento de los hongos marinos de las comunidades arrecifales del mundo. Con este trabajo se establece en México el inicio del estudio de los hongos asociados a los corales.

1.2 Objetivo de la investigación

Valorar la abundancia de los hongos marinos microscópicos asociados a *Pacifigorgia* sp. del arrecife de las Islas Marietas, Bahía de Banderas, estado de Nayarit, México, mediante la aplicación del método empleado por Morrison-Gardiner (2002) modificado, para conocer la biodiversidad de los hongos que habitan en dicho arrecife.

1.3 Justificación de la investigación

La micodiversidad de México ha sido poco estudiada; probablemente existen 200 000 especies de hongos pero sólo 6 710 han sido descritas, de éstas, 4 800 son macromicetes y 1 910 son micromicetes (Guzmán, 1998). En el caso de la distribución de hongos marinos

en costas mexicanas se conoce poco. Las primeras colecciones de hongos marinos de México fueron hechas por Kohlmeyer (1968) y son más escasas. En los siguientes años se ha ido recopilando información para nuestro país (González *et al.*, 2001).

Los países mejor estudiados en cuanto a micobiota marina son Belice, Dinamarca, Japón, Malasia, y EUA (González *et al.*, 2001), por lo que con esta investigación se contribuirá al conocimiento de la micobiota marina de México y en especial de los hongos encontrados en los corales. El trabajo está enfocado al estudio de los hongos marinos en los corales, debido a que el ambiente marino, especialmente ambientes de arrecifes coralinos, ofrecen una gran cantidad de nichos únicos y además, ofrecen oportunidades para explorar y descubrir nuevos microorganismos y conocer el papel ecológico que juegan en ese ambiente; además de que los arrecifes coralinos son los ecosistemas que en mayor medida contribuyen a los procesos oceánicos y de las costas subtropicales y tropicales (Santavy, 1995). Asimismo, estos ecosistemas se encuentran entre los hábitats tropicales más diversos y menos estudiados por los micólogos marinos, dentro de esta biodiversidad se encuentran los organismos microscópicos como los hongos, los cuales son importantes en procesos de sucesión, además de que interactúan con la mayoría de los organismos de la comunidad arrecifal, por ejemplo con los corales, por lo que los resultados de este estudio permitirá ampliar los listados o inventarios fúngicos de México (Kohlmeyer y Volkmann-Kohlmeyer, 1987).

En México se desconoce en su mayor parte la micobiota de las zonas costeras del Océano Pacífico, el Golfo de México y el mar Caribe. Por esta otra razón, se considera que es necesario continuar y profundizar en su estudio para contribuir al conocimiento y conservación de la diversidad fúngica marina de México. Además, a partir de estudios taxonómicos se pueden proponer estrategias de conservación ya que los hongos forman

asociaciones simbióticas con diversos organismos marinos porque tienen una gran importancia en las cadenas tróficas y son elementos clave en el mantenimiento del ecosistema marino.

En décadas recientes, más del 20 % de los arrecifes se ha perdido, y entre el 10 y 20 % podría perderse dentro de unos 20 años, debido al impacto del desarrollo costero, la pesca excesiva, la contaminación, presencia de enfermedades y el calentamiento global; por lo que es importante estudiar los sistemas arrecifales debido a que albergan a más de 1000 especies de corales y millones de organismos (Anónimo, 2003).

Finalmente, los corales son organismos que potencialmente son recurso de numerosos productos farmacéuticos que van desde medicamentos hasta cremas para la piel; además, millones de personas se benefician de las actividades turísticas y pesqueras alrededor de los arrecifes coralinos (Anónimo, 2003).

Esta investigación es preliminar y los resultados servirán para poder elaborar un proyecto más amplio y definido en otros arrecifes de México.

2 Antecedentes

2.1 Antecedentes históricos

A pesar de que la micología marina se ha desarrollado recientemente como un campo especializado, la existencia de los hongos en hábitats marinos se conoce desde tiempos remotos (Hyde *et al.*, 2000). El conocimiento de los hongos marinos se remonta al año de 1840, y durante esta época su estudio fue esporádico y casi sin interés (Kohlmeyer y Kohlmeyer, 1979). En 1859, Westendorp describió la especie *Sphaeria albopunctata* (= *Leptosphaeria albopunctata*) que es el primer registro de un hongo del ambiente marino. Dicha especie y otras más de *Leptosphaeria* se reportaron de colecciones de cúmulos de plantas de partes bajas de los litorales por J.B. Ellis y Everhart (Johnson y Sparrow, 1961). En 1860, Kölliker publicó un artículo acerca de los “parásitos vegetativos” sobre depósitos calcáreos o silíceos de invertebrados marinos tales como esponjas, corales, bivalvos, gasterópodos, braquiópodos, anélidos y cirrópodos. Kölliker concluyó que los túbulos filamentosos que encontró eran de hongos unicelulares. (Johnson y Sparrow, 1961). Posteriormente, Durieu y Montagne en 1869 descubrieron el primer hongo marino obligado en los rizomas de los pastos marinos, *Posidonia oceanica* (Kohlmeyer y Kohlmeyer, 1979).

Se podría decir que el auge de la micología marina empezó con la publicación de Barghoorn y Linder (1944) titulada “Marine fungi: their taxonomy and biology”. Estos autores confirmaron que existían hongos marinos autóctonos al demostrar su crecimiento y reproducción en madera o sustratos sumergidos en el mar después de períodos definidos de tiempo. Otros estudios posteriores de Barghoorn, Linder y otros autores demostraron sin

ninguna duda la existencia de los hongos en estos ambientes, incluyendo los ascomicetes, que contribuyen a la descomposición de sustratos orgánicos en los océanos (Kohlmeyer y Kohlmeyer, 1979).

2.2 Hongos marinos de corales

Los hongos marinos generalmente se encuentran asociados con otros organismos tales como, algas, plantas acuáticas, animales como esponjas, nemátodos, moluscos o corales. En el ambiente marino, se pueden encontrar en diferentes sustratos y hábitats, por ejemplo, desde la arena de la playa, superficie del agua y espuma, hasta aguas muy profundas. Su distribución está limitada principalmente por la cantidad de oxígeno disuelto, la temperatura y en menor grado por la salinidad del agua (Kohlmeyer y Kohlmeyer, 1979). El ambiente marino está caracterizado por poseer varios parámetros diferentes tanto físicos, químicos y biológicos, en comparación con ambientes dulceacuícolas y terrestres (Santavy, 1995).

La presencia regular de hongos en los arrecifes coralinos se descubrió en fechas recientes (Kohlmeyer y Volkmann-Kohlmeyer 1987, 1988, 1989, 1990, 1992).

El carbonato de calcio que producen las plantas marinas y animales se deposita en grandes cantidades a lo largo de las costas y en los sedimentos de los océanos. La presencia de los hongos filamentosos en sustratos calcáreos sumergidos por lo general pasa inadvertida. Sin embargo, 22 especies de ascomicetes y hongos anamórficos han sido reportados de sustratos de CaCO_3 en hábitats marinos; principalmente en los trópicos (Kohlmeyer y Volkmann-Kohlmeyer, 1992).

Kendrick *et al.* (1982) investigaron los hongos que habitan en el interior de corales hermatípicos o pétreos con el fin de identificar a aquellos que se encuentran involucrados en la bioerosión. Las especies de corales que estudiaron fueron: *Acropora hyacinthus*, *Acropora palifera*, *Acropora palmata*, *Diploastrea heliopora*, *Diploria labyrinthiformis*, *Goniastrea australensis*, *Goniastrea retiformis*, *Meandrina meandrites*, *Millepora complanata*, *Montastraea annularis*, *Montastraea cavernosa*, *Porites australensis*, *Porites porites*, *Stylophora pistillata*. Estos autores citan 18 especies pertenecientes a géneros terrestres tales como *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Penicillium*.

La fertilidad del ecosistema es dependiente de la actividad microbiana (Moore y de Ruiter, 1991) y por lo tanto, los hongos filamentosos probablemente juegan un papel importante en la conversión heterotrófica de la biomasa del arrecife en nutrientes (Morrison-Gardiner, 2002). La mayoría de los taxa marinos han sido identificados de manglares, arena de la playa, madera flotante, conchas de moluscos o como patógenos de organismos marinos con valor económico (Hyde, 1996). Los hongos marinos son generalmente colocados dentro de los siguientes grupos: manglicolas, aquellos que se encuentran en un ambiente de manglar; arenícolas, que son hongos asociados a los granos de arena; lignícolas, aquellos que se encuentran sobre la madera; caulícolas, que son aquellos que crecen dentro o sobre los tallos herbáceos; foliícolas, hongos que crecen en hojas, algícolas, aquellos que viven asociadas a algas marinas (Hughes, 1975; Hyde, 1989).

Las investigaciones acerca de los hongos asociados a los arrecifes coralinos se han enfocado principalmente a estudios de enfermedades en corales abanicos de mar (Gorgoniidae) o gorgónidos (Smith *et al.*, 1996; Geiser *et al.*, 1998), y sus síntomas en varios organismos hospederos, usualmente en la forma de necrosis del tejido o biomineralización (Rand *et al.*, 2000), y a organismos con valor económico, especialmente

especies de crustáceos de cultivo, peces y algunas algas (Morrison-Gardiner, 2002). Se ha observado por ejemplo, que los hongos que habitan en el esqueleto de *Porites lobata*, causan la descomposición del denso material esquelético (Le Campion-Alsumard *et al.*, 1995); otros estudios se enfocan a hongos asociados con pepinos de mar (Afiyatulloev *et al.*, 2000; Pivkin, 2000) y esponjas (Höller *et al.*, 2000). En total, únicamente 22 especies de ascomicetes y hongos mitospóricos han sido identificados de origen tropical, en asociación con esponjas costrosas, algas coralinas, fragmentos de coral, moluscos y percebes (Kohlmeyer y Volkmann-Kohlmeyer, 1992). Los estudios de la biodiversidad de hongos marinos, así como estudios sobre las interacciones fúngicas con los organismos de arrecife son más limitados (Morrison-Gardiner, 2002).

Los reportes de taxa fúngicos en un contexto ecológico de ambientes marinos (hongos marinos coralícolas estrictos) son raros. Cinco especies de *Koralionastes* están restringidas a los corales y viven en asociación con esponjas costrosas; 3 especies de *Lulworthia* se encuentran en algas coralinas o en corales y 3 ascomicetes están asociados a las conchas de los moluscos y a los percebes y corales (Kohlmeyer y Volkmann-Kohlmeyer, 1992). A pesar de que se han hecho varios esfuerzos por aislar hongos nativos de hábitat coralinos, sólo se han descrito los siguientes ascomicetes coralícolas:

- (1) *Corallicola nana* Volkm.-Kohlm. & Kohlm. (Fig. 1), descrito únicamente para Belice. Los ascomas se encuentran unidos a trozos de coral muerto y puede estar asociado con esponjas costrosas (Volkmann-Kohlmeyer y Kohlmeyer, 1992).

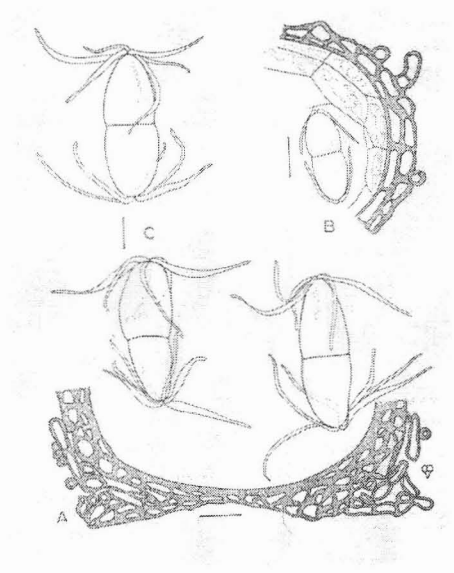


Fig.1. *Corallicola nana*. (A) sección longitudinal del peritecio que muestra la parte basal de la pared y el subículo; (B) sección longitudinal de la parte lateral del peritecio con el pseudoparénquima; (C) ascosporas (Volkman-Kohlmeyer y Kohlmeyer, 1992).

(2) *Halographis runica* Kohlm. & Volkman-Kohlm. (Fig. 2), es un liquenoide endolítico de los corales y conchas de caracoles, esta especie ha sido reportada para Australia (Queensland) y Belice (Kohlmeyer y Volkman-Kohlmeyer, 1988, 1992).

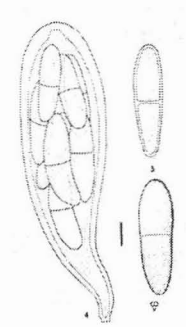


Fig.2. *Halographis runica* a la izquierda se muestra el asca, a la derecha las ascosporas (Kohlmeyer y Volkman-Kohlmeyer, 1988).

(3) Cinco especies de *Koralionastes* viven adheridas a trozos de coral en aguas poco profundas y asociadas con esponjas costrosas. *K. angustus* Kohlm. & Volkm.-Kohlm. y *K. giganteus* Kohlm. & Volkm.-Kohlm han sido reportadas únicamente para Belice, *K. ellipticus* Kohlm. & Volkm.-Kohlm. y *K. ovalis* Kohlm. & Volkm.-Kohlm. (Fig. 3) se han descrito para Belice y Australia (Queensland); *K. violaceus* Kohlm. & Volkm.-Kohlm. ha sido reportada para Australia y las Islas Fiji (Kohlmeyer y Volkmann-Kohlmeyer, 1987, 1990, 1992).

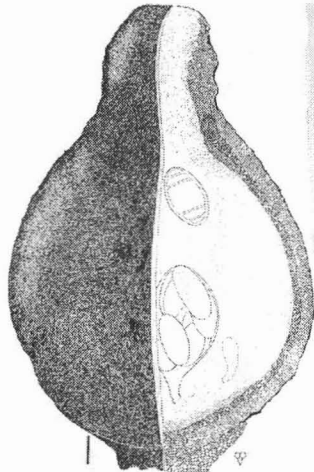


Fig.3. *Koralionastes ovalis*. Corte longitudinal del peritecio (Kohlmeyer y Volkmann-Kohlmeyer, 1987).

(4) *Lulworthia calcicola* Kohlm. & Volkm.-Kohlm. (Fig. 4) es otra especie que habita en los corales, ha sido descrita para Belice (Kohlmeyer y Volkmann-Kohlmeyer, 1989).

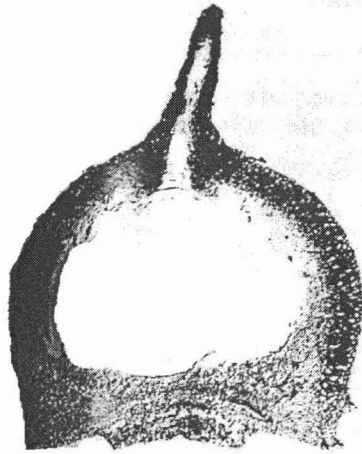


Fig.4. *Lulworthia calcicola*. Corte longitudinal del ascoma (Kohlmeyer y Volkmann-Kohlmeyer, 1989).

(5) *Xenus lithophylli* Kohlm. & Volkm.-Kohlm. (Fig. 5), es un parásito del alga calcificada *Lithophyllum* sp., el hongo vive unido a los corales. Es una especie presente en Belice (Kohlmeyer y Volkmann-Kohlmeyer, 1992).



Fig. 5. *Xenus lithophylli*. Hifas dentro de las células del hospedero (Kohlmeyer y Volkmann-Kohlmeyer 1992).

2.3 Aspergilosis de corales

Otro punto importante es que ciertos hongos pueden infectar el coral, por ejemplo, algunas especies de *Aspergillus*; su abundancia en hábitats marinos está bien documentada, especialmente en los arrecifes coralinos, pero no se conocen bien como agentes patógenos. Sin embargo, se sabe que *Aspergillus sydowii* es responsable de una destrucción masiva de corales (*Gorgonia* spp., especialmente, *G. ventalina* y *G. flabellum*) en el mar Caribe (Hawksworth, 2003).

Una especie del género *Aspergillus* es probablemente el agente causal de las infecciones epizooticas que provocaron una mortalidad en masa del abanico de mar durante 15 años en el Caribe. Se aislaron 4 cepas del hongo involucrado en estas infecciones que pertenecen a *Aspergillus sydowii*, un saprobio común, que se encuentra en ambientes marinos y terrestres (Geiser *et al.*, 1998). Al realizar pruebas de patogenicidad con aislamientos de *A. sydowii* que se tomaron del tejido muerto e infectado, al inocular el hongo en tejido sano causó nuevas infecciones a los abanicos de mar, mientras que aislamientos del hongo que se tomaron de partes sanas no lo hicieron (Geiser *et al.*, 1998).

Geiser *et al.* (1998) tomaron cuatro aislamientos fúngicos a partir de tejido muerto de *Gorgonia ventalina* en Saba, Trinidad, Los Cayos de Florida, y San Salvador, Bahamas. Sembraron los aislamientos en un medio de cultivo y analizaron los hongos morfológicamente y molecularmente secuenciando el ADN. La secuencia de la subunidad pequeña ribosomal 18s fue idéntica en los aislamientos analizados y fue muy similar a la secuencia de *Aspergillus fumigatus*. Los cuatro aislamientos mostraron características morfológicas típicas de *A. sydowii*, incluyendo la producción conspicua de conidiosporas equinuladas y un color azul-turquesa distintivo de la colonia (Geiser *et al.*, 1998).

Las infecciones que *A. sydowii* causa a los abanicos de mar se manifiestan por el desarrollo de tejido engrosado (tumores) y por pequeñas áreas o parches de menos de 1cm² donde el tejido se torna oscuro o púrpura, dichas lesiones están rodeadas de un halo oscuro (Nagelkerken *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1996; Kim y Harvell, 2002). Las causas de la enfermedad se desconocen pero se han propuesto algunos factores que probablemente favorecen la infección como mutaciones en el hongo causadas por contaminación, una reducción del sistema inmune de los corales, daño mecánico o traumas y por estrés como los cambios abruptos en la temperatura del agua. Por lo anterior, se deben estudiar a fondo las diferentes especies patógenas de *Aspergillus* porque es clara la gran importancia que tienen dichos hongos debido a que causan un decremento considerable de las diferentes especies de coral de los arrecifes (Hawksworth, 2003).

“Purpling” o la tinción color de púrpura de las lesiones es una respuesta general que aparece cuando un abanico de mar es infectado por *A. sydowii* o cuando el coral sufre estrés vía abrasión con un agente biótico como el caso del coral de fuego *Millepora alcicornis* (Alker *et al.*, 2001).

Los gorgónidos y los corales escleractinios poseen varios mecanismos de defensa, pero el tipo de respuesta inmune y su éxito varía dependiendo de la expresión de la colonias y de la especie (Mullen *et al.*, 2004). La actividad antifúngica es alta en los abanicos de mar y otros gorgónidos (Kim *et al.*, 2000a,b). En estos corales, los niveles de actividad antifúngica son altos en las partes adyacentes a las lesiones (Kim *et al.*, 2000a) y los niveles naturales suprimen el crecimiento de *A. sydowii* (Dube *et al.*, 2002). Alker *et al.* (2001) hipotetizaron que la coloración púrpura del tejido se relaciona con la respuesta de mecanización hacia la aspergilosis.

En el mar Caribe están apareciendo nuevas enfermedades que atacan varias especies de corales y están causando una gran mortalidad (Weil y Smith, 2003). Los mecanismos de resistencia directa al ataque fúngico y su impacto en la reproducción del coral se desconoce en su mayor parte (Petes *et al.*, 2003) sin embargo, se sabe que los patógenos que suprimen la reproducción tienen un efecto desproporcionado en la evolución de las características del hospedero (Endler, 1986; Altizer *et al.*, 2003). Por otro lado, el blanqueamiento del coral (“coral bleaching”) puede disminuir la fecundidad de las colonias si éstas no se recuperan rápidamente (Szmant y Gassman, 1990; Michalek-Wagner y Willis, 2001), pero aún no se tiene suficiente información acerca de los efectos de los patógenos sobre el potencial reproductivo de los coral (Petes *et al.*, 2003).

Las enfermedades pueden tener un mayor impacto en poblaciones y comunidades en ambientes tropicales marinos. Muchas enfermedades en el medio marino están influenciadas por factores ambientales, especialmente cambios en la temperatura. De esta manera, para poder predecir el impacto de una enfermedad, es importante examinar las interacciones hospedero-patógeno a través de un rango de condiciones ambientales en donde se encuentran (Alker *et al.*, 2001). Descubrimientos recientes indican que el incremento de nutrientes del agua (nitrógeno inorgánico y fósforo) por mínimo que sea, debido a una gran variedad de actividades humanas puede incrementar considerablemente la severidad de la enfermedad como en el caso de *Gorgonia ventalina* y la enfermedad de la banda amarilla “yellow band disease” en el coral *Montastraea* spp. (Bruno *et al.*, 2003).

Como el agente causante de la aspergilosis es el complejo género *Aspergillus* y debido a que se obtuvieron varias especies en este trabajo, se consideró pertinente llevar a cabo una revisión bibliográfica del género, la cual se expone a continuación.

En 1729, P. A. Micheli, un micólogo florentino, describió por primera vez a *Aspergillus*, le dió ese nombre debido a que la estructura característica del género que lleva las esporas semeja un aspergilo, que es un instrumento usado por la iglesia católica para rociar agua bendita (Klich, 2002). *Aspergillus* viene del latín *aspergillo*, de *asper*, áspero, y *gillo*, vasija, vesícula, con el subfijo diminutivo *-illus*, refiriéndose a la vesícula de la cabezuela conidial, la cual está cubierta de fiálides y conidiosporas en casi toda su superficie, lo que le da un aspecto áspero (Ulloa y Herrera, 1994). Muchos miembros del género, degradan productos agrícolas, producen metabolitos tóxicos y causan enfermedades (Klich, 2002). *Aspergillus* es un género de hongos anamorfos que se reproduce por la producción de fialosporas (las fiálides producen las conidiosporas). Es un género muy extenso con más de 180 especies reconocidas (Pitt *et al.*, 2000). Muchas de estas especies son sumamente raras. Otras son muy comunes en diferentes ambientes. *Aspergillus* se caracteriza por su conidióforo, el cual es muy distintivo. La base del conidióforo usualmente forma una “T” o “L” y es en donde se conecta con la hifa vegetativa. Esta estructura es comúnmente llamada la célula pie, sin embargo, no es una célula por separado. El pie se extiende a partir de la célula pie y puede medir de largo hasta 50 μm o menos hasta varios milímetros. El ápice del pie se expande en una vesícula. Las vesículas pueden presentar formas muy características. En algunas especies las fiálides con conidiosporas surgen directamente de la vesícula. A esta forma se le denomina uniseriado. En otras especies, existe una segunda capa de células entre la vesícula y las fiálides. Estas células son llamadas métulas y a las especies con métulas se les denomina biseriadas. Un carácter sumamente importante que distingue a *Aspergillus* de otros géneros cercanos es que las fiálides y las métulas surgen simultáneamente en la vesícula (Klich, 2002).

Algunas especies también producen estados sexuales. Por definición, *Aspergillus* es un género asexual o anamorfo. La fase sexual o teleomórfica pertenece a ocho o más géneros (Klich, 2002). Para lidiar con las numerosas especies dentro del género, recientemente los investigadores los dividen en grupos o series basados en el color de las conidiosporas, forma y tamaño de la vesícula y presencia de una fase teleomórfica. Los grupos fueron formalmente cambiados a subgéneros y secciones por Gams *et al.* (1985) para concordar con el Código Botánico (Klich, 2002).

Las características macroscópicas importantes para la identificación son, el diámetro y color de la colonia, color del micelio, presencia de exudado, pigmentos solubles y la presencia de esclerocios o cleistotecios. Las características microscópicas importantes son, la seriación (uniseriado o biseriado), forma de la vesícula, tamaño y ornamentación de las conidiosporas, tamaño del pie, la presencia de células de Hülle, pared del cleistotecio y las ascosporas (Klich, 2002).

Para facilitar la identificación la Comisión Internacional en *Penicillium* y *Aspergillus* (ICPA), ha creado un juego de cultivos que demuestran las características más importantes de *Aspergillus*. El manual “*Aspergillus* Reference Cultures” esta disponible en internet en la página de ICPA (Klich, 2002).

2.4 Importancia de las comunidades arrecifales

Los arrecifes coralinos se distinguen por poseer una gran diversidad de especies y abundancia, dichos ambientes se comparan o son el equivalente a las selvas tropicales del ambiente terrestre (Santavy, 1995).

En los arrecifes coralinos un gran número de organismos forman asociaciones simbióticas, separación espacial para una repartición de los recursos o desarrollan otros mecanismos para incrementar la eficiencia en la utilización de los recursos escasos de aguas oligotrópicas. Lo anterior es muy evidente entre las poblaciones de invertebrados sésiles o inmóviles. Los microorganismos simbióticos asociados con poblaciones de invertebrados son esenciales para el mantenimiento del buen estado y la supervivencia de ambos organismos (Santavy, 1995).

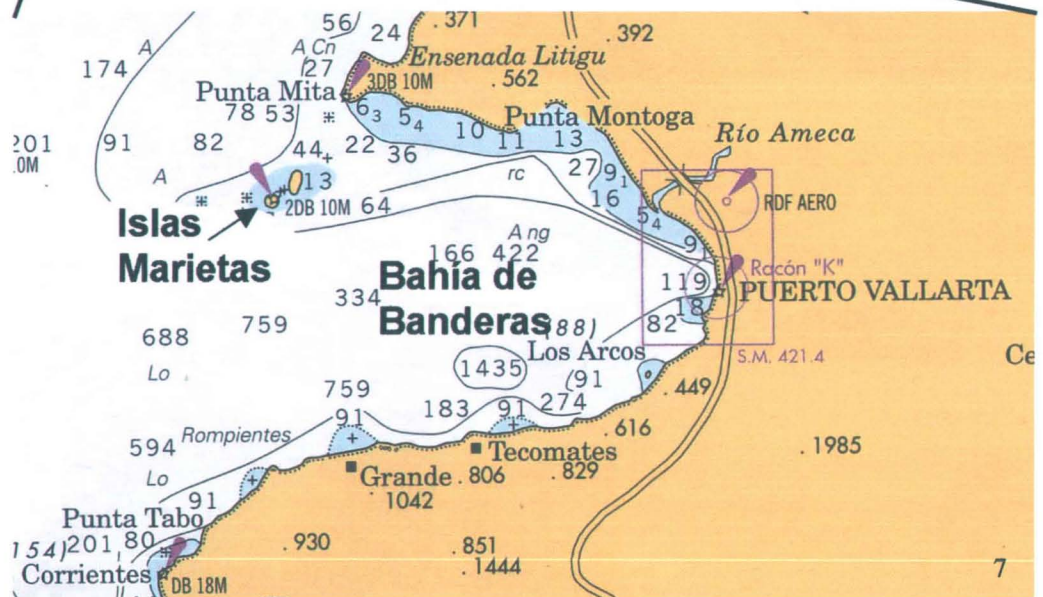
Los corales hermatípicos o pétreos, se conforman de la sustancia escleractina que es la que constituye la estructura arquitectónica de los arrecifes; estos corales proveen hábitats para muchos organismos a todos los niveles tróficos y constituyen uno de los ejemplos clásicos de simbiosis entre el coral (hospedero) y un alga dinoflagelada o zooxantela. En este caso se da un mutualismo obligado ya que el coral depende nutricionalmente del alga, y ésta recibe protección. Los microorganismos son fundamentalmente responsables del reciclaje de nutrimentos y de la salud de los arrecifes coralinos (Santavy, 1995).

3 Materiales y Métodos

3.1 Descripción del área de estudio

La zona que se eligió (Figs. 6-9) se ubica en la Bahía de Banderas que cuenta con 1 407 km² de superficie y es considerada como una de las grandes bahías del litoral centro-occidente del Pacífico mexicano. La bahía comprende la parte suroeste y noroeste de los estados de Nayarit y Jalisco respectivamente. Se ubica geográficamente entre los 20° 15' y 20° 47' de latitud N y los 105° 15' y 105° 42' de longitud O. Los límites morfológicos de este cuerpo costero son, Punta de Mita, Nayarit al norte y Cabo Corrientes, Jalisco al sur. Tiene como frontera cuatro sistemas montañosos: Sierra Vallejo al norte, Sierra El Cuale al este, Sierra El Tuito al sureste y Sierra Lagunilla al sur (Cupul-Magaña, 1998).

Las Islas Marietas son un conjunto de dos pequeñas islas y varios islotes localizados al noroeste de la bahía, aproximadamente a 10 km al SO de Punta de Mita. Cuentan con una superficie de 64 ha. La isla más cercana a tierra es conocida como Isla Redonda, situada a los 20° 42' N y 105° 35' O. Su superficie aproximada es de 28 ha, no tiene playas, presenta un escalón a los 20 pies de profundidad con fondo rocoso y algunos parches arenosos. A partir de ahí, la pendiente aumenta hasta llegar a los 100 pies, presentando un fondo constituido principalmente por arena. La isla Larga ubicada a 1.5 km hacia el oeste de la isla Redonda, se encuentra situada a los 20° 41' N y 105° 36' O. Mide poco más de 1 km de longitud y entre 600 a 700 m de ancho. Su contorno es muy irregular, con algunas áreas protegidas de oleaje y acantilados hasta de 25 m de altura (Cupul-Magaña *et al.*, 2000).



Figs. 6-9. Área de estudio. 6,7. Ubicación del área de estudio. 8,9. Islas Marietas.

Con lo que respecta a oceanografía, la Bahía de Banderas es atravesada por un largo cañón submarino que inicia aproximadamente desde Los Arcos, en el centro-oriente de la bahía y se extiende hacia el sur hasta terminar en una profundidad de 2 000 m en las afueras de Cabo Corrientes. Alcanza una profundidad de 1 754 m frente a Yelapa. La plataforma continental es muy inclinada y angosta en el sur de la bahía, pero se vuelve amplia y suave hacia el norte. La costa sur es rocosa, profunda y con acantilados muy pronunciados. Hacia el norte de la bahía, la costa se vuelve más arenosa y poco profunda, con amplias playas desde Bucerías hasta Punta de Mita (Cupul-Magaña *et al.*, 2000).

Las características fisiográficas de la bahía se reflejan en una estructura hidrográfica y oceanográfica compleja a nivel local y regional. La circulación oceánica en el área varía tanto estacional como anualmente, debido a que es el punto de convergencia de tres importantes sistemas de corrientes marinas: a) la Corriente de California que fluye hacia el sur, trayendo aguas frías y de baja salinidad hacia la región; b) la Corriente Costera de Costa Rica que fluye hacia el norte, trayendo aguas cálidas de salinidad intermedia y c) la masa de agua densa y cálida del Golfo de California, la cual es transportada hacia el sur dentro de esta región. Estas masas de agua convergen en esta región y se unen a la Corriente Nor-ecuatorial (Carriquiry y Reyes-Bonilla, 1997).

La temperatura promedio de la superficie del agua de mar en la bahía es de 26.4 °C, variando estacionalmente desde 23.3 °C en el mes de marzo hasta 30 °C en septiembre (De La Lanza y Cáceres, 1994). La temperatura superficial decrece rápidamente durante el invierno y primavera, algunas veces alcanzando hasta 20 °C, debido principalmente a la actividad de las surgencias en el sur de bahía provocada por los vientos del noroeste. Esta actividad causa que la termoclina verdadera, que normalmente se encuentra a profundidades de 40 m, sea llevada muy cerca de la superficie a profundidades de 20 m en

promedio. No obstante, las temperaturas que se presentan entre los 0 y 20 m de profundidad, son adecuadas para la supervivencia y desarrollo de corales en la región (Carriquiry y Reyes-Bonilla, 1997).

3.2 Realización del muestreo

El 5 de junio de 2004 se realizó un muestreo en el arrecife de las Islas Marietas, Bahía de Banderas, Nayarit, México, para lo cual se estableció un punto de muestreo al azar localizado en el Paredón o Cueva de la Burbuja de la Isla Redonda. Para la realización del muestreo se siguió el método Morrison-Gardiner (2002) modificado (Fig. 10). En el área de muestreo, se tomó una muestra compuesta por 6 submuestras del octocoral *Pacifigorgia* sp. y se colocaron en bolsas Ziploc® estériles. Las seis submuestras se transportaron en una hielera a 4° C aproximadamente y se procesaron antes de 2 horas (Figs. 11-14). Como parte del método, se realizó un control negativo y un control positivo. El control negativo demuestra la esterilidad del material y del proceso al no obtener crecimiento de ningún hongo al final del proceso. Para llevar a cabo el control, se preparó un tubo de cultivo con 10 mL de agua destilada estéril. En el lugar de muestreo el agua destilada estéril se vertió en una bolsa Ziploc® estéril con varios pedazos de papel filtro y se transportó en la misma hielera. El control positivo, demuestra que el método es efectivo al obtener solamente el hongo que se inoculó inicialmente, al final del proceso. Para llevar a cabo el control positivo, se preparó un tubo de cultivo con 10 mL de caldo de extracto de malta y se inoculó con *Aspergillus fumigatus* Fresen 1863. En el lugar de muestreo, el cultivo líquido de *A. fumigatus* se vertió sobre los pedazos de papel filtro contenidos en una bolsa Ziploc® estéril y se transportó en la hielera con las demás submuestras y el control negativo.

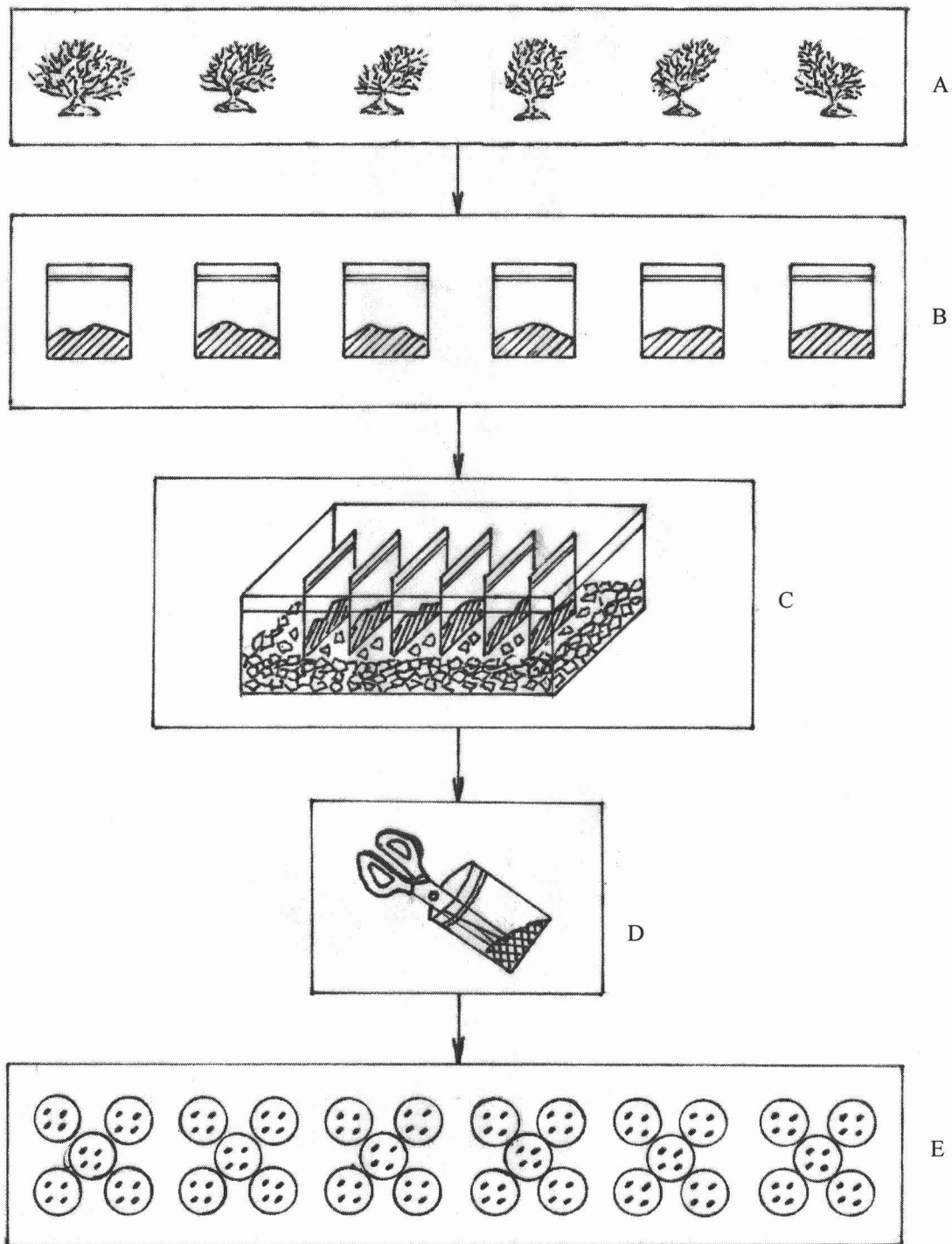
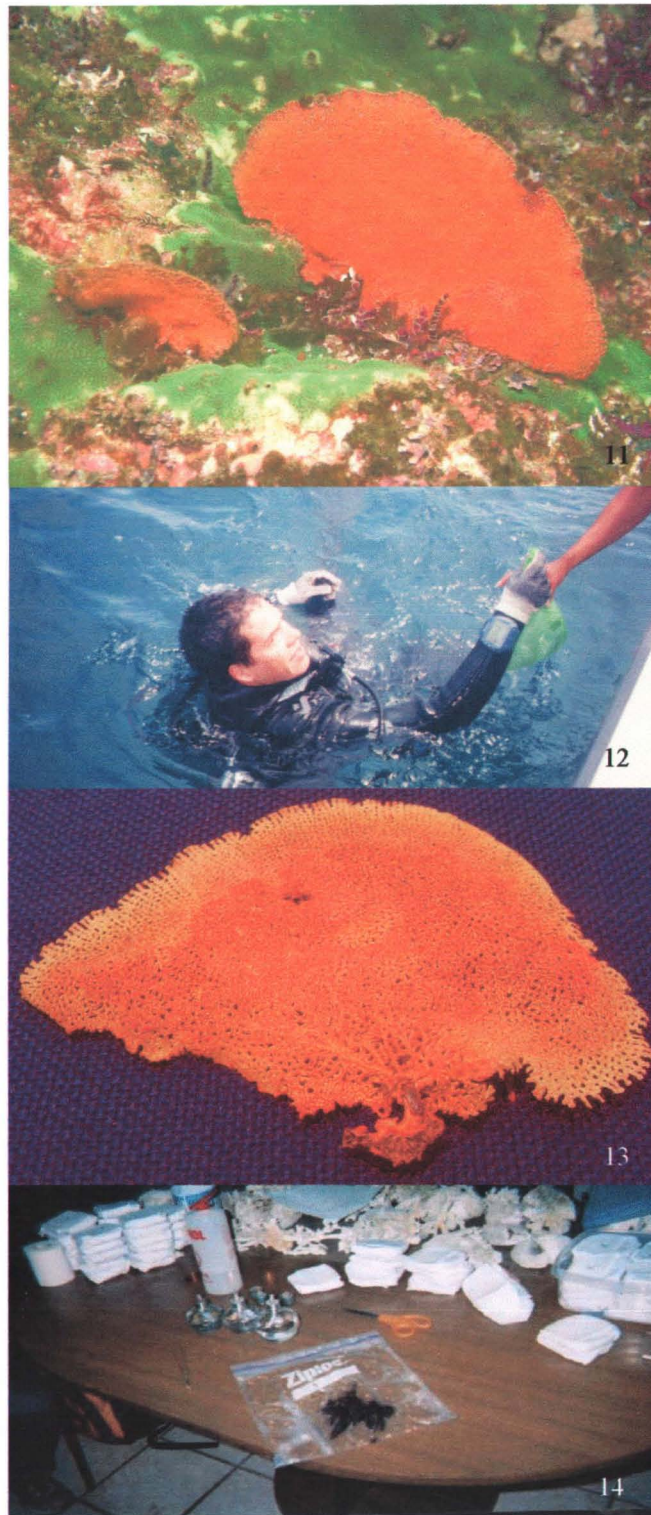


Fig. 10. Método de Morrison-Gardiner (2002) modificado. **A.** Submuestras de *Pacifigorgia* sp. **B.** Submuestras en bolsas Ziploc® estériles con cierre hermético. **C.** Transporte de submuestras a 4 °C aproximadamente. **D.** Corte de tejido del coral en pedazos de 0.5 cm². **E.** Cinco cajas de Petri con medio de cultivo HMA con antibióticos, inoculadas en la superficie con 4 pedazos del tejido del coral.



Figs. 11-14. Realización del muestreo y procesamiento de las submuestras en el laboratorio de la Universidad de Guadalajara. **11.** Foto submarina del arrecife de las Islas Marietas. **12.** Buzo sacando las submuestras. **13.** Colonia de *Pacifigorgia* sp. **14.** Material procesado siguiendo el método de Morrison-Gardiner (2002) modificado.

3.3 Procesamiento de las submuestras en el laboratorio

En el laboratorio, las seis submuestras de *Pacifigorgia* sp. se procesaron siguiendo el método Morrison-Gardiner (2002) modificado. Cada submuestra se cortó con tijeras flameadas y estériles. Se obtuvieron 120 pedazos muy pequeños (aproximadamente 0.5 cm²) del tejido del coral. Estos pedazos se desinfectaron superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 0.06% y agua de mar artificial estéril. Sobre la superficie de 5 cajas de Petri con medio de cultivo harina de maíz agar agua de mar (HMA) con antibióticos (estreptomomicina 0.6 mL, penicilina 1 mL y cloranfenicol 2.5 mL para medio litro) se colocaron 4 inóculos separados del tejido del coral y de la misma forma se procesaron las submuestras restantes.

Por lo que respecta a los controles, para el control negativo, se inocularon 4 pedazos de papel filtro embebido con agua destilada estéril en 5 cajas con medio de cultivo HMA y se incubaron a temperatura ambiente. Para el control positivo, de igual manera, se inocularon 20 pedazos de papel filtro con *A. fumigatus* en 5 cajas de HMA, 4 inóculos en cada caja.

Esta parte del trabajo se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de la Costa, Departamento de Ciencias, Puerto Vallarta, estado de Jalisco.

3.4 Aislamiento, identificación y conservación de los hongos

Las cajas inoculadas con el tejido del coral y las del control negativo y positivo, se incubaron durante 25 días a temperatura ambiente y se revisaron diariamente para localizar el crecimiento fúngico. Todas las colonias con diferente morfología se transfirieron a cajas de Petri con medio de cultivo jugo de ocho verduras agar (V8A) y se valoró su incidencia.

Una vez transferidos los diferentes hongos a las cajas de Petri con medio de cultivo V8A, se revisaron periódicamente para observar el crecimiento fúngico. En algunas cajas se observó el crecimiento de dos hongos por lo que se procedió a separarlos. Una vez separados todos los diferentes hongos, se pasaron a tubo con medio V8A. Una vez aislados en tubo todos los diferentes hongos, se agruparon con base a la morfología de la colonia (color, textura, velocidad de crecimiento), posteriormente se separaron con base en características morfológicas microscópicas de las estructuras reproductivas, se consultaron claves taxonómicas especializadas como Barnett y Hunter (1998) y se determinaron los diferentes géneros, se valoró su abundancia. Como parte de la metodología, también se llevó a cabo un muestreo del aire en el Laboratorio de Micromicetes C-121.

Una vez identificados los diferentes hongos aislados de *Pacifigorgia* sp. a nivel de género se procedió a la identificación a nivel de especie para lo cual se siguió una metodología específica que se explica a continuación.

Acremonium. Se sembró en cajas con extracto de malta agar (EMA) y se incubaron durante 10 días a 20 °C, transcurridos estos días se tomaron las características macroscópicas de la colonia y se fotografiaron. Se hicieron preparaciones en agua destilada, en azul de algodón en ácido láctico y en alcohol polivinílico para observar las estructuras reproductoras del hongo como conidióforo y conidiosporas; para fotografiar estas

estructuras se hicieron microcultivos en EMA. Se tomaron 25 mediciones de cada estructura y se siguió la clave de Domsch *et al.* (1993).

Alternaria. Se sembró en cajas con EMA y se incubaron durante 7 días a 25 °C, transcurridos estos días se tomaron los datos de las características macroscópicas de la colonia y se fotografiaron. Se hicieron preparaciones en agua destilada, en azul de algodón en ácido láctico y en alcohol polivinílico para observar las estructuras reproductoras, pero debido a que éstas no se desarrollaron y se observaron únicamente hifas, el hongo se sembró en EMA con agua de mar durante 7 días a 25 °C, al cabo de estos días, se hicieron de nuevo preparaciones en los medios de montaje antes mencionados; se observaron y midieron las estructuras reproductoras bien desarrolladas. Se siguieron la claves de Domsch *et al.* (1993) y Ellis (1971).

Aspergillus. Para identificar las especies se prepararon los siguientes medios de cultivo recomendados por Klich (2002):

MEA o EMA (Malt Extract Agar)

Extracto de Malta (Bacto™)	20.0 g
Peptona (Bioxon)	1.0 g
Glucosa (J.T. Baker)	20.0 g
Agar (Bioxon)	20.0 g
Agua destilada	1000 mL

CYA 25 y CYA 37 Czapek Yeast Extract Agar

K ₂ HPO ₄ (J.T. Baker)	1.0 g
Concentrado de Czapek	10.0 mL
Extracto de Levadura (Bioxon)	5.0 g
Sacarosa (J.T. Baker)	30.0 g
Agar (Bioxon)	15.0 g
Agua destilada	1000 mL

Concentrado de Czapek

NaNO ₃ (J.T. Baker)	30.0 g
KCl (J.T. Baker)	5.0 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O (J.T. Baker)	5.0 g
FeSO ₄ (J.T. Baker)	0.1 g
ZnSO ₄ (J.T. Baker)	0.1 g
CuSO ₄ (J.T. Baker)	0.05 g
Agua destilada	1000 mL

Estos medios deben ser esterilizados en la autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Se recomienda usar agua destilada, pero no es esencial. Las sustancias químicas deben ser de un grado analítico, sin embargo, la sacarosa (libre de dióxido de azufre), extracto comercial de malta, peptona bacteriológica y agar U.S.P. son aceptables y se usaron en este trabajo. Estrictamente se vierten 25 mL del medio en cajas de Petri estándar. El volumen de cada caja de Petri es importante para poder observar las diferencias morfológicas de las colonias. Para cada cultivo o especie diferente, se prepararon 4 cajas, 2 de CYA, una de CY20S y una de EMA. Cada caja se inoculó en tres puntos equidistantes del centro y se incubaron en la oscuridad durante 7 días. Las cajas inoculadas se incubaron a diferentes temperaturas; CYA25 y CY20S a 25 °C, CYA37 a 37 °C y EMA a 25 °C.

Para inocular las cajas e Petri con los diferentes medios de cultivo se prepararon 4 viales con agar al 0.2 % y Tween 80 (Pitt y Hocking, 1997) al 0.05 %. Cada vial estéril se inoculó con los 4 diferentes *Aspergillus* que se obtuvieron en este trabajo. Transcurridos los siete días se fotografiaron las colonias y se llenó la hoja de datos (Apéndice 1). Los datos de los colores se hicieron con base a la guía de colores Methuen handbook of colours (Kornerup y Wanscher, 1978). Para tomar los datos de las características microscópicas se hicieron preparaciones en agua destilada. Posteriormente se hicieron microcultivos en EMA los cuales se incubaron por siete días a 25°C, una vez transcurridos estos días se hicieron preparaciones en alcohol polivinílico y en azul de algodón en ácido láctico; para observar a detalle la forma de la vesícula, a las preparaciones se les agregó una gota de alcohol y se

pasaron por la flama del mechero. Estas preparaciones se hicieron para tomar 25 mediciones del largo y ancho del pie, el diámetro de la vesícula y el tamaño de las esporas. También se hicieron otras observaciones importantes como por ejemplo si presentaban o no células de Hülle. Una vez recopilados los datos de las características macroscópicas y microscópicas se siguieron claves especializadas como Klich (2002); Raper y Fennell (1965).

Cladosporium. Se inocularon 5 cajas de EMA y se incubaron a 20 °C durante 10 días, transcurridos estos días se fotografiaron las cajas y se tomaron los datos macroscópicos. Para tomar los datos de las características microscópicas se hicieron preparaciones en alcohol polivinílico y también se elaboraron preparaciones con la técnica de la cinta adhesiva (Samson *et al.*, 2004), debido a que el conidióforo de este hongo es muy frágil. Se hicieron 25 mediciones de esporas y observaciones importantes como presencia de escaras o cicatrices en las esporas, ramificación del conidióforo, septos en conidiosporas. Posteriormente se hicieron microcultivos en EMA y se fotografiaron los conidióforos. Una vez recopilados los datos de las características macroscópicas y microscópicas se siguieron claves especializadas como Domsch *et al.* (1993) y Ho (1999).

Epicoccum. Cabe señalar que con este hongo se tuvo un poco de problema y se extendió el tiempo que se tenía planeado para su identificación, debido a que no se observaban claramente las estructuras típicas de un *Epicoccum*. Se inocularon en EMA durante 10 días a temperatura ambiente y al cabo de los cuales se fotografiaron las cajas y se midieron las colonias. Se hicieron preparaciones en alcohol polivinílico para observar estructuras reproductoras pero éstas aún no maduraban por lo que las cajas se expusieron a luz UV (negra), y se le sometió a choques térmicos para inducir esporulación y maduración. Una vez hecho esto se hicieron de nuevo preparaciones en alcohol polivinílico para

observar las estructuras y éstas se notaban muy diferentes a *Epicoccum*, por lo que se hizo una preparación del tubo original y en esta preparación si se observaron las estructuras típicas del hongo. Se procedió a sembrar el hongo en el medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) durante 10 días, se hicieron preparaciones y las conidiosporas aún no estaban maduras. A los 22 días se volvieron a hacer preparaciones y éstas no estaban maduras. Debido a lo anterior se procedió a sembrar al hongo en 5 cajas con EMA con agua de mar y se incubaron durante 10 días a 25 °C. Al cabo de estos días, se hicieron preparaciones en alcohol polivinílico y finalmente se observaron las conidiosporas. Se midieron 25 conidiosporas y 13 conidióforos.

***Penicillium*.** Se realizó una búsqueda bibliográfica acerca del género y se revisaron los términos especializados para poder llenar la hoja de datos (Apéndice 2). Para la identificación de las dos especies de *Penicillium* se siguió la metodología recomendada por Pitt (1979). El autor recomienda utilizar los siguientes medios:

Czapek Yeast Autolysate Agar (CYA; Pitt, 1973)

K ₂ HPO ₄ (J.T. Baker)	1.0 g
Concentrado de Czapek	10 mL
Extracto de levadura (Bioxon)	5.0 g
Sacarosa (J.T. Baker)	30.0 g
Agar (Bioxon)	15.0 g
Agua destilada	1000 mL

Malt Extract Agar /MEA o EMA (según Blakeslee, 1915)

Extracto de Malta (Bacto)	20.0 g
Peptona (Bioxon)	1.0 g
Glucosa (J.T. Baker)	20.0 g
Agar (Bioxon)	15.0 g
Agua destilada	1000 mL

25 % Glycerol Nitrate Agar (G25N; Pitt, 1973)

K ₂ HPO ₄ (J.T. Baker)	0.75 g
Concentrado de Czapek	7.5 mL
Extracto de levadura (Bioxon)	3.7 g
Glicerol, grado analítico (Monterrey)	250 g
Agar (Bioxon)	12 g
Agua destilada	750 mL

Concentrado de Czapek

NaNO ₃	30.0 g
KCl	5.0 g
MgSO ₄	5.0 g
FeSO ₄	0.1 g
Agua destilada	1000 mL

Los tres medios se deben esterilizar en la autoclave por 25 minutos a 121 °C. Se recomienda utilizar agua destilada pero no es esencial. Debido a que el glicerol es usado en una concentración muy exacta y alta, se especifica el grado analítico con el mínimo de agua residual (1 %). Los otros químicos utilizados para preparar los medios deben ser con grado analítico dentro de lo posible, sin embargo, el extracto de malta y la peptona bacteriológica pueden ser comerciales. Las cajas de Petri se inoculan en tres puntos equidistantes para cada aislamiento y condición de crecimiento y se realizan un total de 5 cajas de Petri por aislamiento. Para optimizar los resultados se inoculan 3 cajas con 2 aislamientos, cada uno en 2 puntos, cada una de estas cajas se incubaba a 5 °C, 37 °C y a 25 °C en G25N. Las colonias no deben ser mutuamente inhibitorias bajo estas condiciones de crecimiento. En CYA a 25 °C y EMA, sin embargo, la inoculación de un solo hongo por caja es esencial. En total se inoculan un total de 7 cajas de Petri, seis cajas de 10 cm y una de 6 cm (Fig. 15). Es importante hacer las inoculaciones inmediatamente después de que se vació y solidificó el medio en las cajas y no dejar secar el medio, especialmente se debe tener cuidado con G25N. Se recomienda utilizar cajas de Petri de vidrio, si se utilizan cajas de plástico, éstas

se deben meter en bolsas de polietileno y se deben sellar después de inocularlas. Para evitar la formación de colonias no deseadas, la inoculación de las cajas de Petri de 10 cm se debe hacer a partir de una suspensión semisólida, para esto, es necesario verter en pequeños viales estériles de 0.2-0.4 mL de agar al 0.2 % y detergente (0.05 %) como polisorbitan 80 (Tween 80). Para inocular estos viales usar una aguja y tomar conidiosporas y otros propágulos del hongo e inocular los viales, mezclar y con ayuda de un asa inocular las cajas de 10 cm. Para inocular las cajas de 6 cm es necesario hacerlo con lo que resta de la aguja después de haber inoculado los viales.

Las especies de *Penicillium* se desarrollan satisfactoriamente a 25 °C y la incubación a 37 °C no debe presentar problemas si las cajas de Petri se sellan y se guardan en bolsas de polietileno y si la temperatura se revisa regularmente. Para la incubación a 5 °C se incubaron en un refrigerador dentro de bolsas de plástico. Es necesario revisar en que área del refrigerador la temperatura se encuentra entre 5-0.5 °C, y en ésta área colocar las cajas de Petri.

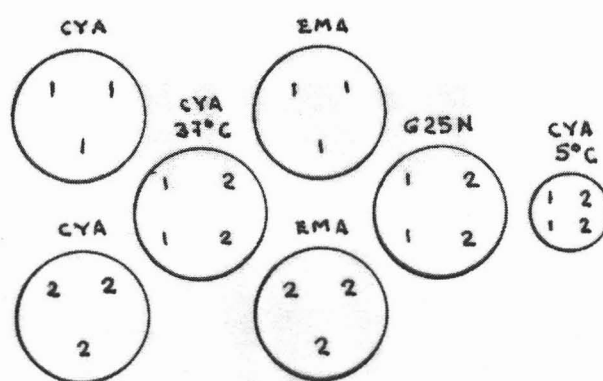


Fig. 15. Diferentes medios y temperaturas de inoculación e incubación recomendados por Pitt (1979) para *Penicillium*.

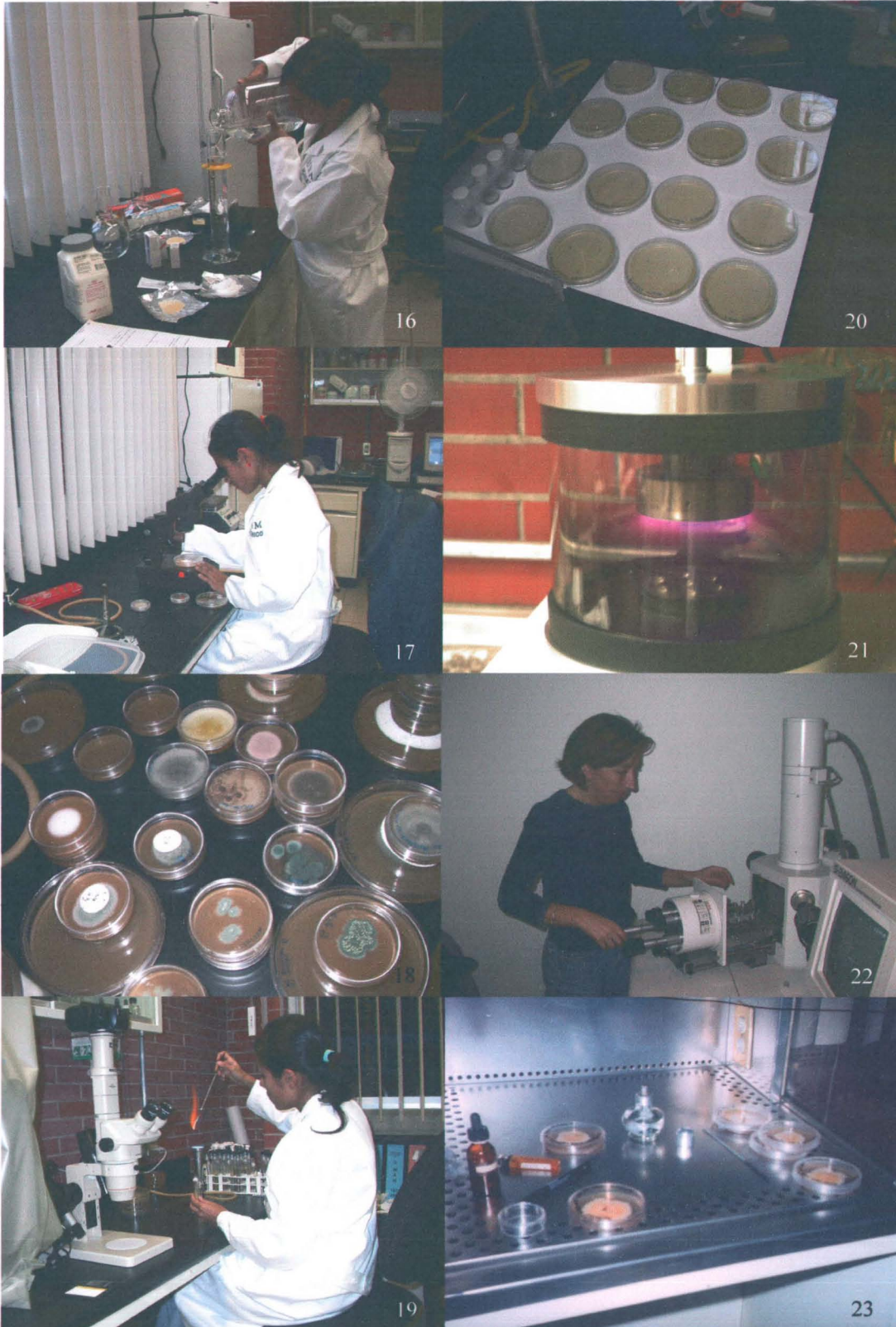
El examen y la toma de datos se hace rigurosamente a los 7 días y comprende tres etapas: 1) medir el diámetro de las colonias 2) tomar los datos de la colonia 3) observaciones microscópicas . Se toman fotografías de las colonias y se anotan los datos de las características macroscópicas y microscópicas en la hoja de datos para *Penicillium*. Para tomar los datos microscópicos se elaboran preparaciones en alcohol polivinílico y en azul de algodón en ácido láctico. Se toman datos microscópicos adicionales y se toman fotos con el microscopio de mayor aumento hasta 1000 x de preparaciones de microcultivos en EMA. Para complementar y verificar su identidad al igual que *Aspergillus*, se examinó también con en el microscopio electrónico y se tomaron fotografías.

El aislamiento, identificación y conservación se llevó a cabo en el Laboratorio de Micromicetes C-121 del Instituto de Biología y en el Laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias, UNAM (Figs. 16-23).

3.5 Análisis de datos

Para estimar la abundancia relativa y el porcentaje de abundancia de las especies que incidieron en más de una submuestra. Para enfatizar los hongos dominantes y los raros, la abundancia total de cada especie se presentó en orden descendente (Bills y Polishook, 1994).

Todas las fotografías de las colonias se tomaron con una cámara digital Rebel/EOS 300D y las fotomicrografías con un microscopio Olympus SZ-PT 60 con la cámara fotográfica acoplada Olympus SC 35, y con un microscopio de alto aumento Olympus BX-50 con cámara integrada modelo Olympus PM-C35. Además, se tomaron fotomicrografías con el microscopio electrónico de barrido Hitachi S-2460N, con cámara modelo Pentax Z-10; para lo cual, las muestras se colocaron en portamuestras con película adhesiva y se



Figs. 16- 23. Aislamiento e identificación de los hongos. 16. Preparación de medio de cultivo V8A. 17, 18. Aislamiento de los hongos. 19, 20. Identificación. 21. Ionizadora cubriendo la muestra fúngica con una capa de oro-paladio. 22. Microscopio electrónico barrido, Instituto de Biología. 23. Campana de flujo laminar, Facultad de Ciencias, UNAM.

cubrieron con una mezcla de oro y paladio de 20 nm de grosor con una ionizadora Emitech K550.

Para conservar los hongos que se obtuvieron se transfirieron a dos tubos con medio V8A, se etiquetaron con los siguientes datos: identidad del hongo, colector, persona que identificó, fecha de aislamiento, fecha de elaboración del tubo, localidad, medio en el que se encuentra, clave de la base de datos y se depositaron en la Colección de Hongos del Herbario Nacional de México (MEXU) y en la colección del Herbario de la Facultad de Ciencias (FCME), UNAM.

4 Resultados

4.1 Abundancia de la microbiota asociada a *Pacifigorgia* sp.

Como resultado del muestreo se obtuvieron 12 hongos diferentes (Figs. 24-31) con un total de 172 incidencias. Se identificaron 8 hongos hasta nivel de especie, 3 hongos hasta el nivel de género y uno no se identificó. Los hongos más abundantes fueron *Aspergillus terreus* Thom (55.81 %), *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries (19.19 %), *Aspergillus ochraceus* Wilhelm (5.81 %) y *Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tiraboschi (3.49 %), con una abundancia moderada fueron *Acremonium fusidioides* (Nicot) W. Gams (2.91 %), *Emericella* sp. (2.91 %), *Alternaria* sp. (2.33 %), *Penicillium corylophilum* Dierckx (2.33 %), hongo no identificado (2.33 %); y los menos abundantes fueron *Aspergillus japonicus* Saito (1.16 %), *Epicoccum* sp. (1.16 %) y *Penicillium citrinum* Thom (0.58 %) (Tabla 1). Estos hongos se registran por primera vez del coral *Pacifigorgia* sp. en México y en el mundo.

4.2 Resultados de los controles

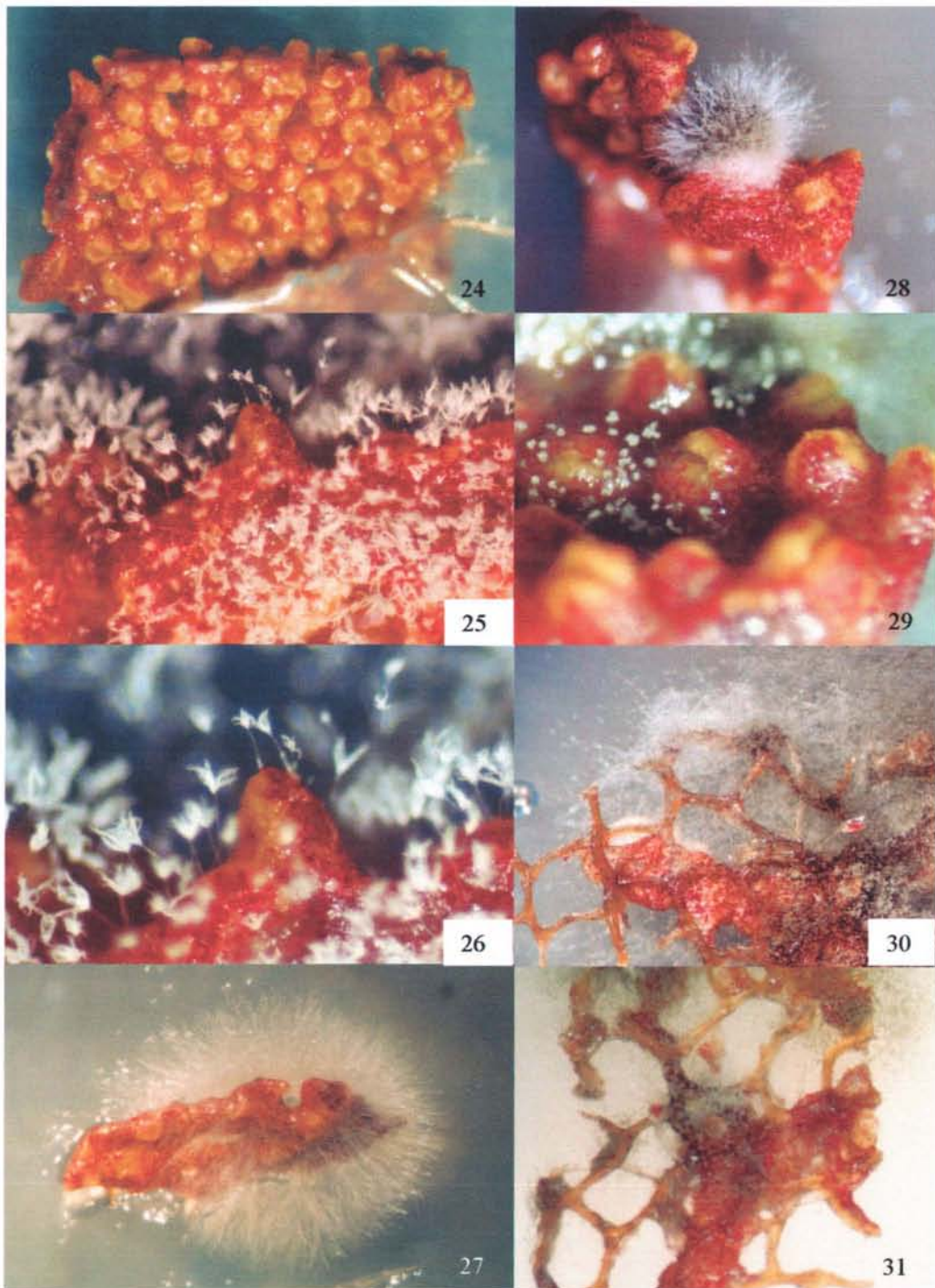
Con lo que respecta a los resultados del control negativo, al final del proceso no se obtuvo ningún hongo ni se observó contaminación en las cajas o en los pedazos de papel filtro; en las cajas del control positivo se observó únicamente crecimiento de *Aspergillus fumigatus* (Figs. 32-36).

Como resultado del muestreo del aire del Laboratorio de Micromicetes C-121, se obtuvieron 5 diferentes hongos pertenecientes a los géneros *Penicillium* (2 especies), *Phoma* (1 especie), y 2 de los 5 hongos no se identificaron debido a que no formaron estructuras reproductoras, sin embargo poseen una morfología muy diferente a aquellos que se aislaron de *Pacifigorgia* sp.

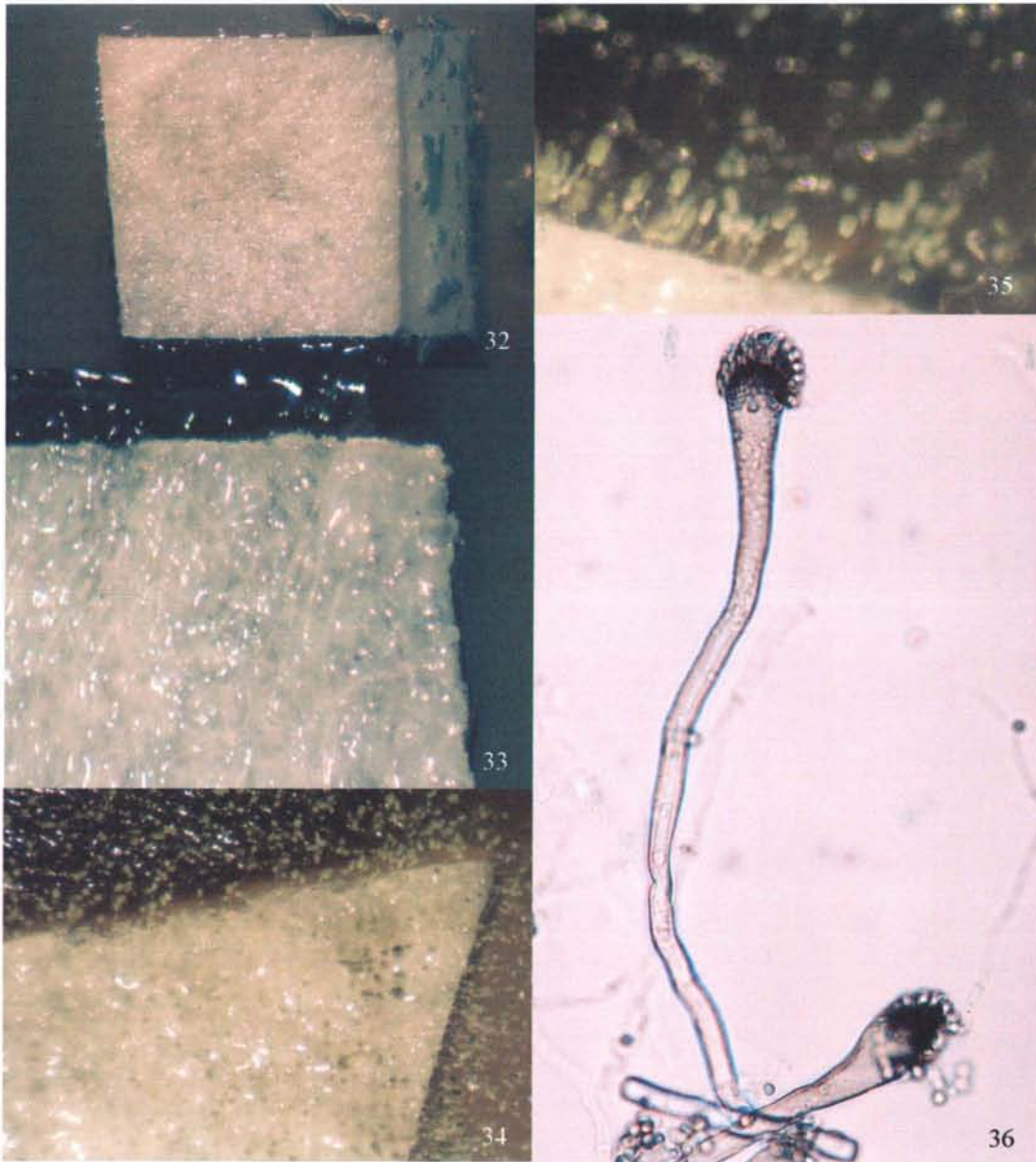
Tabla 1. Abundancia de los doce hongos asociados al coral *Pacifigorgia* sp. del arrecife de las Islas Marietas, Nayarit, México.

Hongo	SB1	SB2	SB3	SB4	SB5	SB6	Abundancia	Porcentaje de abundancia
<i>Aspergillus terreus</i>	8	11	19	21	17	20	96	55.81
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	2	0	10	5	3	13	33	19.19
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0	3	2	2	2	1	10	5.81
<i>Aspergillus versicolor</i>	2	0	2	0	0	2	6	3.49
<i>Acremonium fusidioides</i>	0	2	1	2	0	0	5	2.91
<i>Emericella</i> sp.	1	0	0	2	0	2	5	2.91
<i>Alternaria</i> sp.	2	0	2	0	0	0	4	2.33
<i>Penicillium corylophilum</i>	0	1	2	1	0	0	4	2.33
No identificado	0	2	0	2	0	0	4	2.33
<i>Aspergillus japonicus</i>	0	2	0	0	0	0	2	1.16
<i>Epicoccum</i> sp.	0	0	0	0	0	2	2	1.16
<i>Penicillium citrinum</i>	0	0	0	0	1	0	1	0.58
Total de incidencias por submuestra	15	21	38	35	23	40	172	100.00
Porcentaje de abundancia por submuestra	8.72	12.21	22.09	20.35	13.37	23.26	100.00	100.00
Total de especies								12

SB = submuestra



Figs. 24-31. Hongos creciendo de *Pacifigorgia* sp. sobre medio de cultivo harina de maíz agua de mar con antibióticos. **24.** Fragmento de la colonia de *Pacifigorgia* sp. **25-29.** Diferentes hongos creciendo de *Pacifigorgia* sp. **30, 31.** Hongos desarrollándose del tejido necrosado del coral.



Figs. 32, 33. Control negativo, papel filtro sin crecimiento fúngico.

Figs. 34-36. Control positivo, papel filtro con crecimiento de *Aspergillus fumigatus*. **36.** Conidióforo de *A. fumigatus*.

4.3 Descripción e ilustración de los hongos

La clasificación, descripción e ilustración de los hongos que se aislaron del coral abanico de mar *Pacifigorgia* sp. se muestra enseguida.

Reino Fungi

Phylum Ascomycota

Subphylum Pezizomycotina

Clase Sordariomycetes

Orden Hypocreales

Familia *Incertae sedis*

Género *Acremonium* (Eriksson, 2005)

Especie *Acremonium fusidioides* (Nicot) W. Gams 1971 (Figs. 37-42)

Diámetro de la colonia a los 10 días, en mm: **EMA con agua de mar** 26; **EMA sin agua de mar** 29. **Color de la colonia y textura: EMA con agua de mar:** centro de la colonia rojo pálido (9B3) orilla blanca (9A1), colonia polvosa, presencia de exudado hialino; **EMA sin agua de mar:** centro blanco, borde rosa pálido (9A2), hay presencia de exudado hialino. **Características microscópicas:** conidiosporas catenuladas de dos tipos: ligeramente pigmentados fusiformes con ápices truncados de 4.9 a 6.4×1.2 a $2.1 \mu\text{m}$, globosas hialinas, pared ligeramente ornamentada y miden 3.4 a $4.7 \mu\text{m}$ de diámetro.

Observaciones: El color y la textura de la colonia, así como el tamaño y la morfología del conidióforo y de las conidiosporas, coinciden con la descripción de esta especie, aunque el diámetro de la colonia en EMA con agua de mar fue un poco mayor al descrito (Domsch *et al.*, 1993).

Reino Fungi

Phylum Ascomycota

Subphylum Pezizomycotina

Clase Dothideomycetes

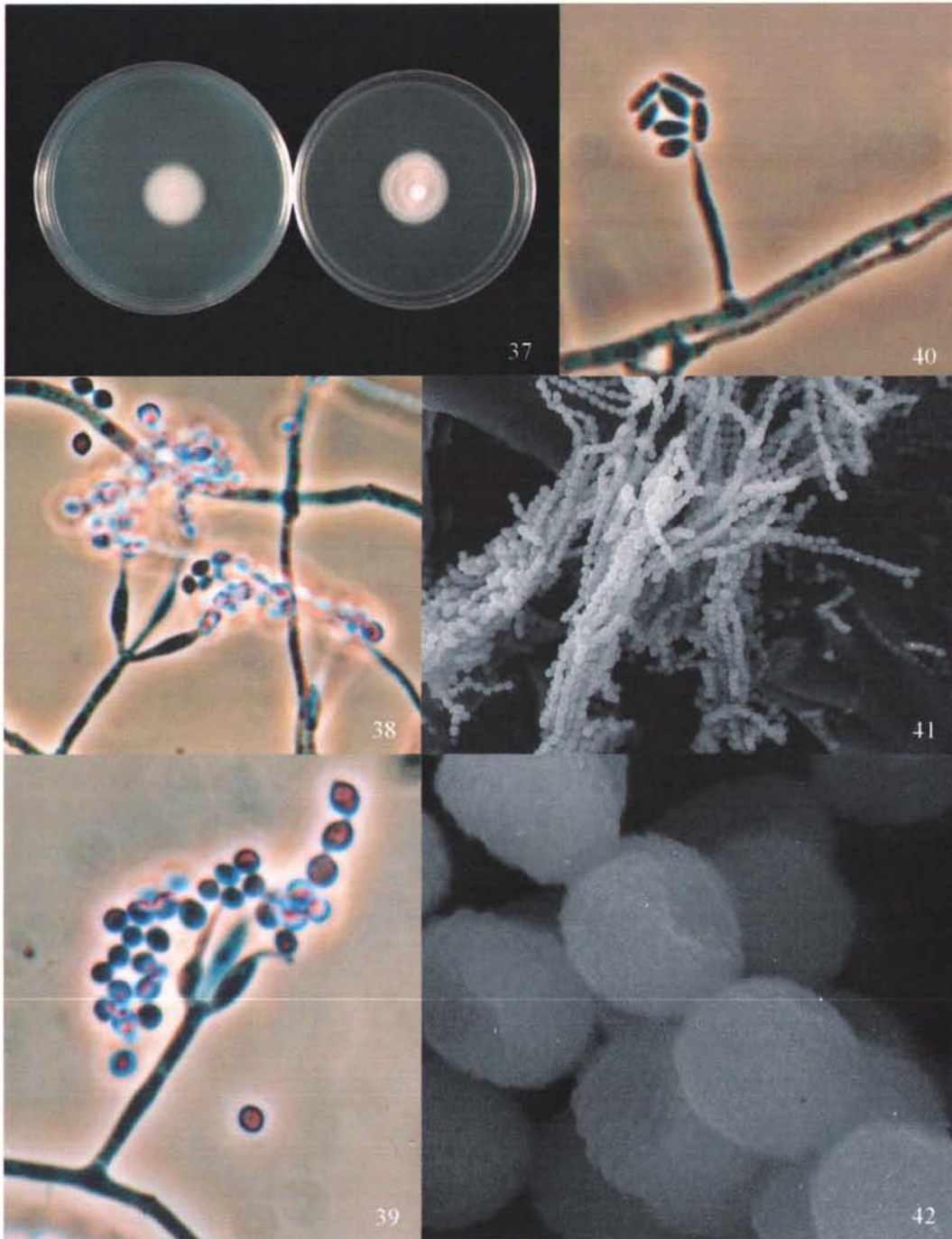
Orden Pleosporales

Familia Pleosporaceae

Género *Alternaria* sp. (Eriksson, 2005) (Figs. 43-46)

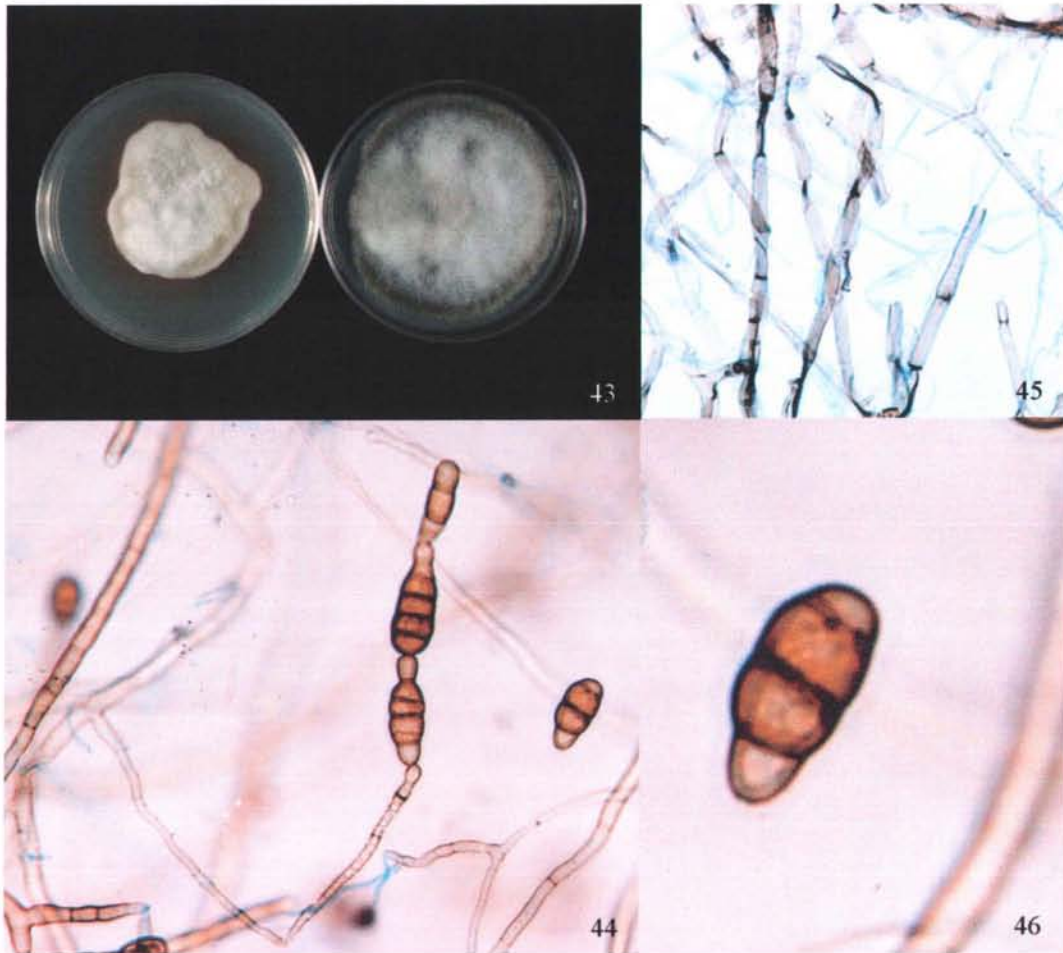
Diámetro de la colonia: a los 7 días, en mm: **EMA con agua de mar** 52; **EMA sin agua de mar** 70. **Color de la colonia y textura: EMA con agua de mar:** verde pálido (4B1) a verde grisáceo (4C2), velutinoso; **EMA sin agua de mar:** colonia gris pálido (3B1). **Características microscópicas:** conidióforos oscuros, generalmente simples; determinado o simpodial, cortos o largos; conidiosporas (porosporas) oscuras, típicamente con septos longitudinales y transversales; presentan varias formas, de obclavada, elíptica u ovoide, frecuentemente se originan acrópetamente en el ápice.

Observaciones: El diámetro, la textura de la colonia, morfología del conidióforo y de las conidiosporas coincidieron con la descripción del género, sin embargo, las medidas y el color de las conidiosporas no coincidieron con ninguna de las especies descritas por lo que podría tratarse de una nueva especie adaptada al medio marino (Ellis, 1971).



Figs. 37-42. *Acremonium fusidioides*. 37. Colonia en EMA con agua de mar (izquierda) y en EMA sin agua de mar (derecha) a 20 °C, 10 días en la oscuridad, $\times 0.40$. 38-40. Diferentes tipos de conidióforos teñidos con azul de algodón en ácido láctico, $\times 750$, $\times 1\ 000$, $\times 1\ 000$. 41. Cadenas de conidiosporas, $\times 250$. 42. Conidiosporas maduras, $\times 6\ 000$.

Fotomicrografías con microscopía de contraste de fases 38-40; con microscopía electrónica de barrido 41, 42.



Figs. 43-46. *Alternaria* sp. **43.** Colonia en EMA con agua de mar (izquierda) y en EMA sin agua de mar (derecha) a 25 °C, 7 días en la oscuridad, $\times 0.4$. **44.** Conidióforo en EMA con agua de mar $\times 600$. **45.** Hifas en EMA sin agua de mar $\times 600$. **46.** Dictiospora madura con septos en EMA con agua de mar $\times 1\ 200$.



Fig. 47. *Aspergillus japonicus*. Colonias en diferentes medios de cultivo para su identificación.

Reino Fungi

Phylum Ascomycota

Subphylum Pezizomycotina

Clase Eurotiomycetes

Orden Eurotiales

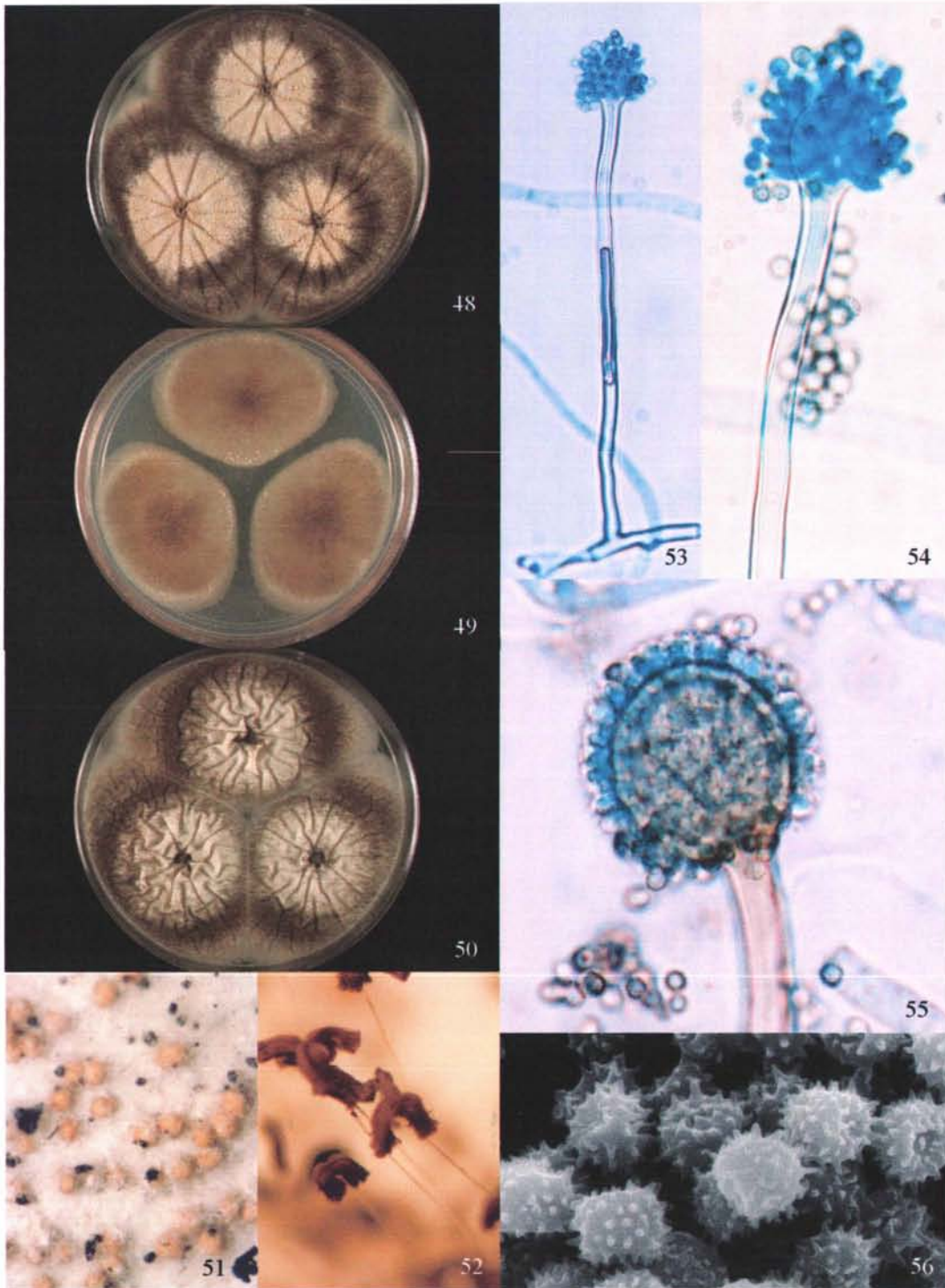
Familia Trichocomaceae

Género *Aspergillus* (Eriksson, 2005)

Especie *Aspergillus japonicus* Saito (Figs. 47-56)

Diámetros de las colonias a los 7 días, en mm: **CYA25** 70; **EMA** 54-56; **CY20S** 66-70; **CYA37** no hubo crecimiento. **Colores de las colonias y texturas:** **CYA25:** Centro de la colonia amarillo pálido (3A3); orilla pardo oscuro (7F4), micelio blanco, esclerocios color crema; el reverso dorado (4B5), exudado claro, no hay presencia de pigmentos solubles; colonias velutinosas a ligeramente flocosas, sulcadas radialmente. **EMA:** Colonias color pardo (5F6), micelio blanco, exudado ausente, reverso verde amarillento (30D6). **CY20S:** Colonias similares a CYA25 excepto por la ausencia de exudado y la presencia de un amarillo pálido en el reverso. **Características microscópicas:** cabezas conidiales radiadas; pie 197.36 μm , liso, hialino o poco pigmentado cerca del ápice; vesícula 14 μm , globosa a alargada; uniseriado; fiálides 5-9 \times 3.0-4 μm , cubriendo de la parte media a la superior de la vesícula. Conidiosporas globosas a subglobosas, ocasionalmente elipsoidales, miden 4-5 \times 3-4 μm , superficie equinulada.

Observaciones: Las características macroscópicas y microscópicas de este hongo aislado de *Pacificorgia* sp. coinciden con la descripción de Klich (2002). Un aspecto que es importante mencionar es que el hongo formó



Figs. 48-56. *Aspergillus japonicus*. 48. Colonias en agar Czapek a 25 °C, 7 días en la oscuridad, × 0.5. 49. Colonias en EMA a 25 °C, 7 días en la oscuridad, × 0.5. 50. Colonias en agar Czapek levadura con 20 % de sacarosa a 25 °C, 7 días en la oscuridad, × 0.5. 51. Esclerocios, × 40. 52. Cabezas conidiales columnares divididas, × 100. 53, 54. Conidióforos teñidos con azul de algodón en ácido láctico, × 280, × 750. 55. Vesícula, × 1 000. 56. Conidiosporas equinuladas con microscopía electrónica de barrido, × 3 500.

numerosos esclerocios globosos color crema lo cual es una característica distintiva de esta especie según la autora antes mencionada.



Fig. 57. *Aspergillus ochraceus*. Colonias en diferentes medios de cultivo para su identificación.

Reino Fungi

Phylum Ascomycota

Subphylum Pezizomycotina

Clase Eurotiomycetes

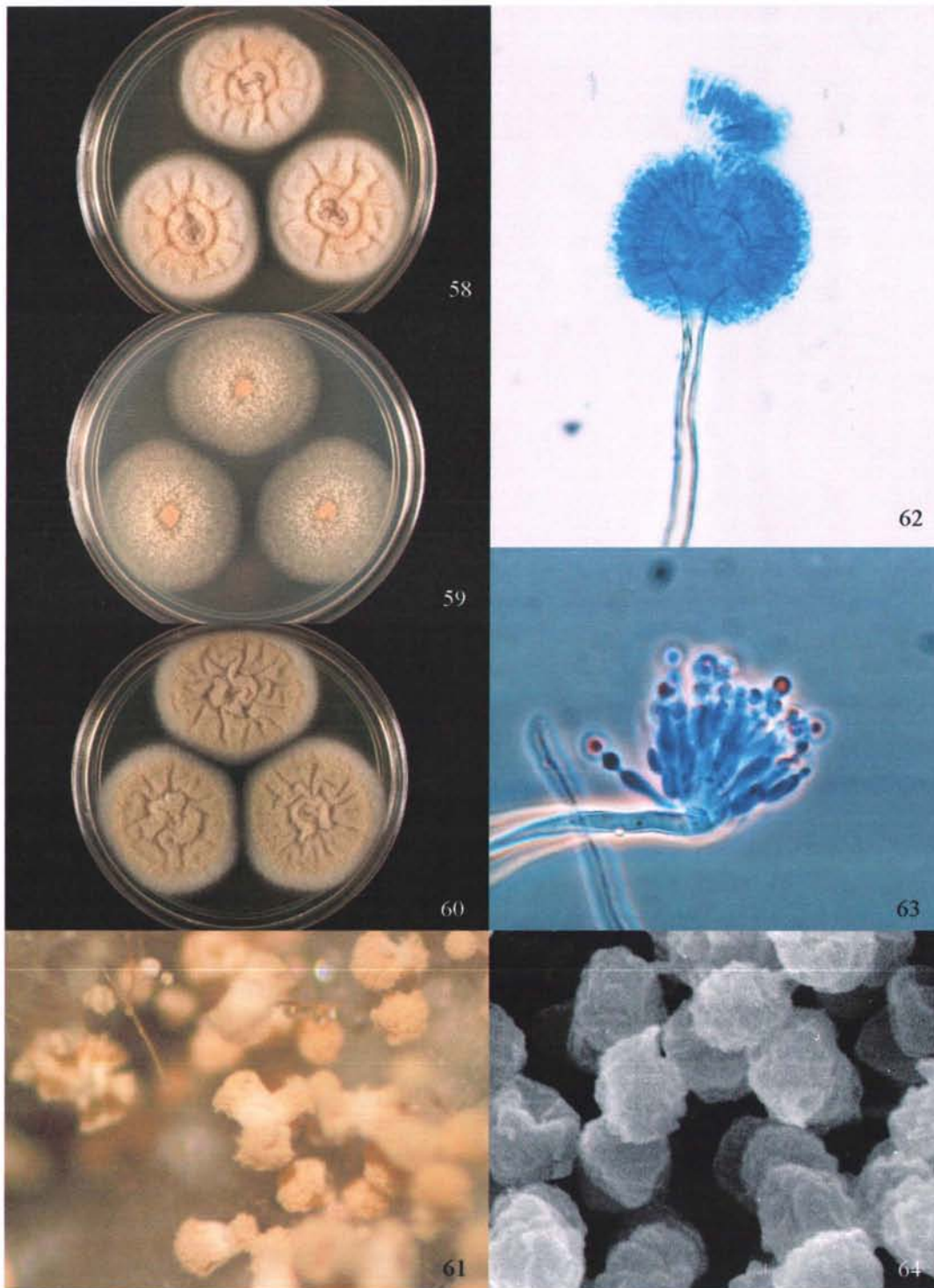
Orden Eurotiales

Familia Trichocomaceae

Género *Aspergillus* (Eriksson, 2005)

Especie *Aspergillus ochraceus* K. Wilh (Figs. 57-64)

Diámetros de las colonias a los 7 días, en mm: **CYA25** 48-49; **EMA** 46-47; **CY20S** 54-56; **CYA37** no hubo crecimiento. **Colores de las colonias y texturas:** **CYA25:** Colonias color crema (4A3), micelio blanco, inconspicuo a floccoso, colonias surcadas; el reverso de éstas es amarillo pálido (4A4). **EMA:** Las colonias no son muy densas amarillo pálido (4A4), micelio blanco, reverso amarillo (4A2). **CY20S:** Las características de la colonia son muy parecidas a CYA25 excepto por el color dorado del reverso de la colonia. **Características microscópicas:** cabezas conidiales radiadas; pie 362.2 μm , paredes ligera o toscamente rugosas, hialino a amarillo pálido en los ápices; vesículas globosas a alargadas 16.3 μm ; biseriado, métulas y fiálides se disponen sobre la vesícula entera, las métulas miden 6-10 \times 2-6 μm ; fiálides 7-12 \times 2-3 μm . Conidiosporas 2.5-3.0 μm , lisas a finamente rugosas, esféricas a elipsoidales, ocasionalmente apiculadas.



Figs. 58-64. *Aspergillus ochraceus*. **58.** Colonias en agar Czapek a 25 °C, 7 días en la oscuridad, × 0.5. **59.** Colonias en agar extracto de malta a 25 °C, 7 días en la oscuridad, × 0.5. **60.** Colonias en agar Czapek levadura con 20 % de sacarosa a 25 °C, 7 días en la oscuridad, × 0.5. **61.** Cabezas conidiales columnares divididas, × 120. **62.** Conidióforo teñido con azul de algodón en ácido láctico, × 240. **63.** Vesícula teñida con azul de algodón en ácido láctico con microscopía de contraste de fases, × 300. **64.** Conidiosporas finamente rugosas con microscopía electrónica de barrido, × 4 000.

Observaciones: El tamaño y el color de las colonias en CYA25 y en EMA se encuentran dentro del rango descrito para esta especie, así como las medidas del conidióforo y de las conidiosporas Klich (2002).

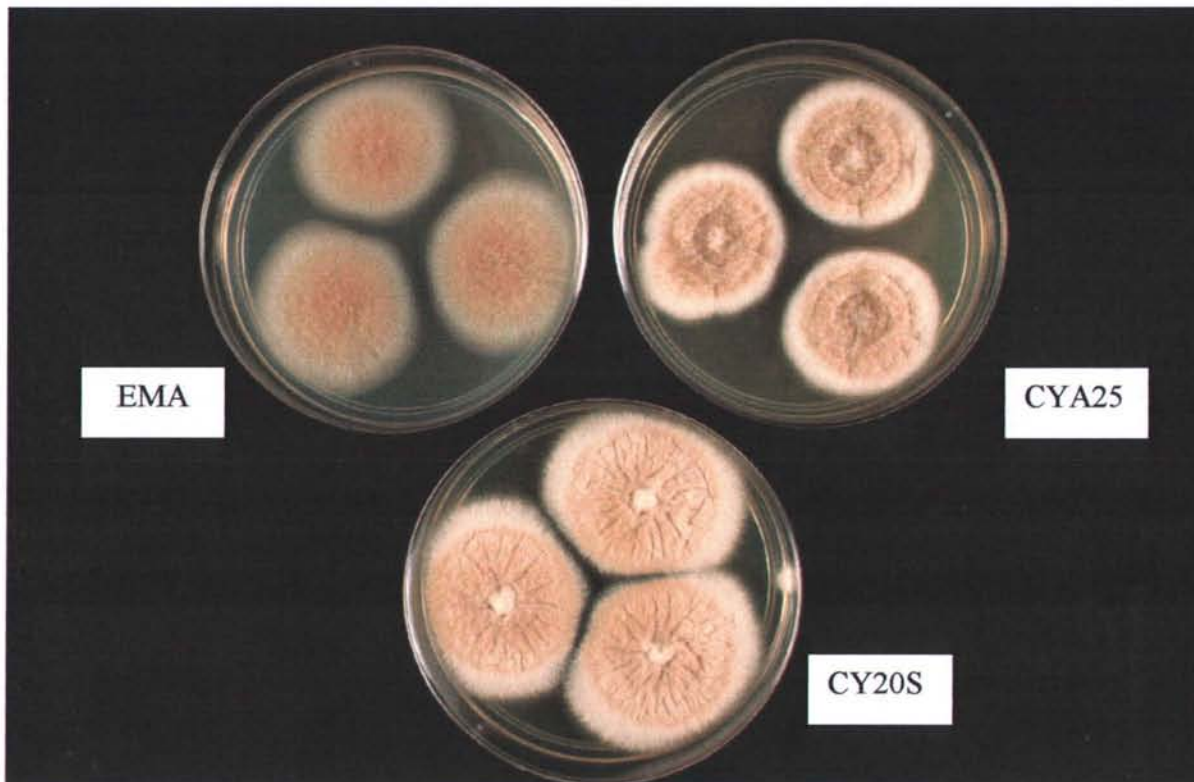


Fig. 65. *Aspergillus terreus*. Colonias en diferentes medios de cultivo para su identificación.

Reino Fungi

Phylum Ascomycota

Subphylum Pezizomycotina

Clase Eurotiomycetes

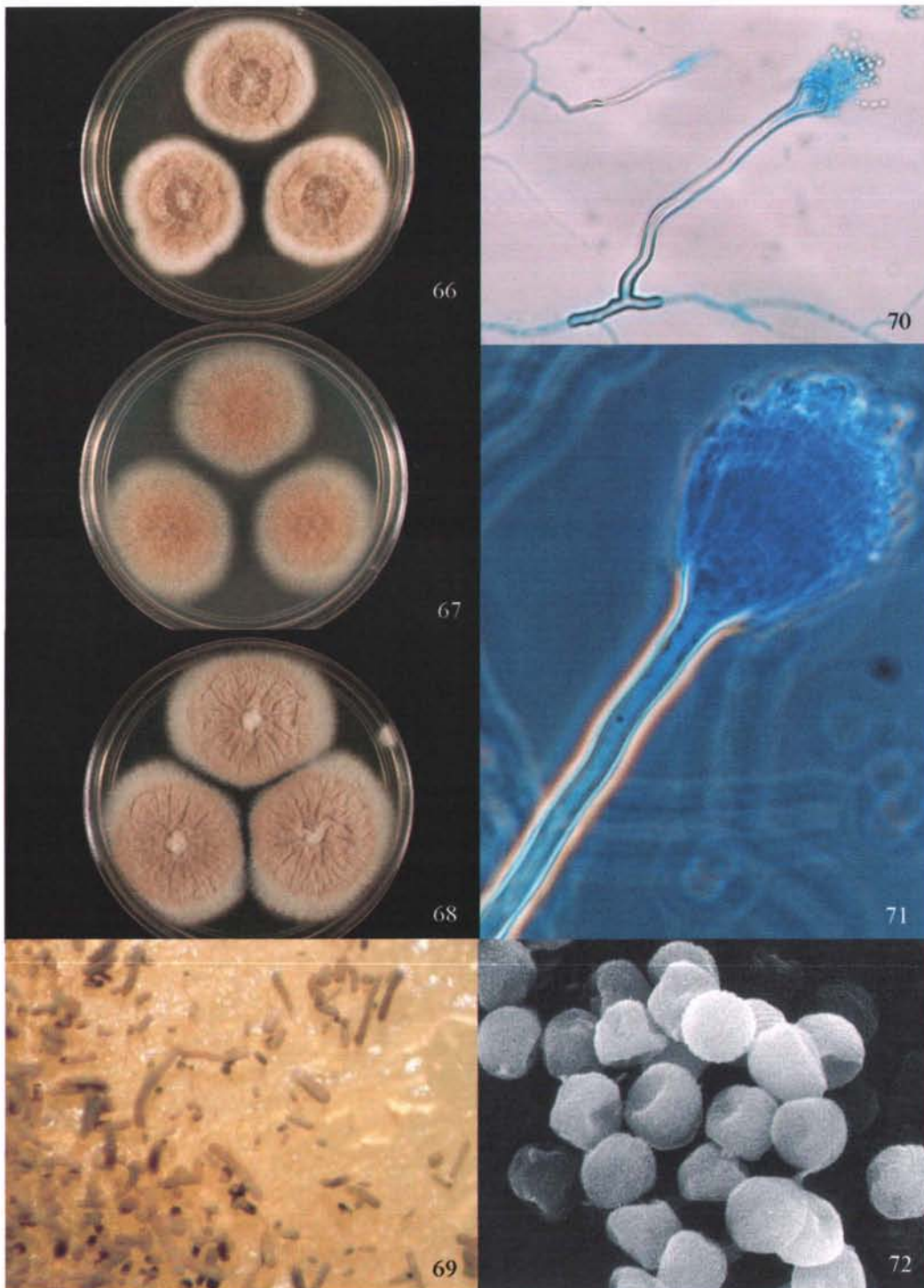
Orden Eurotiales

Familia Trichocomaceae

Género *Aspergillus* (Eriksson, 2005)

Especie *Aspergillus terreus* Thom (Figs. 65-72)

Diámetros de las colonias a los 7 días, en mm: **CYA25** 45-46; **EMA** 48-51; **CY20S** 63; **CYA37** no hubo crecimiento. **Colores de las colonias y texturas:** **CYA25:** Colonias naranja grisáceo (5B3), micelio blanco, exudado hialino, reverso amarillo (4A6), colonias velutinosas a lanosas, radialmente sulcadas. **EMA:** Las colonias sobre este medio crecen esparcidas de color bronce (5E5), micelio blanco usualmente inconspicuo, el reverso de las colonias es amarillo pálido (4A3). **CY20S:** Las características son muy similares a las colonias en CYA25, velutinosas a lanosas, surcadas radialmente. **Características microscópicas:** cabezas conidiales en columnas compactas; pies con pared lisa, hialinos, $153.6 \times 4 \mu\text{m}$; vesículas $9.4 \mu\text{m}$, esféricas o piriformes; biseriado, métulas sobre la mitad superior de la vesícula de $5-7 \times 2-3 \mu\text{m}$; fiálides $5-7 \times 1.5-2.5 \mu\text{m}$. Conidiosporas $2-2.5 \mu\text{m}$ de diámetro, lisas, globosas a elipsoidales.



Figs. 66-72. *Aspergillus terreus*. 66. Colonias en agar Czapek a 25 °C, 7 días en la oscuridad, × 0.5. 67. Colonias en agar extracto de malta a 25 °C, 7 días en la oscuridad, × 0.5. 68. Colonias en agar Czapek levadura con 20 % de sacarosa a 25 °C, 7 días en la oscuridad, × 0.5. 69. Cabezas conidiales en columnas compactas, × 40. 70. Conidióforo teñido con azul de algodón en ácido láctico, × 570. 71. Vesícula teñida con azul de algodón en ácido láctico con microscopía de contraste de fases, × 800. 72. Conidiosporas finamente rugosas con microscopía electrónica de barrido, × 3 000.

Observaciones: La textura, color, presencia o ausencia de exudado de las colonias en los diferentes medios de cultivo concuerdan con la descripción de la especie, así como las características del pie y de las conidiosporas; una de las características distintivas de esta especie son las cabezas conidiales columnares, las cuales se observaron en el aislamiento del arrecife de las Islas Marietas Klich (2002).



Fig. 73. *Aspergillus versicolor*. Colonias en diferentes medios de cultivo para su identificación.

Reino Fungi

Phylum Ascomycota

Subphylum Pezizomycotina

Clase Eurotiomycetes

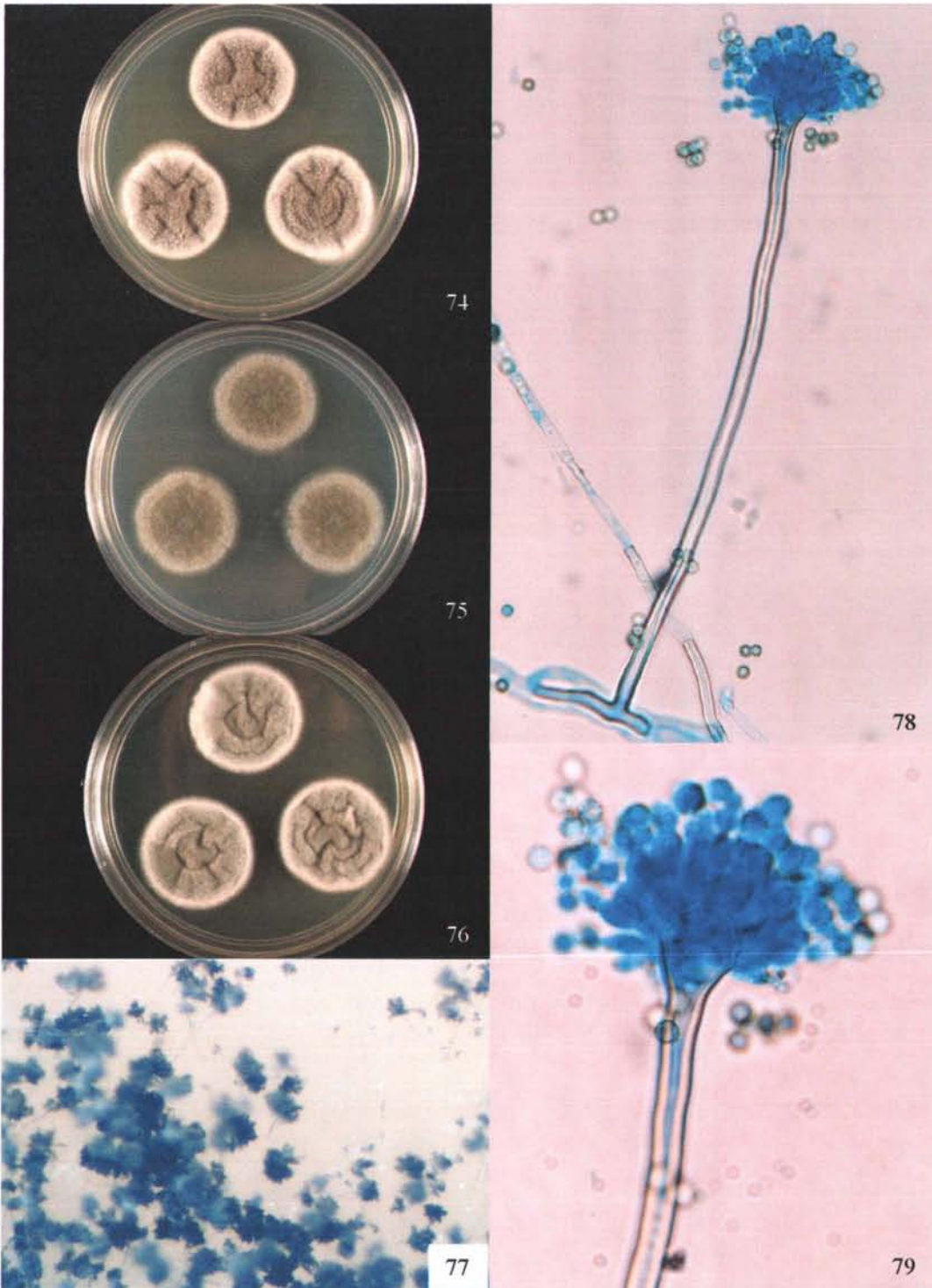
Orden Eurotiales

Familia Trichocomaceae

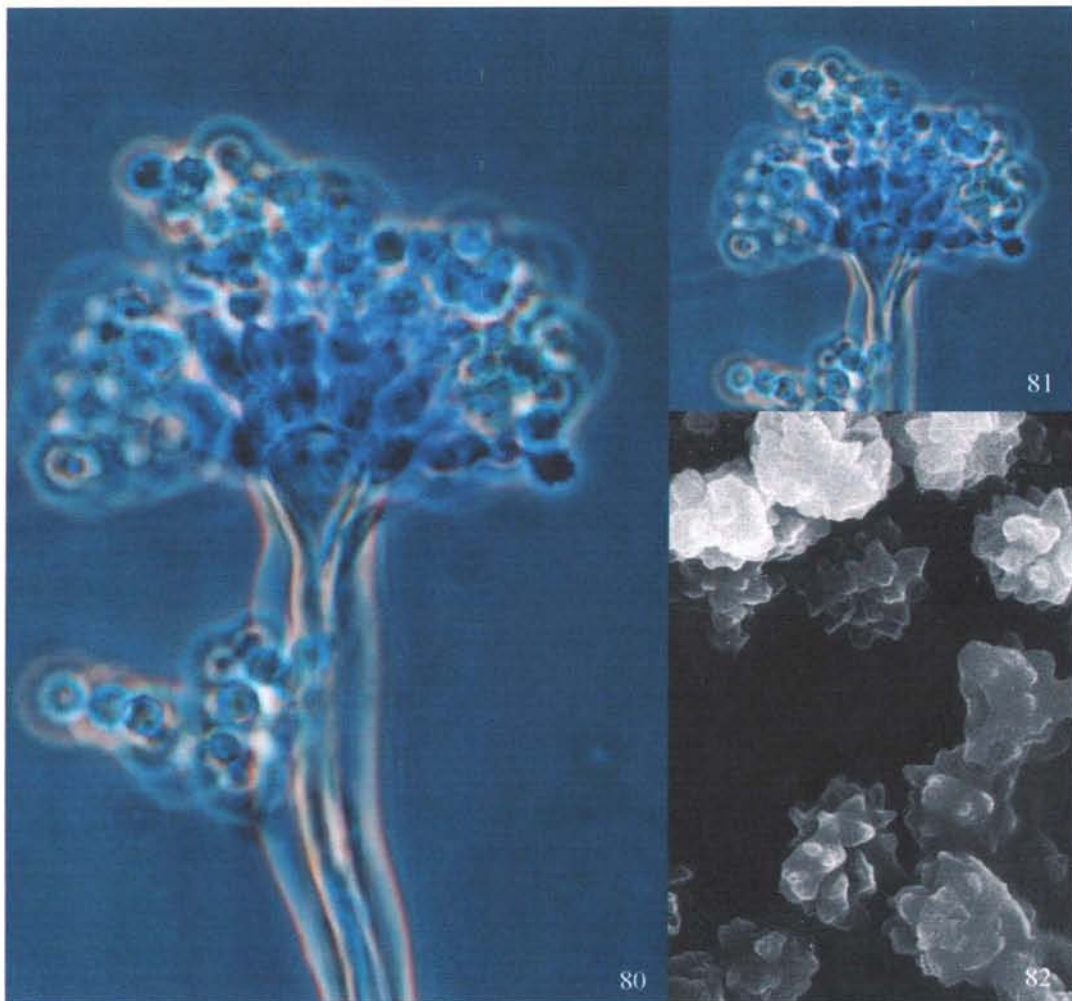
Género *Aspergillus* (Eriksson, 2005)

Especie *Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tiraboschi (Figs. 73-82)

Diámetro de las colonia a los 7 días, en mm: **CYA25** 36-38; **EMA** 36; **CY20S** 37-38; **CYA37** no hubo crecimiento. **Colores de las colonias y texturas:** **CYA25:** verde grisáceo (27E1), micelio blanco, exudado amarillo pálido, reverso dorado (4B5), velutinosas, radialmente sulcadas. **EMA:** verde perejil (30F8), micelio blanco reverso verde pálido (30C7), textura velutinosa a granular. **CY20S:** las colonias en este medio difieren de CYA25 por la ausencia de exudado. **Características microscópicas:** cabezas conidiales radiadas; pie $224.2 \times 4.4 \mu\text{m}$, hialino; vesícula piriforme; conidiosporas $2.0\text{-}3.5 \mu\text{m}$ de diámetro, globosas a subglobosas, con paredes finas rugosas.



Figs. 74-79. *Aspergillus versicolor*. **74.** Colonias en agar Czapek a 25 °C, 7 días en la oscuridad, × 0.5. **75.** Colonias en agar extracto de malta a 25 °C, 7 días en la oscuridad, × 0.5. **76.** Colonias en agar Czapek levadura con 20 % de sacarosa a 25 °C, 7 días en la oscuridad, × 0.5. **77.** Cabezas conidiales, columnares divididas, × 40. **78, 79.** Conidióforo teñido con azul de algodón en ácido láctico, × 330, × 780.



Figs. 80-82. *Aspergillus versicolor*. **80, 81.** Conidióforo teñido con azul de algodón en ácido láctico con microscopía de contraste de fases, $\times 850$, $\times 460$. **82.** Conidiosporas rugosas con microscopía electrónica de barrido, $\times 4\ 000$.

Observaciones: El color de las colonias en los diferentes medios de cultivo, así como las medidas del pie, y la vesícula del conidióforo y de las conidiosporas coinciden con las características de la descripción de esta especie Klich (2002).

Reino Fungi

Phylum Ascomycota

Subphylum Pezizomycotina

Clase Dothideomycetes

Orden Pleosporales

Familia Pleosporaceae

Género *Cladosporium* (Eriksson, 2005)

Especie *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries 1952 (Figs. 83-85)

Diámetro de la colonia a los 10 días, en mm: **EMA con agua de mar** 31; **EMA sin agua de mar:** 28. **Color de la colonia y textura:** **EMA con agua de mar:** centro de la colonia verde pálido (30E3) orilla verde olivacea (30F8), aterciopelada; **EMA sin agua de mar:** colonia verde oscuro (29F4). **Características microscópicas:** los conidióforos miden en promedio 350 μm de largo \times 2-6 μm de ancho, hay presencia de cadenas de conidiosporas, éstas tienen forma de limón miden de 3-5 \times 2-3 μm , presencia de escaras.

Observaciones: Las características macroscópicas de las colonias como el color del anverso, reverso y textura, coincidieron con la descripción de la especie, al igual que las características microscópicas tales como la ramificación del conidióforo, presencia de escaras en las hifas, el número de septos y el tamaño de las conidiosporas (3-5 \times 2-3 μm) que quedó dentro del rango de la especie (3-7 \times 2-7 μm) Domsch *et al.* (1993).

Reino Fungi

Phylum Ascomycota

Subphylum Pezizomycotina

Clase Eurotiomycetes

Orden Eurotiales

Familia Trichocomaceae

Género *Emericella* sp. (Eriksson, 2005) (Figs. 86-93)

Diámetro de la colonia a los 7 días, en mm: **EMA:** 24. **Color de la colonia y textura:** centro de la colonia pardo (7E5), orilla amarillo grisáceo (4B4). **Características macroscópicas y microscópicas:** cleistotecios globosos pardos, pared del cleistotecio compuesto por varias capas, rodeado por células de Hülle; ascas globosas con 8 esporas con pared evanescente; ascosporas unicelulares de color púrpura rojizo globosas en vista frontal y lenticulares vistas de lado con una o más crestas ecuatoriales.

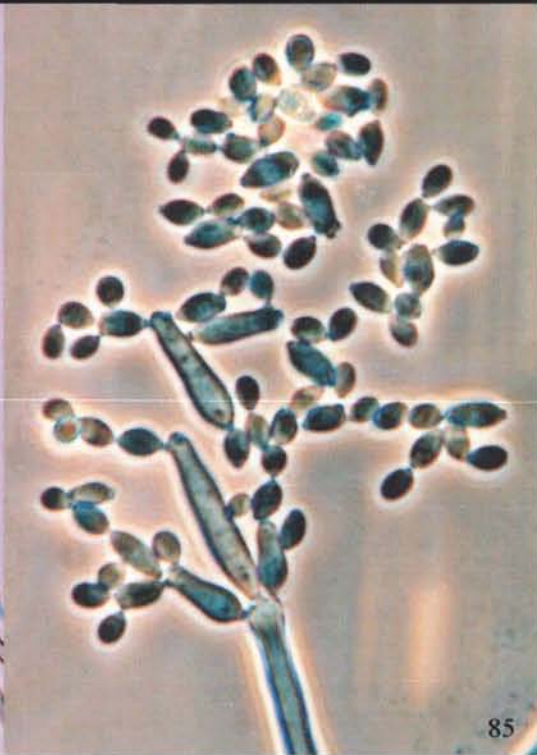
Observaciones: La morfología de los cleistotecios, ascas y ascosporas del aislamiento obtenido en este trabajo están de acuerdo con la descripción de este género por Hanlin (1998).



83

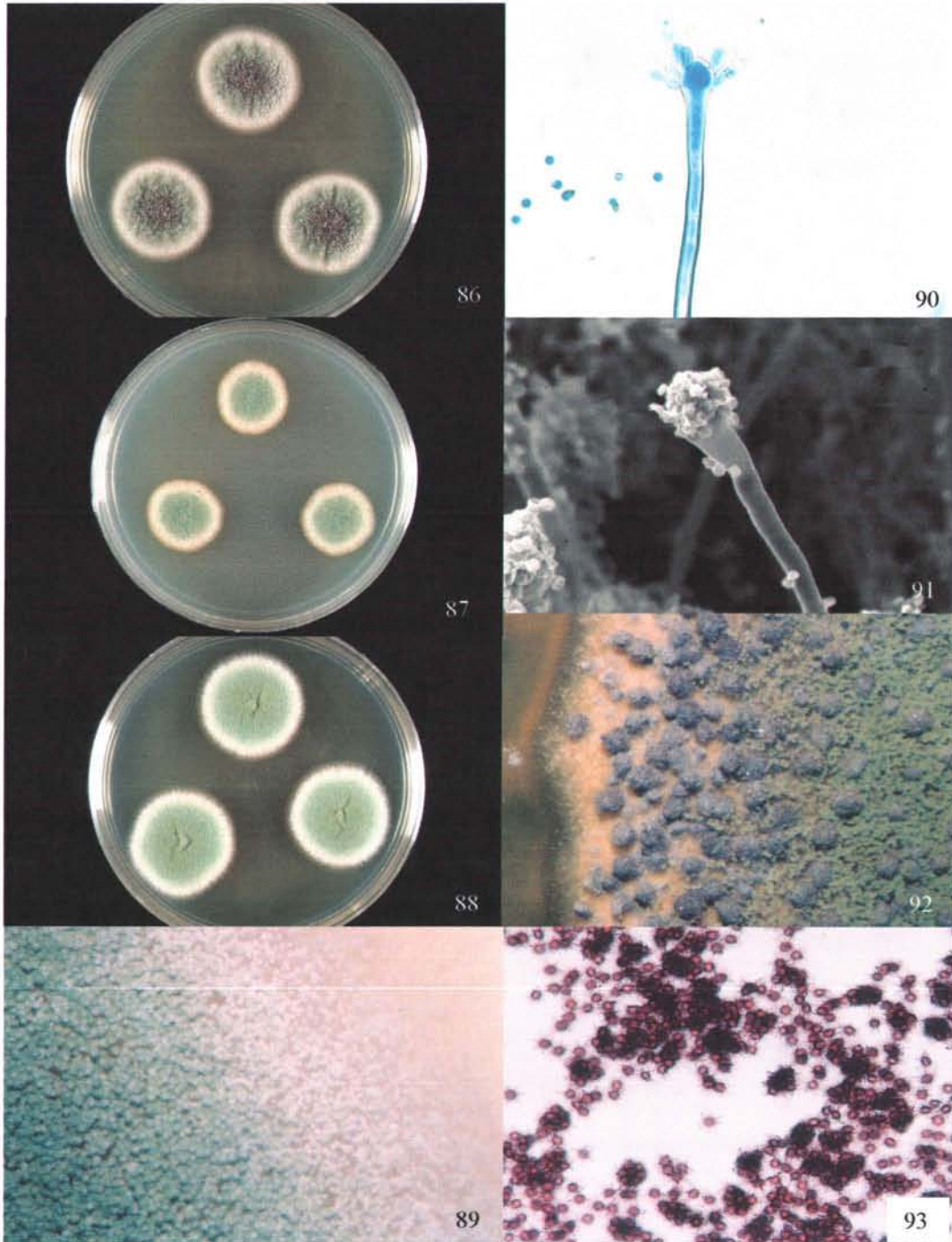


84



85

Figs. 83-85. *Cladosporium cladosporioides*. **83.** Colonia en EMA con agua de mar (izquierda) y en EMA sin agua de mar (derecha), a 20 °C, 10 días en la oscuridad, $\times 0.6$. **84.** Conidióforo, $\times 570$. **85.** Conidióforo y cadenas de blastosporas con microscopía de contraste de fases y con técnica de la cinta adhesiva, $\times 1\ 000$.



Figs. 86-93. *Emericella* sp. **86.** Colonias en agar Czapek a 25 °C, 7 días en la oscuridad, × 0.5. **87.** Colonias en agar extracto de malta a 25 °C, 7 días en la oscuridad, × 0.5. **88.** Colonias en agar Czapek levadura con 20 % de sacarosa a 25 °C, 7 días en la oscuridad, × 0.5. **89.** Colonia joven en V8A, × 20. **90.** Conidióforo teñido con azul de algodón en ácido láctico, × 450. **91.** Conidióforo con microscopía electrónica de barrido, × 900. **92.** Ascomas, × 10. **93.** Ascosporas maduras, × 250.

Reino Fungi

Phylum Ascomycota

Subphylum *Incertae sedis*

Clase *Incertae sedis*

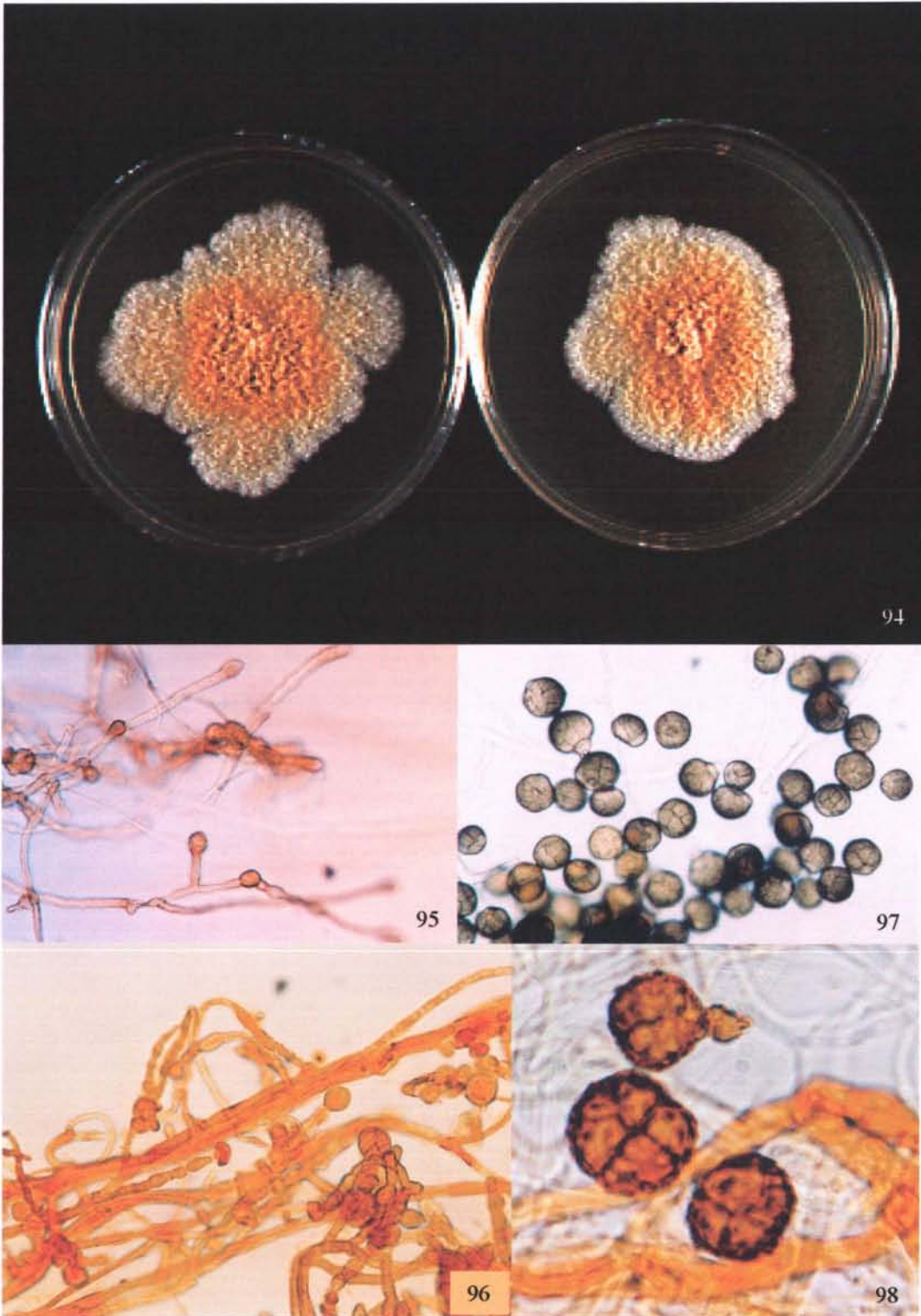
Orden *Incertae sedis*

Familia *Incertae sedis*

Género *Epicoccum* sp. (Eriksson, 2005) (Figs. 94-98)

Diámetro de la colonia a los 10 días, en mm: **EMA sin agua de mar:** 34-43; **EMA mar:** 50-65. **Color de la colonia y textura:** amarillo brillante, algodonosa. **Características microscópicas:** los esporodoquios son negros, presentan una forma más o menos de cojín, tamaño variable, los conidióforos son compactos o flojos, oscuros, cortos, conidiosporas. (dictiosporas) multicelulares, oscuras, 12.4-18.7 μm de diámetro.

Observaciones: Las características del aislamiento de *Pacifigorgia* sp. coincidieron con la descripción del género, Samson *et al.* (2004) y Domsch *et al.* (1993). Las características de la colonia y de la conidiosporas no coincidieron con ninguna de las descripciones de las especies por lo que podría tratarse de una nueva especie de este ambiente marino puesto que el tamaño de las colonias (60 mm) y conidiosporas (15-25 μm de diámetro) descritas para *Epicoccum nigrum*, que ha sido reportada del medio marino (Roth *et al.*, 1964), son mayores que los registrados de *Epicoccum* sp. de las Islas Marietas.



Figs. 94-98. *Epicoccum* sp. **94.** Colonia en EMA con agua de mar (izquierda) y en EMA sin agua de mar (derecha) a 25 °C, 10 días en la oscuridad, $\times 0.7$. **95, 96.** Conidiosporas no desarrolladas en EMA sin agua de mar, $\times 370$, $\times 370$. **97, 98.** Conidiosporas bien desarrolladas en EMA con agua de mar, $\times 400$, $\times 1\ 000$.

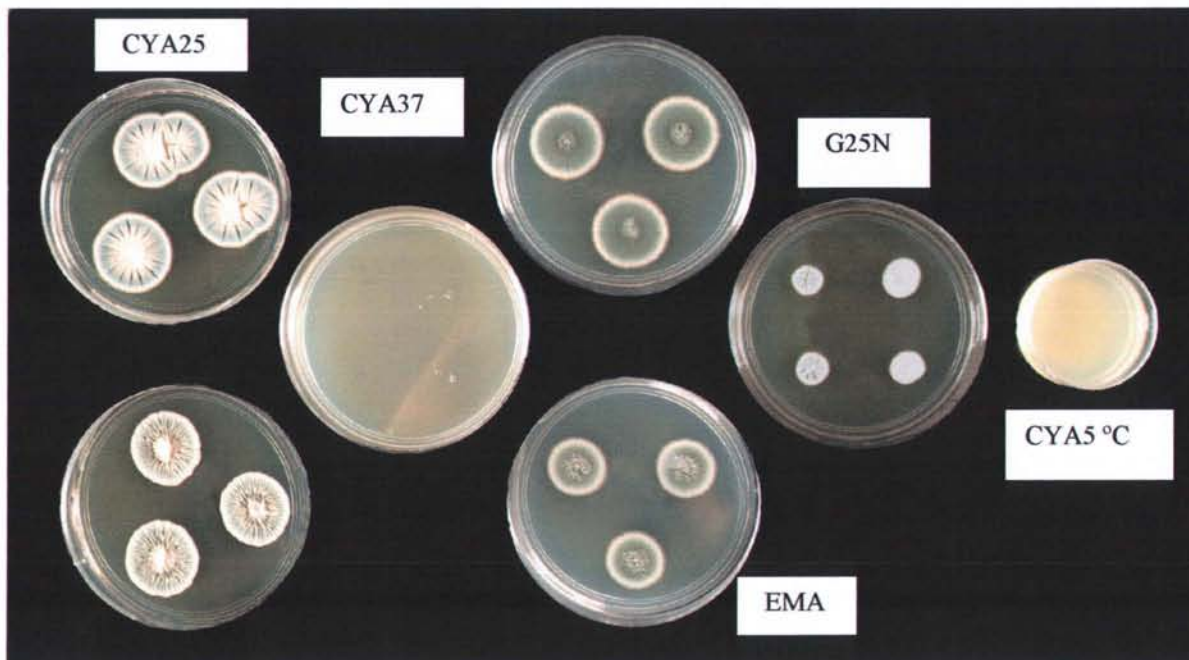


Fig. 99. Colonias de *Penicillium citrinum* y *P. corylophilum* en los diferentes medios y temperaturas recomendados por Pitt (1979). Cajas de Petri superiores, con colonias de *P. citrinum* y cajas inferiores, con colonias de *P. corylophilum*. En G25N las 2 colonias de la izquierda corresponden a *P. citrinum*, y las 2 colonias de la derecha a *P. corylophilum*.

Reino Fungi

Phylum Ascomycota

Subphylum Pezizomycotina

Clase Eurotiomycetes

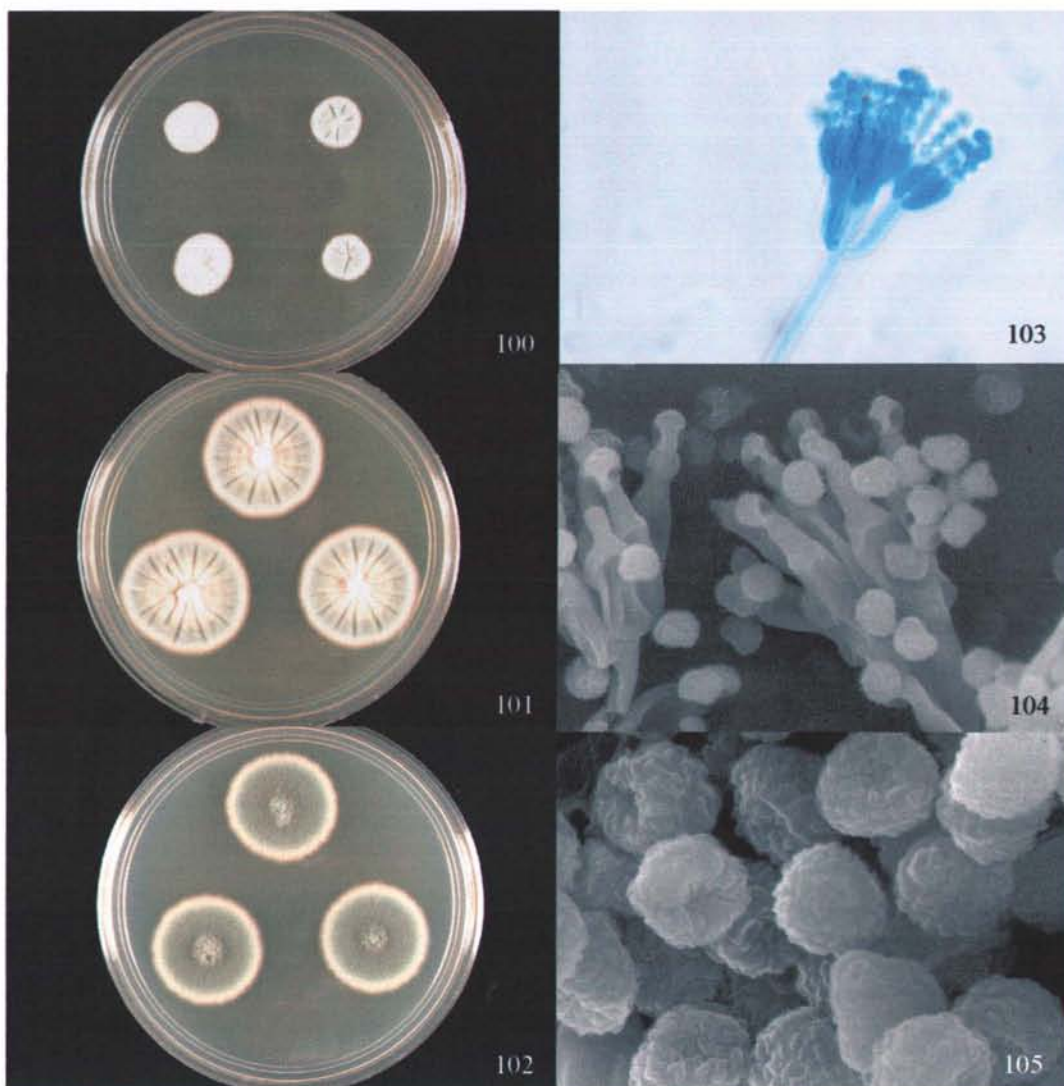
Orden Eurotiales

Familia Trichocomaceae

Género *Penicillium* (Eriksson, 2005)

Especie *Penicillium citrinum* Thom (Figs. 99-105)

Diámetro de las colonias a los 7 días, en mm: CYA25 25-28; EMA 25-30; G25N 14-16; CYA37, CYA5 no hubo crecimiento. **Colores de las colonias y texturas:** CYA25: centro de la colonia blanco con verde grisáceo (27B2), sulcadas, densas, micelio blanco, pigmento soluble ausente, el reverso de la colonia es pardo pálido con tonalidades amarillentas, presencia de exudado amarillo claro. EMA: centro y borde de la colonia amarillo pálido (1A3), centro amarillo grisáceo (14B). G25N: centro y borde de la colonia blanco, el centro presenta un color gris verdoso (26B2). CYA37, 5 °C: No hubo crecimiento. **Características microscópicas:** los conidióforos miden $100-300 \times 2.0-3.0 \mu\text{m}$, paredes lisas, terminan en verticilos bien definidos, fiálides en verticilos compactos, ampuliformes $7-8 \times 2-3 \mu\text{m}$, usualmente con una colula corta. Las conidiosporas son esféricas a subsféricas $2.2-3.0 \mu\text{m}$.



Figs. 100-105. *Penicillium citrinum*. **100-102.** Colonias en los diferentes medios de cultivo recomendados por Pitt (1979). **100.** Colonias en G25N, 7 días en la oscuridad, a la izquierda *P. citrinum*, $\times 0.5$. **101.** Colonias en agar Czapek a 25 °C, 7 días en la oscuridad, $\times 0.5$. **102.** Colonias en agar extracto de malta a 25 °C, 7 días en la oscuridad, $\times 0.5$. **103.** Penicilo teñido con azul de algodón en ácido láctico, $\times 750$. **104.** Penicilos, $\times 1\ 700$. **105.** Conidiosporas esféricas finamente rugosas, $\times 5\ 000$.

Fotomicrografías con microscopía electrónica de barrido 104, 105.

Observaciones: Pitt (1979) menciona que una de las características macroscópicas distintivas de *P. citrinum* es la presencia de exudado en el centro de la colonia, y que la colonia en EMA es muy densa, lo que concuerda con las características observadas para este hongo. Otro aspecto importante que está de acuerdo con la descripción dada por el autor antes mencionado para esta especie es que no hay crecimiento en CYA37 y CYA5. Con lo que respecta a las características microscópicas, éstas coincidieron con la descripción de la especie.

Reino Fungi

Phylum Ascomycota

Subphylum Pezizomycotina

Clase Eurotiomycetes

Orden Eurotiales

Familia Trichocomaceae

Género *Penicillium* (Eriksson, 2005)

Especie *Penicillium corylophilum* Dierckx (Figs. 99, 106-112)

Diámetro de la colonia a los 7 días, en mm: **CYA25** 28-30; **EMA** 25-30; **G25N** 16-18; **CYA37**, **CYA5** no hubo crecimiento. **Colores de las colonias y texturas:** **CYA25:** centro gris amarillento (4 B/2) y verde grisáceo (26 C/2), borde blanco, colonias planas la parte central de la colonia es convoluta, aspecto velutinoso. Se presenta ocasionalmente exudado claro. **EMA: G25N, CYA37, 5 °C: Características microscópicas:** los conidióforos miden 100-250 × 2.2-3.0 μm, paredes lisas, filídes en verticilos ampuliformes miden 7-10 × 2.5-3 μm, con una colula corta, las conidioporas son esféricas a subesféricas, comúnmente de 2.5-3.0 μm de diámetro, lisas, en EMA se forman cadenas de conidiosporas.

Observaciones: Las características del aislamiento de *Pacifigorgia* sp. coincidieron con la descripción de la especie, excepto en que la colonia que se desarrolló en EMA fue 5 mm menor que el valor descrito por Pitt (1979). Otra diferencia fue la falta de crecimiento de microcolonias en CYA5 ya que en la descripción de la especie si hay desarrollo de éstas.

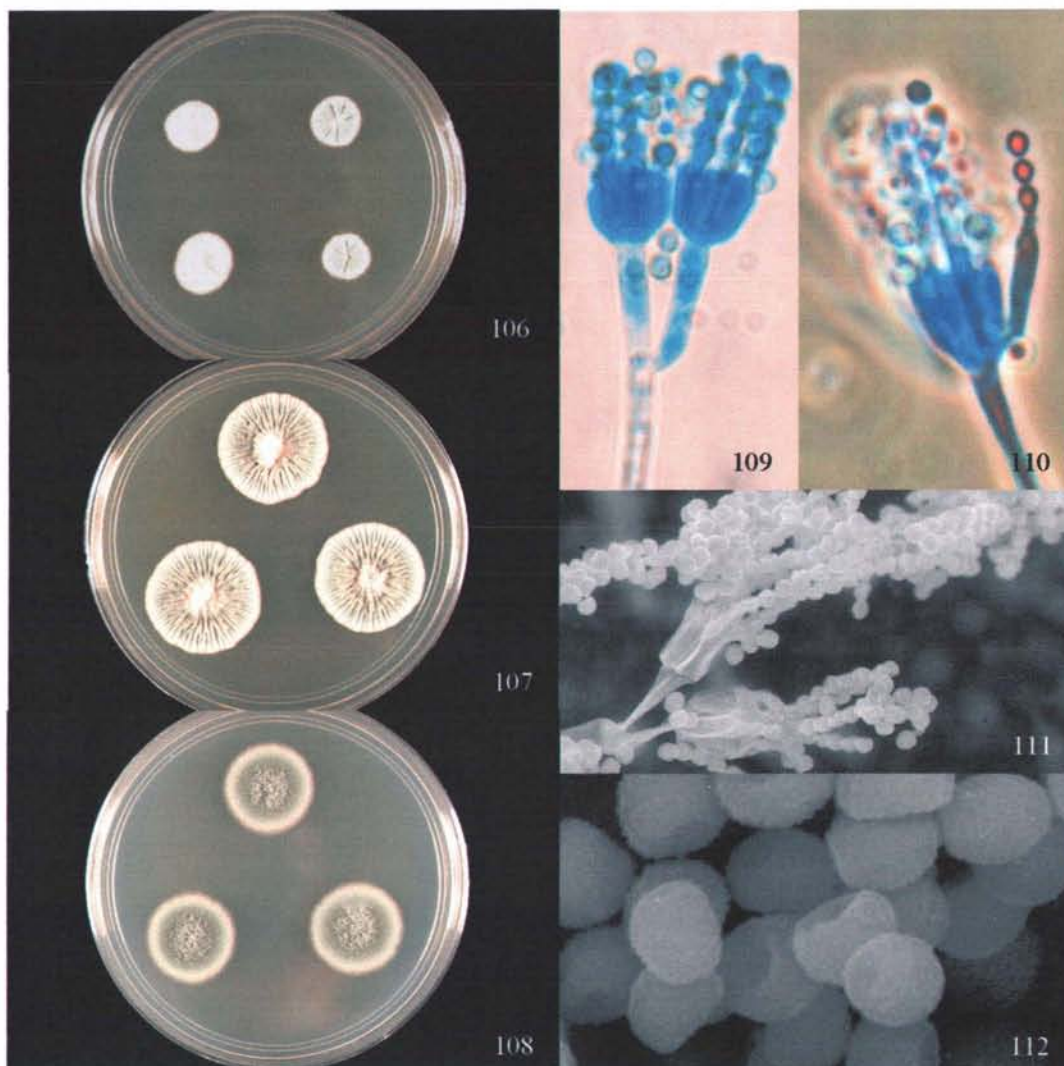
Reino Fungi

Phyla Ascomycota o Basidiomycota

Hongo no identificado (Figs. 113-116)

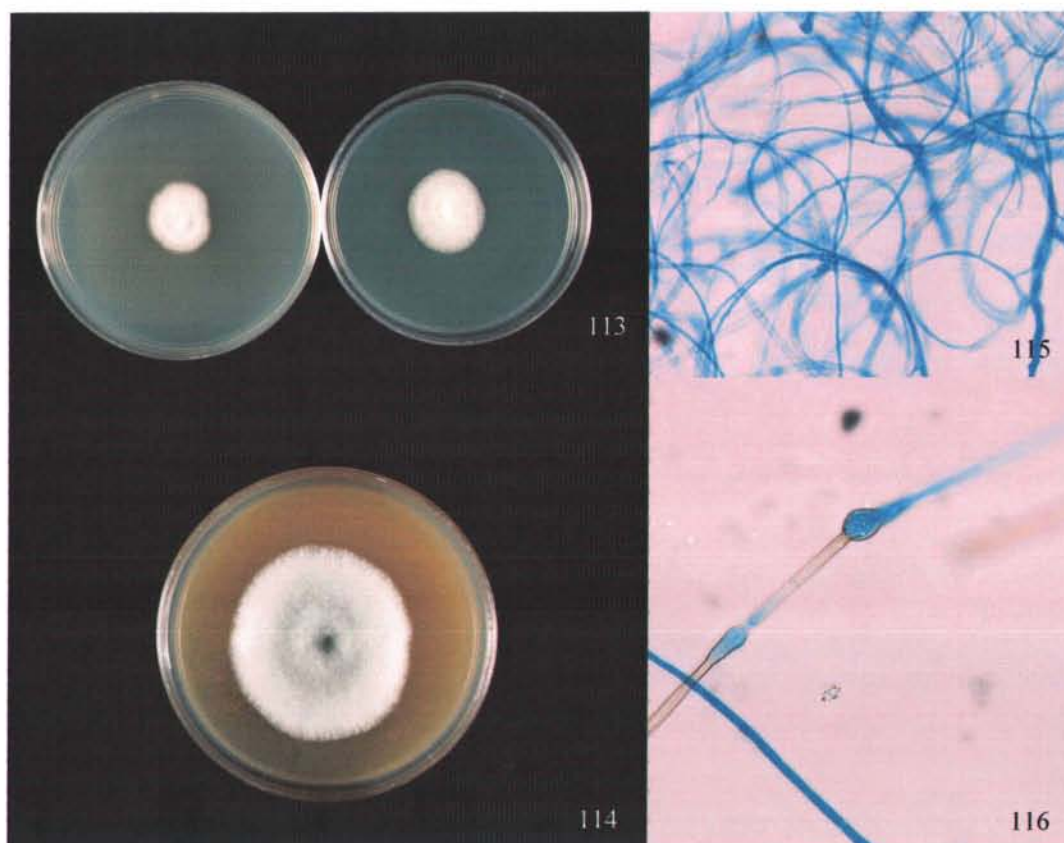
Diámetro de la colonia a los 10 días, en mm: **EMA:** 29. **Colores de la colonia y texturas:** La colonia presentó un color amarillo grisáceo (2C4) con una textura algodonosa, presencia de pigmento soluble púrpura sin presencia de exudado. **Características microscópicas:** Hifas hialinas septadas, micelio estéril.

Observaciones: En el aislamiento de *Pacifigorgia* sp. no se desarrollaron estructuras reproductivas lo que impide llegar a una categoría taxonómica inferior al nivel phylum.



Figs. 106-112. *Penicillium corylophilum*. **106-108.** Colonias en los diferentes medios de cultivo recomendados por Pitt (1979). **106.** Colonias en G25N, 7 días en la oscuridad, a la derecha *P. corylophilum*, $\times 0.5$. **107.** Colonias en agar Czapek a 25 °C, 7 días en la oscuridad, $\times 0.5$. **108.** Colonias en agar extracto de malta a 25 °C, 7 días en la oscuridad, $\times 0.5$. **109, 110.** Penicilos teñidos con azul de algodón en ácido láctico, $\times 670$, $\times 670$. **111.** Penicilos, $\times 670$. **112.** Conidiosporas esféricas, $\times 4\ 000$.

Fotomicrografía con microscopía de contraste de fases 110 y con microscopía electrónica de barrido 111, 112.



Figs. 113-116. Hongo no identificado. **113.** Colonia en EMA con agua de mar (izquierda) y en EMA sin agua de mar (derecha), a 25 °C 10 días en la oscuridad, $\times 0.4$. **114.** Colonia en V8A con agua de mar, a temperatura ambiente 7 días, $\times 0.5$. **115, 116.** Hifas teñidas con azul de algodón en ácido láctico, $\times 100$, $\times 1\ 000$.

5 Discusión

5.1 Micobiota asociada a *Pacifigorgia* sp.

De un total de 172 aislamientos, se obtuvieron doce hongos diferentes del coral *Pacifigorgia* sp. del arrecife de las Islas Marietas. En una investigación similar a la que aquí se presenta, Kendrick *et al.* (1982) reportaron 20 hongos a partir de 15 especies diferentes de corales hermatípicos en 4 localidades. Por los resultados preliminares que se obtuvieron, es probable que exista una diversidad fúngica alta en el arrecife de las Islas Marietas.

Tres de los doce hongos que se obtuvieron en el arrecife de las Islas Marietas se identificaron solamente hasta el nivel de género, debido a que sus características no coincidieron con ninguna de las descripciones de las especies conocidas, la presencia de dichas características distintivas podrían ser el resultado de adaptaciones al ambiente marino o bien, tratarse de nuevas especies. Este problema taxonómico también se ha presentado en otros estudios sobre los hongos de los arrecifes. Kendrick *et al.* (1982) dejó hasta nivel de género 2 de los 20 hongos que registró en su trabajo y Morrison-Gardiner (2002) reportó hasta nivel de género todos los hongos de su estudio.

La especie más abundante en el arrecife de las Islas Marietas fue *Aspergillus terreus* con 55.81 % y la especie menos abundante fue *Penicillium citrinum* con 0.58 %. Cinco de los 12 hongos que se aislaron pertenecen al grupo *Aspergillus* con 4 anamorfos y un teleomorfo: *A. japonicus*, *A. ochraceus*, *A. terreus*, *A. versicolor* y *Emericella* sp., respectivamente. *Penicillium* spp. se ha aislado frecuentemente del tejido necrosado de

gorgónidos recolectados en la Gran Barrera Arrecifal de Australia. *Penicillium* sp. es un hongo terrestre muy común, pero también es frecuente encontrarlo en ambientes marinos (Morrison-Gardiner, 2002).

No existen registros en la literatura de ninguno de los hongos que se encontraron en *Pacifigorgia* sp. del arrecife de las Islas Marietas, por lo que los resultados de este estudio constituyen una contribución importante al conocimiento de la micobiota mexicana y mundial, porque se registran por primera vez en México los géneros *Acremonium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Emericella*, *Epicoccum* y *Penicillium* en gorgónidos. Recientemente, se aislaron *Aspergillus niger*, *A. terreus*, *A. flavus*, *Trichoderma* sp. y *Penicillium* spp. del tejido sano y enfermo de *Gorgonia* sp. en los arrecifes de Puerto Rico siendo el más abundante *A. terreus* y no se obtuvo *A. sydowii* (com. pers.); estos resultados son similares a los obtenidos en el arrecife de las Islas Marietas. Es importante mencionar que en los corales gorgónidos solamente se encuentra registrado el género *Aspergillus*. En este trabajo de tesis se registraron *A. terreus*, *A. japonicus*, *A. ochraceus* y *A. versicolor* de *Pacifigorgia* sp. lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos en otras investigaciones. Sin embargo, en la presente investigación no se obtuvo *A. sydowii* que se ha registrado en gorgónidos por varios autores. Smith *et al.* (1996) registraron *A. sydowii* de *Gorgonia ventalina* y *G. flabellum* en los arrecifes de Bahamas, Islas Vírgenes Británicas, Curacao y Trinidad. Geiser *et al.* (1998) reportó *A. sydowii* como causante de la aspergilosis de *Gorgonia ventalina* en Saba, Trinidad, los Cayos de Florida, San Salvador y Bahamas. Kim y Harvell (2002) aislaron *A. sydowii* de *Gorgonia ventalina* en los Cayos de Florida. En Akumal, México, Bruno *et al.* (2003) a través de los síntomas característicos de la aspergilosis que consiste en la pigmentación púrpura de los escleritos, reportaron la presencia de *A. sydowii* en *Gorgonia ventalina*. En un trabajo más detallado Smith y Weil

(2004) aislaron *A. sydowii* de octocorales gorgónidos enfermos como *Pseudoterogorgia americana*, *Gorgonia mariae*, *Plexaura flexuosa*, *Pseudoplexaura porosa* y *Plexaurella nutans* en varios arrecifes del mar Caribe. Por otra parte, de los corales hermatípicos, conocidos también como corales pétreos, Kendrick *et al.* (1982), reportaron la especie *Aspergillus versicolor* (que se aisló en este trabajo de tesis de *Pacifigorgia* sp.) de *Acropora hyacinthus*, *Acropora* sp., *Goniastrea retiformis*, y de *Porites australensis*; los mismos autores reportaron otros hongos como *Acremonium* sp., *Asteromella* sp., *Aspergillus restrictus*, *Bipolaris rostrata*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium expansum*, *P. godlewskii*, *P. restrictum*, *P. stoloniferum* de las islas Barbados, Lizard, Heron y Rarotonga localizadas en el Caribe y en el Pacífico sur. Morrison-Gardiner (2002) aisló *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. de varios cnidarios sin especificar los taxa. En el mismo trabajo también se aislaron hongos de otros organismos de varios ambientes arrecifales en Australia. *Emericella* no se ha reportado en corales; pero sí se ha aislado de moluscos (Nielsen *et al.*, 1999), medusas (Malmstrom, 1999) y granos de arena (Nicot, 1958). Los ascomicetes encontrados en corales son *Coralicolla nana*, *Halographis runica*, *Koralionastes angustus*, *K. giganteus*, *K. ellipticus*, *K. ovalis*, *K. violaceus*, *Lulworthia calcicola* y *Xenus lithophylli* (Kohlmeyer y Volkmann-Kohlmeyer, 1987, 1988, 1989, 1990, 1992; Volkmann-Kohlmeyer y Kohlmeyer, 1992).

Aspergillus sydowii es el agente causal de la enfermedad conocida como aspergilosis de los abanicos de mar, que ha ocasionado una mortalidad severa de los corales principalmente del género *Gorgonia* en varios arrecifes del mar Caribe. En el arrecife de las Islas Marietas no se encontró *A. sydowii*, sin embargo, se aisló *A. versicolor*. Como resultado de los avances recientes sobre la taxonomía del género *Aspergillus*, la

determinación de las especies de *Aspergillus* del grupo versicolor que se han aislado de los corales enfermos no es clara. Tradicionalmente, en el grupo versicolor se encuentran las especies *A. versicolor* y *A. sydowii*, sin embargo, estudios actuales con base en el análisis de las secuencias de los genes de la unidad ribosomal pequeña 18S y de la parte de los 485-pares de bases de la región 5' no translocada de los genes *trpC*, se encontró que ciertos aislamientos de *A. sydowii*, *A. versicolor* y *Emericella* (uno de los teleomorfos del género *Aspergillus*) se encuentran muy cercanos filogenéticamente. Otro resultado muy interesante que obtuvo Geiser *et al.* (1998) al comparar las secuencias de uno de los aislamientos de *A. sydowii* del tejido de los corales enfermos es que dicha especie resultó muy cercana filogenéticamente (96 %) a *A. fumigatus*, que es una especie patógena de los animales y del hombre. Existe una diferencia importante entre las cepas marinas y terrestres de *A. sydowii*. Las cepas provenientes del medio terrestre no infectaron el coral, mientras que las cepas aisladas del coral enfermo en el medio marino sí fueron patógenas al reinocularse en corales sanos (Alker *et al.*, 2001). También la susceptibilidad para contraer la enfermedad varía en las diferentes especies de corales. En un arrecife de las Bahamas se observó que *Gorgona ventalina* fue más susceptible a la aspergilosis que *G. flabellum* (Smith y Weil, 2004).

Análisis microscópicos y microbiológicos en el Caribe, revelaron que el tejido de coral enfermo siempre contiene hifas, mientras que en el tejido sano, no hay hifas (Smith *et al.*, 1996). Estas hifas pueden ser de un complejo de especies de hongos; algunas especies de dicho complejo podrían ser facultativas, mientras que otras obligadas y como en este estudio se obtuvo un aislamiento que únicamente formó micelio estéril, se podría pensar que se trata de un hongo marino estrechamente asociado a *Pacifigorgia* sp., mientras que

los otros hongos que formaron estructuras reproductivas probablemente sean especies marinas facultativas.

Los hongos marinos presentan una adaptación a la temperatura de su ambiente que va de 15 a 25 °C (Kohlmeyer y Kohlmeyer, 1979). Los aislamientos de *Aspergillus* y *Penicillium* que se obtuvieron del tejido de *Pacificorgia* sp. del arrecife de las Islas Marietas no se desarrollaron a 37 °C, lo cual podría explicarse como una posible adaptación a la temperatura registrada en dicho arrecife que fue de 28 °C.

Aunque *Alternaria*, *Cladosporium* y *Epicoccum* son hongos que comúnmente se encuentran en el ambiente terrestre existen muchos reportes sobre la presencia de estos géneros en diferentes ambientes marinos (Sutherland, 1916; Roth *et al.*, 1964; Kohlmeyer y Kohlmeyer, 1979; Kendrick *et al.*, 1982; Kohlmeyer y Volkmann Kohlmeyer, 1991; Jadulco *et al.*, 2001; Morrison-Gardiner, 2002). En este trabajo *Alternaria* sp. y *Epicoccum* sp. no completaron su ciclo de vida es decir, no produjeron conidiosporas en medios de cultivo sin agua de mar, ni sometidos a choques térmicos, de nutrientes y de luz, en el caso de *Epicoccum* sp. se observó un desarrollo abortivo de las conidiosporas en un medio sin agua de mar y *Alternaria* sp. únicamente desarrolló micelio estéril. Lo anterior nos puede sugerir que aunque son hongos de origen terrestre se encuentran muy adaptados al medio marino. Varias especies de *Cladosporium* son muy comunes en ambientes terrestres, de agua dulce y marinos; en este último se asocian con algas y con holotúridos produciendo sustancias proteolíticas en los tractos digestivos, se hipotetiza que *Cladosporium* sp. era un posible patógeno pero tomó la acción de simbiote ayudando al holotúrido en la producción de enzimas digestivas (Morrison-Gardiner, 2002). *Alternaria* sp. ha sido aislado de una gran variedad de hospederos marinos, agua de mar, raíces de mangle y algas (Domsch *et al.*, 1993). Hyde *et al.* (2000) mencionan que el phylum predominante de hongos en el

medio marino es el Ascomycota, lo que está de acuerdo con los resultados de este trabajo, ya que se encontró un ascomicete, y todos los anamorfos que se registraron pertenecen a dicho phylum.

5.2 Controles de la investigación

Los resultados de los estrictos controles positivo y negativo así como el análisis del aire del laboratorio donde se trabajó, mostraron que las cepas que se obtuvieron provienen del tejido de *Pacifigorgia* sp. y no se trata de hongos contaminantes, ni del agua de mar. Con el control negativo se demostraron de manera clara las condiciones de esterilidad del proceso y del material utilizado, mientras que los resultados del control positivo demostraron la eficiencia del método ya que al final del proceso se obtuvo el hongo testigo *Aspergillus fumigatus*, lo que significa que la metodología aplicada para aislar la micobiota fue la adecuada. Se eligió *A. fumigatus* para el control positivo porque la secuencia de la subunidad ribosomal 18s es casi idéntica a *A. sydowii*, el cual es causante de una gran mortalidad en especies de coral como *Gorgonia ventalina* (Geiser *et al.*, 1998).

Este estudio fue preliminar porque es la primera vez que se aplica la metodología de Morrison-Gardiner (2002) para estudiar los arrecifes mexicanos y se desconocía que resultados se iban a obtener. Se tomó una muestra pequeña compuesta por seis submuestras de *Pacifigorgia* sp. debido a que la zona de estudio está protegida debido al impacto de las actividades turísticas (lanchas, barcos, buceo, esnorqueleo).

6 Conclusiones

- En *Pacifigorgia* sp. del arrecife de las Islas Marietas prevaleció la dominancia de los hongos mitospóricos o anamorfos por las adaptaciones morfológicas y fisiológicas de éstos al medio marino, lo que permite su supervivencia y crecimiento.
- Los 11 nuevos registros de hongos marinos para México asociados a *Pacifigorgia* sp. en el arrecife de las Islas Marietas, Bahía de Banderas fueron: *Acremonium fusidioides*, *Alternaria* sp., *Aspergillus japonicus*, *A. ochraceus*, *A. terreus*, *A. versicolor*, *Cladosporium cladosporioides*, *Emericella* sp., *Epicoccum* sp., *Penicillium citrinum* y *P. corylophilum*.
- Las especies más abundantes fueron *Aspergillus terreus* y *Cladosporium cladosporioides* las cuales representan el 75 % de la abundancia total registrada.
- El mayor número de especies encontradas pertenecen al género *Aspergillus*, con 4 anamorfos y un teleomorfo, lo que era de esperarse porque este género es el que se encuentra registrado como característico de los corales.
- Aunque la muestra fue pequeña y se estudió solamente un coral, se obtuvo un número mayor de hongos que el registrado en otros trabajos en los que se analizó una muestra más grande y varios corales por lo que se sospecha que la micodiversidad existente en el arrecife de las Islas Marietas en el litoral del Pacífico mexicano podría ser alta.
- El empleo del método Morrison-Gardiner (2002) modificado se aplicó de manera correcta, ya que todos los hongos que se obtuvieron están registrados de los corales de los arrecifes.

- Existe una gran diversidad en los arrecifes coralinos, son ecosistemas muy complejos con un gran potencial de aplicación biotecnológica, farmacéutica, cosmética, etc; sin embargo, a nivel mundial son ambientes que se encuentran poco estudiados por los micólogos marinos; por lo que es necesario continuar con este tipo de estudios en los arrecifes de México.
- Aunque estos resultados son preliminares sirven como base para realizar futuras investigaciones y evaluaciones para conocer el rol ecológico que juegan estos hongos en el coral y en la comunidad arrecifal.

7 Literatura citada

- Afiyatulloev SS, Kuznetsova TA, Isakov VV, Pivkin MV, Prokofeva NG, Elayakov G.B. 2000. New diterpenic altrosides of the fungus *Acremonium striatisporum* isolated from a sea cucumber. *Journal of Natural Products* 63:848-850.
- Alker AP, Smith GW, Kim K. 2001. Characterization of *Aspergillus sydowii* (Thom *et* Church), a fungal pathogen of Caribbean sea fan corals. *Hydrobiologia* 460:105-111.
- Altizer S, Harvell D, Friedle E. 2003. Rapid evolutionary dynamics and disease threats to biodiversity. *Trends in Ecology and Evolution* 18:589-596.
- Anónimo. 2003. Saving the rainforest of the seas. *Solutions, Environmental Defense* 34:4-6.
- Barghoorn ES, Linder DH. 1944. Marine fungi: their taxonomy and biology. *Farlowia* 1:395-467.
- Barnett HL, Hunter BB. 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 4th ed. USA: APS Press. 218 p.
- Bills G, Polishook J. 1994. Abundance and diversity of microfungi in leaf litter of a lowland rain forest in Costa Rica. *Mycologia* 86:187-198.
- Blakeslee AF. 1915. Linder's roll tube method of separation cultures. *Phytopathology* 5:68-69.
- Bruno JF, Petes LE, Harvell CD, Hettinger A. 2003. Nutrient enrichment can increase the severity of coral diseases. *Ecology Letters* 6:1056-1061.
- Carriquiry JD, Reyes- Bonilla H. 1997. Community structure and geographic distribution of the coral reefs of Nayarit, Mexican Pacific. *Ciencias Marinas* 23:227-248.
- Cupul-Magaña FG. 1998. ¿Quién es la Bahía de Banderas? *Divulgare (Universidad Autónoma de Baja California)*: 21:48-52.
- Cupul-Magaña FG, Aranda OS, Medina P, Vizcaíno V. 2000. Comunidades coralinas de las Islas Marietas, Bahía de Banderas, Jalisco-Nayarit, México. *Mexicoa* 2:15-22.

- De La Lanza EG, Cáceres C. 1994. Lagunas costeras y el litoral mexicano. *Mexicoa* 2:64-68.
- Domsch KH, Gams W, Anderson TH. 1993. Compendium of soil fungi. Germany: IHW Verlag. 859 p.
- Dube D, Kim K, Alker AP, Harvell CD. 2002. Size structure and geographic variation in chemical resistance of sea fan corals *Gorgonia ventalina* to a fungal pathogen. *Marine Ecology Progress Series* 231:139-150.
- Ellis MB. 1971. Dematiaceous hyphomycetes. England: CAB. 608 p.
- Endler JA. 1986. Natural selection in the wild. New Jersey, United States of America: Princeton University Press. 336 p.
- Eriksson OE. (ed). 2005. Outline of Ascomycota-2005. *Myconet* 11:1-13.
- Gams W, Christensen M, Onions AH, Pitt JI, Samson RA. 1985. I. Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In: Samson RA, Pitt JI, eds. *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics*. New York: USA: Plenum Press. p 55-62.
- Geiser DM, Taylor JW, Ritchie KB, Smith GW. 1998. Cause of sea fan death in the West Indies. *Nature* 394:137-138.
- González MC, Hanlin R, Ulloa M. 2001. A checklist of higher marine fungi of Mexico. *Mycotaxon* 80:241-253.
- Guzmán, G. 1998. Inventorying the fungi of Mexico. *Biodiversity and Conservation* 7:369-384.
- Hanlin RT. 1998. Illustrated genera of ascomycetes. St. Paul Minnesota, USA: APS Press. 258 p.
- Hawksworth DL. 2003. Aspergillosis in sea fans. *Mycological Research* 107:129-130.
- Ho MHM. 1999. *Cladosporium* and *Cladophialophora* in culture: descriptions and an expanded key. *Mycotaxon* 72:115-157.

- Höller U, Wright AD, Matthée GF, König GM, Draeger S, Aust HJ, Schultz B. 2000. Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. *Mycological research* 104:1354-1365.
- Hughes GC. 1975. Studies of fungi in oceans and estuaries since 1961. I. Lignicolous, caulicolous and foliicolous species. *Oceanographic Marine Biology Annual Reviews* 13:69-180.
- Hyde, KD. 1989. Ecology of tropical marine fungi. *Hydrobiologia* 178:199-208.
- Hyde KD. 1996. Marine Fungi. In: Orchard AE, eds. *Fungi of Australia, Volume 1B*. Australian Biological Resources Study, Canberra, Australia: p 39-64.
- Hyde KD, Sarma VV, Jones EBG. 2000. Morphology and taxonomy of higher marine fungi. In: Hyde KD, Pointing SB, eds. *Marine mycology a practical approach*. Hong Kong, China: Fungal Diversity Press. p 172-204.
- (ICPA) International Commission on *Penicillium* and *Aspergillus*. 2002. *Aspergillus* Reference Cultures. www.cbs.knaw.nl/ICPA/ICPA.HTM.
- Jadulco R, Proksch P, Wray V, Sudarsono BA, Gräfe U. 2001. New macrolides and furan carboxylic acid derivative from the sponge-derived fungus *Cladosporium herbarum*. *Journal of Natural Products* 64:527-530.
- Johnson TW, Sparrow K. 1961. *Fungi in oceans and estuaries*. New York, USA: Weinheim. 668 p.
- Kendrick B, Risk, MJ, Michaelides J, Bergman K. 1982. Amphibious microborers: bioeroding fungi isolated from live corals. *Bulletin of Marine Science* 32:862-867.
- Kim K, Harvell CD, Kim PD, Smith GW, Merkel SM. 2000a. Fungal disease resistance of Caribbean sea fan corals (*Gorgonia* spp.). *Marine Biology* 136:259-267.
- Kim K, Kim PD, Alker AP, Harvell CD. 2000b. Chemical resistance of gorgonian corals against fungal infections. *Marine Biology* 137:393-401.

- Kim K, Harvell CD. 2002. Aspergillois of sea fan corals: disease dynamics in the Florida Keys. In: Porter JW, Porter KG, eds. The Everglades, Florida Bay and coral reefs of the Florida Keys: an ecosystem sourcebook. USA; CRC Press. p. 813-824.
- Klich MA. 2002. Identification of common *Aspergillus* species. Wageningen, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures. 116 p.
- Kohlmeyer J. 1968. Marine fungi from the tropics. *Mycologia* 60:252-270
- Kohlmeyer J. 1974. On the definition and taxonomy of higher marine fungi. *Veröffentlichungen des Instituts für Meeresforsch Bremerhaven, Supplement*. 5:339-356.
- Kohlmeyer J, Kohlmeyer E. 1979. Marine mycology: the higher fungi. New York, USA: Academic Press. 690 p.
- Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B. 1987. Koralionastetaceae *Fam. Nov.* (Ascomycetes) from Coral Rock. *Mycologia* 79:764-778.
- Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B. 1988. *Halographis* (Opegraphales), a new endolithic lichenoid species from corals and snails. *Canadian Journal of Botany* 66:1138-1141.
- Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer, B. 1989. A new *Lulworthia* (Ascomycotina) from corals. *Mycologia* 81:289-292.
- Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B. 1990. New species of *Koralionastes* (Ascomycotina) from the Caribbean and Australia. *Canadian Journal of Botany* 68:1554-1559.
- Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B. 1991. Illustrated key to the filamentous higher marine fungi. *Botanica Marina* 34:1-61.
- Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B. 1992 Two Ascomycotina from coral reefs in the Caribbean and Australia. *Cryptogamic Botany* 2:367-374.

- Kornerup A, Wanscher JH. 1978. Methuen handbook of colours. 3rd ed. London, United Kingdom: Eyre Methuen. 252 p.
- Le Campion-Alsumard T, Golubic S, Priess K. 1995. Fungi in corals: symbiosis or disease? Interaction between polyps and fungi causes pearl-like skeleton biomineralization. Marine Ecology Progress Series 117:137-147.
- Malmstrom J. 1999. Unguisins A and B: New cyclic peptides from the marine derived fungus *Emericella unguis*. Journal of Natural Products 62:787-789.
- Michalek-Wagner K, Willis BL. 2001. Impacts of bleaching on the soft coral *Lobophytum compactum*. I. Fecundity, fertilization and offspring viability. Coral Reefs 19:231-239.
- Moore JC, de Ruiter PC. 1991. Temporal and spatial heterogeneity of trophic interactions within below-ground food webs. Agriculture, Ecosystems and Environment 34:371-397.
- Morrison-Gardiner S. 2002. Dominant fungi from Australian coral reefs. Fungal Diversity 9:105-121.
- Mullen KM, Peters EC, Harvell CD. 2004. Coral resistance to disease. In: Rosenberg E, Loya Y, eds. Coral health and disease. Germany: Springer-Verlag. p 377-399.
- Nagelkerken I, Buchan K, Smith GW, Bonair K. 1997. Widespread disease in Caribbean sea fans: I. Spreading and general characteristics. Proceedings in the 8th International Coral Reef Symposium 1:679-682.
- Nicot J. 1958. Quelques micromycètes des sables littoraux. Bulletin Trimestrielle de la Société de Mycologie Française 74:221-235.
- Nielsen J, Nielsen PH, Frisvad JC. 1999. Fungal depside, guisinol, from a marine derived strain of *Emericella unguis*. Phytochemistry 50:263-265.

- Petes LE, Harvell CD, Peters EC, Webb MAH, Mullen KM. 2003. Pathogens compromise reproduction and induce melanization in Caribbean sea fans. *Marine Ecology Progress Series* 264:167-171.
- Pitt JI. 1973. An appraisal of identification methods for *Penicillium* species: novel taxonomic criteria based on temperature and water relations. *Mycologia* 65:1135-1157.
- Pitt JI. 1979. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. London, United Kingdom: Academic Press Inc. 634 p.
- Pitt JI, Hocking AD. 1997. Fungi and food spoilage. 2nd ed. London, United Kingdom: Blackie Academic & Professional. 456 p.
- Pitt JI, Samson RA, Frisvad, JC. 2000. List of accepted species and their synonyms in the family Trichocomaceae. In: Samson RA, Pitt JI, eds. Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. United Kingdom: Academic Publishers. p 9-49.
- Pivkin MV. 2000. Filamentous fungi associated with holothurians from the sea of Japan, off the Primorye Coast of Russia. *Biological Bulletin* 198:101-109.
- Rand TG, Bunkley-Williams L, Williams EH. 2000. A hyphomycete fungus, *Paecilomyces lilacinus*, associated with wasting disease in two species of Tilapia from Puerto Rico. *Journal of Aquatic Animal Health* 12:149-156.
- Raper KB, Fennell DI. 1965. The genus *Aspergillus*. Baltimore, USA: Robert E. Krieger Publishing Company. 686 p.
- Roth FJ, Orpurt PA, Ahearn DG. 1964. Occurrence and distribution of fungi in a subtropical marine environment. *Canadian Journal of Botany* 42:375-383.
- Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC. 2004. Introduction to food-and airborne fungi. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures. 389 p.

- Santavy DL. 1995. The diversity of microorganisms associated with marine invertebrates and their roles in the maintenance of ecosystems. In: Allsopp D, Colwell RR, Hawksworth DL, eds. Microbial diversity and ecosystem function. United Kingdom: CAB International. Wailingford. p 211-229.
- Smith GW, Ives LD, Nagelkerken IA, Ritchie KB. 1996. Caribbean sea-fan mortalities. *Nature* 383:487.
- Smith GW, Weil E. 2004. Aspergillosis of gorgonians. In: Rosenberg E, Loya Y, eds. Coral health and disease. Germany: Springer Verlag. p 279-287.
- Sutherland GK. 1916. Marine Fungi Imperfecti. *New Phytologist* 15:35-48.
- Szmant AM, Gassman NJ. 1990. The effects of prolonged bleaching on the tissue biomass and reproduction of the coral *Montastrea annularis*. *Coral Reefs* 8:217-224.
- Ulloa M, Herrera T. 1994. Etimología e iconografía de géneros de hongos. México: Instituto de Biología, UNAM. 300 p.
- Volkman-Kohlmeyer B, Kohlmeyer J. 1992 *Corallicola nana* gen. & sp. nov. and other ascomycetes from coral reefs. *Mycotaxon* 44:417-424.
- Weil E, Smith G. 2003. Scleractinian and octocoral disease Caribbean-wide. In: Kasim Moosa MK, Soemodihardjo S, Nontji A, Soegiarto A, Romimohtarto K, Sukarno A, Suharsono G, eds. Proceedings of the 9th International Coral Reef Symposium. Indonesia, October 23-27, 2000. Indonesian Institute of Sciences.

Apéndice 1. Hoja de datos para la identificación de especies de *Aspergillus*.

Características macroscópicas

	CYA25	EMA	CYA37	CY20S
Diámetro				
Colores				
Conidiosporas				
Micelio				
Exudado				
Reverso				
Pigmentos solubles				
Cleistotecios/ esclerocios				

Características microscópicas

Pie: Largo _____
Ancho _____
Textura _____

Vesícula: Diámetro _____
Forma _____

Seriación : uniseriado/ biseriado

Conidiosporas: Largo _____
Forma _____
Textura de la superficie _____

Cleistotecios/Esclerocios : Diámetro _____
Forma _____
Color _____
Superficie de las células- hifas/ parénquima

Ascosporas : Días de maduración _____
Largo _____
Ancho _____
Textura de la superficie _____

Apéndice 2. Hoja de datos para la identificación de especies de *Penicillium*.

Penicillium

No.

Hábitat :

Características macroscópicas

CYA: 0 4 8 12 15 20 25 28 30 35 40 50 70 mm

colonia: esparcida, medio, densa; plana, sulcado, convoluto

micelio: velutino, flocoso, funiculado, fasciculado, coremiforme, sinematoso

sinemas formados en: luz UV; a los 7 14 21 días; altura 3 5 10 + mm.

márgenes: entero, irregular

exudado:

pigmentos solubles:

reverso:

EMA: 0 4 8 12 15 20 25 30 35 40 45 50 70 mm

colonia: esparcida, medio, densa; plana, sulcado, convoluto

micelio: velutino, flocoso, funiculado, fasciculado, coremiforme, sinematoso

sinemas formados en: luz UV; a los 7 14 21 días; altura 3 5 10 + mm.

márgenes: entero, irregular

exudado:

pigmentos solubles:

reverso:

G25N: 3 5 6 8 10 12 14 16 18 20 22 26 mm

colonia: esparcida, medio, densa; plana, sulcado, convoluto

micelio: velutino, flocoso, funiculado, fasciculado, coremiforme, sinematoso

márgenes: entero, irregular

exudado:

pigmentos solubles:

reverso:

5°C: 0 1 2 3 4 5 6 mm

micelio:

reverso:

37°C 0 4 7 10 15 20 25 30 35 40 50 70 mm.

colonia: esparcida, medio, densa; plana, sulcado, convoluto

micelio: velutino, flocoso, funiculado, fasciculado, coremiforme, sinematoso

exudado:

pigmentos solubles:

reverso:

Características microscópicas

Conidióforos:

ornamentación:

Pies: 7 10 15 20 30 40 60 80 100 150 200 300 400 500 800 1000 μm
 \times 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 5 6 μm lisos rugosos

Penicilio : monoverticilado biverticilado terverticilado cuadvverticilado

Rami :

Métulas :

Fiálides : ampuliformes acerosas cilíndricas; 1 3 4 5 6 8 10 12 16
4.5 5 6 7 8 9 10 12 15 18 20 \times 1.5 2 2.5 3 3.5 4 μm

Colula: corta larga truncada cónica

Conidiosporas: esféricas subesféricas elipsoidales cilíndricas fusiformes piriformes
apiculado

2 2.5 3 3.5 4 4.5 5 6 7 \times 1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 5 μm
lisas rugosas verrugoso espinuloso estriado cadenas: desordenadas
columnas