



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

COMPARACIÓN DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS DE DOS CORALES
ESCLERACTINIOS AFECTADOS POR SÍNDROMES EN AKUMAL, QUINTANA
ROO, MÉXICO.

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:
YOLITZIN RODRÍGUEZ GALLARDO

TUTOR PRINCIPAL
DRA. ALEJANDRA PRIETO DAVÓ
(FACULTAD DE QUÍMICA)

EN SU CASO, MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. MARÍA LETICIA ARENA ORTIZ
(FACULTAD DE CIENCIAS)
DR. JORDAN DAHLGREN ERIC
(INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA)
DRA. THOMÉ ORTIZ PATRICIA ELENA
(INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA)
DR. JOAQUÍN RODRIGO GARZA PÉREZ
(FACULTAD DE CIENCIAS)

MÉXICO, D. F. ENERO 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología

Universidad Nacional Autónoma de México



**“COMPARACIÓN DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS DE DOS CORALES
ESCLERACTINIOS AFECTADOS POR SÍNDROMES EN AKUMAL, QUINTANA
ROO, MÉXICO.”**

T E S I S

Que para obtener el grado académico de:

MAESTRA EN CIENCIAS

Presenta:

YOLITZIN RODRÍGUEZ GALLARDO

Director de Tesis: Dra. Alejandra Prieto Davó

Comité tutorial: Dra. María Leticia Arena Ortiz

Dr. Jordan Dahlgren Eric

Dra. Thomé Ortiz Patricia Elena

Dr. Joaquín Rodrigo Garza Pérez

12 de Enero de 2016 [Rodríguez-Gallardo Y. 2016]

Índice

GLOSARIO	5
INTRODUCCIÓN	6
ARRECIFES DE CORAL	6
VISIÓN CONTEMPORÁNEA DEL ESTUDIO DE LOS ARRECIFES CORALINOS	7
DAÑOS EN CORALES (SÍNDROMES O ENFERMEDADES)	8
EFECTO DE LOS SÍNDROMES CORALINOS	11
SÍNDROMES EN EL CARIBE	12
<i>Mancha Negra (MN)</i>	13
ANTECEDENTES.....	15
MICROORGANISMOS EN LESIONES DE CORALES.	15
<i>Virus</i>	15
<i>Protistas</i>	16
<i>Hongos</i>	16
<i>Bacterias</i>	18
MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN (DE MICROORGANISMOS).....	21
JUSTIFICACIÓN.....	23
HIPÓTESIS	24
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
ZONA DE ESTUDIO	25
<i>Akumal, Q. Roo.</i>	25
TRABAJO DE CAMPO	26
<i>Colecta de muestras</i>	26
TRABAJO DE LABORATORIO	28
<i>Extracción de ADN</i>	28
<i>Determinación de concentración de ADN.</i>	29
<i>PCR</i>	31
<i>Muestra H</i>	32
<i>Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización (DGGE por sus siglas en inglés)</i>	33
<i>Análisis de la comunidad</i>	33
<i>Selección de bandas para secuenciar</i>	35
<i>Secuenciación</i>	35
<i>El análisis de las secuencias</i>	36
RESULTADOS.....	36
EXTRACCIÓN DE ADN Y PCR	36
PCR	39
<i>Bacterias</i>	39
<i>Muestra H</i>	41

<i>Hongos</i>	41
DGGE (DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS).....	43
<i>Bacterias</i>	43
<i>Hongos</i>	50
.....	54
<i>Comparación de comunidades microbianas entre especies de coral</i>	55
DISCUSIÓN	61
EXTRACCIÓN DE ADN	61
PCR	61
<i>Bacterias</i>	61
<i>Hongos</i>	62
DGGE	63
<i>Bacterias</i>	63
<i>Identificación de bacterias en corales</i>	67
<i>Hongos</i>	68
<i>Comparación de comunidades microbianas entre especies de coral</i>	69
CONCLUSIONES	72
APÉNDICE	73
AGRADECIMIENTOS	75
REFERENCIAS	76

Glosario

Abundancia relativa.- Proporción de cada especie en el número total de individuos de la comunidad (Campbell and Reece 2007)

Riqueza de especies.- Número total de especies diferentes en la comunidad (Campbell and Reece 2007)

Diversidad de especies.- Depende tanto de la riqueza de especies como de la abundancia relativa. La diversidad mide el número de especies en una comunidad (su riqueza) y su abundancia relativa. La comunidad con una abundancia similar de especies es más diversa que una comunidad en la cual una o dos especies son abundantes y el resto es escaso (Campbell and Reece 2007)

Densitometría.- Es un parámetro que calcula la concentración de las muestras, ayudando a determinar las abundancias relativas (Cuello et al. 2013)

Enfermedad.- Cualquier impedimento (interrupción, suspensión, proliferación u otro desorden) de las funciones vitales del cuerpo, sistema u órganos (Sutherland et al. 2004)

Frecuencia.- Número de veces que se repite cada uno de los distintos valores originales (Campbell and Reece 2007)

Holobionte.- Hospedero de comunidades microbianas diversas (Sweet et al. 2010)

Hologenoma.- Es la suma de la información genética del hospedero y de su comunidad microbiana simbiótica (Zilber-Rosenberg and Rosenberg 2008).

Incidencia.- Número de individuos con nuevos casos de una enfermedad durante un periodo específico de tiempo en una población determinada (Sutherland et al. 2004)

Saprófito.- Organismos dependientes de residuos procedentes de otros organismos para su nutrición (Kendrick et al. 1982)

Síndrome.- Conjunto de síntomas característicos de una enfermedad o situación específica que no ha mostrado evidencia de un agente patógeno causante del malestar (<http://lema.rae.es/drae>). Muerte celular extensiva y programada, aparentemente independiente de la colonización de microorganismos patógenos (Ainsworth et al. 2007a).

Prevalencia.- Número de casos de una enfermedad en una población en un tiempo determinado (Sutherland et al. 2004)

Introducción

Arrecifes de coral

Las asociaciones existentes entre corales (holobionte) y microorganismos son complejas y los cambios radicales en esta asociación pueden tener consecuencias graves para la supervivencia de los corales. La diversidad de microorganismos asociados a los corales juega un papel importante en el mantenimiento de la salud de su hospedero. A pesar de que se han identificado microorganismos específicos asociados a lesiones coralinas, aún no es claro el efecto que estos microorganismos tiene sobre la homeostasis de la comunidad microbiana asociada a los corales. Los primeros reportes sobre este tema son contradictorios y ninguno de ellos se ha realizado en nuestro país. Tomando en cuenta la importancia tanto económica como ecológica que tiene para el Caribe Mexicano la salud de su sistema arrecifal, es fundamental reconocer las diferencias entre comunidades microbianas que mantienen un equilibrio ecológico con corales sanos, así como los cambios de diversidad que rompen este equilibrio.

Los arrecifes de coral son ecosistemas marinos someros, definidos por su estructura física y los organismos encontrados en ellos. Tienen geografía única y, aunque solamente ocupan el 0.015% del océano, se calcula que en ellos habitan por lo menos 25% de las especies del océano, considerándose una de las comunidades más diversas del planeta (Spalding et al. 2001). Se encuentran en más de 100 países y ocupan cerca de 284,300 km² de las zonas someras que van de 18 a 27 m en promedio en los mares tropicales (<http://coralreef.noaa.gov>. 2013). (Halfpter and Moreno 2005; Weil et al. 2006a; Hunter et al. 2007).

Los arrecifes de coral están conformados principalmente por corales escleractinios zooxantelados, los cuales se caracterizan por tener una elevada tasa de crecimiento (0.5-4 cm/año) (Mulhall 2008), en comparación con los corales no constructores de arrecifes que en promedio crecen 0-0.2 cm/año (Stoddart 1969; Schuhmacher and Zibrowius 1985). También se caracterizan por poseer en su interior dinoflagelados del genero *Symbiodinium* que, a cambio de protección, proporcionan al coral alimento necesario para sus actividades, desarrollo y crecimiento (Crabbe 2009). Los corales son organismos generalmente coloniales conformados

por varios pólipos interconectados entre sí (Birkeland 1997), que les permite conformar estos ecosistemas que son considerados casi completamente autosuficientes por ser comunidades altamente productivas (Spalding et al. 2001).

Entre los roles fundamentales de los arrecifes, se encuentra el de ser un criadero para un aproximado de 4,000 especies de peces (Burke et al. 2012). También ofrecen beneficios a organismos superiores, incluyendo al humano, tales como: barrera protectora de oleaje y tormentas que causarían erosión y daños a las costas, tanto en asentamientos humanos, como en espacios de recreación que se aprovechan para turismo permitiendo una entrada económica sustentable para estas zonas (Birkeland 1997). Más aún, los corales son fuente para la obtención de medicamentos como anticoagulantes, agentes anticancerígenos, prostaglandinas y el más reciente descubrimiento de proteínas con actividad antagonista contra el virus HIV (<http://www.sciencedaily.com/releases/2014/04/140429092649.htm>) por lo que, en los últimos años, los arrecifes coralinos han despertado el interés para el sector salud (Kim et al. 2000; Mayer et al. 2000).

Visión contemporánea del estudio de los arrecifes coralinos

En las últimas dos décadas los arrecifes coralinos han sido el centro de atención de numerosos estudios ya que, debido a la cantidad de bienes y servicios que nos brindan, es necesaria la comprensión de su desarrollo óptimo (Burke et al. 2012). Una de las primeras observaciones que se realizaron fue la importancia del mucus del coral, sustancia generada por los pólipos y que es un importante vínculo entre el holobionte y de su medio circundante (sedimento y agua) y el importante papel que juegan tanto en la estructura de la comunidad microbiana asociada a los corales como en la salud del organismo (S. Raghukumar 1991; Wilson et al. 2012). Esta fina capa de moco coralino que está próxima al agua es importante en el reciclaje de materia orgánica pues, además de capturar microorganismos del medio, permite transformarlos en formas biodisponibles de materia orgánica (MO) (Garren and Azam 2012). De ésta manera, la MO se reintegra al medio y puede seguir circulando cuando el moco se desprende del coral, llevando consigo un microhábitat característico (Krediet et al. 2013). Algunos estudios que se desarrollan en los últimos años son mecanismos de salud en corales, resiliencia de arrecifes

coralinos, cuantificación de la magnitud y variabilidad de flujos de materia orgánica en corales y como ellos responden a perturbaciones, estos estudios son, actualmente, uno de los principales objetos de investigación para la determinación de la microbiota en corales (Ritchie 2006). Más aún, los cambios en la distribución de materia orgánica en la columna de agua afectan directamente a la distribución de la microbiota asociada al coral, incluyendo: bacterias, bacterioplancton, fitoplancton y virus (Patten et al. 2006). Esto se ve reflejado en la variedad de la diversidad de microorganismos en muestras de agua tomadas sobre un transecto de centímetros desde la columna de agua hasta la superficie del coral (Sweet et al. 2011; Weinbauer et al. 2012). Como organismos bentónicos, los corales también están involucrados en el reciclaje de materia orgánica y flujo de nitrógeno hacia sedimentos marinos ya que, en áreas poco profundas, el sedimento puede levantarse en la columna de agua y ayudar a la interacción oportunista entre el bentos, columna de agua y comunidad microbiana del coral (Garren and Azam 2012; Krediet et al. 2013). Como ejemplo basta decir que la comunidad microbiana presente en sedimentos marinos puede degradar hasta el 7% de las partículas atrapadas en el moco de coral en 1 hora (Wild et al. 2004; Garren and Azam 2012).

Estos flujos constantes de materia orgánica demuestran que, en un arrecife de coral, existen interacciones muy fuertes entre todos los organismos que lo habitan, así como variables externas abióticas que influyen sobre éstos, lo cual produce un acoplamiento complejo del sistema (Krediet et al. 2013). Por ello, es de suma importancia entender cómo funcionan los ecosistemas arrecifales a una escala multidimensional y saber cómo se regula el crecimiento de comunidades microbianas para establecer la existencia de dominancias en ciertos nichos, condiciones ambientales determinantes de la mortalidad bacteriana y como todos estos mecanismos se relacionan con estados de salud y enfermedad del arrecife (Porter et al. 2004). El uso de nuevas tecnologías nos permite ampliar la visión que se tenía, hasta hace algunos años, acerca de las interacciones ecológicas en un sistema arrecifal y nos permite incluir estudios sobre una variabilidad de nichos a diferentes escalas para lograr el estudio integral del sistema (Garren and Azam 2012).

Daños en corales (síndromes o enfermedades)

Desde la década de los 60 se ha reconocido la disminución en cobertura de los arrecifes de coral debido a varios factores, entre ellos: la contaminación y el aumento de la temperatura del mar;

ambos factores relacionados con el estrés (Vargas-Angel et al. 2007) y pérdida de las zooxantelas de los corales (algas simbiotes) (Warner et al. 1999). Igualmente la sobrepesca, factor antropogénico que causa la disminución de los controladores de algas (principales competidores de los corales por espacio), y las prácticas de pesca destructiva que causan daño físico a los organismos (Hughes 1994; Adjeroud et al. 2002), provocan un cambio de fase repentino en estos ecosistemas (Hughes et al. 1999).

En las últimas cinco décadas los estudios sobre arrecifes coralinos han registrado decoloración y pérdida de tejido coralino, lo cual se asocia a daños que diezman rápidamente estos ecosistemas (Aronson et al. 2003; Bruno et al. 2007), sin embargo, se conoce poco acerca de sus causas y su relación con agentes causantes (Richardson 1998; Weil 2001). En algunos trabajos, se muestra la presencia de microorganismos como *Clostridium* sp., *Arcobacter* sp., *Campylobacter* sp., *Cytophaga fermentans*, *Cytophaga columnaris* y *Trichodesmium tenue* en lesiones coralinas (Cooney et al. 2002; Frias-Lopez et al. 2002; Pantos and Bythell 2006; Sato et al. 2010; Sweet and Bythell 2012) por lo que se ha propuesto la presencia de algunos de ellos como agentes patógenos causantes de estos daños (Alker et al. 2001; Weil et al. 2006a). Al comprobar que los daños sobre un coral fueron efectivamente causados por un microorganismo específico (ya sea bacteria, ciliado, u hongo) se utiliza el término de "enfermedad" (Sutherland et al. 2004; Rosenberg et al. 2007). Sin embargo, debido a que no ha sido posible asociar todos los daños a algún microorganismo específico se prefiere utilizar el término "síndrome" para describir aquellos daños que presentan un conjunto de síntomas característicos de cierta enfermedad o anomalía (Ainsworth et al. 2007b; Sussman et al. 2008). En el presente trabajo se utilizará el término "síndrome" para describir las lesiones encontradas en los corales afectados. Es necesario mencionar que, debido a la composición fisiológica simple de los corales, éstos no pueden desarrollar una extensa variación de sintomatologías físicas que determinen de primera instancia si las lesiones son causadas por factores bióticos o abióticos y, por consiguiente, si se trata de enfermedad o síndrome (Brusca and Brusca 2003; Ainsworth et al. 2007b; Lesser et al. 2007). En la actualidad se han desarrollado diversos estudios que cuestionan el hecho de que un solo microorganismo sea el causante de la enfermedad, y se estipula, más bien, que la enfermedad sea causada por un consorcio poli microbiano o bien

como una reacción asociada a diversos factores estresantes para el coral (Gil-Agudelo, D.L., Smith and Weil 2006; Sato et al. 2010; Garcia et al. 2013).

En la última década, las nuevas tecnologías para realizar estudios independientes de cultivo han logrado brindar información destacada referida a este tema (Woodley et al. 2008; Amend et al. 2012; Wilson et al. 2012). Dada la disponibilidad de numerosas bases de datos libres y abiertas al público para comparación e identificación (e.g. Gen Bank), la mayoría de estos trabajos se enfocan en las comunidades bacterianas, aunque existen algunos trabajos que describen la presencia de otros microorganismos conformadores del holobionte coralino como protistas (Kramarsky-Winter et al. 2006; Patten et al. 2008), hongos (Le Campion-Alsumard et al. 1995; Golubic et al. 2005; Amend et al. 2012) y virus (Danovaro et al. 2008; Vega Thurber et al. 2008). Sin embargo, son necesarias las investigaciones que generen un panorama integral de la comunidad microbiana para identificar si ésta tiene alguna relación con las afectaciones encontradas en corales (Weil 2001).

Distintos autores difieren en el número de enfermedades y/o síndromes y nivel de daño que puede causar cada uno por lo que la literatura al respecto no es consistente (Tabla 1).

Tabla 1.- Enfermedades / síndromes destacadas del Atlántico occidental, citados en la literatura. Las celdas sombreadas son las enfermedades a las que se les ha podido comprobar los postulados de Koch, junto con blanqueamiento bacteriano por *Vibrio coralliilyticus* y *Vibrio shiloi*, (Modificado de Raymundo, et. al., 2008 y Weil & Hooten, 2008).

Síndrome	Síntoma	Hospedero	Presunta causa	Referencia
Banda Blanca (WBD)	Línea Blanca, Muerte Blanca, Plaga Blanca	Acroporidos	Desconocido: Agregados bacterianos presentes normalmente	Gladfelter, 1977
Banda Blanca tipo II (WBD II)	Banda Blanca tipo II (WBD II)	<i>Acropora cervicornis</i>	Bacteria <i>Vibrio charcharia</i>	Weil, 2004; Smith, 1995; Gil-Agudelo, 2006.
Plaga Blanca	Plaga Tipo II, Plaga Blanca tipo III, Plaga, Enfermedad de Plaga Blanca, enfermedad línea blanca	<i>Diploria stokes</i> + 40 spp. No Acropora plato, y corales masivos	<i>Aurantimonas coralicida</i>	Weil, 2006; Richardson, 1998
Parche Blanco	Viruela Blanca, Parche de Necrosis	<i>A. palmata</i>	<i>Serratia mercenscens</i>	Sutherland, 2004; Patterson, 2002
Banda Negra (BBD)	Línea Negra	24 corales escleratinios, 1 hidrozo 6 gorgonias.	Consorcio microbiano de cianobacterias, <i>Beggiatoa</i> & <i>Desulfovibrio</i>	Antonious, 1973; Rützler, 1983.
Banda Amarilla (YBD)	Mancha Amarilla, Anillo blanqueado, Viruela Amarilla, Banda Amarilla, Banda/Mancha Amarilla.	<i>Orbicella annularis</i> spp., other faviidos, <i>Agaricia agaricites</i>	Posible <i>Vibrio</i> ; Podría ser una afectación de las zooxantelas	Sutherland, 2004; Bruckner, 2006; Cervino, 2004.

Mancha Negra (DSD)	Mancha Negra, Síndrome de Mancha Negra, Enfermedad de Anillo, DSD tipo II, Síndrome de Banda Morada, Bandas Oscuras	<i>O. annularis</i> , <i>O. faveolata</i> , <i>M. cavamosa</i> , <i>Siderastrea sidereal</i> , <i>Stephanocoenia intersepta</i> , <i>A. agaricites</i>	Origen fúngico; asociada con <i>Vibrio</i> spp.	Weil, 2004; Gil-Agudelo, 2004; Gil-Agudelo, 2001; Gochfeld, 2006.
Caribbean ciliate infections (CCI)	Banda de erosión esquelética (SEB)	>10 especies incluyendo <i>Dichocoenia</i> , <i>Orbicella</i> , <i>Acropora</i>	<i>Halofolliculina</i> sp. Ciliado	Weil, 2006; Croquer, 2006
Crecimiento anómalo (GA)	Hyperplasia, Neoplasia, Tumores, Gigantismo, Crecimiento Acelerado, Desarrollo Cahótico de pólipo, Epitelioma Cilicoblastico	<i>Diploria</i> , <i>Colpophyllia</i> , <i>Porites</i> , <i>Orbicella</i> , <i>Agaricia</i> , <i>A. palmata</i> , <i>Dichocoenia</i> , <i>madracis</i> .	Desconocido; Genético o desencadenado por estresores ambientales.	Loya, 1984; Peters, 1986.
Aspergillosis (ASP)	Enfermedad de pluma de mar	<i>Gprgonia</i> spp. y otros 6 octocorales	<i>Aspergillus sydowii</i> hongo	Kim, 2004; Alker, 2001; Negelkerken, 1997a; Negelkerken, 1997b.
Banda Roja (RBD)	Banda Roja (RBD), Banda Roja tipo II	<i>Gorgonia</i> , <i>Colpophyllia</i> , <i>Agaricia</i> , <i>Mycetophyllia</i> , <i>Stephanocoenia</i> ; Tipo II reportada en <i>D. strigosa</i> , <i>O. annularis</i> , <i>M. cavernosus</i> , <i>S. radians</i> , <i>P. asteroides</i>	Consorcio microbiano dominado por Cyanommacteria <i>Schizothrix Mexicana</i> y <i>S. calcicola</i> ; segundo tipo disminuido por dos especies de <i>Oscillatoria</i> .	Rützler, 1983; Santavy, 1997; Richardson, 1992.

Efecto de los síndromes coralinos

En la actualidad se reconoce que los síndromes en corales son un factor de pérdida de cobertura arrecifal importante, con estudios predictivos se ha llegado a la conclusión de que, si las tasas de mortalidad en corales por esta causa siguen en un aumento significativo como se ha demostrado, por ejemplo, en Brasil, se podría generar un declive importante de 50% en la cobertura de coral en los próximos 50 años (Francini-Filho et al. 2008) afectando grandes extensiones e incluso arrecifes completos (Richardson and Aronson 2000; Francini-Filho et al. 2008). Los síndromes coralinos se distribuyen alrededor del mundo y, junto con temperaturas elevadas y contaminación, aceleran el declive de estos ecosistemas y de los organismos que dependen de ellos (Jordán-Dahlgren et al. 2005; Ruiz-Moreno et al. 2012). Por otro lado, aunque los síndromes son reconocidos por la alta mortandad en una especie, pueden ayudar a desarrollar cierta inmunidad en los sobrevivientes que a su vez son los individuos más aptos para repoblar los sitios afectados (Bruckner 2002). Por ésta razón, los síndromes coralinos han sido reconocidos por algunos autores como controladores naturales (Dalton and Smith 2005) puesto que los brotes determinan la estructura y composición de la comunidad arrecifal (Bruckner 1992)

Síndromes en el Caribe

La estandarización de la nomenclatura para la identificación, descripción y diferenciación de los síndromes debe ser relacionada con técnicas de bioquímica, histopatología, microbiología e identificación molecular de cada síndrome para el reconocimiento completo de la misma (Harvell 2007).

Uno de los primeros sitios en donde se evidenciaron síndromes de corales fue el Caribe. Existe un gran número de estudios que señalan una incidencia elevada de síndromes en esta zona convirtiéndola en lo que se conoce como un “hot spot” de síndromes coralinos (Figura 1) (Weil 2001; Bruckner 2002; Willis et al. 2002).

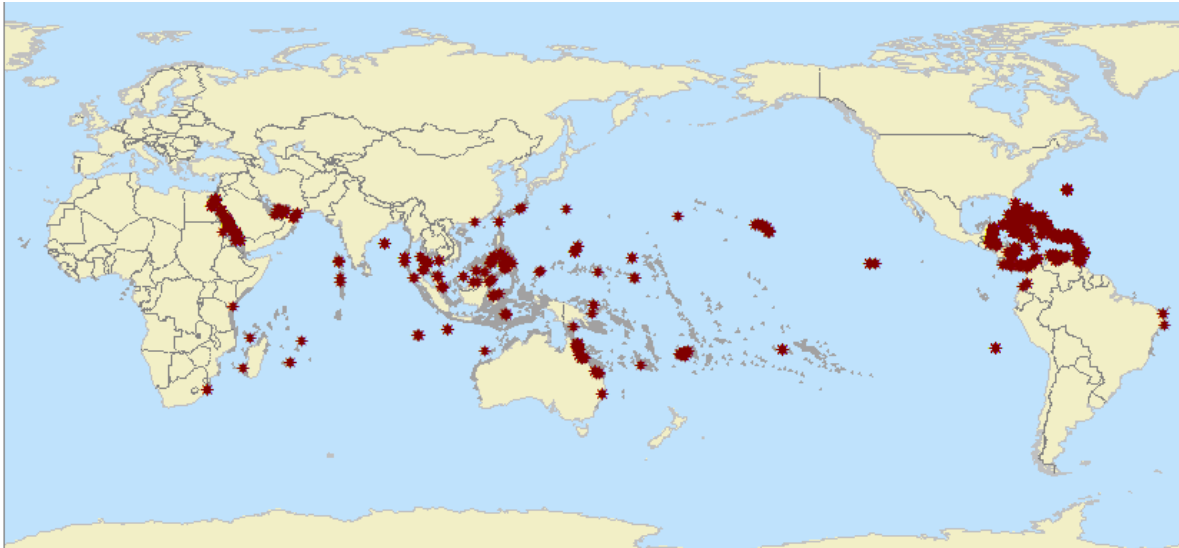


Figura 1.- Síndromes de coral en el mundo, se aprecia al Caribe como “Hot spot” (<http://www.reefbase.org/main.aspx>)

De los 18 síndromes registrados en el mundo, 10 se encuentran en esta región y seis de ellos afectan de manera considerable al Caribe mexicano (Ward et al. 2006; Dubinsky and Stambler 2011). En 2006, un estudio de Ward y colaboradores realizado en la región de Akumak, Quintana Roo, evidenció la presencia de 19 especies de corales pertenecientes a un total de 12 géneros, todas ellas con afectaciones de síndromes coralinos (Ward et al. 2006). De ellos, el más abundante fue Mancha Negra (MN) con un 4.3% de colonias escleractinias afectadas en 2002 y un 2.9% en 2004. En ese mismo año, *Siderasrea siderea*, *Agaricia agaricites* y a el

género *Orbicella* se registraron como las especies más abundantes del área de estudio (Ward et al. 2006). Cabe mencionar que todas estas especies han sido reconocidas por la comunidad científica como portadoras de alguno de los cinco síndromes de corales escleractinios que más afectan al Caribe mexicano (Banda Negra (EBN), Banda Amarilla (EBA), Plaga Blanca (EPB), Banda Blanca (EBB) y EMN) (Bruckner and Bruckner 2006).

Mancha Negra (MN)

Dark Spot Disease (DSD) (Ward et al. 2006) que también es conocida como Enfermedad de Lunares Oscuros (ELO) (García et al. 2002; Raymundo et al. 2008). Se caracteriza básicamente por la aparición de una mancha irregular oscura en la superficie de la colonia y varía en tonalidad y en tamaño (1 - 5 cm) (García and Cróquer 2003). Se sabe que el tamaño de la afectación aumenta con el tiempo y llega a presentar depresión en el tejido y esqueleto coralino (Borneman 2001; Rosenberg and Loya 2004). Ataca principalmente a corales de los géneros *Siderastrea*, y *Orbicella* (Gil-Agudelo et al. 2009) y a las especies *Stephanocoenia intercepta* y *Agaricia agaricites* (Ward et al. 2006; Gil-Agudelo et al. 2009). En ocasiones el daño que se registra puede ocasionar mortandad tisular, con lo que se genera una zona en donde las algas pueden crecer libremente (Rosenberg and Loya 2004). Más aún, existen casos avanzados del síndrome en los que se evidencia una erosión en el esqueleto calcáreo (Rosenberg and Loya 2004).

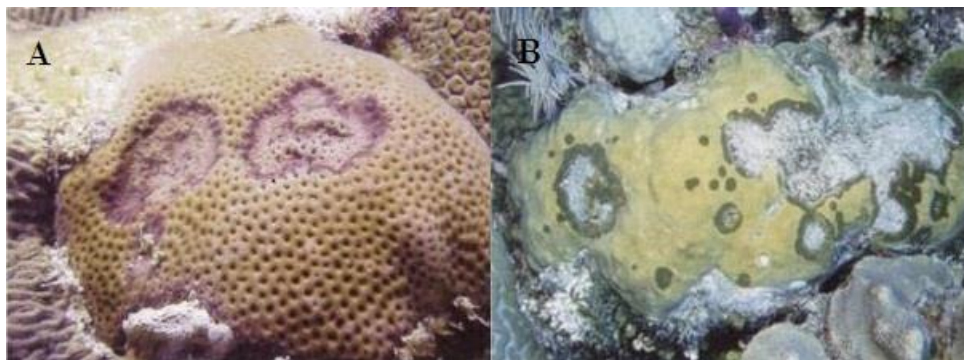


Figura 2.- Síndrome de Mancha Negra de corales del Caribe mexicano (Rosenberg & Loyola 2004)

En el 2008, la asociación CRTR (Coral Reef Targeted Research) reportó una prevalencia anual sumamente variable de MN en el Caribe con porcentajes que van de <1% hasta 36% durante los brotes asociados a las altas temperaturas de verano-otoño, sin embargo, refirió que éstos brotes podrían extenderse hasta primavera-invierno (Weil et al. 2008). Más aún, se ha registrado que el síndrome de MN es la tercera afectación más frecuente en el Caribe afectando a cerca del 1.3% de las colonias y superada solo por Aspergilosis y Banda Negra (Gil-Agudelo et al. 2009). Para el 2010 en Akumal, Quintana Roo, se registró al síndrome de MN con una presencia en el arrecife de 9.09%, superada por Aspergilosis, Plaga Blanca y Banda Amarilla, esta última con el porcentaje más elevado de cualquier afectación cubriendo el arrecife hasta en un 44.16% (Figura 3) (Garza-Pérez et al. 2010).

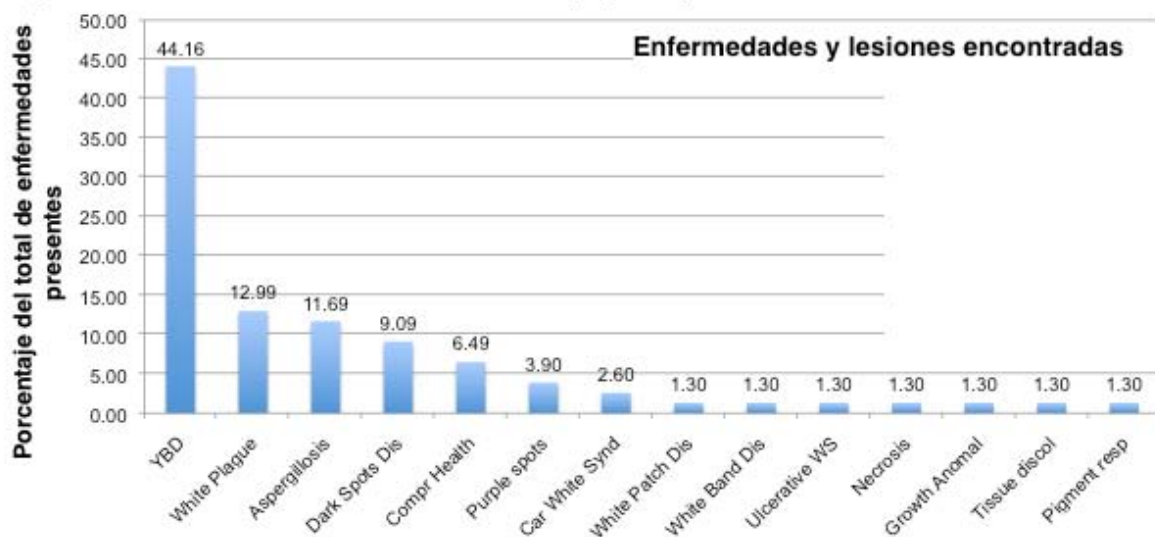


Figura 3.- Gráfica de barras en orden de presencia de las afectaciones encontradas en el arrecife de Akumal, Quintana Roo YBD = Yellow Band Disease; Compr Health = Compromised Health; Car White Synd = Caribbean White Syndrome; Ulcerative WS = Ulcerative White Spots; Tissue discoloration & Pigment resp = Pigmentations response. (Garza-Pérez 2010).

Antecedentes

Microorganismos en lesiones de corales.

Un problema en el diagnóstico de lesiones de coral recae en las ambigüedades al momento de su diagnóstico. Esto es, debido a que éste se realiza principalmente mediante características observacionales, en ocasiones se designan diferentes nombres a la misma enfermedad o síndrome o igual nombre para diferentes enfermedades o síndromes, dependiendo de los autores (Weil 2001). Aunque los manuales de identificación intentan remediar este problema, la manera más eficiente de confirmar un síndrome es asociándolo con el o los agentes causantes o representativos (Sutherland et al. 2004; Raymundo et al. 2008). Son muchos los trabajos que hablan de las comunidades microbianas asociadas a estados de afectación o estrés en corales (Vargas-Angel et al. 2007; Vega Thurber et al. 2008; Mouchka et al. 2010; Amend et al. 2012; Krediet et al. 2013) y los microorganismos involucrados en esta asociación van desde las más pequeñas partículas virales hasta la distinción entre clados de los dinoflagelados simbioses dependiendo del estado de salud del coral huésped (Cervino et al. 2004).

Virus

La presencia de virus del tipo herpes se ha detectado en el consorcio coralino en respuesta a estresores abióticos, en particular a una reducción de pH, incremento de nutrientes y estrés térmico (Vega Thurber et al. 2008). De la misma manera se ha observado que la abundancia de virus en el agua subyacente a corales escleractinios es similar aunque la superficie coralina presenta morfotipos virales exclusivos de la especie de coral, lo que sugiere una comunidad viral exclusiva del hospedero (Davy and Patten 2007). Debido a las diferentes morfologías y tamaños de partículas virales que se han encontrado dentro de todo el tejido coralino, se sugiere que estos parásitos infectan no solo al pólipo, sino también a la zooxantela, bacterias intracelulares y demás microbiota asociada al holobionte (Patten et al. 2008).

Protistas

Protistas del filo sptamenofila han sido encontrados en parches del tejido coralino, con especial énfasis en la boca del pólipo (S. Raghukumar 1991). Se considera que estos microorganismos se ubican en esta región debido a que la boca del polipo es una zona de intercambio de nutrientes en donde pueden disponer más fácilmente de recursos (Bongiorni et al. 2004). Al mismo tiempo, estos microorganismos ofrecen al coral beneficios por depredación directa (Kramarsky-Winter et al. 2006) o indirectamente gracias a sus capacidades bioquímicas ya que algunas especies, como por ejemplo, el grupo de los traustoquítridos que se han encontrado en corales, son reconocidos por reciclar sustancias orgánicas o producir un número importante de nutrientes (Kramarsky-Winter et al. 2006). De manera similar se han encontrado otros grupos, como *Labyrinthula* sp., que por su parte han sido identificados como parásitos y asociados a enfermedades en otros ambientes como el césped (Bigelow et al. 2005). Algunos ciliados como *Philaster* sp. y *Porpostoma guamense* han sido asociados a síndromes como Síndrome Blanco y Banda Café (Sweet and Bythell 2012).

Hongos

Los hongos también han sido aislados en tejidos de corales con lesiones (Priess et al. 2000) , Algunos de ellos han sido aislados del agua y sedimentos cercanos al coral y, debido a que tienen un efecto antimicrobiano (Rajasekar et al. 2012), podrían inhibir el crecimiento y desarrollo normal de bacterias que formen parte del sistema inmune en el holobionte (Rosenberg et al. 2007). Uno de los ejemplos más notables es el de la Aspergillosis en los gorgonaceos la cual se caracteriza por manchas violetas aparentemente causadas por el hongo *Aspergillus sudowii* (Kim et al. 2000). En la actualidad se ha puesto en duda el papel infeccioso de estos microorganismos pues existen numerosos trabajos en donde no se ha podido realizar una reinfección de organismos saludables con el supuesto agente patógeno (Toledo-Hernández et al. 2008), por lo que es necesario continuar con la investigación al respecto.

Por otro lado, los hongos también son considerados parásitos del dinoflagelado simbiote (zooxantela) por lo que afectan indirectamente al pólipo hospedero (Ravindran et al. 2001; Golubic et al. 2005). Priess y colaboradores (2000) determinaron que hongos endolíticos anamorfos, posiblemente *Aspergillus*, *Penicillium* y *Cladosporium*, presentan un estado

criptoendolítico mientras que, en la superficie del coral, este desarrolla conidios para tratar de impedir la entrada del hongo generando así una pigmentación oscura sobre el esqueleto coralino (Le Campion-Alsumard et al. 1995). En algunos casos, los hongos son considerados saprófitos (*Cladosporium sphaerospermum*) y heterótrofos endolíticos (*Paecilomyces lilacinus*) (glosario) (Kendrick et al. 1982; Le Campion-Alsumard et al. 1995).

Algunas de las especies de hongos que se han encontrado en corales se describen ampliamente en el trabajo de Kendrick y colaboradores (1982) y se enlistan en la siguiente tabla.

Tabla 2.- Hongos encontrados en corales (Tomada de Kendrick 1982).

Hongo	Coral
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Meandrina meandrites</i>
<i>Aspergillus restrictus</i> Smith	<i>Diploastrea heliopora</i>
<i>A. sydowi</i> (Bain. & Sart.)	<i>Acropora palmata</i>
	<i>Montastrea annularis</i>
	<i>Porites porites</i>
<i>A. versicolor</i> (Yuill.) Tiraboschi	<i>Acropora hyacinthus</i>
	<i>Acropora</i> sp
	<i>Goniastrea retiformis</i>
	<i>Porites australensis</i>
<i>Asteromella</i> sp	<i>Diploastrea heliopora</i>
<i>Bipolaris rostrata</i> (Drechs.) Shoem	<i>Acropora palifera</i>
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penz	<i>Montastrea annularis</i>
	<i>Porites</i> sp.
<i>Hormonema dematioides</i> Lagerb. & Melin	<i>Acropora</i> sp
	<i>Diploastrea heliopora</i>
	<i>Goniastrea retiformis</i>
	<i>Porites australensis</i>
<i>Humicola alopallonella</i> Meyers & Moore	<i>Acropora hyacinthus</i>
<i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thorn.) Samson	<i>Goniastrea australensis</i>
<i>Penicillium avellaneum</i> Thorn & Turesson	<i>Porites porites</i>
<i>P. expansum</i> Link ex S.F. Gray	<i>Acropora palmata</i>
<i>P. godlewskii</i> Zaleski	<i>Montastrea cavernosa</i>
<i>P. restrictum</i> Gilm. & Abbott	<i>Goniastrea australensis</i>
	<i>Porites australensis</i>
<i>P. stoloniferum</i> Thorn	<i>Acropora palmata</i>
	<i>Diploria labyrinthiformis</i>
	<i>Millepora complanata</i>
<i>Phialophora bubaki</i> (Laxa) Schol- Schwarz	<i>Diploastrea heliopora</i>

	<i>Goniastrea retiformis</i>
	<i>Porites australensis</i>
<i>Pithomyces chartarum</i> (Berk. & Curt.) M.B. Ellis	<i>Acropora</i> sp.
<i>Wallemia ichthyophaga</i> Johan-Olson Esteril	<i>Porites</i> sp.
Micelio hialino estéril con hinchazones	<i>Acropora</i> sp.
	<i>Diploastrea heliopora</i>
	<i>Goniastrea australensis</i>
Micelio oscuro estéril con hinchazones	<i>Acropora palifera</i>
	<i>Acropora</i> sp.
	<i>Porites</i> sp.

A pesar de que Gallaway y colaboradores (2007) publicaron un estudio en el que se encuentra a *Vibrio carchariae* viviendo únicamente en colonias afectadas por MN no ha sido posible inducir las lesiones a corales sanos para completar los postulados de Koch. Por lo tanto, una nueva hipótesis señala a hongos endolíticos como posibles responsables de los daños (Galloway et al. 2007). Renegar y colaboradores (2008), reafirma la presencia de hifas fúngicas en el coral *Agaricia agaricites* con daños de MN (Renegar et al. 2008). Esta hipótesis se respalda con el trabajo anterior de Golubic y colaboradores en 2005, quienes demuestran, por medio de microscopia, la presencia de hongos endolíticos facultativos en corales afectados por MN de los arrecifes tropicales, lo cual ofrece la posibilidad de una asociación entre los hongos y el síndrome (Golubic et al. 2005).

Uno de los estudios más recientes de síndromes en corales del Caribe causados por hongos fue realizado por Sweet y colaboradores (2013) quienes, por medio de análisis moleculares, identificaron la presencia del hongo *Rhytisma acerinum* en corales que mostraban signos de Mancha Negra. Esta especie de hongo es terrestre y se ha reportado como causante de la enfermedad “costra negra del acre” (Tar Spot) en varias especies de Acre, en la que se daña al cloroplasto provocando una pigmentación oscura (Jones 1925).

Bacterias

Las bacterias son el grupo más estudiado en cuanto a su asociación con corales, se consideran una parte importante de la base de la cadena trófica, sobre todo en aguas oligotróficas, ya que

ayudan al aprovechamiento de los nutrientes reciclándolos de la columna de agua y directamente del moco de corales (Hoppe, H. G., W. Schremm 1988). Se reconocen diferencias en cuanto a la comunidad microbiana que presenta cada especie de coral, sin embargo, existe una tendencia en cuanto a la presencia de ciertos grupos encontrados en varias especies de corales tales como *Vibrio* sp., *Pseudomonas* sp. y diferentes especies del grupo alfa-proteobacterias en corales afectados por algún síndrome (Koren and Rosenberg 2006; Ritchie 2006; Weil et al. 2006b; Gil-Agudelo et al. 2007; Mouchka et al. 2010; Cárdenas et al. 2012a; Wilson et al. 2012). Sin embargo, algunos estudios han cuestionado la idea de que un solo microorganismo sea el responsable de los daños (Richardson 1998; Sato et al. 2010), deliberando incluso trabajos que han comprobado los postulados de Koch, pues los organismos podrían presentar susceptibilidad a las condiciones de aislamiento (Sutherland et al. 2004). En la actualidad, la hipótesis más aceptada es la que indica que las afectaciones en corales están dadas, no solo por un microorganismo específico, sino por un consorcio microbiano o por cambios en la abundancia de los microorganismos presentes en consorcios asociados a los corales (Cooney et al. 2002; Sutherland et al. 2004). Cooney y colaboradores en 2002, utilizaron técnicas moleculares para confirmar la presencia de la cianobacteria *Phormidium corallyticum*, anteriormente propuesta como la causante de lesiones coralinas características de BN. Sin embargo, también se detectó la presencia constante de bacterias del género *Desulfovibrio* spp. y algunas sulfato-reductoras. Sus resultados apoyan la hipótesis de un desbalance en la ecología microbiana del coral causado por el ataque de un patógeno y el consecuente establecimiento de un consorcio microbiano distinto al de los corales saludables (Cooney et al. 2002). Por otro lado, Gil-Agudelo y colaboradores (2007) descartaron que las bacterias fueran la causa de MN en tres especies de coral (*Montastraea annularis*, *M. faveolata* y *Siderastrea siderea*). Más aún, en este trabajo se señalan a los hongos, a los virus y a ciertas respuestas metabólicas como posibles factores asociados al síndrome (Gil-Agudelo et al. 2007).

Gracias al avance de la tecnología en los últimos 10 años, actualmente se utilizan herramientas moleculares y bioinformáticas para estudiar a toda la comunidad microbiana asociada a corales sanos y afectados (Sutherland et al. 2004; Sunagawa et al. 2010; Sweet et al. 2011; Cárdenas et al. 2012a; Lins-de-Barros et al. 2013). Por ejemplo, Sunagawa y colaboradores (2009) determinaron el incremento de la diversidad así como un cambio significativo en la estructura de la comunidad microbiana asociada a ejemplares de *Montastraea faveolata* que presentaban

signos de Plaga Blanca tipo II en la Isla San Cristobal, Boca del Toro, Panamá (Sunagawa et al. 2009). Los investigadores reportaron la presencia de bacterias de las familias Alteromonadaceae y Vibrionaceae previamente observadas en corales afectados. Sin embargo, *Aurantimonas coralicida*, previamente reportada como causante del síndrome (Denner 2003), no fue encontrada en ninguna de las muestras, por lo que se propone que los signos de esta afectación pueden estar relacionados con distintos grupos de bacterias (Sunagawa et al. 2009). Más aún, Cárdenas y colaboradores (2012) proponen que el síndrome Plaga Blanca en los corales *S. siderea* y *D. strigosa* del caribe Colombiano está asociado a una pérdida en el balance de las poblaciones bacterianas residentes, ya que observaron el incremento en la abundancia relativa del grupo de alfa proteobacteria sin reportar la presencia de *A. coralicida* y a su vez, observaron el decaimiento de los grupos beta y gamma proteobacteria. Al mismo tiempo, el estudio reportó la presencia de *Vibrio rotiferanus*, *Pseudomonas putida*, *Brevibacterium linens*, *Alcaligenes fecalis* y *Micrococcus yunnanensis* en los corales afectados de ambas especies, mientras que los corales saludables no presentan especies bacterianas similares entre sí (Cárdenas et al. 2012a).

De Castro y colaboradores en 2010, identificaron grupos bacterianos asociados a corales blanqueados (presumiblemente Plaga Blanca). En ellos se observó que el filo Bacteroidetes comprendía al 70% de la población bacteriana, mientras que los corales saludables mostraban al filo Proteobacterias como el más sobresaliente de la población. Sin embargo, la presencia de cualquiera de los dos filo no fue excluyente del otro, lo cual indica que los síntomas representativos de éste síndrome podrían ser causados por un cambio en abundancias relativas (glosario) de los microorganismos asociados al coral (de Castro et al. 2010). Esto sugiere, que la pérdida de la homeostasis en la comunidad microbiana asociada a los corales permite la colonización del holobionte por la comunidad oportunista que, a su vez, toma ventaja de la inestabilidad del sistema inmune del coral y de la proliferación de colonias afectadas (de Castro et al. 2010). Estos resultados apoyan la teoría propuesta por Cooney y Sutherland (Cooney et al. 2002; Sutherland et al. 2004). Otro factor que puede afectar dicha homeostasis es el cambio de diversidad (glosario) en las comunidades microbianas asociadas a corales. Tal fue el resultado de Wilson y colaboradores (2012) quienes al estudiar el Síndrome Blanco de

Acrópora en Samoa encontraron una mayor diversidad bacteriana en los corales saludables, mientras que los corales afectados revelaron un mayor índice de riqueza (Wilson et al. 2012).

Otro ejemplo del cambio dramático en la composición de la comunidad bacteriana asociada a corales sanos y afectados lo presentan Lins-de-Barros y colaboradores (2013) quienes trabajaron con *Siderastrea stellata* de arrecifes de Brasil, ellos muestran una transición de betaproteobacterias en corales sanos a alfa y gamaproteobacterias en corales estudiados durante un periodo de blanqueamiento (Lins-de-Barros et al. 2013).

Métodos de identificación (de microorganismos)

Los primeros estudios para vislumbrar la asociación de microorganismos en corales fueron realizados con cultivos de bacterias del moco del coral (Ritchie 2006). En la actualidad se siguen utilizando estos procedimientos por la facilidad y veracidad que tienen las pruebas de cultivo, además de poder estudiar mejor a los microorganismos (Rosenberg and Loya 2004). Durante estos estudios, Ritchie (2006) evidenció que el moco de corales saludables inhibe el crecimiento de microbios potencialmente invasivos, mostrando actividad antibiótica contra patógenos, incluyendo *Serratia marcescens* implicado en la enfermedad de “Patch White”, y detectó una menor actividad antibiótica en corales colectados durante un evento de blanqueamiento en verano, por lo cual propone que la población bacteriana actúa como un sistema inmune en el holobionte (Ritchie 2006).

A pesar de esto, hay que tomar en cuenta que la gran mayoría de los microorganismos del medio marino no son cultivables (Madigan et al. 2012) por lo que se han utilizado distintas técnicas para realizar estudios microbiológicos en corales. Algunos de ellos realizan la identificación microscópica del tejido de los especímenes colectados para identificar por morfología a los grupos microbianos (Banin et al. 2000; Ravindran et al. 2001; Golubic et al. 2005). Banin y colaboradores (2000) demostraron que la infección del coral *Oculina patagonica*, por el patógeno *Vibrio shiloi* ocurre en la epidermis después de una adhesión superficial gracias a imágenes captadas en el microscopio de fluorescencia y electrónico (Banin et al. 2000). Posteriormente, Ravindran y colaboradores (2001) estudiaron la asociación de los hongos en

corales, utilizando microfotografías y demostraron que los hongos son residentes naturales en el holobionte, reforzando así las teorías de que los hongos no necesariamente patógenos que han sido adquiridos por actividades humanas, sino que se encuentran naturalmente asociados al holobionte e incluso han evolucionado a la par (Ravindran et al. 2001). En 2002, Patterson y colaboradores presentaron imágenes de microscopía electrónica de barrido en las que se evidencia a la bacteria *Serratia marcescens*, (asociada a materia fecal), posteriormente su presencia en tejidos de *Acrópora palmata* blanqueada fue confirmada por amplificación del fragmento 16S (Patterson et al. 2002). De manera similar, Patten y colaboradores (2008) demostraron la presencia de partículas virales gracias a imágenes de microscopía electrónica de transmisión en muestras del coral *Acrópora muricata*, en corales de la Gran Barrera en Australia, así como la presencia de filamentos endolíticos no identificados, aparentemente fúngicos (Patten et al. 2008). En 2005, Richardson y colaboradores validaron mediante pruebas de cultivo, e hibridación por fluorescencia in situ (FISH), utilizando oligonucleótidos específicos para *Aurantimonas coralicida*, la presencia de esta bacteria patógena de la EPB (tipo II), en un intento por utilizar métodos de microscopía y moleculares (Richardson et al. 2005).

En la última década, los avances tecnológicos han permitido la amplificación de fragmentos específicos de DNA de determinado grupo, siendo el preferido por facilidad, bacterias y arqueas. Pantos y colaboradores (2006); utilizaron la amplificación del fragmento 16S del gen ribosomal, clonación y secuenciación, para determinar la presencia de alfa proteobacterias en el coral *Acropora palmata* afectada por EBB (Pantos and Bythell 2006).

Gracias a los métodos basados en la amplificación masiva a partir del ADN ambiental de la muestra del holobionte, mejor conocido como metagenómica, se han logrado avances importantes en esta área de estudio (Cárdenas et al. 2012a; Wilson et al. 2012; Lins-de-Barros et al. 2013; Sweet et al. 2013). Con dicha técnica ha sido posible reconocer a todos los grupos microbianos presentes en la muestra y compararlos tanto entre corales como con bases de datos públicas lo cual ha permitido identificar la presencia de grupos de microorganismos presentes o ausentes en muestras afectadas y saludables e incluso del medio adyacente (Thomas et al. 2012).

Justificación

El síndrome de Mancha Negra afecta a corales escleractinios del Caribe mexicano (Weil 2001; Bruckner and Bruckner 2006; Ward et al. 2006) por lo que en el presente trabajo se tratará de evidenciar a la comunidad microbiana en corales saludables y afectados por el síndrome de Mancha Negra (MN) debido a que, de los cinco síndromes mencionados anteriormente, éste es el menos estudiado y hasta la fecha no se ha comprobado que algún microorganismo sea el responsable de las lesiones causadas.

De manera similar, el presente trabajo tratará de evidenciar a la comunidad microbiana en corales saludables y afectados por el Síndrome de Banda Amarilla debido a que existen diferencias en los registros dependiendo de los autores y los métodos utilizados y considerándose una de las afectaciones de mayor importancia para el Caribe mexicano.

La dependencia económico-social de los arrecifes de coral en el Caribe puede llegar a representar un aporte de hasta 3,100 millones de dólares por concepto de bienes y servicios y 4,600 millones de dólares por concepto de pesquerías, turismo y protección costera (Burke et al. 2012) por lo anterior, es necesario llevar a cabo estudios que permitan evidenciar posibles agentes causantes de daños a los corales.

Este trabajo tiene como objetivo evidenciar la diversidad de las comunidades de microorganismos (bacterias y hongos) asociados a dos especies de corales escleractinios sanos y afectados de Akumal, Quintana Roo, México. Se estudiará el síndrome de MN en el coral *Siderastrea siderea* debido al reciente reporte en el cual se evidencia la presencia del hongo *Rhytisa acerunu* asociada a lesiones de éste síndrome (Sweet et al. 2013).

Hipótesis

Existe una comunidad microbiana núcleo (bacterias y hongos) asociada a corales escleractinos afectados indistinta de síndrome y especie.

Ho: Cada especie de coral afectado presenta una comunidad microbiana asociada (bacterias y hongos) distinta a los corales sanos y dependiendo del síndrome.

Objetivo general

Comparar la diversidad en la comunidad bacteriana y fúngica asociada a organismos de las especies *S. siderea* y *O. faveolata* afectados por el síndrome de Mancha Negra y Banda Amarilla respectivamente, así como la diversidad asociada a organismos aparentemente saludables de cada especie en Akumal, Quintana Roo, México.

Objetivos específicos

Determinar cuál es la mejor técnica de extracción para la obtención de DNA para la realización del análisis de la comunidad microbiana de corales escleractinos.

Determinar la presencia o ausencia de grupos representativos de bacterias y hongos típica en corales escleractinos de la especie *S. siderea* afectados con el síndrome de Mancha Negra (zona lesionada) así como los de la especie *O. faveolata* afectados con el síndrome de Banda Amarilla (zona lesionada) en Akumal, Quintana Roo.

Identificar al máximo grado taxonómico posible, la identidad de estos microorganismos presentes en cada estado de afectación de los corales *S. siderea* y *O. faveolata*.

Comparar la diversidad de bacterias y hongos presente en corales escleractinos de *S. siderea* y *O. faveolata* en Akumal, Q. Roo.

Materiales y Métodos

Zona de estudio

Akumal, Q. Roo.

El área de estudio es un destino turístico localizado a 105 km al sur de Cancún, en la costa este de la Península de Yucatán, un pueblo asentado en la Riviera Maya a 20° 23'N y 87° 18'O. Tiene un arrecife bordeante característico del Sistema Arrecifal Mesoamericano, el cual abarca de Yucatán a Honduras y con parches arrecifales que pueden llegar a alcanzar los 30 m de profundidad (Garza-Pérez et al. 2004; Vázquez-Botello and Alfonso 2008). La Bahía de Akumal es un hábitat para una gran variedad de tortugas marinas, por tal motivo el nombre *Akumal* hace referencia en el idioma local (maya) al “Lugar de las Tortugas” (Herring 2006). La zona presenta un total de 40 especies de coral escleractinio en las cuales se han reportado seis síndromes (BN, MN, BA, PB, BB y SAC) (Weil 2001; Ward et al. 2006; Rosenberg et al. 2007), y dos especies de octocoral en las cuales se presenta solamente un síndrome (ASP) (Ward et al. 2006). Los organismos utilizados en este proyecto fueron colectados en el arrecife Morgan que está localizado en las afueras del extremo norte de la Bahía de Akumal y el cual es menos visitado por buceadores recreativos (20°23'48''N y 87°18'33''W).

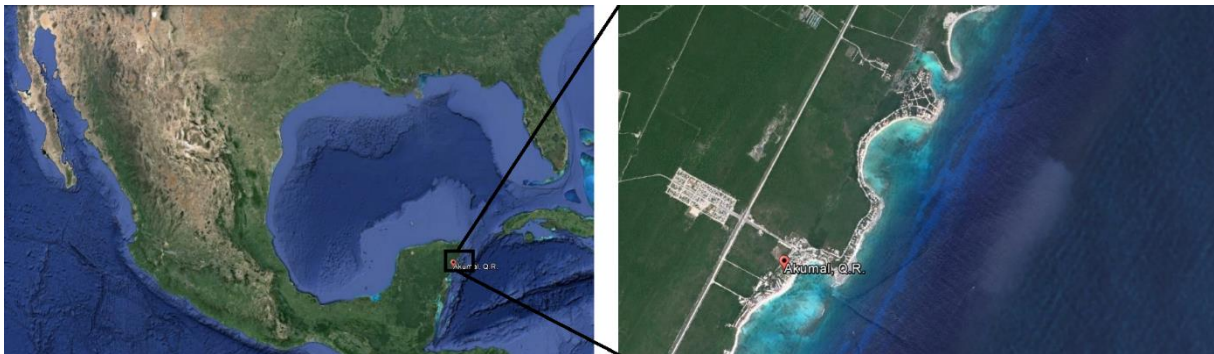


Figura 4.- Mapa de la zona de estudio, Akumal, Quintana Roo, México (Google Earth, 2013).

Trabajo de campo

Colecta de muestras

Para la colecta de especímenes se llevaron a cabo un total de cuatro buceos, dos de ellos los días 19 y 20 de Marzo de 2014 para obtener muestras de *Siderastrea siderea* y otros dos el día 11 de Octubre del mismo año para la obtención de muestras de *Orbicella faveolata*. Todos los buceos se realizaron a una profundidad máxima de 15m y se localizaron 6 colonias de cada especie, tres de las cuales presentaban apariencia saludable y tres identificadas como afectadas por MN para el caso de *S. siderea* y BA para el caso de *O. faveolata*. Las afectaciones fueron identificadas con ayuda de las tarjetas sumergibles de Weil, & Hooten (2008). Para obtener cada muestra de coral se utilizó un sacabocados de 1.3cm de diámetro y un mazo de 3 libras (Rohwer et al. 2001). Las muestras se obtuvieron por triplicado de cada una de las colonias con apariencia saludable mientras que, para las colonias afectadas, se colectaron 6 muestras de cada colonia, 3 de la parte afectada y 3 de la parte aparentemente saludable (Tabla 3). Se tomaron registros fotográficos de todos los corales muestreados (Figura 5 y 6).

Tabla 3.- Identificación y clasificación de las colonias de corales muestreadas.

Muestreo del 19 y 20 de Marzo de 2014				
Coral	Síndrome	Estado	Muestra de coral	Etiqueta
A	N/A	Saludable	1, 2 y 3	A1, A2 y A3
B	N/A	Saludable	1, 2 y 3	B1, B2 y B3
C	N/A	Saludable	1, 2 y 3	C1, C2 y C3
D	Mancha Negra	Afectado	Sano: 1, 2 y 3. Lesión: 4, 5 y 6	D1, D2, D3, D4, D5 y D6
E	Mancha Negra	Afectado	Sano: 1, 2 y 3. Lesión: 4, 5 y 6	E1, E2, E3, E4, E5 y E6
F	Mancha Negra	Afectado	Sano: 1, 2 y 3. Lesión: 4, 5 y 6	F1, F2, F3, F4, F5 y F6
Muestreo del 11 de Octubre de 2014				
G	N/A	Saludable	1, 2 y 3	G1, G2 y G3
H	N/A	Saludable	1, 2 y 3	H1, H2 y H3
I	N/A	Saludable	1, 2 y 3	I1, I2 y I3
J	Banda Amarilla	Afectado	Sano: 1, 2 y 3. Lesión: 4, 5 y 6	J1, J2, J3, J4, J5 y J6
K	Banda Amarilla	Afectado	Sano: 1, 2 y 3. Lesión: 4, 5 y 6	K1, K2, K3, K4, K5 y K6
L	Banda Amarilla	Afectado	Sano: 1, 2 y 3. Lesión: 4, 5 y 6	L1, L2, L3, L4, L5 y L6

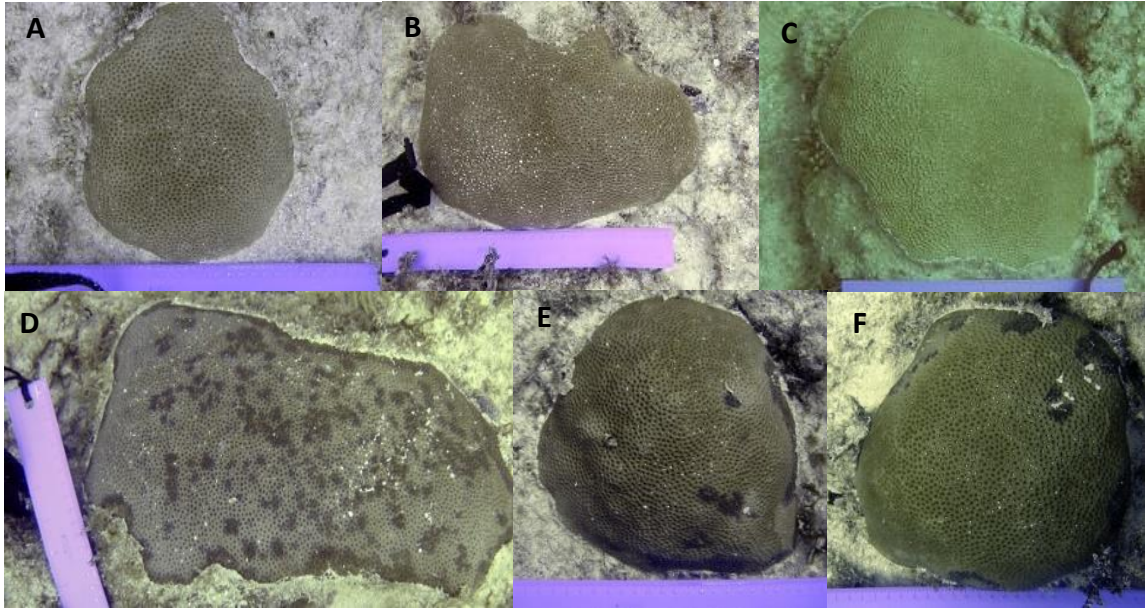


Figura 6.- Corales de la especie *S. sierea*. A, B y C organismos aparentemente saludables. D, E y F organismos afectados con Mancha Negra.

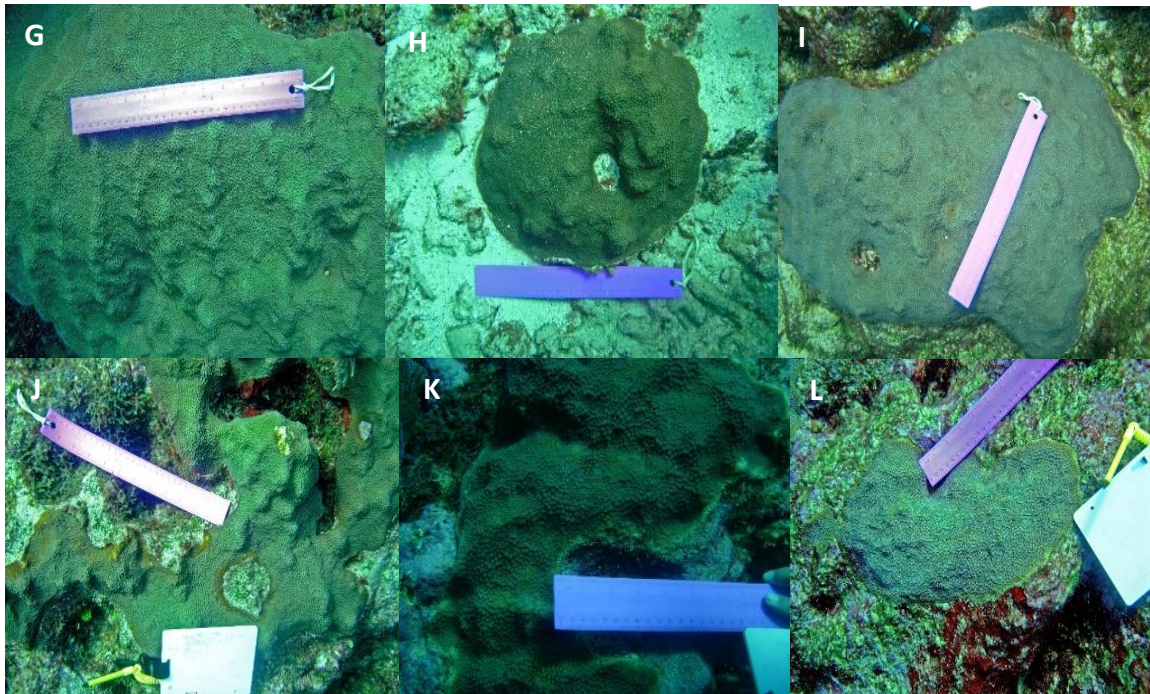


Figura 5.- Corales de la especie *O. faveolata* G, H e I organismos aparentemente saludables. J, K y L organismos afectados con Banda Amarilla.



Figura 7.- Muestreo de cada coral. A) toma de la muestra con cincel y martillo. B) Muestra colocada en tubos para su transporte. C) Cobertura de lesiones con resina epoxica. D) Limpieza de las muestras para su almacenamiento y transporte.

Cada muestra obtenida fue colocada en un tubo Falcón estéril (50 ml) bajo el agua, al llegar a la superficie fueron enjuagadas tres veces con agua purificada (mediante filtro de 0.22 μ m y UV) para retirar la mayor cantidad de bacterias que no estuvieran asociadas al tejido del organismo. Cada muestra fue embebida en alcohol absoluto y refrigerada a 4°C para su traslado al laboratorio y posterior procesamiento. Durante la toma de muestra se cubrieron las lesiones resultantes de cada biopsia con resina epóxica (marca Ceys, S.A.) para reducir el riesgo de infección al organismo (Santavy et al. 2001; Meron et al. 2012) (Figura 7).

Trabajo de laboratorio

Extracción de ADN

Cada muestra se maceró en un mortero con pistilo, previamente esterilizados mediante flameo con alcohol y se mantuvieron en refrigeración a -20°C hasta su uso (Lins-de-Barros et al. 2013).

Se realizaron 3 diferentes métodos de extracción de DNA los cuales fueron: 1) técnica de extracción de Rojas-Herrera, y colaboradores (2008), 2) Kit Nucleo Spin Soil (Macherey.Nagel) y, 3) técnica de extracción de STE (CINVESTAV, Mérida).

Las técnicas de extracción anteriormente mencionadas fueron probadas con 2 de las muestras colectadas durante el primer muestreo, las muestras 13 y 28 pertenecientes a un coral sano y uno afectado, respectivamente, de la especie *S. siderea*.

La cantidad de DNA obtenido fue corroborado realizando dos PCR, el primero con los cebadores universales para bacterias 27F y 1492R bajo las siguientes condiciones: 95°C 5min, seguido por 35 ciclos de 1) 94°C 30 seg, 2) 58°C 30 seg, 3) 72°C 1:10 min finalizando con 72°C durante 5 min (Frias-Lopez et al. 2002); el segundo utilizando los cebadores universales para hongos ITS4 e ITS5 y las condiciones a las cuales se llevó a cabo fueron: 95°C 5 min seguida por 30 ciclos de 1) 95°C 1 min, 2) 57°C 1 min, 3) 72°C 1 min, terminando con 72°C 5 min (Sweet et al. 2013). La visualización de los productos de PCR se llevó a cabo en geles de agarosa al 1% (May et al. 2010).

Todas las PCRs realizadas fueron llevadas a un volumen final de 25 µl, conteniendo 16.3 µl de H₂O libre de nucleasas, 5 µl de Buffer 5X, 0.5 µl de mezcla de dNTPs, 1 µl de cada cebador respectivamente, 0.2 µl de Taq Polimerasa y 1 µl del producto de la extracción (Fredricks et al. 2005).

Para el resto de las extracciones se utilizaron los kits de extracción Nucleo Spin Soil y Soil Micrbe DNA MiniPrep (Zymo Scientific). Las 54 muestras de ambos corales se realizaron en condiciones de máxima esterilidad, iniciando por las muestras presuntamente saludables (corales A, B, C, G, H e I), y terminando con las muestras afectadas (corales D, E, F, J, K y L) para evitar algún tipo de contaminación entre muestras y entre estados de salud y afectación.

Determinación de concentración de ADN.

Para determinar un aproximado de la concentración de material genético obtenido con la extracción, se midieron las absorbancias a 260 y 280 nm con ayuda del espectrofotómetro marca Genesys 10UV – Thermo scientific, tomando 2µl de la muestra en 498µl de agua destilada. Posteriormente, se dividieron los valores de ambas absorbancias para determinar la pureza de la muestra, considerando un buen grado de pureza 1.8 – 2.0, un grado moderado de pureza de 1.4 - 1.8 y un mal grado de pureza por debajo de 1.4 (Tapia-Tussel et al. 2009).

Todas las muestras se llevaron a una misma concentración con el fin de estandarizar los resultados posteriores y volverlos compatibles. Para ello se utilizó la concentración más baja en las muestras de cada especie (*S. sidereal* y *O. faveolata*) como base para estandarizar al resto que se diluyó a la concentración deseada (Belda-baillie et al. 2002). Para reducir la cantidad de muestras a procesar y obtener resultados más robustos (LaJeunesse et al. 2004), para cada muestra de estado de salud de cada coral se hizo un “pool” de triplicados, es decir, se tomaron 20 µl de la dilución de cada muestra y se unieron en una sola muestra representativa.

Tabla 4.- Pools de las muestras después de la cuantificación y las diluciones. Las letras mayúsculas indican el coral del cual se trata. En el caso de corales afectados por MN o por BA las letras minúsculas indican el estado muestreado del coral, “s” estado saludable y “e” estado afectado.

Mezcla (pool)	Muestra (dilución)	Mezcla (pool)	Muestra (dilución)
A	A1	G	G1
	A2		G2
	A3		G3
B	B1	H	H1
	B2		H2
	B3		H3
C	C1	I	I1
	C2		I2
	C3		I3
D.s. (saludable)	D1	J.s. (saludable)	J1
	D2		J2
	D3		J3
D.e. (afectado)	D4	J.e. (afectado)	J4
	D5		J5
	D6		J6
E.s. (saludable)	E1	K.s. (saludable)	K1
	E2		K2
	E3		K3
E.e. (afectado)	E4	K.e. (afectado)	L4
	E5		L5
	E6		L6
F.s. (saludable)	F1	L.s. (saludable)	L1
	F2		L2
	F3		L3
F.e. (afectado)	F4	L.e. (afectado)	L4
	F5		L5
	F6		L6

PCR

Bacterias

Se realizaron dos diferentes PCRs de bacterias utilizando el ADN de cada pool. El primero con el par de cebadores 518F-GC/338R (Tabla 5) bajo las siguientes condiciones: 94°C durante 3 minutos, seguido por 20 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 64.5°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto, continuando con 15 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto y terminando con un tiempo de elongación de 7 minutos a 72°C (Muyzer et al. 1993).

El segundo PCR fue realizado con el par de cebadores 357F-GC/907R (Tabla 5) bajo las siguientes condiciones: 96°C durante 2 minutos, seguido por 5 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 56°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto, continuando con 25 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 54°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto, y terminando con un tiempo de elongación de 10 minutos a 72°C (Muyzer et al. 1993; Sweet et al. 2011).

Hongos

Para la obtención de fragmentos de hongos se siguió la metodología descrita por Sweet y colaboradores (2013). Se realizó una PCR-semianidada, el cebadores juego de cebadores fueron ITS1/ITS4 (Tabla 5), posteriormente, el producto de esta reacción fue utilizado para una segunda reacción utilizando los cebadores ITS3/ITS4-GC (Tabla 5), ambas reacciones se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones: 94°C durante 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos terminando con un tiempo de elongación de 5 minutos a 72°C (Sweet and Bythell 2012).

Todas las reacciones anteriores, fueron llevadas a un volumen final de 25 µl cada una, las cuales consistieron en 16.3µl de agua para PCR, 5.0µl de Buffer5X (MgCl²), 0.5µl de mix de dNTP's, 1.0µl de cada cebador, 0.2µl de Taq Polimerasa y 1µl de muestra para cada reacción (May et al. 2010).

Tabla 5.- Cebadores utilizados para la obtención de producto útil para pruebas de DGGE.

Cebadores	Secuencia	Fragmento
27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	V1, 16S rRNA
1492R	5'-GGTACCTTGTACGACTT-3'	V9, 16S rRNA
357F-GC	5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGG GCAGCACGGGGGCTACGGGAGGCAGCAG-3'	V3, 16S rRNA (DGGE)
907R	5'- CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT -3'	V5, 16S rRNA
338F-GC	5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGG GCAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	V3, 16S rRNA (DGGE)
518R	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'	V3, 16S rRNA
ITS-1	5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAG- TAA-3'	ITS-1, 18S rRNA
ITS-4	5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'	ITS-2, 18S rRNA
ITS-3	5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC- 3'	ITS-2, 18S rRNA
ITS4-GC	5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGG GCAGCGGGGGCCTCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	ITS-2, 18S rRNA (DGGE)
ITS-5	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'	ITS2, 18S DNA

Para el análisis de comunidades bacterianas y fúngicas, se realizaron amplificaciones hasta obtener un volumen final de 100 µl de cada muestra utilizando los cebadores específicos diseñados con una “cola” de guanina y citosina (GC) que se utiliza como ancla en la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (Tabla 4) (Pantos et al. 2003).

Muestra H

La muestra “H” que corresponde a la mezcla de los triplicados del coral saludable *O. faveolata*, se volvió a amplificar con más cantidad de muestra y cambiando la concentración de Mg⁺⁺, resultando una mejor amplificación e igualando la intensidad de las bandas de las otras muestras.

Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización (DGGE por sus siglas en inglés)

Se realizaron un total de seis geles de poliacrilamida para DGGE, tres para la especie *S. siderea* y tres para la especie *O. faveolata*. Se utilizaron los productos de PCR obtenidos con tres diferentes pares de cebadores, dos de ellos para bacterias: 338F-GC/518R (Muyzer et al. 1993), 357F-GC/907R (Sánchez et al. 2007) y uno para hongos ITS3/ITS4-GC (Sweet and Bythell 2012) para cada especie de coral (Tabla 5).

Los geles a utilizar con el primer par de cebadores (338F-GC/518R) se prepararon a una concentración de poliacrilamida al 8% (Muyzer *et. al.*, 1993) con un gradiente de 35% a 60% y se dejaron correr durante 18 horas. Los geles correspondientes al segundo par de cebadores (357F-GC/907R) se prepararon a una concentración de poliacrilamida al 6% (Muyzer *et. al.*, 1993), el gradiente fue el mismo que el anterior y se dejaron correr durante 22 horas. Los geles de las reacciones de PCR semianidadas para hongos (ITS3/ITS4-GC) se prepararon a una concentración de poliacrilamida al 10% (Sweet, *et. al.*, 2013) con un gradiente de 25% a 55% y se dejaron correr durante 24 horas. Todos los geles corrieron a 80 V y se mantuvieron a una temperatura constante de 60°C.

El gel de comparación entre especies de coral se realizó bajo las siguientes condiciones: concentración de poliacrilamida al 8% con un gradiente de 30-55% y tiempo de corrida de 22 horas (Sweet and Bythell 2012).

Todas los geles, tanto de agarosa para la visualización de producto de PCR y de poliacrilamida para la visualización de la comunidad microbiana de cada coral, fueron visualizadas y capturadas en imagen con el fotodocumentador BioRad GelDocXR con el programa Quantity One, con el que también se analizaron las imágenes en análisis posteriores (Bio-Rad 1997).

Análisis de la comunidad

Los análisis de las fotografías consistieron en la medición de la densitometría de cada banda visible en el fotodocumentador y utilizando el programa Quantity One, con lo que se generó

una matriz de presencia/ausencia y posteriormente una de intensidad de cada pico presente (Bio-Rad 1997). Estas matrices se utilizaron posteriormente para ingresarlas a un programa estadístico PRIMER 6 (Clarke and Warwick 1994) en el que se obtuvieron los índices de diversidad de Shannon, MDS y CLUSTER (Cho et al. 2003; Wu et al. 2006).

Análisis estadísticos

Índice de Shannon.- La diversidad se calculó con el índice de Shannon que engloba los tres estados comparados en este estudio de cada coral y de cada microorganismos (bacterias y hongos).

Como todo índice de diversidad, enfatiza la riqueza de especies o componentes de equidad de la diversidad y se basa en la siguiente formula:

$$H' = -\sum_i p_i \log(p_i)$$

En donde p_i es la biomasa o cuanta total. El valor de H' varía en un rango de 1-5, aunque en la mayoría de los ecosistemas naturales, su valor es de 2-3 (Clarke and Warwick 1994).

MDS.- Escalamiento multidimensional no métrico (Non-metric Multidimensional Scaling) es una técnica popular para el análisis de datos multivariados y exploratorio, que se encarga de analizar un conjunto de datos que dan un estímulo de las medidas de similitud o disimilitud colocándolos en un espacio correspondiente, de esta manera se puede inferir las dimensiones del espacio perceptivo de los sujetos, en donde los puntos cercanos corresponden a objetos similares, mientras que los puntos alejados corresponden a objetos disímiles (Clarke and Warwick 1994; Wickelmaier 2003).

CLUSTER.- Este análisis tiene como finalidad, encontrar y establecer agrupamientos naturales dependiendo de su similitud o disimilitud. Este agrupamiento puede ser entre muestras que se encuentren a su vez en grupos similares o disímiles y da una representación de la cercanía de los objetos a estudiar (Clarke and Warwick 1994).

ANOSIM.- Análisis de similitud permite definir diferencia significativas entre dos o más grupos estudiados, es el equivalente no paramétrico del test ANOVA, que determina las diferencias significativas entre las variables de estudio para índices univariados (Clarke and Warwick 1994; Alexander et al. 2013).

Selección de bandas para secuenciar

Los criterios de selección de bandas para secuenciar se ajustaron a diversos criterios, 1) la banda seleccionada tenía que ser intensa y visiblemente separada de otras, 2) la re amplificación tenía que ser de una concentración adecuada para poder secuenciar, 3) bandas que estuvieran presentes solo en un estado (salud o afectación) del coral o bien, que pudieran encontrarse en todos ellos, 4) en la medida de lo posible, igual cantidad de bandas entre estados de salud del mismo coral y entre corales, 5) en el caso de bacterias, el producto de cebadores de mayor tamaño para ayudar a la identificación (Muyzer et al. 1993).

Secuenciación

Se enviaron un total de 20 bandas aisladas, correspondientes a: 10 bandas del coral *S. siderea* de las cuales siete fueron de bacterias y tres de hongos. De las siete bandas de bacterias se eligieron cinco de corales afectados (tejido afectado) y solo una de corales saludables, mientras que para las de hongos se eligieron dos de coral afectado (tejido afectado) y una de coral saludable.

Para la especie *O. faveolata* se eligieron igualmente 10 bandas de las cuales seis fueron de bacterias y cuatro de hongos. De las seis de bacterias se eligieron cuatro de corales afectados (tejido afectado) y dos de corales saludables mientras que de las bandas para hongos se eligieron cuatro bandas que correspondían a dos de organismos afectados (tejido afectado), una de coral saludable y una de un cultivo puro de hongo.

Cabe destacar que la cantidad de muestras a secuenciar fue un factor importante que delimitó los criterios y la selección de las muestras.

El análisis de las secuencias

Para la identificación de las secuencias, éstas se compararon con la base de datos de GenBank disponible en NCBI (National Center for Biotechnology Information - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Resultados

Extracción de ADN y PCR

Los resultados de los 3 diferentes métodos de extracción de ADN para las muestras 13 y 28 del coral *S. siderea* mostraron que con los 3 diferentes métodos de extracción se obtiene DNA de diferente calidad (Figura 8).

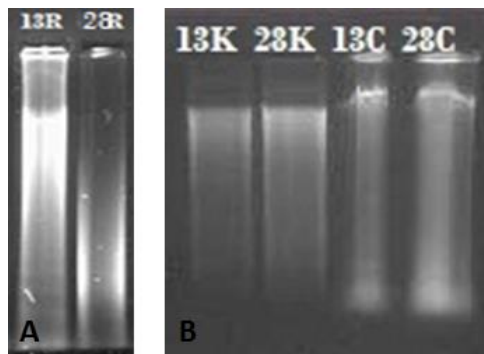


Figura 8.- Tres diferentes métodos de extracción realizados para comprobar la calidad del material genético obtenido en las muestras 12 y 28. La imagen A representa el método de extracción de Rojas-Herrera 2008 (R). La imagen B representa los métodos de extracción Kit Soil (K) y por uso de proteinada y RNAsa (C).

Las pruebas de PCR utilizando los cebadores ITS4/ITS5 para hongos y 27F/1492R para bacterias realizadas a los productos de los métodos de extracción de las muestras 13 y 28 se muestran en la figura 9. La presencia de bandas tanto de bacterias (b) como de hongos (h) se evidencia en las muestras de ADN obtenidas con el método de extracción de Rojas (R) y en las muestras obtenidas con el Kit Nucleo Spin Soil (K). El ADN obtenido con la técnica de extracción de STE (CINVESTAV, Mérida) no mostró producto de la amplificación.

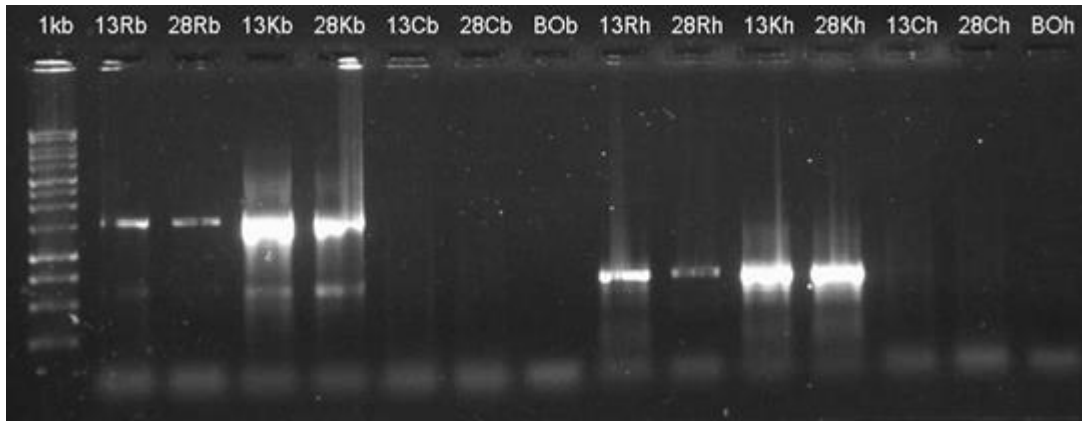


Figura 9.- Electroforesis del producto de PCR realizado a las muestras de los corales 13 (sano) y 28 (afectado) con cebadores 27F y 1492R para bacterias (b) y del ITS4/5 para hongos (h). El ADN fue obtenido con tres diferentes métodos de extracción: 1) Rojas.Herrera 2008. 2) Kit Nucleo Spin Soil (K) y 3) extracción con STE (C).

Para el resto de las pruebas se utilizó el ADN obtenido con el Kit de extracción. Los resultados de las extracciones del coral *S. siderea* se muestran en la figura 10. En la figura 11 se presenta la electroforesis en gel de agarosa con el producto de ADN de las extracciones de las muestras de *O. faveolata*.

Para las muestras de *S. siderea*, las concentraciones de ADN estimadas fueron variables desde un máximo 162.5 ng/μl a un mínimo de 62.5 ng/μl, con una pureza estimada de 1.5 a 2.0. Mientras que para la especie *O. faveolata* la máxima concentración estimada fue de 125 ng/μl y la mínima fue de 12.5 ng/μl, con una pureza estimada que va de 0.5 a 2.0. Los detalles de cada una de las muestras se presentan en el apéndice de ésta tesis.

Todas las muestras se estandarizaron a una concentración de 50 ng/μl para los análisis posteriores.

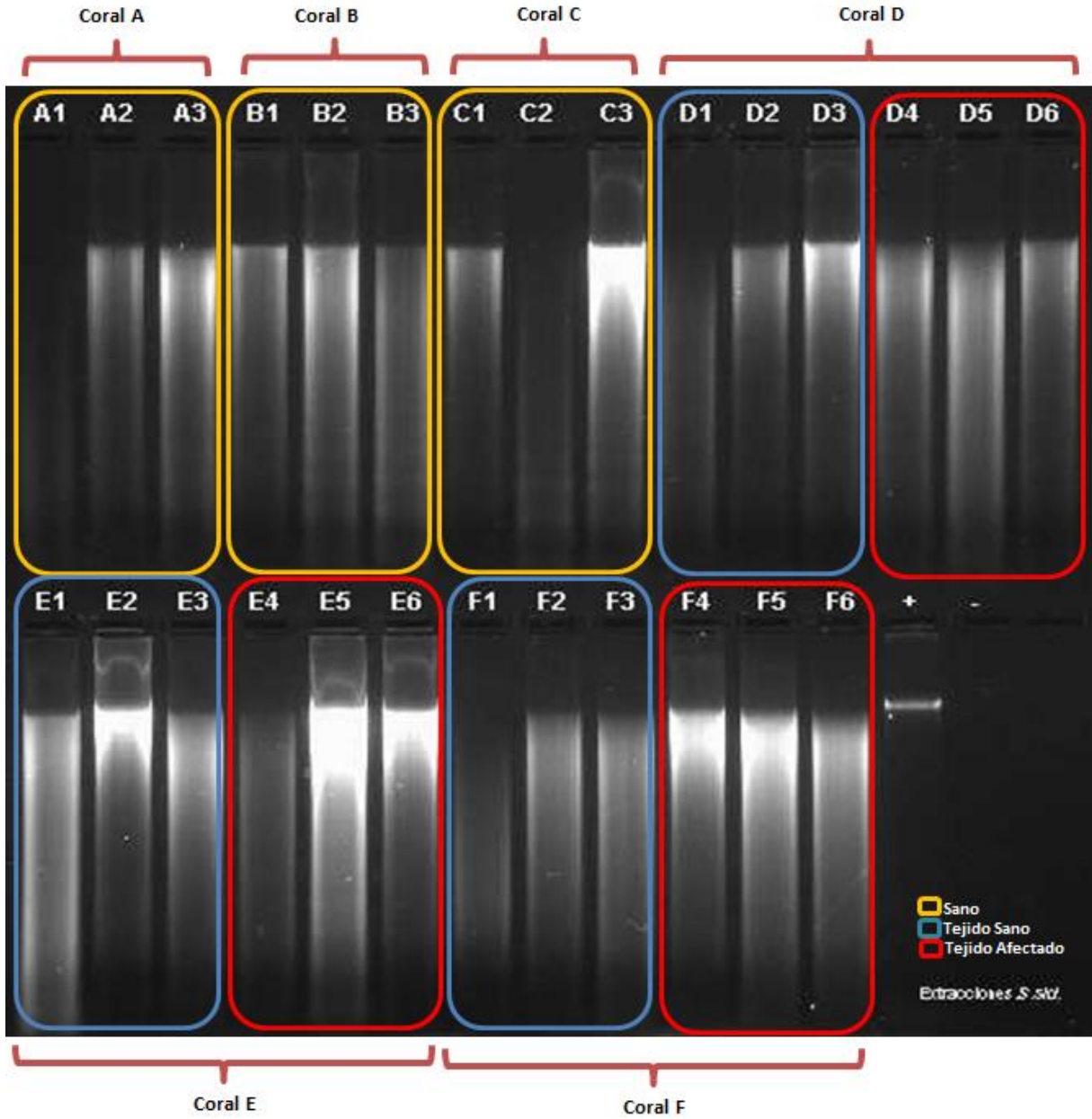


Figura 10.- Extracción de las 27 muestras de *S. siderea* con el Kit Nucleo Spin Soil. Tres corales saludables (A, B y C), colecta por triplicado (1-3) y tres corales afectados por el síndrome de MN (D, E y F) con colecta por triplicado en ambos estados de afectación (1-6), control positivo (+) y un control negativo (BO).

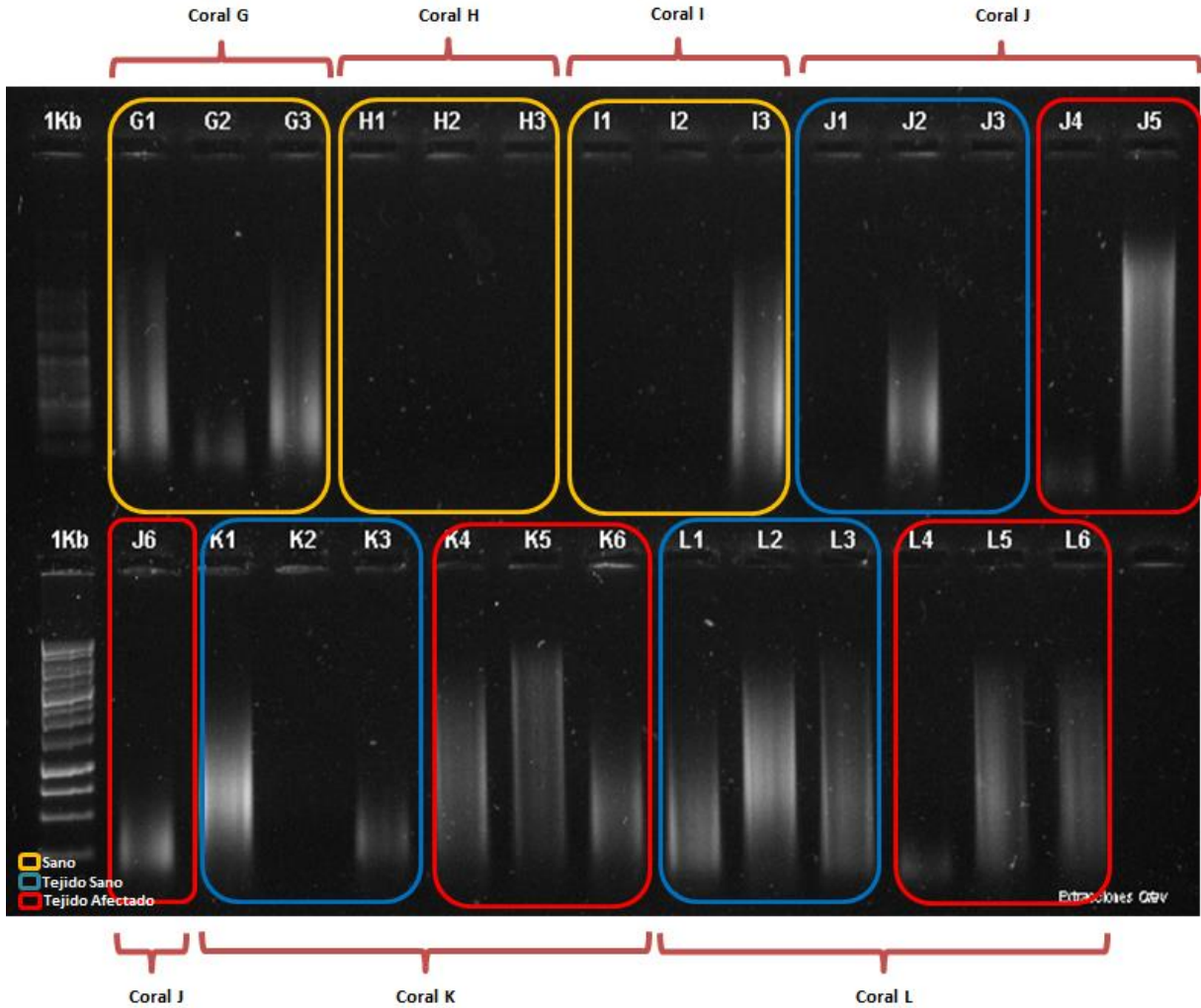


Figura 11.- Extracción de las 27 muestras de *O. faveolata* con el Kit de extracción Soil Microbe DNA MiniPrep. colecta por triplicado (1-3) y tres corales afectados por el síndrome de BA (J, K y L) con colecta por triplicado en ambos estados de afectación (1-6).

PCR

Bacterias

La figura 12 muestra el resultado de la amplificación del gen 16S ARNr para el coral *S. siderea* utilizando los cebadores 338F-GC/518R. La intensidad de las bandas es baja, sin embargo, el tamaño de banda fue el esperado (180 pb) (A) por lo que el producto fue utilizado para análisis de DGGE.

La amplificación con los cebadores 357F-GC/907R muestran doble banda, una a 500pb (B) y la segunda ligeramente debajo de la primera probablemente debido a la formación de dímeros de los cebadores.

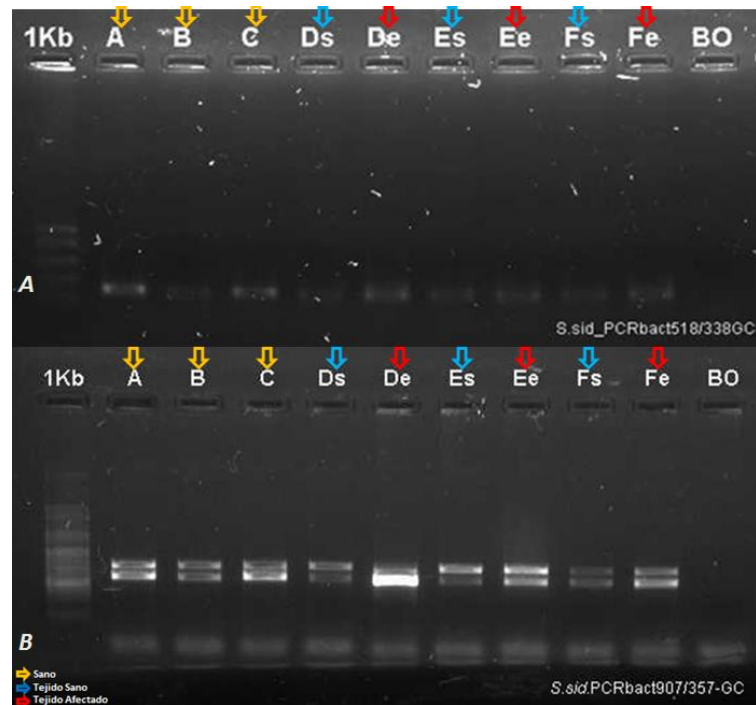


Figura 12.- Electroforesis de agarosa al 1% que muestran productos de PCR con los primers 338F-GC y 518R (A) y los primers 357F-GC y 907R (B) en especímenes de coral *Siderastrea siderea* de Akumal, Q. Roo. Tres corales saludables con colecta por triplicado (A, B y C) señalados en amarillo y tres corales afectados por el síndrome de MN con colecta por triplicado (D, E y F) en ambos estados de afectación (s=sano, e=afectado) señalados con azul y rojo respectivamente, un control negativo (BO) en la parte derecha de cada gel.

La figura 13 muestra los resultados de amplificación del gen 16S ARNr para la especie de coral *O. faveolata*. La amplificación con el par de cebadores 338F-GC/518R muestra una banda de tamaño esperado (180 pb) (A) con distintas intensidades (Figura 13, A). Nuevamente la amplificación con el segundo par de cebadores (357F-GC/907R) muestra una segunda banda bajo la banda de tamaño esperado (Figura 13, B).

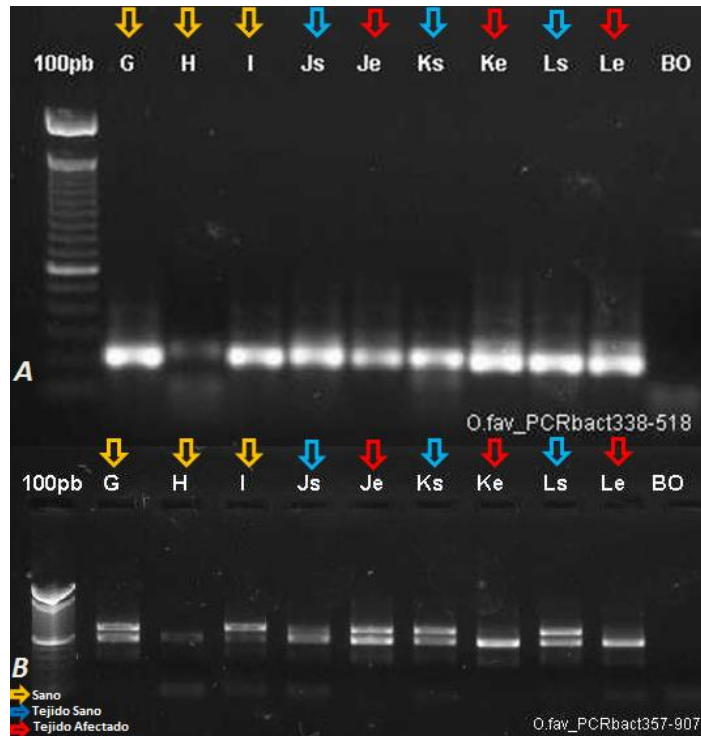


Figura 13.- Electroforesis de agarosa al 1% que muestran productos de PCR con los cebadores 338F-GC y 518R (A) y los cebadores 357F-GC y 907R (B) en especímenes de coral *Orbicella faveolata* de Akumal, Q. Roo. Tres corales saludables con colecta por triplicado (G, H e I) señalados en amarillo y tres corales afectados por el síndrome de BA con colecta por triplicado (J, K y L) en ambos estados de afectación (s=sano, e=afectado) señalados con azul y rojo respectivamente, un control negativo (BO) en la parte derecha de cada gel.

Muestra H

La muestra H se realizó separadamente resultando una mejor amplificación e igualando la intensidad de las bandas de las otras muestras (resultados no mostrados), se aprecia en la figura 13 su amplificación sin modificación.

Hongos

PCR-semianidada

La figura 14.A muestra que en la amplificación del gen 18S ARNr de la especie *S. siderea* con los cebadores ITS-1/ITS-4 se obtuvo el tamaño de fragmento esperado (~650pb). La segunda reacción, (14.B) muestra que la amplificación del producto de la primera reacción con los cebadores ITS3/ITS4-GC obtuvo el tamaño de fragmento esperado (~350 pb) entre otras bandas. Los productos obtenidos de la segunda reacción fueron utilizados para la realización de la prueba de DGGE. En la segunda reacción de PCR, se ingresó el producto del control negativo (BO) de la primera reacción (no mostrado en la Figura 14.A) para descartar amplificación por contaminación.

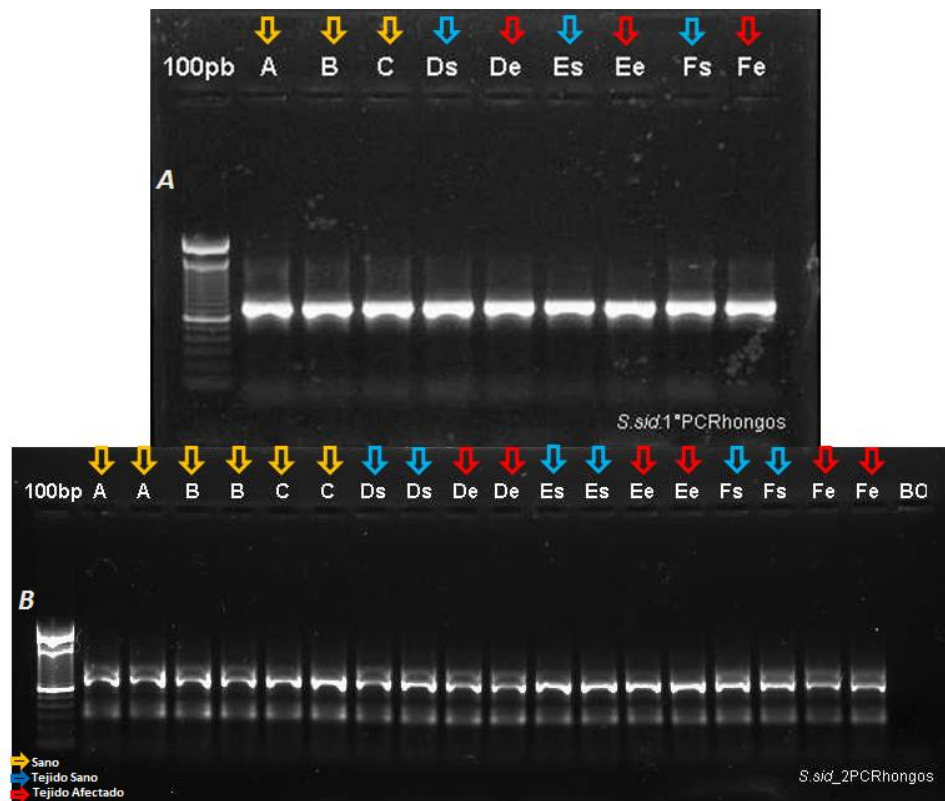


Figura 14.- Electroforesis de agarosa al 1% que muestran productos de PCR con los cebadores ITS1/ITS4 (A) y los cebadores ITS3/ITS4-GC (B, duplicado de cada muestra) en especímenes de coral *S. siderea* de Akumal, Q. Roo. Tres corales saludables con colecta por triplicado (A, B y C) señalados en amarillo y tres corales afectados por el síndrome de MN con colecta por triplicado (D, E y F) en ambos estados de afectación (s=sano, e=afectado) señalados con azul y rojo, un control negativo (BO) en la parte derecha de la figura B.

La figura 15.A muestra la amplificación del gen 18S ARNr de la especie *O. faveolata* con los cebadores ITS-1/ITS-4 en donde se obtuvo el tamaño de fragmento esperado (~ 650pb). La segunda reacción, (15.B) muestra que la amplificación del producto de la primera reacción con los cebadores ITS3/ITS4-GC obtuvo el tamaño de fragmento esperado (~350 pb). Los productos obtenidos de la segunda reacción fueron utilizados para la realización de la prueba de DGGE. Ambas reacciones tienen se realizaron con un control negativo (BO) para descartar amplificación por contaminación.

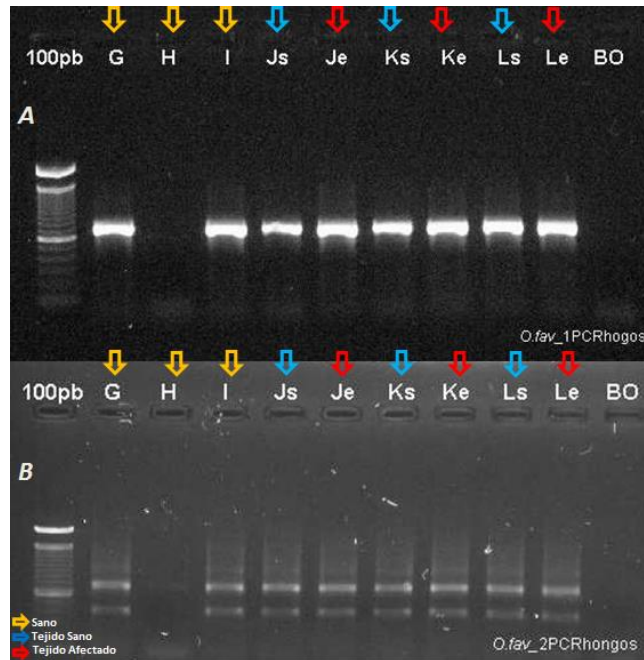


Figura 15.- Electroforesis de agarosa al 1% que muestran productos de PCR con los cebadores ITS1/ITS4 (A) y los cebadores ITS3/ITS4-GC (B, duplicado de cada muestra) en especímenes de coral *O. faveolata* de Akumal, Q. Roo. Tres corales saludables con colecta por triplicado (G, H e I) señalados en amarillo y tres corales afectados por el síndrome de MN con colecta por triplicado (J, K y L) en ambos estados de afectación (s=sano, e=afectado) señalados con azul y rojo, un control negativo (BO) en la parte derecha de la figura B.

DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

Bacterias

Con los productos obtenidos del PCR se realizaron un total de seis DGGE's. Dos de ellos con el juego de cebadores 338F-GC y 518R, uno para la especie *S. siderea* y el otro para la especie *O. faveolata* (Figura 16A y B, respectivamente). Cada banda fue considerada como una unidad taxonómica operacional (OTU por sus siglas en ingles).

En el coral *S. siderea* se observan un total de 18 OTU's en coral saludable, y 49 OTU's de coral afectado (Grafica 1). El número total de OTU's de la parte saludable del coral afectado fue de 27 y de OTU's de la parte afectada del coral afectado fue de 45 (Gráfica 1). La intensidad de cada OTU fue variable dependiendo del coral, de su estado de salud y del tamaño de la banda que compone a la OTU (Figura 16).

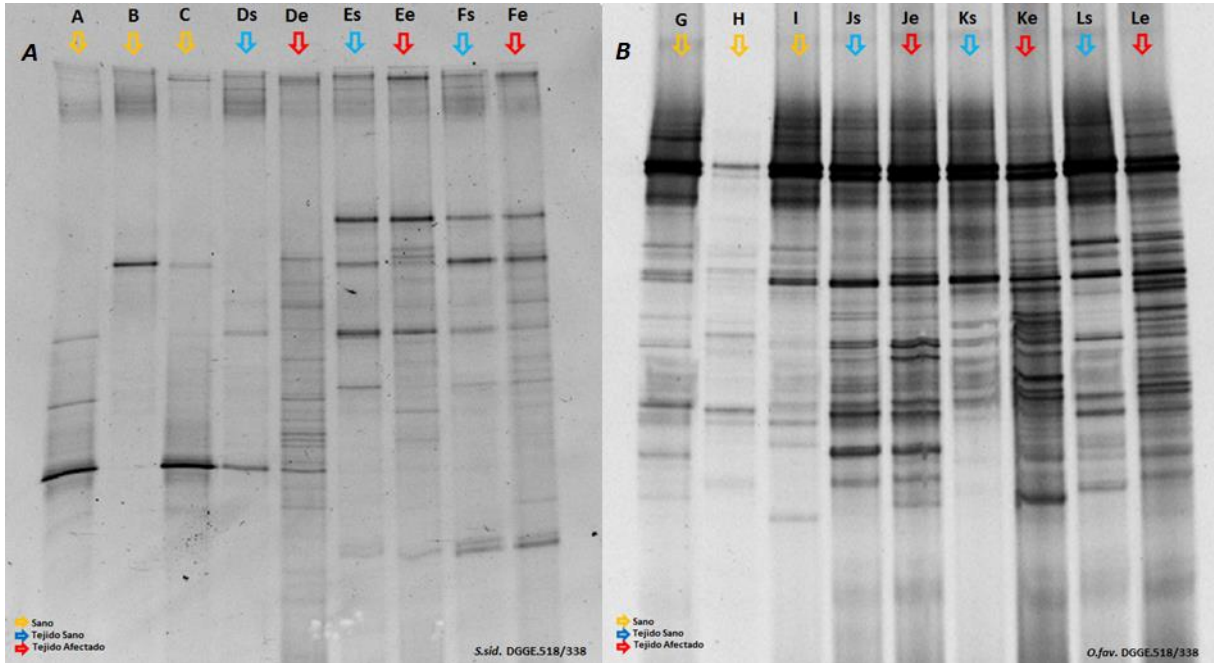
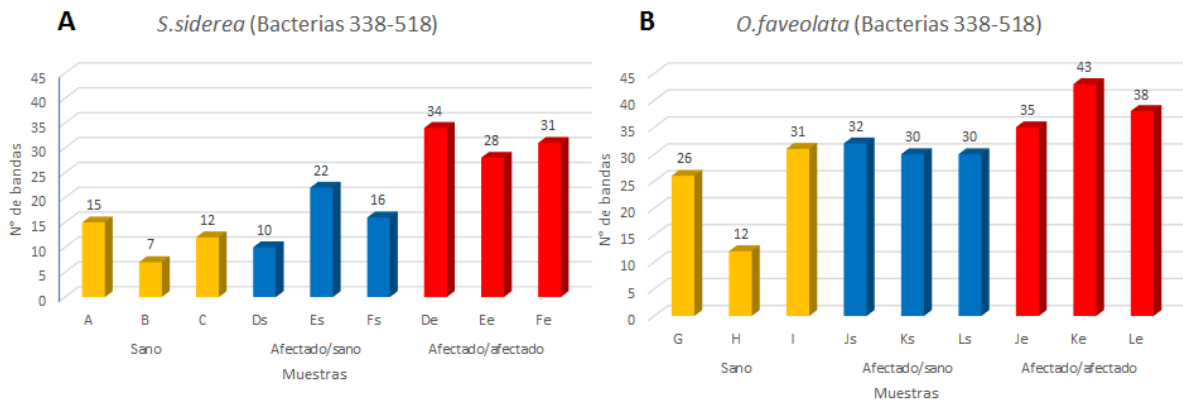


Figura 16.- DGGE con el para de cebadores 338F-GC/518R de la especie *S. siderea* (A) y de la especie *O. faveolata* (B). En amarillo corales saludables (A, B, C, G, H e I), en azul y rojo corales afectados, tejido saludable (s) y afectado (e) respectivamente (D, E, F, J, K y L).

La gráfica 1 muestra el análisis del gel presentado en la figura 16. El mayor número de bandas se observa en el coral “Ke” (*O. faveolata* afectado) y el menor en el coral “B” (*S. siderea* sano), en ambas especies, es notorio el aumento de bandas en los organismos afectados.



Gráfica 1.- Cantidad de bandas detectadas por DGGE de bacterias encontradas en cada muestra de ambas especies de coral. A) *S. siderea* y B) *O. faveolata*. En amarillo las muestras sanas, en azul y rojo las muestras de corales afectados de tejido sano y afectado respectivamente. A-L corales (mezclas de los triplicados), e (tejido afectado), s (tejido aparentemente saludable).

Tabla 6.- Diversidad de Shannon de OTU's de bacterias, calculada para cada estado de salud de ambas especies de coral. Cebadores 338F-GC/518R.

Estado	<i>S.siderea</i>		<i>O.faveolata</i>	
	N° de OTU's	Shannon	N° de OTU's	Shannon
Sano	18	2.82	37	3.52
Afectado/sano	27	3.21	42	3.67
Afectado/afectado	45	3.72	47	3.78

Los análisis de diversidad de Shannon muestran que, no sólo hay un aumento en el número de bandas (número de OTUs), sino también existe un aumento en la diversidad de los corales afectados (Tabla 6).

Para analizar a más detalle los datos obtenidos, se realizó un análisis de CLUSTER que muestra una clara división entre el coral *S.siderea* sano y afectado (Figura 17A). No obstante, una de las muestras de coral afectado (parte saludable) se agrupa en el CLUSTER de los corales sanos.

Para el coral *O. faveolata* el análisis de CLUSTER no muestra una clara división entre corales sanos y afectados (Figura 17B). La muestra “H” sale completamente de cualquier agrupación lo cual la convierte en incomparable con el resto, por esta razón fue eliminada del MDS. La muestra “G” se agrupa con “Ke” la cual pertenece a una muestra de coral afectado (tejido afectado), mientras que la muestra “I” se agrupa con la muestra “Ls” la cual pertenece a una muestra de coral afectado (tejido saludable). El resto de las muestras forman un grupo aparte que a su vez se divide en dos grupos de corales afectados-tejido saludable (Je y Le).

Para visualizar los datos de CLUSTER se llevó a cabo el análisis de MDS de *S. siderea* el cual mostró una clara separación en tres grupos; dos de ellos con un pequeño traslape (Figura 17). Los corales sanos se agrupan todos del lado izquierdo de la gráfica (amarillo), mientras que los afectados-tejido afectado- se agrupan del lado derecho (rojo). Los corales afectados pero de la zona sana forman un grupo intermedio (azul) con un traslape causado por el coral “Ds” (Figura 17).

El análisis de ANOSIM para la especie *S. siderastea* muestra un valor estadístico de R global de 0.638, mientras que para grupos: sano-afectado/sano R=0.481, sano-afectado/afectado R=0.852 y afectado/sano-afectado/afectado R=0.444.

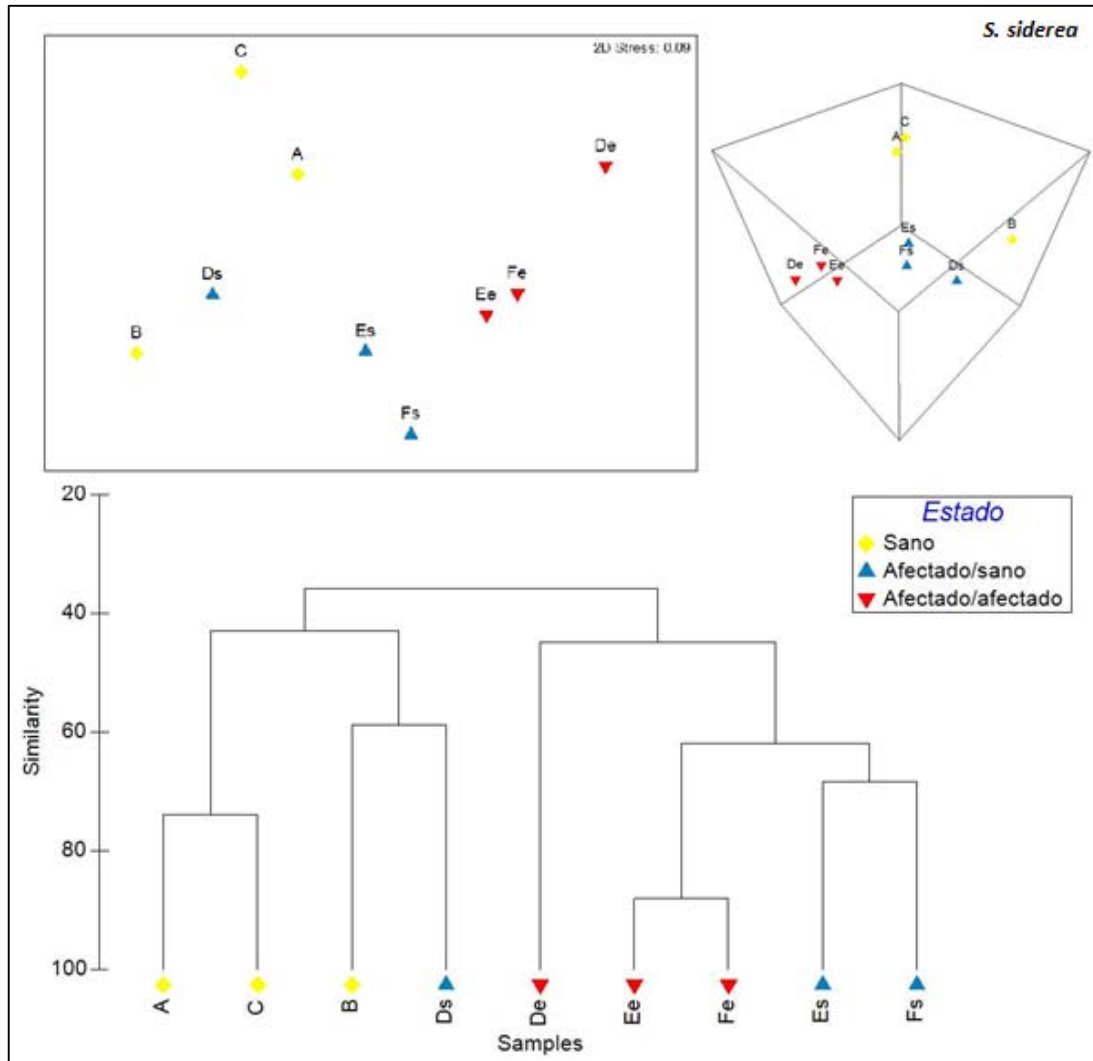


Figura 17.- Análisis de CLUSTER y MDS para las muestras de bacterias de corales *S. siderastea*.

Para *O. faveolata*, los resultados del análisis MDS no mostraron una agrupación tan clara para los distintos estados de salud del coral (Figura 18). Las muestras de corales saludables (G e I) forman un grupo en la parte derecha superior del gráfico de MDS, mientras que el coral afectado presenta traslapes entre los grupos formados por las zonas afectada y sana (Figura 18).

El análisis de ANOSIM para la especie *O. faveolata* arroja un valor grupal de R de 0.279, mientras que para cada grupo los valores fueron los siguientes: sano-afectado/sano R=0.75, sano-afectado/afectado R=0.25 y afectado/sano-afectado/afectado R=0.11.

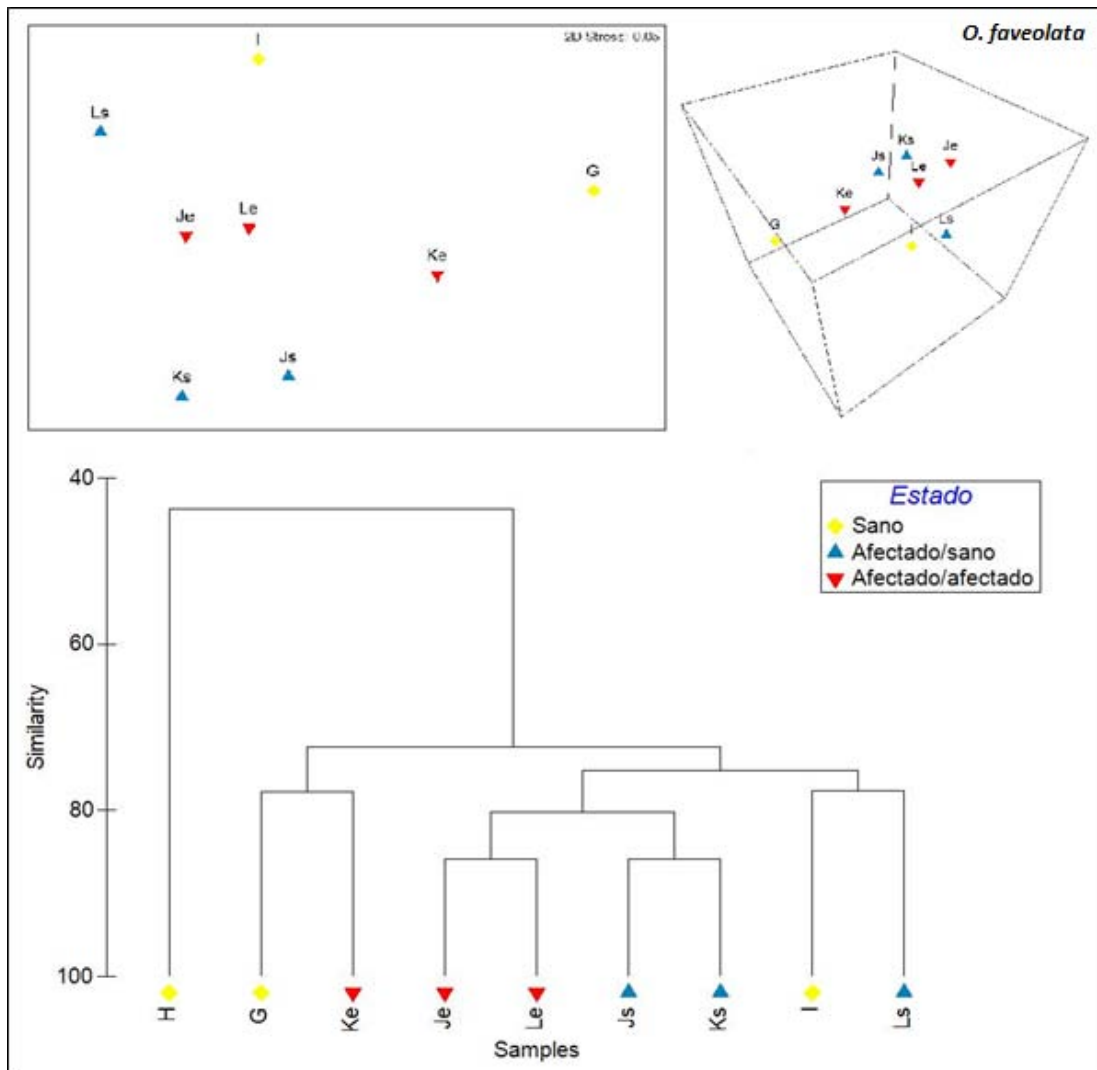


Figura 18.- Análisis de CLUSTER y MDS para las muestras de bacterias de corales *O.faveolata*.

Los gels obtenidos con el segundo par de cebadores para bacterias (357F-GC/907R) se muestran en la figura 19. Debido a que la longitud del fragmento obtenido con estos cebadores es mayor que la del set anterior, estos fragmentos fueron utilizados para estudios de secuenciación. Los fragmentos que se enviaron a secuenciar aparecen marcados en rojo y se muestran en la tabla 7.

En la figura 19A se presentan los tres estados de salud/afectación de la especie *S. siderea*. Un total de 19 OTU's se encuentran en corales saludables mientras que 42 OTU's se presentan en corales afectados. En los corales afectados, 15 OTU's están presentes en tejido saludable y 40 en tejido afectado. La muestra "De" la cual corresponde a una muestra de coral afectado-tejido afectado- tiene una mayor abundancia en OTUs (bandas) que cualquiera de las otras muestras de esta especie con 31 OTU's (Figura 19A). Para la especie *O. faveolata*, se presentn un total de 25 OTU's en corales saludables y 43 OTU's en corales afectados, 32 OTU's se presentan en corales afectados-tejido saludable y 34 OTU's en organismos afectados-tejido afectado (Figura 19B).

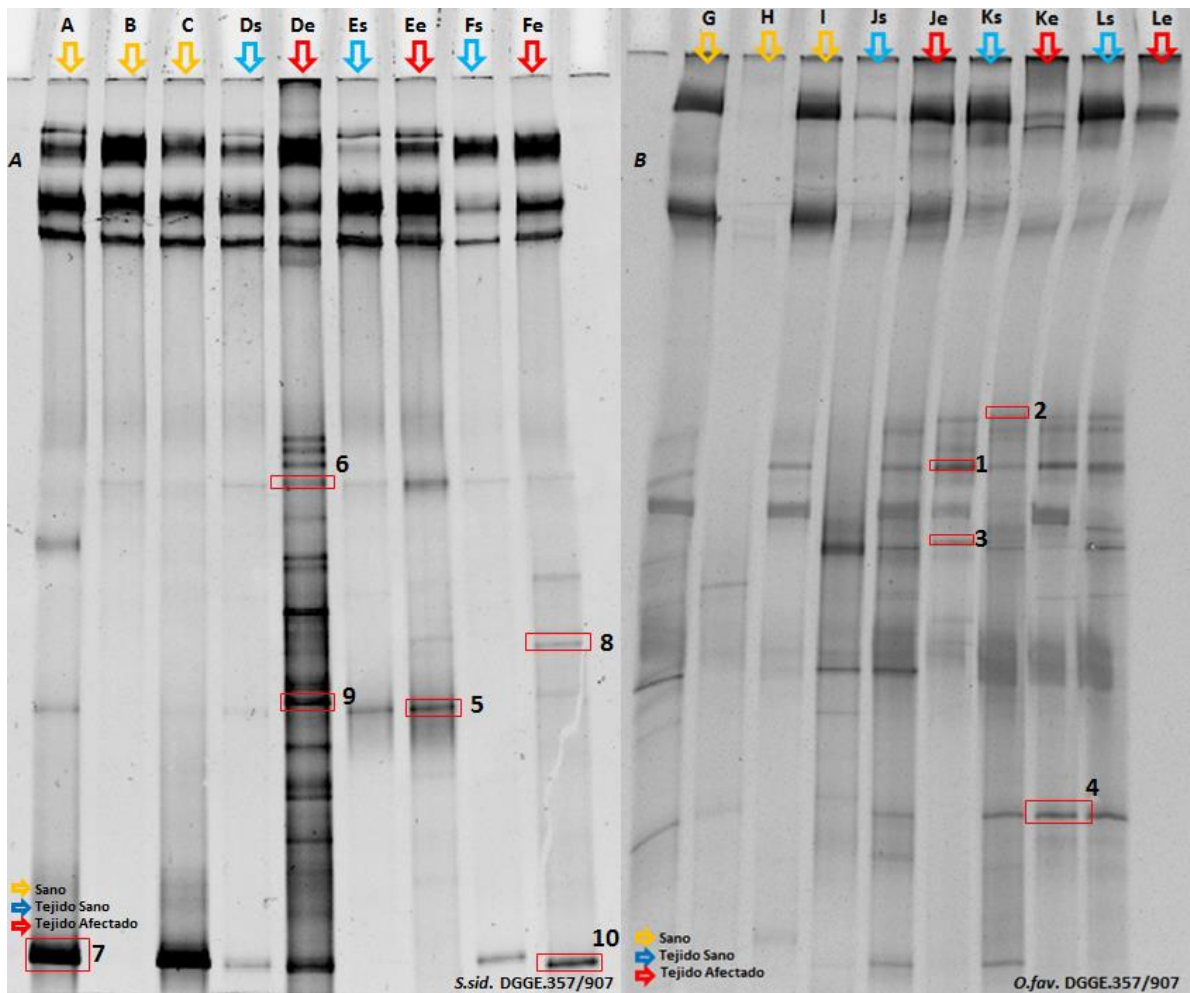
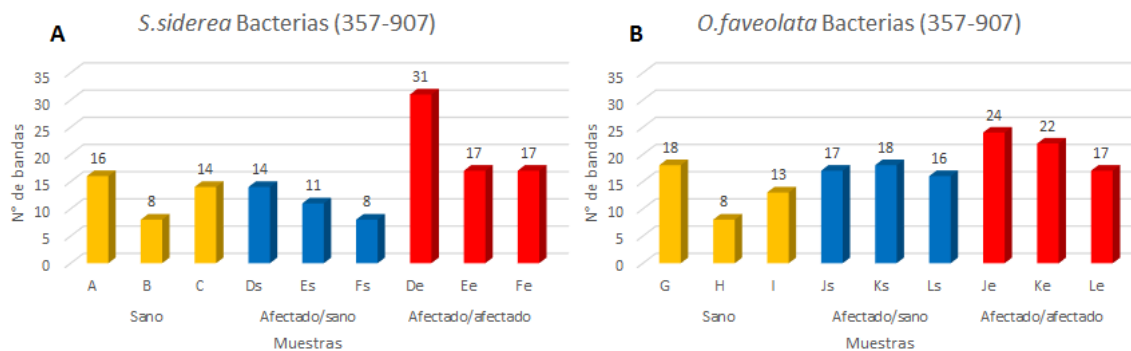


Figura 19.- DGGE del segundo par de cebadores 357F-GC/907R de la especie *S. siderea* (A) y de la especie *O. faveolata* (B). En amarillo corales saludables (A, B, C, G, H e I), en azul y rojo corales afectados, tejido saludable (s) y afectado (e) respectivamente (D, E, F, J, K y L).



Gráfica 2.- Cantidad de bandas de bacterias encontradas en cada muestra de ambas especies de coral. A) *S. siderea* y B) *O. faveolata*. En amarillo las muestras sanas, en azul y rojo las muestras de corales afectados de tejido sano y afectado respectivamente.

Tabla 7.- Diversidad de Shannon de OTU's de bacterias, calculada para ambas especie de coral. Cebadores 357F-GC/907R.

Estado	<i>S. siderea</i>		<i>O. faveolata</i>	
	Nº de OTU's	Shannon	Nº de OTU's	Shannon
Sano	18	2.74	25	2.75
Afectado/sano	15	2.59	32	3.13
Afectado/afectado	40	3.44	34	3.25

De los 20 fragmentos enviados a secuenciar solamente 10 tuvieron resultados de calidad suficiente para lograr una identificación taxonómica utilizando un Blastn contra la base de datos de GenBank (Tabla 8). La identificación llegó a nivel filo y se observa que los dos fila identificados son Bacteroidetes y Proteobacteria. De ellos, cinco de los fragmentos analizados mostraron similitud con bacterias previamente identificadas en corales y publicadas en la base de datos GenBank (1, 2, 3, 4 y 8). El resto de los fragmentos presentan similitud con clonas de bacterias no cultivadas.

Tabla 8.- Características de las secuencias obtenidas a partir de los DGGE's de bacterias de ambas especies de coral y analizadas mediante Blastn con la base de datos de GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Coral	Estado	N°	Long	% de sim	ID NCBI	Referencia	Filo	Identificación previa
O.fav	sano-/afectado+	1	109	97%	JQ516559	Kimes, 2013	Bacteroidetes	Sphingobacteriales no cultivada de tejido saludable de M. faveolata
O.fav	afectado	2	533	87%	JQ516339	Kimes, 2013	Bacteroidetes	Sphingobacteriales no cultivada de M. faveolata tejido afectado
O.fav	afectado	3	555	99%	GU118635	Sungawa, 2010	Bacteroidetes	Bacteria no cultivada de M. faveolata
O.fav	afectado	4	547	99%	FJ203480	Sunagawa, 2009	Proteobacteria	Alfa no cultivada aislada de tejido de M. faveolata tejido saludable
S.sid	sano-/afectado+	5	97	80%	EU774418	Ley, 2008	Proteobacteria	(Alfa) asociada a intestino de diversos mamíferos y rumiantes
S.sid	sano-/afectado+	6	544	80%	JQ236040	Meron, 2012	Bacteroidetes	Bacteria no cultivada del esqueleto de Cladocora caespitosa (pH 8.1)
S.sid	sano	7	556	90%	AY799960	O'Naill, 2004	Proteobacteria	Bacteria no cultivada Gama (Dyella sp.) reductora de sulfato
S.sid	afectado	8	560	98%	GU118058	Sungawa, 2010	Bacteroidetes	Bacteria no cultivada de Acropora palamta
S.sid	afectado	9	560	99%	FJ463701	Steinert, 2014	Proteobacteria	Alfa (posiblemente Ruegeria sp.) aislada de esponjas marinas
S.sid	afectado	10	238	95%	KC128961	Pires, 2012	Proteobacteria	Dyella sp. (gama) Suelo c/metales pesados del norte de Portugal

Hongos

En la figura 20 se presentan los gels de mejor resolución que se obtuvieron para ambas especies de corales obtenidos con el producto de la PCR semianidada para hongos. Se aprecian bandas inespecíficas y acumulaciones de material indeterminado.

El DGGE sigmoidal para determinación del gradiente a utilizar, se muestran en la figura 21. En él, se aprecia que el intervalo en el que las muestras presentan una degradación adecuada para la prueba de DGGE perpendicular es de 25% a 55% aproximadamente (Figura 21).

Los gels de ambas especies de corales obtenidos con el producto de la PCR semianidada para hongos se muestran en la figura 20. Se aprecian bandas inespecíficas y acumulaciones de material indeterminado. Cabe destacar que este gel presentó problemas y las condiciones de tiempo de corrida, voltaje y porcentaje del gel así como el gradiente, se probaron en diversas ocasiones, sin embargo, las fotos presentadas en este documento fueron las que mejores resultados arrojaron. El DGGE sigmoidal para la determinación del gradiente a utilizar, se muestra en la figura 20, y solo se realizó para este gel debido a los problemas ya mencionados. En el gel se aprecia que el rango en el que las muestras presentan una degradación adecuada para la prueba de DGGE perpendicular es de 25% a 55% aproximadamente (Figura 20).

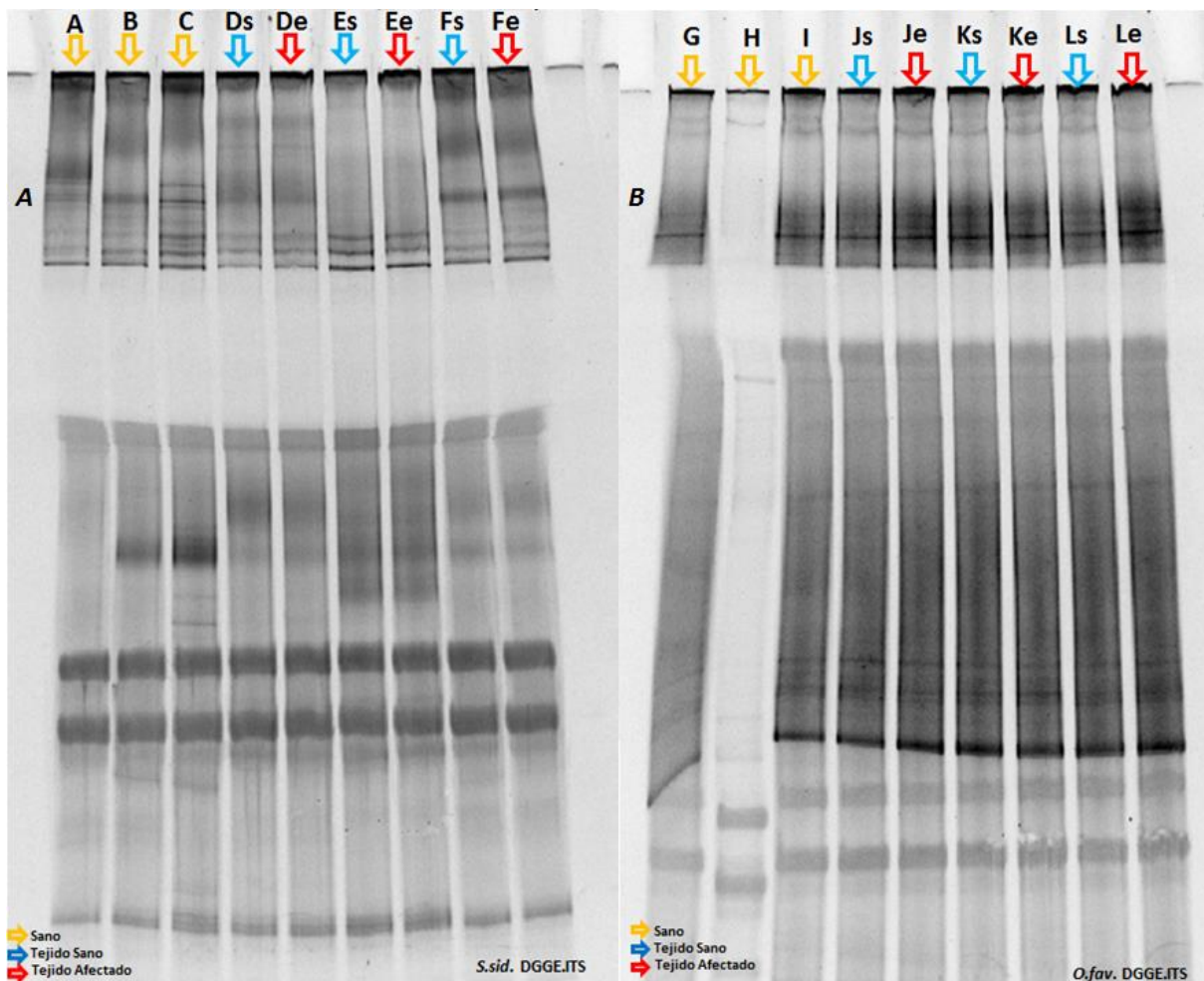


Figura 20.- DGGE de cebadores ITS3/ITS4-GC de la especie *S. siderea* (A) y de la especie *O. faveolata* (B). En amarillo corales saludables (A, B, C, G, H e I), en azul y rojo corales afectados, tejido saludable (azul) (s) y afectado (rojo) (e) respectivamente (D, E, F, J, K y L).

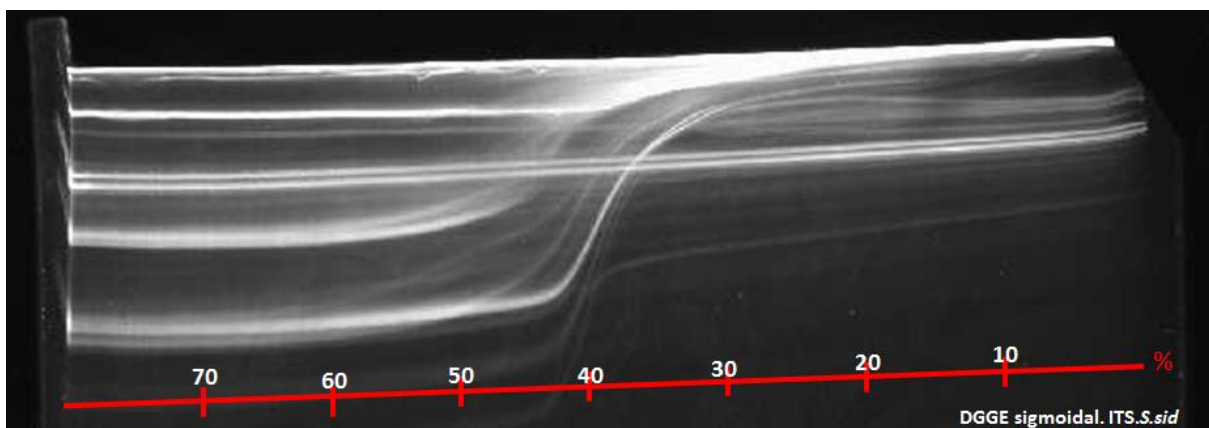
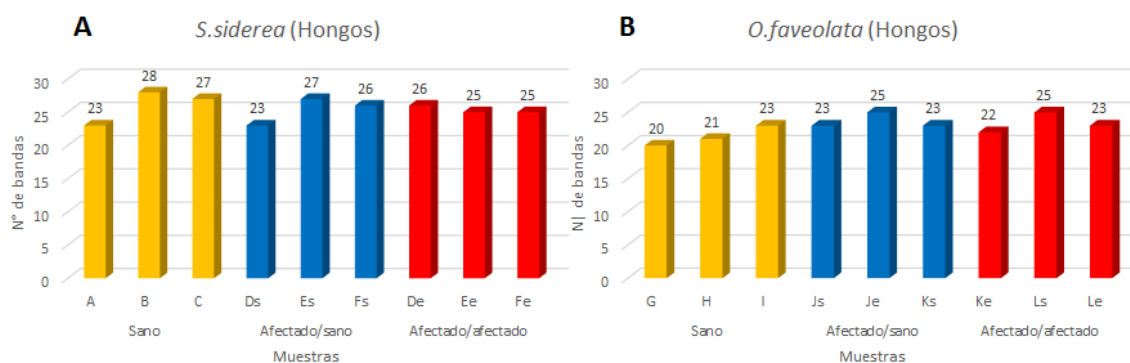


Figura 21.- DGGE sigmoidal para detectar el rango de degradación de las muestras pool para hongos en el coral *S. siderea*. Cebadores ITS3/ITS4-GC. Se aprecian bandas que no responden a la degradación.

La gráfica 3 muestra el análisis de las imágenes de la figura 20. En ella se ve que el máximo de bandas aparece en el coral B (*S. siderea* sano) y el mínimo en el coral G (*O. faveolata* sano). En ninguna de las especies y en ninguno de los estados de salud/afectación del coral se observa una disminución o aumento en la cantidad de bandas presentes.



Gráfica 3.- Cantidad de bandas encontradas en cada especie de coral utilizando los cebadores ITS3/ITS4-GC. **A)** *S. siderea* y **B)** *O. faveolata*. En amarillo las muestras sanas, en azul las muestras de corales afectados de tejido sano y en rojo las muestras de corales afectados de tejido afectado.

En la tabla 9 se observa el número de OTUs presentes en ambas especies de coral. Para la especie *S. siderea* se observan 41 OTUs en corales saludables y 42 OTUs en corales afectados. En los corales afectados se presentan 39 OTUs en tejido saludable y 40 en tejido afectado.

Para la especie *O. faveolata* se obtuvieron 32 OTUs en corales saludables y 28 OTUs en corales afectados. En corales afectados se presentaron 28 OTUs en tejido saludable y 27 en tejido afectado.

Tabla 9.- Diversidad de Shannon y número de OTU's calculada para cada estado de salud de ambas especies de coral utilizando los cebadores ITS3/ITS4-GC.

Estado	<i>S.siderea</i>		<i>O.faveolata</i>	
	Nº de OTU's	Shannon	Nº de OTU's	Shannon
Sano	41	3.52	32	3.13
Afectado/sano	39	3.46	28	3.13
Afectado/afectado	40	3.47	27	3.11

La prueba de ANOSIM para la especie *S. siderastrea* mostro un valor global de R de -0.004, mientras que para los grupos fue de: sano-afectado/sano R=0.185, sano-afectado/afectado R=0.111, afectado/sano-afectado/afectado R=-0.37.

Para la especie *O. faveolata* la prueba de ANOSIM arrojó un valor global de R de 0.062 mientras que para los grupos: sano-afectado/sano R=0.333, sano-afectado/afectado R=0.148, afectado/sano-afectado/afectado R=-0.556.

El análisis del gel DGGE de hongos (ITS3/ITS4) para la especie *S. siderea* evidenció dos grupos con las pruebas de MDS y CLUSTER (Figura 22 y 23). Uno de los grupos se compone por todas las muestras de corales saludables en tres clados distintos cada uno, lo cual a su vez, sugiere que los corales saludables no comparten una comunidad de hongos común. Sin embargo, no todos los corales afectados se encuentran en el mismo grupo ya que el coral F (tanto tejido saludable como afectado), se agrupa junto con el coral B. Los otros dos corales afectados si forman un clado en conjunto y dentro de este ambos corales se separan uno del otro. El MDS evidencia el agrupamiento descrito anteriormente, se aprecia cada coral saludable (**A**, **B** y **C**) en color amarillo en cierto espacio y sin embargo separados unos de otros, mientras que las muestras afectadas (**De**, **Ee** y **Fe**) y sus respectivas contrapartes (**Ds**, **Es** y **Fs**) se agrupan por organismo, independientemente del estado de afectación (Figura 22)

El mismo análisis para la especie *O. faveolata* muestra resultados similares. Nuevamente, el análisis CLUSTER mostró que la muestra "H" sale del rango completamente, por lo que se decidió no incluirla en el MDS. Para *O. faveolata* se aprecian las muestras saludables (G, H e I) en un determinado espacio mientras que las muestras de coral afectado se agrupan conjuntamente con su contraparte. Al igual que en *S. siderea*, es posible observar el agrupamiento por coral y, en este caso, también por estado de salud (Figura 23).

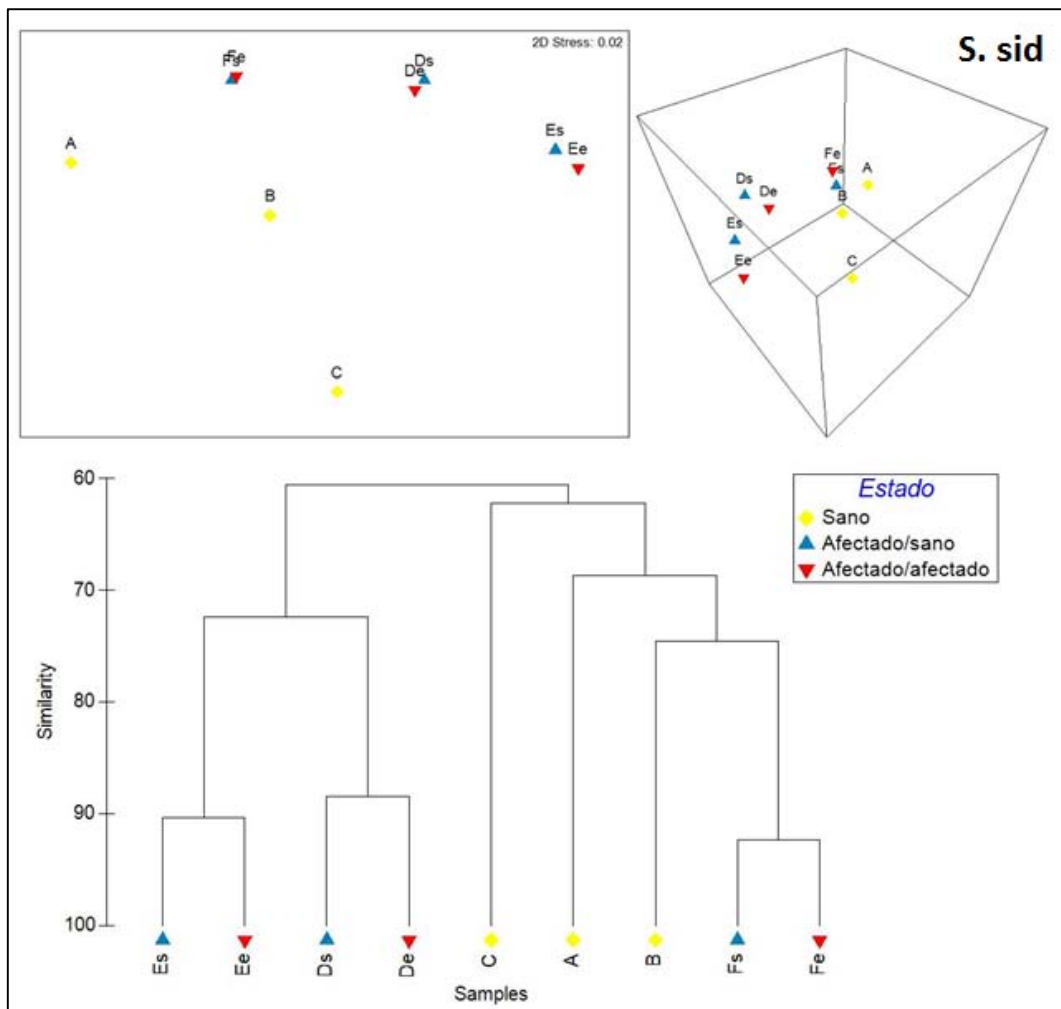


Figura 22.- Análisis CLUSTER y MDS para las bandas del gel DGGE que fueron amplificadas con primers ITS3/ITS4-GC para hongos a partir de los corales *S. siderea*.

Comparación de comunidades microbianas entre especies de coral

A fin de lograr un análisis que englobe los resultados de éste trabajo, se realizó una comparación entre especies de coral y su microbioma (Figura 24). Esta comparación muestra una clara diferencia entre los microbiomas de corales que se evidencian por la diferencia de posición de las bandas sobre el gel DGGE. Esta diferencia se mantiene en el análisis con cebadores del ITS del 18S de hongos. La gráfica 4 muestra el resultado de la evaluación de los datos obtenidos, i.e. conteo de las bandas (OTUs) de cada muestra. Los resultados indican que la especie *O. faveolata* tiene un mayor número de OTUs que *S. siderea*. Por otro lado, los resultados del análisis de OTUs de hongos muestran que la diferencia entre tejido afectado y sano de *S. siderea* es muy bajo ya que solamente se diferencian por dos bandas. Para *O. faveolata* esta diferencia con el tejido afectado es de una desaparición de cuatro bandas (Figura 25, gráfica 4).

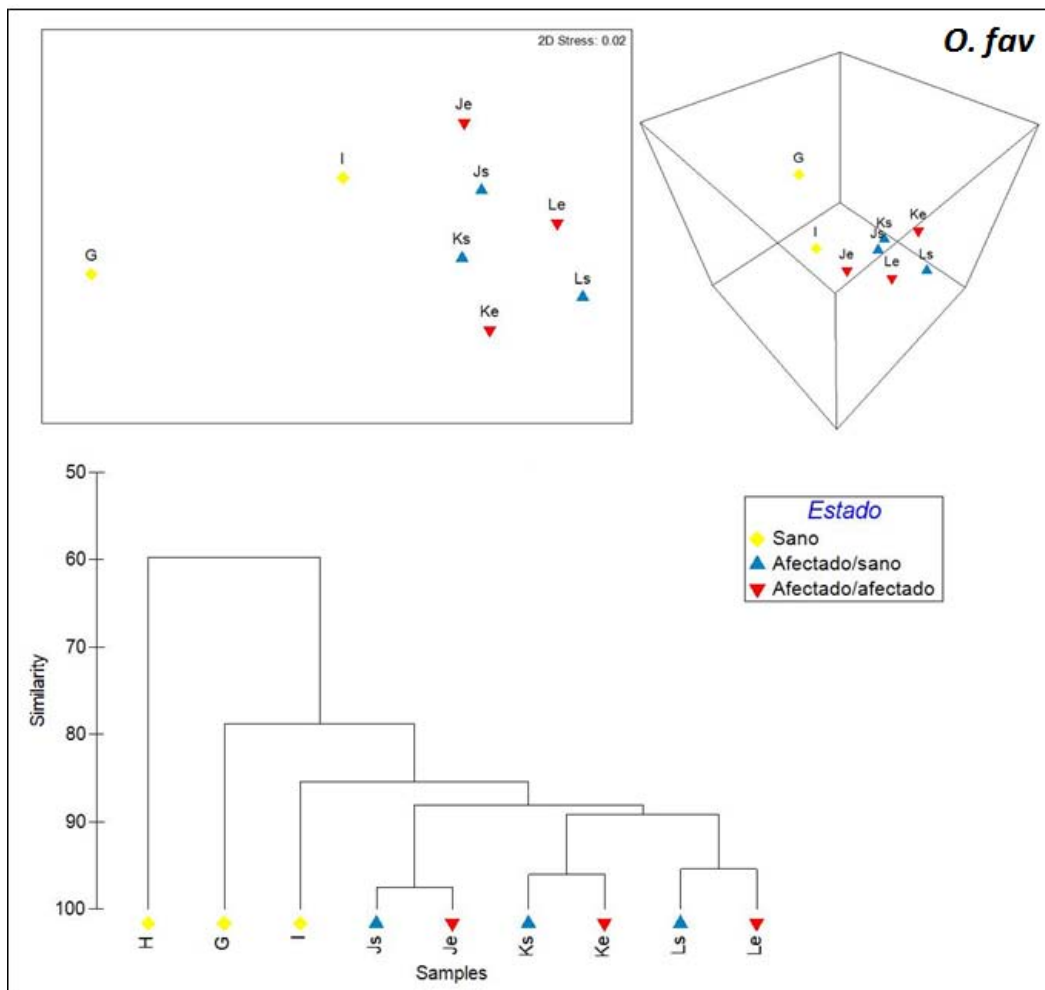


Figura 23.- Análisis CLUSTER y MDS para las bandas del gel DGGE que fueron amplificadas con cebadores ITS3/ITS4-GC para hongos a partir de los corales *O. faveolata*.

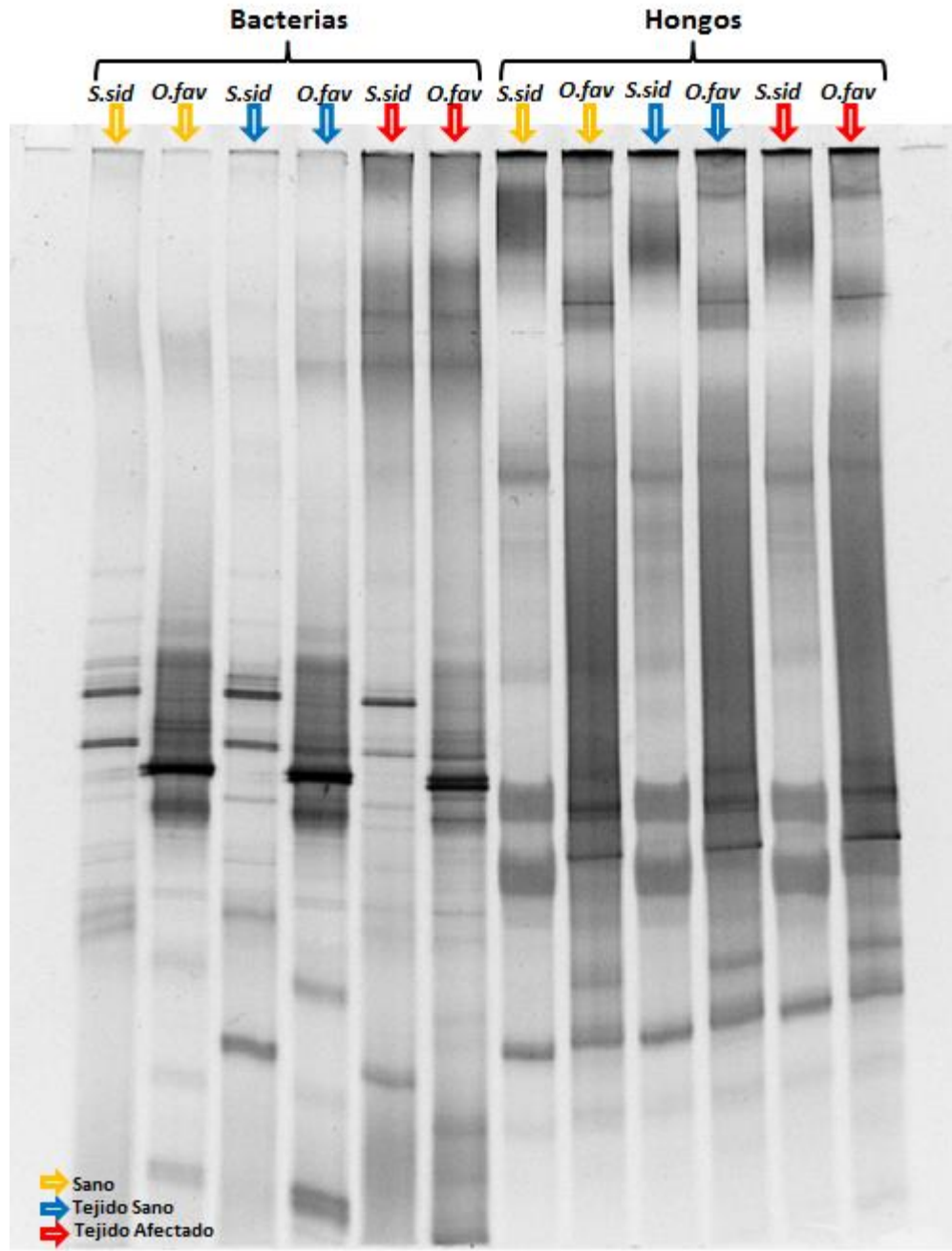
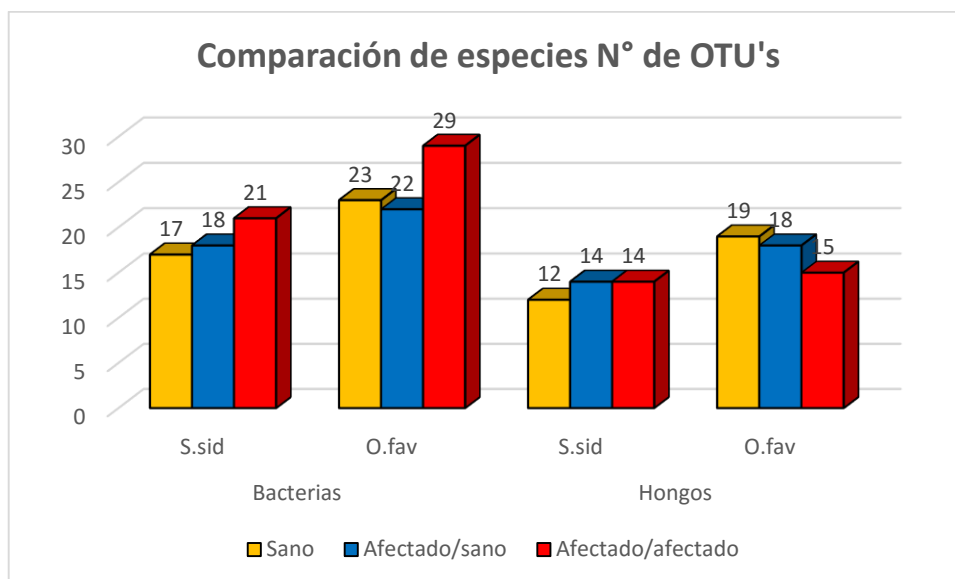


Figura 24.- DGGE de bacterias (338-518) y hongos (ITS3/4) de ambas especies *S. siderea*, y *O. faveolata*. Flechas amarillas: muestras de corales sanos, flechas azules: muestras de corales afectados tejido sano, flechas rojas: muestras de corales afectados tejido afectado.



Gráfica 4.- OTU's de bacterias y hongos presentes en cada estado d salud o afectación de ambas especies de coral.

Los índices de diversidad se calcularon en éste último gel para cada muestra con el fin de comparar entre ambas especies utilizando la misma fotografía para evitar errores por cambio de intensidad de pixeles. La tabla 8 muestra que *S. siderea* presenta una diversidad mayor en corales afectados tejido afectado con 3.04 que para corales sanos y afectados de tejido sano que presentaron una diversidad de 2.83 y 2.88 respectivamente.

Tabla 10.- Diversidad de OTU's de bacterias y hongos presentes en las muestras de ambos corales calculado a partir del gel de la figura 23.

Microorganismos	Bacterias (338-518)				Hongos (ITS)			
	<i>S. siderea</i>		<i>O.faveolata</i>		<i>S. siderea</i>		<i>O.faveolata</i>	
Coral	OTU's	Shannon	OTU's	Shannon	OTU's	Shannon	OTU's	Shannon
Diversidad	(S)	(H')	(S)	(H')	(S)	(H')	(S)	(H')
Sanos	17	2.83	23	3.12	12	2.48	19	2.93
Afectados/sanos	18	2.88	22	3.07	14	2.63	18	2.88
Afectados/afectados	21	3.04	29	3.35	14	2.63	15	2.70

Para *O. faveolata* los corales afectados tejido afectado también presentan una diversidad mayor (3.35) que las muestras de sanos y afectados tejido sano (3.12 y 3.07 respectivamente).

Para las muestras de ITS 18S, en la especie *S. siderea* la diversidad entre corales sanos y afectados no es muy variable, mientras que para *O. faveolata* el valor de diversidad de la

muestra de corales sanos (2.93) es mayor que las de corales afectados tejido sano (2.88) y coral afectado tejido afectado (2.70).

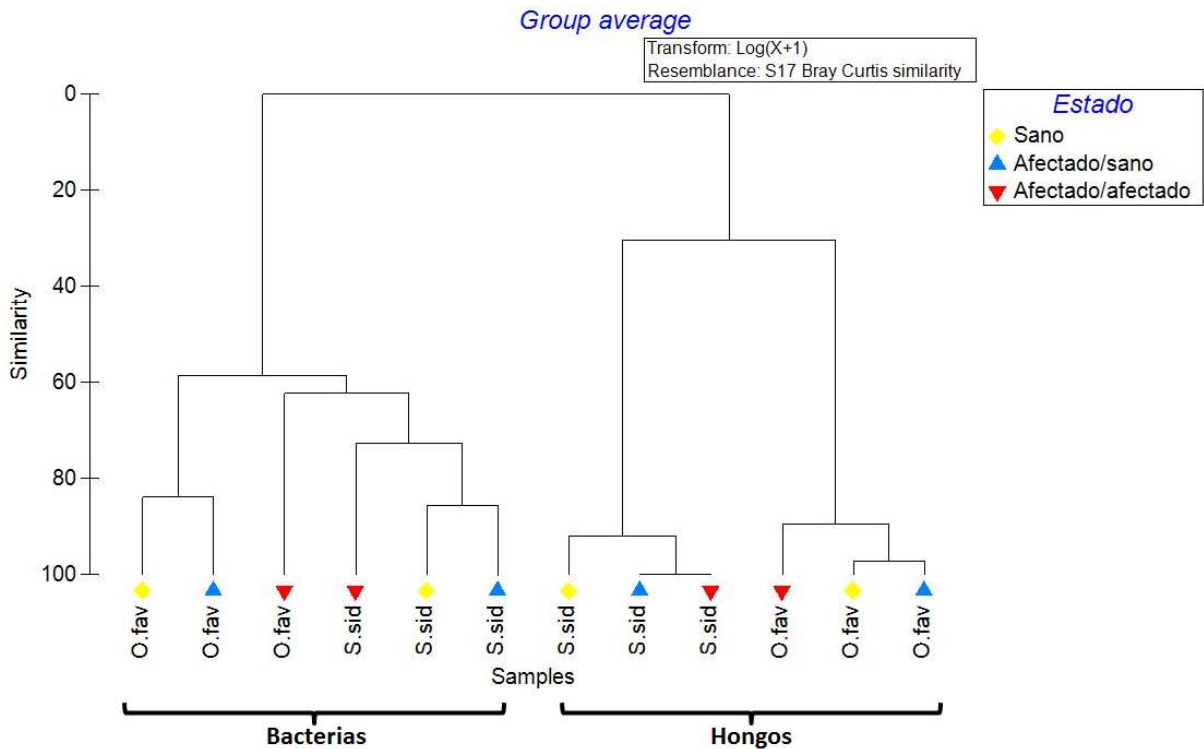


Figura 25.- CLUSTER de las muestras de *S. siderea* y *O. faveolata*. Se aprecian los estados de afectación y su agrupación con respecto al microorganismo observado.

El análisis CLUSTER de la comparación entre corales se presenta en la figura 23 y representa un agrupamiento relacionado por especie de coral. En el se observa una primera agrupación entre resultados de 16S ARNr e ITS 18S. El primer grupo, para ambos análisis muestra un ordenamiento de clusters por especie de coral excepto para *Orbicella faveolata* tejido afectado, la cual se agrupa junto con *S. siderea* tejido afectado. Para 16S ADNr se observa un agrupamiento entre los tejidos sanos para cada especie de coral, dejando a los tejidos afectados en clusters separados (Figura 25). En el análisis de ITS 18S no es evidente una agrupación entre tejidos sanos y afectados para ambas especies.

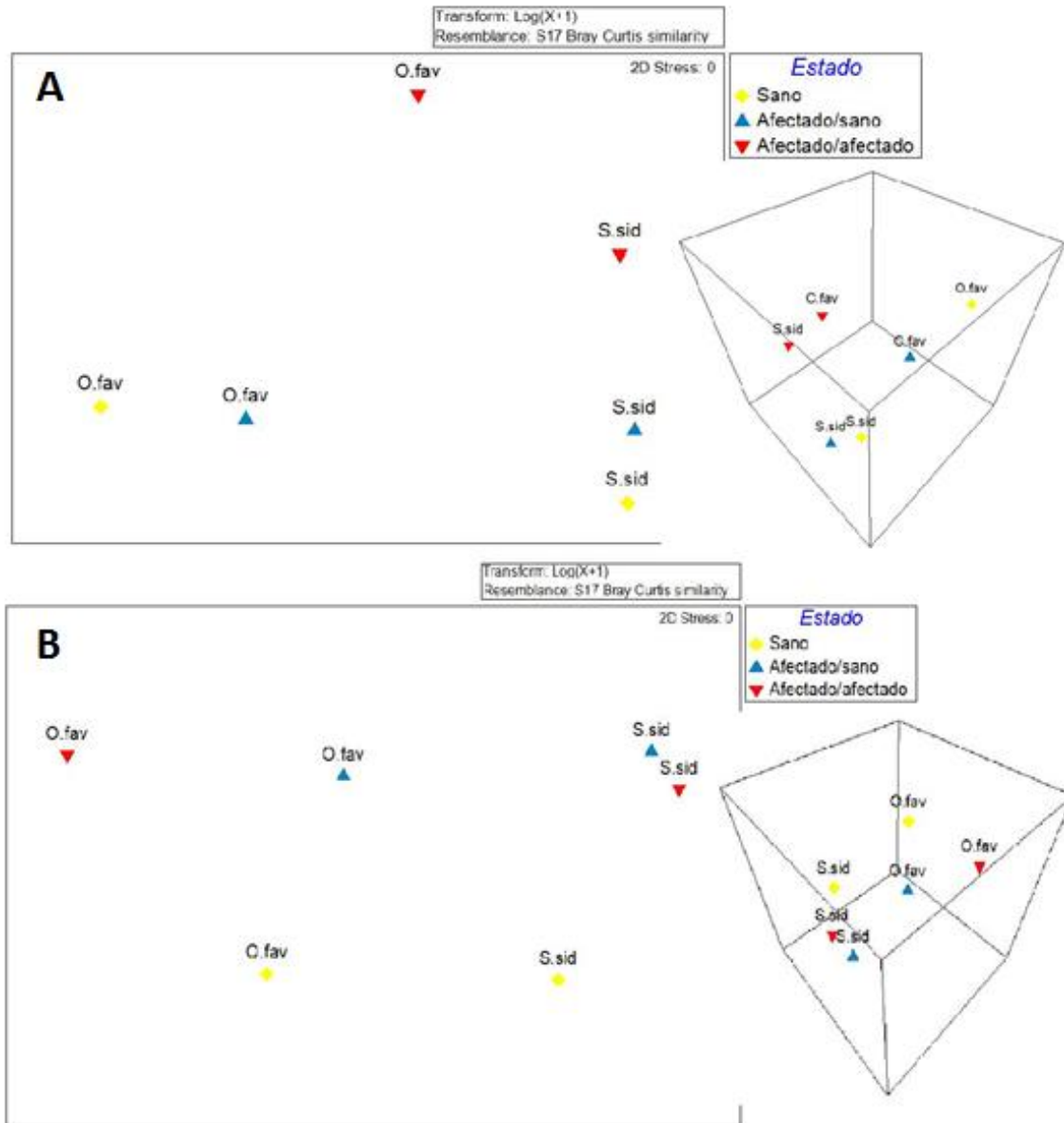


Figura 26.- Análisis de MDS de **A)** bacterias y **B)** hongos, tomando en cuenta los estados de salud o afectación de ambas especies de coral.

El análisis MDS realizado sobre estos datos respalda lo observado en el análisis de CLUSTER (Figura 26). Para el análisis con 16S, se aprecia un agrupamiento entre las muestras de corales saludables y las muestras de tejido saludable para ambas especies, mientras que las muestras de tejido afectado se presentan más alejadas e incluso más cercanas entre ellas mismas (Figura 26A). Para el análisis de ITS 18S, los agrupamientos son más cercanos entre la especie misma

que entre su estado de salud, al mismo tiempo, se observa una separación entre corales sanos y afectados si se traza una línea horizontal imaginaria a la mitad del plano (Figura 26B).

La prueba de ANOSIM para este último gel se calculó tomando en cuenta los estados de salud/afectación, el valor de R global fue -0.229, mientras que para los grupos: sano-afectado/sano $R=-0.25$, sano-afectado/afectado $R=-0.229$, afectado/sano-afectado/afectado $R=-0.219$.

Discusión

Extracción de ADN

Las muestras utilizadas para las pruebas de los tres diferentes métodos de extracción corresponden a organismos representativos de dos estados de salud, 13 de coral saludable y 28 de coral afectado/tejido afectado; se eligieron estos debido que se disponía de más material para la realización de las pruebas. Los barridos que se presentan en las extracciones son característicos de muestras metagenómicas (Bey et al. 2010) debido a la gran cantidad de DNA de los diferentes organismos que pueden habitar el holobionte (Rosenberg et al. 2007; Ainsworth et al. 2010; Krediet et al. 2013).

La comparación entre métodos de extracción de ADN demostró que los kits de extracción siguen siendo la mejor opción para obtener ADN de mejor calidad para pruebas posteriores. A pesar de que el método de Rojas-Herrera y colaboradores es presentado como una buena opción para utilizar en trabajos metagenómicos (Rojas-Herrera et al. 2008), la matriz de coral es mayoritariamente carbonato de calcio y esto puede influir en la baja eficiencia de la extracción. Es notoria la eficiencia que tiene el Kit para purificar la muestra durante el proceso, eliminando sustancias que pueden interferir en la PCR (Chen et al. 2010).

La estandarización de concentraciones de ADN fue utilizada para tener una estimación aproximada de la concentración entre muestras, sin embargo la espectrofotometría no es el mejor método para obtener una estimación altamente confiable (Nielsen et al. 2008; Shokere et al. 2009). Lo anterior es evidente al observar las extracciones de los triplicados de la muestra “H” en donde no se aprecia material y aunque la lectura del espectrofotómetro arrojó un valor promedio de 82.17 al momento de amplificar con PCR (Apéndice), el producto es muy bajo o incluso inexistente (Figura 11).

PCR

Bacterias

Los productos de las amplificaciones del gen 16S ARNr en general arrojan la banda del tamaño esperado (Muyzer et al. 1993, 1995; Toffin et al. 2004; Richardson et al. 2005; Sánchez et al.

2007; Lins-de-Barros et al. 2013; Piterina and Pembroke 2013) y solo se aprecia un aumento en la intensidad de banda de la muestra “De” (*S.siderea*), mientras que la intensidad de banda es baja en la muestra “H” (*O. faveolata*). Lo anterior puede deberse a la poca eficiencia del método de cuantificación antes mencionado (Nielsen et al. 2008; Shokere et al. 2009) o bien a la cantidad del DNA de interés presente en la muestra, es decir que la cuantificación sea correcta y sin embargo el DNA que se busca con los cebadores específicos no tenga la calidad o tamaño apropiado para la amplificación (Innis et al. 2012).

Los productos de la reacción de PCR con el segundo par de cebadores (357F-GC/907R) arrojaron una segunda banda por arriba de la esperada, lo cual puede generarse por una amplificación no específica de los cebadores debido a las condiciones a las que se corrió la reacción, ya sea concentración de Mg, concentración de cebadores, temperatura de alineamiento no específica para los cebadores o número de ciclos de la reacción lo cual causa la aparición de más de una banda en el producto amplificado (Chou et al. 1992; Hecker and Roux 1996; Espinosa 2007).

Hongos

Los productos de la amplificación del gen 18S ARNr arrojan una banda densa con el primer par de cebadores y doble banda con los segundos, lo cual es lo esperado para una PCR-semianidada pues se amplifica el fragmento final a partir de un fragmento más grande, (Oros-Sichler et al. 2006; Kumar and Tuohy 2013), ambos fragmentos se ven reflejados en la última reacción (Figura 14B y 15B). La PCR-semianidada de la especie *S. siderea* (Figura 14B) muestra además de estas dos bandas esperadas, otras inespecíficas, aunque los cebadores utilizados para estas reacciones están reportados como específicos para hongos (White et al. 1990; Sweet and Bythell 2012) se considera que no son los más adecuados para el análisis de hongos de la especie *S. siderea* debido a que no descartan la secuencia del coral que puede ser muy parecida a la de los hongos (Forsman et al. 2005) lo cual se vio posteriormente reflejado en los resultados de secuenciación. Otra dificultad con la utilización de estos cebadores es la posibilidad de que amplifique regiones de plantas, protistas y animales sobre todo en una situación de simbiosis o parasitismo, ya que el DNA del hongo se encontraría en una concentración menor que la del hospedero (White et al. 1990; Gardes and Bruns 1993).

DGGE

Los primeros trabajos acerca de la comunidad microbiana en corales afectados se desarrollaron con base en la creencia de que un solo microorganismo es el causante de la afectación (Smith et al. 1996; Airoidi 1998; Alker et al. 2001). Actualmente se reconoce que las afectaciones pueden deberse a un conjunto de factores que conllevan a reacciones de estrés que causan un desequilibrio en la microbiota del coral (Toledo-Hernández et al. 2008). Es decir, la interacción dinámica entre factores ambientales, inmunidad del hospedero y su microbioma se mantienen en homeostasis hasta que alguno de los componentes sufre alguna modificación que conlleva al desarrollo de la afectación y, entre estas modificaciones, se encuentra el desequilibrio o cambio de los microorganismos asociados al holobionte (Rosenberg and Loya 2004; Sutherland et al. 2004; Zilber-Rosenberg and Rosenberg 2008; Cárdenas et al. 2012b). Prueba de ello se puede observar en los estudios más recientes en donde se ha demostrado que la composición de la comunidad bacteriana varía entre estados de salud y afectación de los corales (Cooney et al. 2002a; Pantos and Bythell 2006; Sunagawa et al. 2009; Sato et al. 2010; Cárdenas et al. 2012b; Lins-de-Barros et al. 2013). Sin embargo, estos trabajos se han enfocado al estudio de una sola especie de coral y una sola enfermedad a la vez, es decir, no se ha determinado si el cambio en la microbiota en los corales afectados es semejante entre ellos. En este estudio se presentan los resultados de la comparación de comunidades microbianas de dos especies de coral afectados y sanos en la zona de Akumal, Quintana Roo, México con el fin de detectar si las comunidades microbianas que dominan en corales con daños / tejido afectado son más parecidas entre ellas que a las comunidades del mismo coral en estado sano.

Bacterias

Nuestros resultados muestran que la diversidad de bacterias en corales afectados es mayor que la encontrada en corales sanos (Tabla 10). Distintos estudios reportan mayor diversidad de bacterias en corales saludables que en afectados (Frias-Lopez et al. 2002; de Castro et al. 2010; Lins-de-Barros et al. 2013) y se puede argumentar que esta diversidad provee al holobionte de bacterias pro-bióticas que actúan como un sistema inmune contra bacterias oportunistas (Rosenberg et al. 2007). Al crearse una desestabilidad en la comunidad microbiana debido a

cambios ya sea en la temperatura o pH del medio, estrés por depredación, daño físico, competitividad de espacio y alimento, sedimentación, exposición a contaminación e incidencia de luz, es posible que cambien las condiciones químicas del mucus coralino y estas bacterias pro-bióticas sean desplazadas por oportunistas (Ainsworth et al. 2008; Sato et al. 2010; Meron et al. 2012). Sin embargo, también se ha visto que el cambio en la composición química del mucus coralino bajo condiciones específicas de pH, temperatura, sedimentación etc., e incluso una mezcla entre varios de estos factores de estrés, podría también causar un aumento en la diversidad cuando el holobionte está afectado (Cróquer et al. 2002; Ben-haim et al. 2003; Sutherland et al. 2004; Rosenberg et al. 2007; Vargas-Angel et al. 2007). Más aún, es posible que en un estado de afectación muy temprano o tardío exista un escenario en el cual todos los grupos bacterianos se encuentren compitiendo por ocupar el sustrato mucoso y, a su vez, la comunidad probiótica del holobionte esté tratando de re-establecerse. Esta situación podría provocar una diversidad baja en organismos saludables y una diversidad elevada en aquellos con estados de afectación, tal como se observa en nuestros datos (Cooney et al. 2002a; Pantos and Bythell 2006; Sunagawa et al. 2009). Al mismo tiempo, se observa un aumento en el número de OTU's bacterianos en los corales afectados independientemente de la especie de coral y el daño (Gráfica 4). Esto puede atribuirse a la competencia de las bacterias oportunistas para ocupar un sitio en el hospedero mientras el sistema de bacterias probióticas está inactivo o suprimido (Rosenberg et al. 2007). Tal es el caso en los resultados obtenidos por Wilson y colaboradores en el 2012 muestran que, en corales afectados con el síndrome blanco en *Acropora*, las bacterias cultivables pertenecen al género *Vibrio*, con la especie *V. owensii*, descrita como una especie oportunista (Goulden et al. 2012), como principal representante.

En este trabajo se observaron secuencias similares a *Dyella* sp., la cual ha sido descrita como bacteria oportunista en infecciones de pacientes con fibrosis quística (Duus et al., 2012 10.1016/S1569-1993(12)60298-7), en tejidos sanos y afectados de *S. siderea* (Tabla 8). Sin embargo, los resultados de la secuenciación no son lo suficientemente claros como para asegurar que este sea el género al que corresponden estas secuencias.

También se reconocieron secuencias que concuerdan con *Sphingobacteria* descrita previamente encontradas en otros corales (Sweet et al. 2010; Wilson et al. 2012; Kimes et al. 2013; Lema et

al. 2014), muestras de suelo (Otsuka et al. 2008; Mao et al. 2012) y hasta en cúmulos de plástico que flotan en mar abierto (Zettler et al. 2013) por lo que se piensa que contribuyen a funciones de degradación de la materia orgánica. La secuencia 5 se correlaciona con una proteobacteria, posiblemente alfa, aislada previamente del intestino de algunos mamíferos rumiantes mientras que el resto de las secuencias corresponden a bacteroidetes y proteobacterias no cultivadas pero sin embargo se correlacionan con estudios similares a este, en el que se identifican como parte de la microbiota coralina (Sunagawa et al. 2009, 2010; Meron et al. 2012; Kimes et al. 2013; Steinert et al. 2014). De Castro y colaboradores (2010) proponen estudios a diferentes estadios de la afectación para esclarecer la diferencia y tendencia de abundancias entre organismos saludables y afectados (de Castro et al. 2010).

Desde los primeros estudios realizados en el campo de enfermedades coralinas se ha propuesto la idea de la co-evolución de microorganismos simbioses y el holobionte, formando entre ellos un consorcio específico bacteria-especie de coral (Rohwer et al. 2001; Cooney et al. 2002b; Sekar et al. 2006). Esta idea responde a la teoría del hologenoma (ver glosario), la cual nos explica que la diversidad microbiana simbiótica juega un papel importante en la adaptación y evolución de organismos superiores, tanto así que se vuelve esencial y específica a la especie coralina con la cual co-evolucionó. Por otro lado, la regulación de comunidades simbioses mediante cambios rápidos, podría también permitir al holobionte sobrevivir en condiciones de estrés ambiental dándole el tiempo necesario para que se adapte a ellas (Zilber-Rosenberg and Rosenberg 2008). Las observaciones realizadas en este estudio concuerdan con esta hipótesis ya que se observa una comunidad microbiana específica a cada coral en condiciones sanas (Figura 25), mientras que en condiciones de afectación (indistinta a la especie de coral), los corales muestran una mayor diversidad bacteriana que además es más parecida entre ellas que a las de su misma especie de coral en condiciones sanas (Figura 25). El análisis de MDS muestra con mayor claridad la especificidad de comunidades bacterianas a cada coral en estado sano y su similitud en corales afectados indistintamente al tipo de afectación (Figura 26A). Esta observación es similar a la reportada por Sekar y colaboradores en el 2006 quienes registraron miembros específicos de la comunidad bacteriana asociada a corales afectados por Banda Negra (Sekar et al. 2006) y por Wilson y colaboradores en el 2012 quienes encontraron una mayor

similitud entre los corales afectados por Síndrome Blanco que entre los saludables de *Acropora* (Wilson et al. 2012).

De manera similar, podríamos identificar esta respuesta natural de las fluctuaciones de la comunidad bacteriana que se basan en la teoría de póliza de seguro (Insurance hypothesis) la cual explica que la presencia de muchas especies funciona como una garantía para el sistema (coral) en caso de que el medio cambie drásticamente, pues algunos grupos resistentes a estos cambios ambientales podrían compensar con una mayor producción los requerimientos del sistema, en este caso se explicaría la mayor diversidad en corales saludables mientras que en caso contrario, es decir, cuando la diversidad es mayor en corales afectados, el sistema podría estar necesitando la mayor cantidad de grupos bacterianos que aporten una mínima cantidad en cuanto a productividad para cubrir los requerimientos del microecosistema (Yachi and Loreau 1999).

En el presente estudio, aunque ambas especies de coral presentan una mayor diversidad bacteriana en organismos afectados que en organismos saludables, las comunidades bacterianas muestran una diferencia en la presencia y abundancia entre organismos afectados de la misma especie. Lo anterior coincide con lo obtenido por Sekar y colaboradores (2006), quienes reportan que a pesar de que se registran miembros específicos en la comunidad bacteriana asociada a corales afectados por Banda Negra, también se denota variabilidad entre colonias de la misma especie (*S. siderea*) los autores atribuyen lo anterior a múltiples factores como la falta de estudios en otras especies con la misma afectación o la región del Caribe de la que fueron obtenidas las muestras. (Sekar et al. 2006). Por otro lado, Gil-Agudelo y colaboradores (2007) no encontraron cambios en la composición de la microbiota de corales sanos y afectados con Mancha Negra de tres diferentes especies de corales, *S. siderea*, *M. annularis* y *M. faveolata* (Gil-Agudelo et al. 2007). Las diferencias entre estudios pueden deberse a la variación entre métodos, ambos estudios tomaron muestras de la capa de mucopolisacarido del coral no obstante Sekar y colaboradores utilizaron técnicas moleculares, mientras que Gil-Agudelo y colaboradores realizaron medios de cultivos, en donde evidentemente se subestima a las bacterias no cultivables que son una gran mayoría en el medio marino (Garren et al. 2009).

Identificación de bacterias en corales

Las secuencias obtenidas en este trabajo corresponden a dos grupos, Bacteroidetes y Proteobacterias (alfa y gamma). Los bacteroidetes, presentes normalmente en el humano y en otros organismos superiores, es un grupo de gram negativas anaeróbicas y con amplia distribución en el ambiente incluyendo agua de mar, sedimentos y suelo (Madigan et al. 2012). Debido a que la abundancia es menor en el medio marino circundante que en corales (Meron et al. 2012) se cree que puede existir una reacción de resiliencia al presentarse en el holobionte, pues se ha descubierto que los bacteroidetes contribuyen a la bioremediación en suelo, sedimento y cuerpos acuáticos contaminados (Mao et al. 2012), también se ha reconocido como importantes productores de esfingolípidos, los cuales desempeñan un papel importante en la señalización celular por ejemplo de apoptosis y mitosis, siendo indispensables en la proliferación o decremento de las células (Hannun and Bell 1989; Futerman and Hannun 2004).

Por otro lado, las proteobacterias son un grupo de gram negativas, se distribuyen en el ambiente incluyendo el marino, son un grupo muy amplio y sus miembros se caracterizan por el amplio reportorio metabólico que generan, lo cual los hace en su mayoría de importancia médica, industrial y agrícola (Madigan et al. 2012). En específico las gamaproteobacterias destacan principalmente por la capacidad de realizar fotosíntesis anoxigenica gracias a la bacterioclorofila que presentan sus integrantes (Garrity et al. 2007), *Dyella* sp. puede ser efectiva para la reducción de nitratos (Weon et al. 2009) lo que, pueda explicar la coloración rojiza que llega a presentarse en corales con lesiones de MN (Weil et al. 2006b).

El 70% de las secuencias obtenidas en este trabajo fueron identificadas como “bacteria no cultivada” lo cual ha sido reportado en otros trabajos, como Sungawa y colaboradores (2010) quienes, al realizar el análisis masivo de bacterias en diferentes especies de coral, muestran que estos organismos marinos actúan como hábitats especializados de microbios raros o hasta ahora no estudiados (Sunagawa et al. 2010). Debido a esto, el esfuerzo de identificación de especies bacterianas en corales sanos y afectados se ve mermado y se sugiere el uso de secuenciación masiva del ADN ambiental para realizar análisis funcionales de las comunidades presentes. A pesar de estos problemas de identificación es posible calcular la diversidad de una comunidad basándose en OTUs. Se sabe que la diversidad de bacterias entre corales saludables y afectados

llega a variar entre estudios, por ejemplo, De Castro y colaboradores (2010) obtienen un índice de diversidad de Shannon menor en corales afectados que en corales saludables del mucus del coral *M. hispida* (de Castro et al. 2010), Lins-de-Barros y colaboradores (2013) consiguen el mismo patrón con una biopsia del coral *S. stellata*, ambos trabajos estudian afectaciones de corales blanqueados. Por otro lado, este trabajo junto con el de Shekar, y colaboradores (2006) en síndromes de Banda Negra en mucus de *S. siderea* y Cárdenas y colaboradores (2012) en Plaga Blanca mediante biopsia de *S. siderea* y *D. strigosa* muestran un aumento en la diversidad en los corales afectados. La diferencia en este índice de diversidad puede ser causada por la especificidad entre coral y microbiota como mencionan los mismos autores, ya que probablemente no todas las bacterias que necesite una especie para estar saludable sean necesarias para otra (Zilber-Rosenberg and Rosenberg 2008)

Ambos grupos bacterianos (proteobacterias y bacteroidetes) son reconocidos con mayor abundancia en organismos afectados (Sekar et al. 2008; Sunagawa et al. 2009; de Castro et al. 2010; Cárdenas et al. 2012b; Garcia et al. 2013), tomando en cuenta lo antes mencionado, podríamos pensar que la desestabilidad de algunos grupos de importancia metabólica, conlleva a la desestabilidad de toda la comunidad microbiana siendo representativos en los estados de salud o afectación según sea el caso. Aunque los estudios de comunidades microbianas asociadas a afectaciones de corales son contradictorios, es evidente que, en corales dañados, existe un desequilibrio en la comunidad microbiana al compararlo con un coral sano lo cual probablemente afecta la capacidad de defensa que presenta el holobionte en condiciones normales (Pantos, et. al, 2006) y pudiera ser la causa de los síndromes en éstos organismos y de sus lesiones físicas.

Hongos

El análisis de las comunidades bacterianas de ambas especies de coral y ambas afectaciones en conjunto muestra una tendencia a separar las comunidades microbianas de los corales afectados independientemente de la especie. Esta observación apoya la propuesta de Lins-de-Barros y colaboradores (2010) acerca de la especificidad de la microfauna de cada especie de coral observada en *S. stellata* y *M hispida* (Lins-De-Barros et al. 2010). Sin embargo, dicha tendencia no fue observa en el análisis presentado en este trabajo con cebadores del ITS dirigido hacia

hongos, esta diferencia pudo darse por la inespecificidad de los cebadores los cuales en realidad amplificaron ITS del 18S de corales mayoritariamente

A pesar de haber utilizado cebadores descritos como específicos para amplificar el ITS del gen 18S ribosomal de hongos (Forsman et al. 2005; Sweet y Bythell, 2012), la inespecificidad de los cebadores fue demostrada con los resultados de secuenciación de las bandas obtenidas, por lo tanto, los análisis de este trabajo no pueden ser discutidos como resultado de comunidad de hongos sino comunidad eucarionte. La clara segregación entre especies de coral era totalmente esperada ya que los resultados de amplificación de secciones del ITS del 18S ribosomal mostraron la identificación de los propios corales. Debido a esto, no es posible inferir una influencia de la comunidad de hongos en los resultados observados. Sin embargo, es importante mencionar que los trabajos previos utilizando estos cebadores han encontrado por lo menos cinco ribotipos en muestras del coral *Stephanocoenia intersepta* los cuales fueron *Tritirachium*, *Cryptococcus*, *Malasseziales*, *Aspergillus sydowii* y *Rhytisma acerinum* solo este último ribotipo fue encontrado en corales afectados por MN (Sweet and Bythell 2012).

A pesar de los esfuerzos realizados, no se sabe si la fluctuación en la diversidad de la comunidad microbiana (OTUs,) sea producto de la afectación que presente el coral, o si la afectación esté dada por el cambio en la diversidad del organismo y son necesarios más estudios para contestar esta pregunta (Sunagawa et al. 2009; Littman et al. 2010; Sato et al. 2010; Lins-de-Barros et al. 2013).

Comparación de comunidades microbianas entre especies de coral

La separación en dos clados correspondientes a cada una de las especies coralinas al realizar una comparación entre corales confirma los resultados obtenidos por Rohwer y colaboradores (2002) y más adelante por De Castro (2010) en donde se sugiere la existencia de una comunidad microbiana específica para cada especie de coral que ha co-evolucionado con su hospedero (Rohwer et al. 2002; de Castro et al. 2010). En cuanto a la afectación de corales, en este trabajo es evidente una tendencia de la comunidad microbiana a diferenciarse de aquella de los corales sanos y formar una comunidad más parecida entre si, tal y como se propuso en la hipótesis y como se aprecia en el trabajo de Wilson y colaboradores (2012) en donde las distancias de

Jaccard calculadas muestran una mayor similitud entre los organismos afectados por Síndrome Blanco que entre los saludables de *Acropora*. (Wilson et al. 2012). Esta observación de la semejanza entre corales afectados ha sido hecha en trabajos previos con corales de diferentes especies afectados con el mismo síndrome como el de Cardenas y colaboradores (2012) quienes determinaron que los cambios en los diferentes órdenes bacterianos entre tejido saludable y afectado no son consistentes entre las dos especies estudiadas (*S. siderea* y *Diploria strigosa*), mas bien muestran los cambios más importantes en la abundancia de secuencias que son Rhizobiales, Caulobacteriales, Burkholoderales y Xanthomonadales que pertenecen todas al filo proteobacteria y se desplazan en direcciones opuestas en ambas especies a pesar de que las muestras afectadas de ambas especies presentaban la misma afectación Plaga Blanca (Cárdenas et al. 2012b). Sin embargo, esta es la primera vez en la que se presenta una comparación entre dos especies con diferentes afectaciones y se observa una similitud más alta entre las comunidades bacterianas de los organismos afectados, independientemente de la especie de la que provienen. Esta tendencia se comienza a observar desde el análisis individual por especie coralina en donde, como ya se mencionó, fue posible observar una diferenciación entre las tres etapas de afectación de cada especie y se cree que la comunidad bacteriana de organismos afectados fluctúa basándose en las rutas metabólicas y sus capacidades funcionales para los hospederos definirán la comunidad microbiana núcleo basándose también en el medio en el que se desarrollen (Krediet et al. 2013)

Por otro lado, en este trabajo se aprecia que las muestras de corales afectados presentan similitud en su composición microbiana independientemente si son de tejido saludable o afectado siempre y cuando sean de la misma colonia y se separan del perfil de comunidad de corales completamente saludables de diferente colonia aunque sean de la misma especie, lo anterior es similar a lo reportado por Wilson y colaboradores (2012) en donde identifican mayor similitud de comunidad bacteriana entre tejido saludable de colonia afectada por *Acropora* White Syndrome y tejido afectado de la misma colonia que con el tejido saludable de otra colonia sin daños (Wilson et al. 2012). Lo anterior puede deberse a que al estar una parte de la colonia infectada, el resto del holobionte presenta una comunidad similar general debido a la estrecha relación que existe entre los compartimentos internos de la colonia (esqueleto, tejido y moco) (Rosenberg et al. 2007) y sin embargo, los mecanismos de defensa del coral con actividad antibiótica pueden estar activados en la parte del tejido saludable (Ritchie 2006).

Por último, existen autores que señalan a la calidad de la productividad y no la cantidad de los simbioses la que determinará la presencia o ausencia de algunos de los grupos simbióticos, por lo que resaltan el hecho de que la abundancia de un grupo de bacterias dentro de una comunidad microbiana no sea igualmente benéfica para todos los hospederos (Freeman et al. 2013). Esta teoría deberá ser probada con estudios de metagenómica en los cuales se logren separar las células procariontes de las eucariontes para lograr distinguir las diferencias entre los metabolismos de las comunidades microbianas de corales afectados y sanos.

Conclusiones

En la zona de Akumal, Q. R., la diversidad bacteriana de coral es más elevada en muestras de organismos afectados por Mancha Negra de la especie *S. siderea* que en organismos saludables de la misma especie. De manera similar, la diversidad bacteriana es más elevada en muestras de organismos afectados por Banda Amarilla de la especie *O. faveolata* que en organismos saludables de la misma especie.

La comunidad bacteriana presente en cada especie de coral es un patrón único y característico de cada una de ellas independientemente del estado de salud o afectación que presenten los organismos.

La identidad de los microorganismos más abundantes presentes en organismos afectados (tejido saludable) fue principalmente del filo Bacteroidetes para ambas especies, mientras que para los organismos afectados (tejido afectado) la identidad de los microorganismos fueron Bacteroidetes y Proteobacterias para ambas especies.

La comparación de ambas especies de coral, evidencia que la diversidad de ambas especies de corales saludables son más bajas que su correspondiente estado de afectación (tejido afectado) de cada especie.

La especie *O. faveolata* tiene una diversidad mayor que la especie *S. siderea*, independientemente de los estados de salud o afectación que se estén comparando.

Con las pruebas realizadas en este trabajo, bajo las condiciones especificadas, no se puede decir que la comunidad fúngica de ninguna de las dos especies de coral esté cambiando con respecto a su estado de salud por lo cual se recomienda para futuros trabajos seleccionar o diseñar otro par de cebadores más adecuados para tal fin.

Apéndice

Tabla 1.- Estimación de DNA por medio de absorbancias

Coral	Muestra	260	280	Relación (A260/A280)	DNA (µg/µL)	DNA (ng/µL)
A	1	0.007	0.004	1.75	0.09	87.50
	2	0.006	0.004	1.50	0.08	75.00
	3	0.006	0.004	1.50	0.08	75.00
B	1	0.007	0.004	1.75	0.09	87.50
	2	0.01	0.006	1.67	0.13	125.00
	3	0.009	0.005	1.80	0.11	112.50
C	1	0.007	0.004	1.75	0.09	87.50
	2	0.006	0.005	1.20	0.08	75.00
	3	0.012	0.007	1.71	0.15	150.00
D	1	0.006	0.004	1.50	0.08	75.00
	2	0.005	0.003	1.67	0.06	62.50
	3	0.008	0.004	2.00	0.10	100.00
	4	0.006	0.003	2.00	0.08	75.00
	5	0.011	0.006	1.83	0.14	137.50
	6	0.006	0.003	2.00	0.08	75.00
E	1	0.013	0.007	1.86	0.16	162.50
	2	0.01	0.005	2.00	0.13	125.00
	3	0.01	0.006	1.67	0.13	125.00
	4	0.01	0.006	1.67	0.13	125.00
	5	0.015	0.008	1.88	0.19	187.50
	6	0.011	0.006	1.83	0.14	137.50
F	1	0.007	0.004	1.75	0.09	87.50
	2	0.007	0.004	1.75	0.09	87.50
	3	0.008	0.004	2.00	0.10	100.00
	4	0.009	0.005	1.80	0.11	112.50
	5	0.011	0.006	1.83	0.14	137.50
	6	0.008	0.004	2.00	0.10	100.00
G	1	0.01	0	1.67	0.06	62.50
	2	0.01	0	1.25	0.06	62.50
	3	0.01	0.01	1.40	0.09	87.50
H	1	0.01	0.01	1.14	0.10	100.00
	2	0.01	0.01	1.11	0.13	125.00
	3	0	0	0.5	0.01	12.50
I	1	0	0	1.00	0.03	25.00
	2	0	0	0.5	0.01	12.50
	3	0.01	0	1.5	0.08	75.00

J	1	0.001	0.001	1.00	0.01	12.50
	2	0.005	0.003	1.67	0.06	62.50
	3	0.001	0.002	0.50	0.01	12.50
	4	0.002	0.001	2.00	0.03	25.00
	5	0.007	0.005	1.40	0.09	87.50
	6	0.003	0.002	1.50	0.04	37.50
K	1	0.009	0.006	1.50	0.11	112.50
	2	0.001	0.001	1.00	0.01	12.50
	3	0.006	0.004	1.50	0.08	75.00
	4	0.005	0.004	1.25	0.06	62.50
	5	0.005	0.004	1.25	0.06	62.50
	6	0.004	0.003	1.33	0.05	50.00
L	1	0.005	0.003	1.67	0.06	62.50
	2	0.008	0.005	1.60	0.10	100.00
	3	0.005	0.003	1.67	0.06	62.50
	4	0.001	0.001	1.00	0.01	12.50
	5	0.005	0.003	1.67	0.06	62.50
	6	0.006	0.004	1.50	0.08	75.00

Pureza de la muestra	Relación : $260_{nm}/280_{nm}$
Concentración de DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	$(\text{DO}_{260} * \text{Factor de dilución} * \text{Factor del Ac. Nucléico})/(1000)$
Factor de dilución	Volumen final ($500\mu\text{l}$) * Volumen de la muestra ($2\mu\text{l}$)
Factor de DNA	$50 \mu\text{g}/\mu\text{L}$

Agradecimientos

A CONACyT por brindar los recursos necesarios durante la elaboración de este proyecto.

A la Mtra. En Ciencias Karla Susana Escalante quien apoyo de todas las formas posibles la realización de este proyecto con su invaluable enseñanza, guía, consejos y material para la elaboración del mismo.

A la Mtra. En Ciencias Korintia López quien aportó consejos, material y enseñanza para la realización de este proyecto.

A Akumal Dive Center y a su capacitado personal que hizo posible la colecta de las muestras.

A la Dra. Vanessa Francisco quien destinó conocimiento, tiempo y habilidad para la colecta de las muestras.

A la Dra. Gabriela Rodríguez por apoyar en la interpretación de resultados y sugerencias para el proyecto.

A mis tutores por el aporte de conocimiento, consejos, guía y seguimiento en el proyecto.

Referencias

- Adjeroud M, Augustin D, Galzin R, Salvat B (2002) Natural disturbances and interannual variability of coral reef communities on the outer slope of Tiahura (Moorea, French Polynesia): 1991 to 1997. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 237:121–131
- Ainsworth TD, Kramasky-Winter E, Loya Y, Hoegh-Guldberg O, Fine M (2007a) Coral disease diagnostics: what's between a plague and a band? *Appl. Environ. Microbiol.* 73:981–92
- Ainsworth TD, Kramasky-Winter E, Loya Y, Hoegh-Guldberg O, Fine M (2007b) Coral disease diagnostics: What's between a plague and a band? *Appl. Environ. Microbiol.* 73:981–992
- Ainsworth TD, Thurber RV, Gates RD (2010) The future of coral reefs: a microbial perspective. *Trends Ecol. Evol.* 25:233–240
- Alexander D, González L, Aguilar VH, Casotto M, Laurentin A, Gómez A (2013) Aplicabilidad de estadística multivariada para estudios nutricionales : bioensayo con el gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae* L). *Arch. Latinoam. Nutr.* 63:224–231
- Alker AP, Smith GW, Kim K (2001) Characterization of *Aspergillus sydowii* (Thom et Church), a fungal pathogen of Caribbean sea fan corals. 460:105–111
- Amend AS, Barshis DJ, Oliver T a (2012) Coral-associated marine fungi form novel lineages and heterogeneous assemblages. *ISME J.* 6:1291–1301
- Aronson RB, Bruno JF, Precht WF, Glynn PW, Harvell CD, Kaufman L, Rogers CS, Shinn EA, Valentine JF (2003) Causes of coral reef degradation. *Science* 302:1502–1504; author reply 1502–1504
- Banin E, Israely T, Kushmaro a, Loya Y, Orr E, Rosenberg E (2000) Penetration of the coral-bleaching bacterium *Vibrio shiloi* into *Oculina patagonica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3031–6
- Belda-baillie CA, Baillie BK, Maruyama T (2002) Specificity of a Model Cnidarian-Dinoflagellate Symbiosis. 74–85
- Bey BS, Fichot EB, Dayama G, Decho AW, Norman RS (2010) Extraction of high molecular weight DNA from microbial mats. *Biotechniques* 49:631–640
- Bigelow DM, Olsen MW, Gilbertson RL (2005) *Labyrinthula terrestris* sp. nov., a new pathogen of turf grass. *Mycologia* 97:185–190
- Bio-Rad (1997) Quantity One ®. 428

- Birkeland C (1997) *Life and Death Of Coral Reefs*. Springer US,
- Bongiorni L, Pignataro L, Santangelo G (2004) Thraustochytrids (fungoid protists): an unexplored component of marine sediment microbiota. *Sci. Mar.* 68:43–48
- Borneman E (2001) *Aquarium Corals: Selection, Husbandry, and Natural History*. Microcosm Limited,
- Bruckner A (1992) II . GLOBAL PERSPECTIVE OF CORAL DISEASE. *Proc 10th Ann. Amer. Acad. Underw. Sci.* 90–125
- Bruckner AW (2002) *Priorities for Effective Management of Coral Diseases* Priorities for Effective Management of Coral Diseases.
- Bruckner AW, Bruckner RJ (2006) The recent decline of *Montastraea annularis* (complex) coral populations in western Curaçao : a cause for concern ? *54:45–58*
- Bruno JF, Selig ER, Casey KS, Page C a, Willis BL, Harvell CD, Sweatman H, Melendy AM (2007) Thermal stress and coral cover as drivers of coral disease outbreaks. *PLoS Biol.* 5:e124
- Brusca RC, Brusca GJ (2003) *Invertebrates*. Sinauer Associates,
- Burke LM, Reytar K, Spalding M, Perry A (2012) *Reefs at Risk Revisited in the Coral Triangle*.
- Campbell NA, Reece JB (2007) *Biología*. Editorial Medica Panamericana Sa de,
- 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. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 117:137–147
- Cárdenas A, Rodríguez-R LM, Pizarro V, Cadavid LF, Arévalo-Ferro C (2012a) Shifts in bacterial communities of two Caribbean reef-building coral species affected by white plague disease. *ISME J.* 6:502–12
- Cárdenas A, Rodríguez-R LM, Pizarro V, Cadavid LF, Arévalo-Ferro C (2012b) Shifts in bacterial communities of two Caribbean reef-building coral species affected by white plague disease. *ISME J.* 6:502–12
- De Castro AP, Araújo SD, Reis AMM, Moura RL, Francini-Filho RB, Pappas G, Rodrigues TB, Thompson FL, Krüger RH (2010) Bacterial community associated with healthy and diseased reef coral *Mussismilia hispida* from eastern Brazil. *Microb. Ecol.* 59:658–67

- Cervino JM, Hayes R, Goreau TJ, Smith GW (2004) Zooxanthellae Regulation in Yellow Blotch / Band and Other Coral Diseases Contrasted with Temperature Related Bleaching : In Situ Destruction vs Expulsion. 37:63–85
- Chen H, Rangasamy M, Tan SY, Wang H, Siegfried BD (2010) Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. PLoS One 5:
- Cho H, Lee J, Choi Y (2003) The Genetic Diversity Analysis of the Bacterial Community in Groundwater by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). J. Microbiol. 41:327–334
- Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W (1992) Prevention of pre-PCR mispriming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. Nucleic Acids Res. 20:1717–1723
- Clarke KR, Warwick RM (1994) Change in marine communities. An approach to statistical analysis and interpretation. Nat. Environ. Res. Counc. 1–172
- Cooney RP, Pantos O, Le Tissier MD a, Barer MR, O'Donnell AG, Bythell JC (2002) Characterization of the bacterial consortium associated with black band disease in coral using molecular microbiological techniques. Environ. Microbiol. 4:401–13
- Crabbe MJC (2009) Scleractinian coral population size structures and growth rates indicate coral resilience on the fringing reefs of North Jamaica. Mar. Environ. Res. 67:189–98
- Cuello M, Cabrera O, Rodríguez Y, Thurheim G, Norheim G, Cabrera RA, Álvarez M, Álvarez M, Blain K, Naess L, Rosenqvist E, García L (2013) SDS-PAGE y análisis densitométrico para determinar la concentración de lipopolisacáridos de Neisseria meningitidis serogrupos A, W135 y X. Vaccimonitor 22:36–42
- Dalton SJ, Smith SD a. (2005) Coral disease dynamics at a subtropical location, Solitary Islands Marine Park, eastern Australia. Coral Reefs 25:37–45
- Danovaro R, Bongiorni L, Corinaldesi C, Giovannelli D, Damiani E, Astolfi P, Greci L, Pusceddu A (2008) Sunscreens cause coral bleaching by promoting viral infections. Environ. Health Perspect. 116:441–7
- Davy J, Patten N (2007) Morphological diversity of virus-like particles within the surface microlayer of scleractinian corals. Aquat. Microb. Ecol. 47:37–44
- Denner EBM (2003) *Aurantimonas coralicida* gen. nov., sp. nov., the causative agent of white plague type II on Caribbean scleractinian corals. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:1115–1122
- Dubinsky Z, Stambler N (2011) Coral reefs: An ecosystem in transition. Coral Reefs An Ecosyst. Transit. 1–552

- Espinosa AL (2007) Guía práctica sobre la técnica de PCR. *Ecología Molecular*. pp 517–540
- Forsman ZH, Guzman HM, Chen C a., Fox GE, Wellington GM (2005) An ITS region phylogeny of *Siderastrea* (Cnidaria: Anthozoa): is *S. glynni* endangered or introduced? *Coral Reefs* 24:343–347
- Francini-Filho RB, Moura RL, Thompson FL, Reis RM, Kaufman L, Kikuchi RKP, Leão ZM a N (2008) Diseases leading to accelerated decline of reef corals in the largest South Atlantic reef complex (Abrolhos Bank, eastern Brazil). *Mar. Pollut. Bull.* 56:1008–14
- Fredricks DN, Smith C, Meier A (2005) Comparison of Six DNA Extraction Methods for Recovery of Fungal DNA as Assessed by Quantitative PCR Comparison of Six DNA Extraction Methods for Recovery of Fungal DNA as Assessed by Quantitative PCR. *J. Clin. Microbiol.* 43:5122–5128
- Freeman CJ, Thacker RW, Baker DM, Fogel ML (2013) Quality or quantity: is nutrient transfer driven more by symbiont identity and productivity than by symbiont abundance? *ISME J.* 7:1116–1125
- Frias-Lopez J, Zerkle AL, Bonheyo GT, Fouke BW (2002) Partitioning of bacterial communities between seawater and healthy, black band diseased, and dead coral surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2214–2228
- Futerman AH, Hannun Y a. (2004) The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep.* 5:777–782
- Galloway S, Work T, Bochsler V, Ra H, Kramarsky-Winters E, McLaughlin S, Meteyer C, Morado J, Nicholson J, Parnell P, Peters E, Reynolds T, Rotstein D, Sileo L, Woodley C (2007) Coral disease and health workshop: coral histopathology II. NOAA Tech. Memo. NOS NCCOS 56 NOAA Tech. Memo. CRCP 4. Natl. Ocean. Atmos. Adm. Silver Spring, MD. 84
- García A, Cróquer A (2003) Estado actual de las enfermedades y otros signos de deterioro coralino en siete arrecifes del Parque Nacional Archipiélago de Los Roques , Venezuela. 173–180
- García A, Cróquer A, Pauls SM (2002) Relación entre la incidencia de enfermedades y la estructura de tallas y especies en corales del parque Nacional Archipiélago de Los Roques, Venezuela. *Interciencia*
- Garcia GD, Gregoracci GB, Santos EDO, Meirelles PM, Silva GGZ, Edwards R, Sawabe T, Gotoh K, Nakamura S, Iida T, de Moura RL, Thompson FL (2013) Metagenomic Analysis of Healthy and White Plague-Affected *Mussismilia braziliensis* Corals. *Microb. Ecol.* 65:1076–1086

- Garren M, Azam F (2012) New directions in coral reef microbial ecology. *Environ. Microbiol.* 14:833–844
- Garren M, Raymundo L, Guest J, Harvell CD, Azam F (2009) Resilience of coral-associated bacterial communities exposed to fish farm effluent. *PLoS One* 4:e7319
- Garrity G, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JR (2007) *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria.* Springer US,
- Garza-Pérez J, Lehmann a, Arias-González J (2004) Spatial prediction of coral reef habitats: integrating ecology with spatial modeling and remote sensing. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 269:141–152
- Garza-Pérez J., Mata-Laura M, García-Guzmán S, Schirp-García EA (2010) Reporte de Caracterización y Evaluación de Estado de Condición Arrecifal. Akumal, Q. Roo. 2010.
- Gil-Agudelo DL, Fonseca DP, Weil E, Garzón-Ferreira J, Smith GW (2007) Bacterial communities associated with the mucopolysaccharide layers of three coral species affected and unaffected with dark spots disease. *Can. J. Microbiol.* 53:465–471
- Gil-Agudelo DL, Navas-Camacho R, Rodríguez-Ramírez A, Reyes- Nivia MC, Bejarano S, Garzón-Ferreira J, Smith GW (2009) Enfermedades coralinas y su investigación en los arrecifes colombianos *. *Boletín Investig. Mar. y Costeras* 38:189–224
- Gil-Agudelo, D.L., Smith, Weil E (2006) The white band disease type II pathogen in Puerto Rico. *54:59–67*
- Golubic S, Radtke G, Le Campion-Alsumard T (2005) Endolithic fungi in marine ecosystems. *Trends Microbiol.* 13:229–235
- Goulden EF, Hall MR, Bourne DG, Pereg LL, Høj L (2012) Pathogenicity and infection cycle of *Vibrio owensii* in larviculture of the ornate spiny lobster (*Panulirus ornatus*). *Appl. Environ. Microbiol.* 78:2841–9
- Halfpiter G, Moreno CE (2005) SIGNIFICADO BIOLÓGICO DE LAS DIVERSIDADES ALFA, BETA Y GAMMA. *Sobre Diversidad Biológica: El significado de las Diversidades Alfa, Beta y Gamma.*
- Hannun Y a, Bell RM (1989) Functions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation. *Science* 243:500–507
- Harvell D (2007) Coral Disease, environmental drivers and the balance between coral and microbial associates. *Oceanography* 20:

- Hecker KH, Roux KH (1996) High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *Biotechniques* 20:478–485
- Herring CM (2006) Coral Reef valuation and perceptions of the tourism industry in Akumal, Mexico.
- Hoppe, H. G., W. Schremm PB (1988) Spatial and temporal distribution of pelagic microorganisms and their proteolytic activity over a partly destroyed coral reef.
- Hughes T (1994) Catastrophes, Phase Shifts, and large-scale degradation of a Caribbean Coral Reef. *Science* (80-.). 265:1547–1551
- Hughes T, Szmant AM, Steneck R, Carpenter R, Miller S (1999) Algal blooms on coral reefs : What are the causes ? *Limnology Oceanogr.* 44:1583–1586
- Hunter RL, Lajeunesse TC, Santos SR (2007) STRUCTURE AND EVOLUTION OF THE rDNA INTERNAL TRANSCRIBED SPACER (ITS) REGION 2 IN THE SYMBIOTIC DINOFLAGELLATES (SYMBIODINIUM , DINOPHYTA) 1 and. 128:120–128
- Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (2012) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Elsevier Science,
- Jones SG (1925) Life-history and Cytology of *Rhytisma acerinum* (Pers.) Fries. *Ann. Bot.* 39:41–75
- Jordán-Dahlgren E, Maldonado MA, Rodríguez-Martínez RE (2005) Diseases and partial mortality in *Montastraea annularis* species complex in reefs with differing environmental conditions (NW Caribbean and Gulf of Mexico). *Dis. Aquat. Organ.* 63:3–12
- Kendrick B, Risk MJ, Michaelides J, Bergman K (1982) CORAL REEF PAPER AMPHIBIOUS MICROBORERS : BIOERODING ISOLATED FROM LIVE CORALS FUNGI. 32:862–867
- Kim K, Harvell CD, Kim PD, Smith GW, Merkel SM (2000) Fungal disease resistance of Caribbean sea fan corals (*Gorgonia* spp.). *Mar. Biol.* 136:259–267
- Kimes NE, Johnson WR, Torralba M, Nelson KE, Weil E, Morris PJ (2013) The *Montastraea faveolata* microbiome: Ecological and temporal influences on a Caribbean reef-building coral in decline. *Environ. Microbiol.* 15:2082–2094
- Koren O, Rosenberg E (2006) Bacteria associated with mucus and tissues of the coral *Oculina patagonica* in summer and winter. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:5254–9

- Kramarsky-Winter E, Harel M, Siboni N, Ben Dov E, Brickner I, Loya Y, Kushmaro a (2006) Identification of a protist-coral association and its possible ecological role. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 317:67–73
- Krediet CJ, Ritchie KB, Paul VJ, Teplitski M (2013) Coral-associated micro-organisms and their roles in promoting coral health and thwarting diseases. *Proc. Biol. Sci.* 280:20122328
- Kumar GV, Tuohy MG (2013) *Laboratory Protocols in Fungal Biology.*
- LaJeunesse TC, Bhagooli R, Hidaka M, DeVantier L, Done T, Schmidt GW, Fitt WK, Hoegh-Guldberg O (2004) Closely related Symbiodinium spp. differ in relative dominance in coral reef host communities across environmental, latitudinal and biogeographic gradients. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 284:147–161
- Lema K a., Bourne DG, Willis BL (2014) Onset and establishment of diazotrophs and other bacterial associates in the early life history stages of the coral *Acropora millepora*. *Mol. Ecol.* 23:4682–4695
- Lesser MP, Bythell JC, Gates RD, Johnstone RW, Hoegh-Guldberg O (2007) Are infectious diseases really killing corals? Alternative interpretations of the experimental and ecological data. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 346:36–44
- Lins-de-Barros MM, Cardoso AM, Silveira CB, Lima JL, Clementino MM, Martins OB, Albano RM, Vieira RP (2013) Microbial community compositional shifts in bleached colonies of the Brazilian reef-building coral *Siderastrea stellata*. *Microb. Ecol.* 65:205–13
- Lins-De-Barros MM, Vieira RP, Cardoso AM, Monteiro VA, Turque AS, Silveira CB, Albano RM, Clementino MM, Martins OB (2010) Archaea, Bacteria, and algal plastids associated with the reef-building corals *Siderastrea stellata* and *Mussismilia hispida* from Búzios, South Atlantic Ocean, Brazil. *Microb. Ecol.* 59:523–532
- Littman R a, Bourne DG, Willis BL (2010) Responses of coral-associated bacterial communities to heat stress differ with Symbiodinium type on the same coral host. *Mol. Ecol.* 19:1978–90
- Madigan MT, Martiniko JM, Stahl DA, Clark DP (2012) *Biology of microorganisms.* Pearson,
- Mao J, Luo Y, Teng Y, Li Z (2012) Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil by a bacterial consortium and associated microbial community changes. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 70:141–147
- May LA, Avadanei AR, Rogers CS, Woodley CM (2010) Microbial Community Analysis of *Acropora palmata* Mucus Swabs , Water and Sediment Samples from Hawksnest.

- Mayer AMS, Lehmann VKB, Zealand N, Kingdom U (2000) Endocrine , Immune , and Nervous Systems ; and other Miscellaneous Mechanisms of Action . 42:62–69
- Meron D, Rodolfo-Metalpa R, Cunning R, Baker AC, Fine M, Banin E (2012) Changes in coral microbial communities in response to a natural pH gradient. *ISME J.* 6:1775–1785
- Mouchka ME, Hewson I, Harvell CD (2010) Coral-associated bacterial assemblages: Current knowledge and the potential for climate-driven impacts. *Integr. Comp. Biol.* 50:662–674
- Mulhall M (2008) Saving the Rainforests of the Sea: an Analysis of International Efforts To Conserve Coral Reefs. *Duke Env'tl. L. Pol'y F.* 33:321–351
- Muyzer G, Teske A, Wirsen CO, Jannasch HW (1995) Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch. Microbiol.* 164:165–172
- Muyzer G, Waal ECD, G.Uitterlinden A (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain rea. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Nielsen K, Mogensen HS, Hedman J, Niederstätter H, Parson W, Morling N (2008) Comparison of five DNA quantification methods. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2:226–230
- Oros-Sichler M, Gomes NCM, Neuber G, Smalla K (2006) A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities. *J. Microbiol. Methods* 65:63–75
- Otsuka S, Abe Y, Fukui R, Nishiyama M, Sendoo K (2008) Presence of previously undescribed bacterial taxa in non-axenic *Chlorella* cultures. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 54:187–193
- Pantos O, Bythell JC (2006) Bacterial community structure associated with white band disease in the elkhorn coral *Acropora palmata* determined using culture-independent 16S rRNA techniques. *Dis. Aquat. Organ.* 69:79–88
- Pantos O, Cooney RP, Le Tissier MD a, Barer MR, O'Donnell AG, Bythell JC (2003) The bacterial ecology of a plague-like disease affecting the Caribbean coral *Montastrea annularis*. *Environ. Microbiol.* 5:370–382
- Patten NL, Harrison PL, Mitchell JG (2008) Prevalence of virus-like particles within a staghorn scleractinian coral (*Acropora muricata*) from the Great Barrier Reef. *Coral Reefs* 27:569–580

- Patten NL, Seymour JR, Mitchell JG (2006) Flow cytometric analysis of virus-like particles and heterotrophic bacteria within coral-associated reef water. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 86:563
- Patterson KL, Porter JW, Ritchie KB, Polson SW, Mueller E, Peters EC, Santavy DL, Smith GW (2002) The etiology of white pox, a lethal disease of the Caribbean elkhorn coral, *Acropora palmata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:8725–30
- Piterina A V., Pembroke JT (2013) Use of PCR-DGGE Based Molecular Methods to Analyse Microbial Community Diversity and Stability during the Thermophilic Stages of an ATAD Wastewater Sludge Treatment Process as an Aid to Performance Monitoring. *ISRN Biotechnol.* 2013:1–13
- Porter JW, Lafferty KD, Ford SE (2004) Are Diseases Increasing in the Ocean?*. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 35:31–54
- Priess K, Le Campion-Alsumard T, Golubic S, Gadel F, Thomassin B a. (2000) Fungi in corals: black bands and density-banding of *Porites lutea* and *P. lobata* skeleton. *Mar. Biol.* 136:19–27
- Rajasekar T, Balaji S, Kumaran S, Deivasigamani B, Pugzhavendhan SR (2012) Isolation and characterization of Marine fungal metabolites against clinical pathogens. *Asian Pacific J. Trop. Dis.* S387–S392
- Ravindran J, Raghukumar C, Raghukumar S (2001) Fungi in *Porites lutea*: association with healthy and diseased corals. *Dis. Aquat. Organ.* 47:219–28
- Raymundo LJ, Couch CS, Harvell CD (2008) *Coral Disease Handbook-Guidelines for Assessment, Monitoring & Management.*
- Renegar D, Blackwelder P, Miller J., Gochfeld D, Moulding A (2008) Ultrastructural and histological analysis of Dark Spot Syndrome in *Siderastrea siderea* and *Agaricia agaricites*. *Proc. 11th ...* 7–11
- Richardson LL (1998) Coral diseases: what is really known? *Trends Ecol. Evol.* 13:438–43
- Richardson LL, Aronson RB (2000) Infectious diseases of reef corals. 2:
- Richardson LL, Mills DK, Remily ER, Voss JD (2005) Development and field application of a molecular probe for the primary pathogen of the coral disease white plague type II. *Rev. Biol. Trop.* 53 Suppl 1:1–10
- Ritchie KB (2006) Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 322:1–14

- Rohwer F, Breitbart M, Jara J, Azam F, Knowlton N (2001) Diversity of bacteria associated with the Caribbean coral *Montastraea franksi*. *Coral Reefs* 20:85–91
- Rohwer F, Seguritan V, Azam F, Knowlton N (2002) Diversity and distribution of coral-associated bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 243:1–10
- Rojas-Herrera R, Narváez-Zapata J, Zamudio-Maya M, Mena-Martínez ME (2008) A simple silica-based method for metagenomic DNA extraction from soil and sediments. *Mol. Biotechnol.* 40:13–17
- Rosenberg E, Koren O, Reshef L, Efrony R, Zilber-Rosenberg I (2007) The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 5:355–362
- Rosenberg E, Loya Y (2004) *Coral Health and Disease*. Springer,
- Ruiz-Moreno D, Willis BL, Page a C, Weil E, Cróquer A, Vargas-Angel B, Jordan-Garza AG, Jordán-Dahlgren E, Raymundo L, Harvell CD (2012) Global coral disease prevalence associated with sea temperature anomalies and local factors. *Dis. Aquat. Organ.* 100:249–61
- S. Raghukumar 1991 (1991) Occurrence of thraustochytrid fungi in corals and coral mucus. *Indian Journal Mar. Sci.* 20:6
- Sánchez O, Gasol JM, Massana R, Mas J, Pedrós-Alió C (2007) Comparison of different denaturing gradient gel electrophoresis primer sets for the study of marine bacterioplankton communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:5962–5967
- Santavy DL, Mueller E, Peters EC, MacLaughlin L, Porter JW, Patterson KL, Campbell J (2001) Quantitative assessment of coral diseases in the Florida Keys: Strategy and methodology. 460:39–52
- Sato Y, Willis BL, Bourne DG (2010) Successional changes in bacterial communities during the development of black band disease on the reef coral, *Montipora hispida*. *ISME J.* 4:203–14
- Schuhmacher H, Zibrowius H (1985) What is hermatypic? *Coral Reefs* 4:1–9
- Sekar R, Kaczmarek L, Richardson L (2008) Microbial community composition of black band disease on the coral host *Siderastrea siderea* from three regions of the wider Caribbean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 362:85–98
- Sekar R, Mills DK, Remily ER, Voss JD, Richardson LL (2006) Microbial communities in the surface mucopolysaccharide layer and the black band microbial mat of black band-diseased *Siderastrea siderea*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:5963–73

- Shokere L a., Holden MJ, Ronald Jenkins G (2009) Comparison of fluorometric and spectrophotometric DNA quantification for real-time quantitative PCR of degraded DNA. *Food Control* 20:391–401
- Spalding MD, Ravilious C, Green EP (2001) *World Atlas of Coral Reefs*.
- Steinert G, Whitfield S, Taylor MW, Thoms C, Schupp PJ (2014) Application of Diffusion Growth Chambers for the Cultivation of Marine Sponge-Associated Bacteria. *Mar. Biotechnol.* 594–603
- Stoddart DR (1969) Ecology and morphology of recent coral reefs. *Biol. Rev.* 44:433–498
- Sunagawa S, DeSantis TZ, Piceno YM, Brodie EL, DeSalvo MK, Voolstra CR, Weil E, Andersen GL, Medina M (2009) Bacterial diversity and White Plague Disease-associated community changes in the Caribbean coral *Montastraea faveolata*. *ISME J.* 3:512–21
- Sunagawa S, Woodley CM, Medina M (2010) Threatened corals provide underexplored microbial habitats. *PLoS One* 5:1–7
- Sussman M, Willis BL, Victor S, Bourne DG (2008) Coral pathogens identified for White Syndrome (WS) epizootics in the Indo-Pacific. *PLoS One* 3:
- Sutherland KP, Porter JW, Torres C (2004) Disease and immunity in Caribbean and Indo-Pacific zooxanthellate corals. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 266:273–302
- Sweet M, Burn D, Croquer A, Leary P (2013) Characterisation of the Bacterial and Fungal Communities Associated with Different Lesion Sizes of Dark Spot Syndrome Occurring in the Coral *Stephanocoenia intersepta*. *PLoS One* 8:1–9
- Sweet M, Bythell J (2012) Ciliate and bacterial communities associated with White Syndrome and Brown Band Disease in reef-building corals. *Environ. Microbiol.* 14:2184–2199
- Sweet MJ, Croquer a., Bythell JC (2010) Bacterial assemblages differ between compartments within the coral holobiont. *Coral Reefs* 30:39–52
- Sweet MJ, Croquer A, Bythell JC (2011) Development of bacterial biofilms on artificial corals in comparison to surface-associated microbes of hard corals. *PLoS One* 6:e21195
- Tapia-Tussel R, Magaña Gómez JA, Cortés Velázquez A, Higuera Ciapara I, Pérez-Brito D (2009) Protocolos para la detección molecular de fitopatógenos y organismos genéticamente modificados.
- Thomas T, Gilbert J, Meyer F (2012) *Metagenomics - a guide from sampling to data analysis*. *Microb. Inform. Exp.* 2:3

- Toffin L, Webster G, Weightman AJ, Fry JC, Prieur D (2004) Molecular monitoring of culturable bacteria from deep-sea sediment of the Nankai Trough, Leg 190 Ocean Drilling Program. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48:357–367
- Toledo-Hernández C, Zuluaga-Montero a., Bones-González a., Rodríguez J a., Sabat a. M, Bayman P (2008) Fungi in healthy and diseased sea fans (*Gorgonia ventalina*): Is *Aspergillus sydowii* always the pathogen? *Coral Reefs* 27:707–714
- Vargas-Angel B, Peters EC, Kramarsky-Winter E, Gilliam DS, Dodge RE (2007) Cellular reactions to sedimentation and temperature stress in the Caribbean coral *Montastraea cavernosa*. *J. Invertebr. Pathol.* 95:140–5
- Vázquez-Botello, Alfonso (2008) Evaluación regional de la vulnerabilidad actual y futura de la zona costera mexicana y los deltas más impactados ante el incremento del nivel del mar debido al cambio climático y fenómenos hidrometeorológicos extremos.
- Vega Thurber RL, Barott KL, Hall D, Liu H, Rodriguez-Mueller B, Desnues C, Edwards R a, Haynes M, Angly FE, Wegley L, Rohwer FL (2008) Metagenomic analysis indicates that stressors induce production of herpes-like viruses in the coral *Porites compressa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:18413–8
- Ward JR, Rypien KL, Bruno JF, Harvell CD, Jordán-Dahlgren E, Mullen KM, Rodríguez-Martínez RE, Sánchez J, Smith G (2006) Coral diversity and disease in Mexico. *Dis. Aquat. Organ.* 69:23–31
- Warner ME, Fitt WK, Schmidt GW (1999) Damage to photosystem II in symbiotic dinoflagellates: a determinant of coral bleaching. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96:8007–8012
- Weil E (2001) Caribbean Coral Reef Diseases , Status and Research Needs. 1–9
- Weil E, Hooten AJ, Disease C (2008) Underwater Cards for Assessing Coral Health on Caribbean Reefs Underwater Cards for Assessing Coral Health on Caribbean Reefs How to use these cards.
- Weil E, Smith G, Gil-Agudelo DL (2006a) Status and progress in coral reef disease research. *Dis. Aquat. Organ.* 69:1–7
- Weil E, Smith G, Gil-Agudelo DL (2006b) Status and progress in coral reef disease research. *Dis. Aquat. Organ.* 69:1–7
- Weinbauer MG, Ogier J, Maier C (2012) Microbial abundance in the coelenteron and mucus of the cold-water coral *Lophelia pertusa* and in bottom water of the reef environment. *Aquat. Biol.* 16:209–216

- Weon H-Y, Anandham R, Kim B-Y, Hong S-B, Jeon Y-A, Kwon S-W (2009) *Dyella soli* sp. nov. and *Dyella terrae* sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59:1685–1690
- White TJ, Bruns S, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protoc. A Guid. to Methods Appl.* 315–322
- Wickelmaier F (2003) An introduction to MDS. *Reports from Sound Qual. Res. Unit, ...* 26
- Wild C, Huettel M, Klueter A, Kremb SG, Rasheed MYM, Jørgensen BB (2004) Coral mucus functions as an energy carrier and particle trap in the reef ecosystem. *Nature* 428:66–70
- Willis BL, Page CA, Dinsdale EA (2002) Coral Disease on the Great Barrier Reef. *Coral health and disease.* pp 69–104
- Wilson B, Aeby GS, Work TM, Bourne DG (2012) Bacterial communities associated with healthy and *Acropora* white syndrome-affected corals from American Samoa. *FEMS Microbiol. Ecol.* 80:509–20
- Woodley CM, Bruckner AW, McLendon AL, Higgins JL, Galloway S., Nicholson JH (2008) *Field Manual for Investigating Coral Disease Outbreaks.*
- Wu Q, Zhao X-H, Zhao S-Y (2006) Application of PCR-DGGE in research of bacterial diversity in drinking water. *Biomed. Environ. Sci.* 19:371–374
- Yachi S, Loreau M (1999) Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: the insurance hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96:1463–1468
- Zettler ER, Mincer TJ, Amaral-Zettler LA (2013) Life in the “plastisphere”: microbial communities on plastic marine debris. *Environ. Sci. Technol.* 47:7137–7146
- Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E (2008) Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 32:723–35