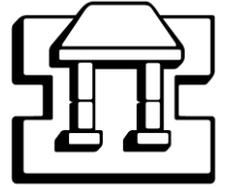




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA



**“Comunidad microbiana asociada a la enfermedad de
la mancha negra en el coral escleractinio *Siderastrea
radians* (Pallas, 1766)”**

Tesis que presenta:

Yolitzin Rodríguez Gallardo

Para obtener el título de:

Bióloga

Asesor de Tesis: Dr. Guillermo Horta Puga

Coasesor: Dr. Rofólfo De La Torre Almaráz

Estado de México Agosto, 2011



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.

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá, Josefina Gallardo Hernández por darme la vida y ser uno de mis mas grandes ejemplos a seguir, por estar conmigo siempre apoyandome y guiandome, con todo su amor y su lindo ser, ¡Muchísimas gracias mami!.

A mi papá Cuauhtémoc Rodríguez Ramírez por darme la oportunidad de seguir adelante apoyandome y guiandome, siendo una enorme influencia en mi vida y tomando en cuenta todos tus consejos (aunque no lo creas), y darme tu cariño y amor. ¡Gracias apaito!

A mis tíos Araceli y Homero, por ser ángeles guías en mi formación personal y académica, procurándome atenciones, consejos y bienestar ¡Gracias por todo!

A mis hermanos Cuau, Miguel y Fernando que aunque no crecimos muy juntos los quiero mucho y siempre pienso en ustedes, esperando que sigan el ejemplo de nuestro papá y lleguen a ser personas de calidad y se cumpla todo lo que se propongan. ¡Ánimo!

A todos mis amigos y compañeros con los que pasé ratos inolvidables durante mi vida academica, Diana y Claudia, Ivonne, Jessica, Moni, Ponchito, Karen, “Erny” ¡Gracias en verdad, por acompañarme y apoyarme!

A todo el Grupo 2, (o a los que alguna vez estuvieron en el grupo) que a todos les sea propicio la suerte y el amor y que el viento sople a su favor, ¡Mucho éxito! Gracias por los buenos y malos ratos, los aprecio y estimo mucho a todos.

A mis compañeros de equipo, amigos y colegas de la carrera, del Vivario y del Ajolotario, y socios de trabajos Alex, Aza, Gus Helena, y como olvidar a la Bodeguita, Adri, Marisol, Lulu, Milton, Edith, Dany, Richy, Anita y por supuesto a mis “hermanos académicos”

Junuen Julliana Ramírez Hernández (chaparrita Jun Jun) y Abraham Aguilar Franco (un b y un g), que me “ayudaron” a terminar esta etapa de mi vida. ¡Muchas gracias chavos, los quiero mucho!

A todos los que hicieron posible la elaboración de mi tesis con apoyo, consejos y regaños, sin su guía y ayuda no hubiera sabido cómo llegar hasta aquí ¡Muchas gracias! Biólogos Adriana, Salomé, Marisol, Tello, Maestros Graciela y Ale, Doctores Martha, Miguel, Elías y Jorge Campos y a mis directores de Tesis Profe Guillermo Horta Puga y Rodolfo de la Torre.

A los que, con su paciencia, comprensión y apoyo hicieron más llevadero el camino hasta aquí, David G. y Omeyan, ¡Sigán haciendo arte!

¡Muchas gracias por todo, que mi luz les acompañe hoy y siempre!

INDICE

GLOSARIO	5
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	8
ANTECEDENTES	13
HIPÓTESIS	16
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS PARTICULARES	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
RESULTADOS	28
DISCUSIÓN	38
CONCLUSIONES	43
RECOMENDACIONES	44
LITERATURA CITADA	45
ANEXO	49

Glosario

Amplicón.- Son los pedazos de DNA formado como los productos de los acontecimientos naturales o artificiales de la amplificación. Por ejemplo, pueden ser formados vía reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) o reacciones en cadena del ligase (voltaje residual), así como por natural duplicación del gene.

Cebador.- Oligonucleótido.

dNTPs.- Mezcla de los 4 desoxirribonucleósidos trifosfatos. (dATP, dTTP, dCTP y dGTP).

EMN.- Enfermedad de Mancha Negra.

Enfermedad.- Cualquier desviación o interrupción de la estructura o funcionamiento normal de cualquier parte, órgano o sistema que se manifiesta por un conjunto de síntomas y signos.

FD1 Eubac.- Oligonucleótido que amplifica, junto con RD1 Eubac la región conservada altamente variable 16S correspondiente a DNA bacteriano.

ITS.- Por sus siglas en inglés Espaciador Interno del Transcrito.

ITS'4.- Oligonucleótido que amplifica, junto con ITS'5 la región conservada altamente variable 18S correspondiente a DNA fúngico

ITS'5.- Oligonucleótido que amplifica, junto con ITS'4 la región conservada altamente variable 18S correspondiente a DNA fúngico.

Oligonucleótido.- Secuencia corta (de cincuenta a menos pares de bases) de DNA o RNA, que actúa como iniciador en una reacción de amplificación (PCR), por lo anterior, es responsable de la obtención específica del fragmento deseado.

PCR.- Reacción en Cadena de la Polimerasa.

PMN.- Parque Marino Nacional.

Primer.- Oligonucleótido

Probiótico.- Microorganismos vivos que al ser administrados o estar presentes en dosis adecuadas confieren un beneficio de salud al receptor.

RD1 Eubac.- Oligonucleótido que amplifica, junto con FD1 Eubac la región conservada altamente variable 16S correspondiente a DNA bacteriano.

rDNA 16S.- Fragmento de ácido desoxirribonucleico de la subunidad ribosomal 16S.

rDNA 18S.- Fragmento de ácido desoxirribonucleico de la subunidad ribosomal 18S.

rDNA.- Ácido desoxirribonucleico ribosomal.

RNA-dc.- Ácido ribonucleico doble cadena.

rRNA.- Ácido ribonucleico ribosomal.

SAV- Sistema Arrecifal Veracruzano.

Signo.- Indicio, señal de algo.

Síntoma.- Fenómeno revelador de una enfermedad, señal, indicio de que algo está sucediendo o sucederá.

Síndrome.- Conjunto de síntomas que caracterizan una enfermedad ó conjunto de fenómenos característicos de una situación determinada.

Taq DNA polimerasa.- Enzima que se encarga de la amplificación del DNA en una PCR, aislada a partir de la bacteria *Thermus aquaticus* que habita en aguas termales, lo cual la hace ideal para los ciclos térmicos, debido a que no se desnaturaliza y su acción puede continuar.

RESUMEN

Los arrecifes de coral son uno de los ecosistemas marinos más hermosos y complejos de la Tierra que durante los últimos años se han visto afectados por el incremento de daños, denominados “enfermedades de corales”. En México, en el Sistema Arrecifal Veracruzano (SAV) el 41.9% del total de los corales afectados presentan características de la Enfermedad de la Mancha Negra (EMN). En el presente trabajo se realizaron análisis moleculares preliminares que ayudan a determinar la presencia de microorganismos asociados a la EMN, las pruebas indican que los hongos están asociados a los corales afectados obteniendo una mayor cantidad de DNA fúngico que bacteriológico.

Palabras clave: Coral, enfermedades de coral, Enfermedad de la Mancha Negra, *Siderastrea radians*.

INTRODUCCIÓN

De todos los ecosistemas marinos, los arrecifes de coral destacan por ser los más complejos, ricos en especies y su producción que es considerada energéticamente autosuficiente para el ecosistema (McField, *et al.* 2007). Los humanos también aprovechamos estos ecosistemas para turismo, obtención de alimentos, recreación, educación e investigación las cuales son actividades de importancia para la economía local y nacional. De manera similar, los productos naturales que pueden obtenerse de los arrecifes de coral son de destacado valor debido a que auxilian en muchos tratamientos de enfermedades humanas críticas e incluso en la práctica médica los corales se usan para implantes óseos (Saura, 1991; Raymundo, *et al.* 2008). En los últimos años, la pérdida de estos ecosistemas es mayor debido a que son impactados por la combinación de diversos factores como el calentamiento global, desgaste de la capa de ozono, sobrepesca, eutrofización, contaminación, degradación del hábitat y manifestaciones de actividades humanas que amenazan su sustentabilidad, estos informes hacen hincapié en el incremento de enfermedades y/o síndromes de los corales escleractinios hermatípicos, los cuales son los constructores de los ecosistemas arrecifales (Richardson, 1998; Lafferty *et al.*, 2004). Aunque los investigadores aún no han quedado completamente de acuerdo con la designación de síndrome o enfermedad para las afecciones en los corales hermatípicos, cabe aclarar que, en términos médicos, un síndrome es el conjunto de síntomas que caracterizan una enfermedad o conjunto de fenómenos característicos de una situación determinada, en base a lo anterior una enfermedad se define como cualquier desviación o interrupción de la estructura o funcionamiento normal de cualquier parte, órgano o sistema, que se manifiesta por un conjunto de síntomas y signos, aunque los microbiólogos

consideran que para este último término es necesario que se conozca el microorganismo causante de la afectación y por lo tanto, que los postulados de Koch sean cubiertos (Richardson, 1998); sin embargo para fines del presente trabajo se tomará en consideración que una enfermedad es cualquier deterioro de la salud como resultado de la disfunción fisiológica (Raymundo, *et al.* 2008).

Las investigaciones acerca de las enfermedades de coral (o síndromes, según algunos autores) son relativamente recientes, se sabe que las enfermedades ayudan a regular el número de individuos en una población depurando a los individuos poco aptos, por lo que se les considera un aspecto natural, mientras no se pierda la totalidad o un porcentaje considerable de los individuos (Raymundo, *et al.* 2008). El primer reporte de daños en corales se publicó en 1970 y describe la degradación de tejido al presentarse una interfase entre tejido saludable y enfermo que atraviesa toda la colonia destruyendo completamente el tejido coralino a su paso. La primera enfermedad reportada como tal en 1973, fue denominada Enfermedad de Banda Negra, ésta consiste en una banda oscura presente entre tejido sano y afectado dejando expuesto el esqueleto coralino (Richardson, 1998; Borneman, 2001). En la actualidad, los daños a los corales a causa de las enfermedades se aprecian en todo el mundo pero afectan particularmente al Caribe (Figura 1). Las enfermedades coralinas han incrementado en frecuencia y severidad, pero todavía más preocupante es el hecho de que desconocemos el agente causante de la gran mayoría de ellas y aunque se han realizado detalladas descripciones sobre diferentes enfermedades en corales hermatípicos, se ha considerado fundamental el reconocer las asociaciones coralinas con microorganismos debido a que se estiman como posibles agentes causantes de

enfermedades infecciosas. Mientras más conozcamos esta correlación, más podemos entender las enfermedades de corales y controlar los brotes que se presenten (Raymundo, *et al.* 2008; Wilkinson, 1998).



Figura 1.- Las tres enfermedades más registradas en el Caribe son banda negra, banda blanca y plaga blanca. Cabe mencionar que el reporte de estas enfermedades está limitado por la distribución de las actividades de monitoreo en la región.

De los muchos reportes de enfermedades de corales hermatípicos destacan: Banda Negra, Banda Blanca, Banda Amarilla, Banda Roja, Plaga Blanca Tipo I y II, Mancha Blanca, Necrosis Rápida, Aspergillosis o Síndrome de Línea Rosa (Borneman, 2001). Sin embargo,

la falta de conocimiento acerca de las enfermedades en corales y sus patógenos asociados ha llevado a confusiones, ya que son determinadas únicamente con características visuales y en ocasiones las condiciones observadas no concuerdan, lo que se refleja al designar un solo nombre para lo que posiblemente podrían ser varias enfermedades o bien, a una sola enfermedad se le designan varios nombres, es por esta razón que la necesidad de investigación de las enfermedades en corales es hoy en día indispensable para el reconocimiento y la solución de este problema (Richardson, 1998; Raymundo, *et al.* 2008). Debido a que la relación entre corales y microorganismos, no ha sido estudiada con detalle, aún se desconocen las circunstancias en la que esta relación puede llegar a originar un daño al organismo; sin embargo, se entiende que la interacción entre el hospedador, un agente patógeno y el medio ambiente son promotores de una enfermedad (Raymundo, *et al.* 2008). Algunos estudios sugieren que el microorganismo afectará al hospedador de manera significativa cuando se presente una condición de estrés (como la calidad del agua, sedimentación, cambio en salinidad, luz o temperatura) causando una enfermedad y con ello puede llegar a causar blanqueamiento o mortalidad a su hospedador (Borneman, 2001; García *et al.*, 2004; Denner *et al.*, 2003; Rosenberg *et al.*, 2007). En condiciones normales los microorganismos son probióticos elementales y benefician a su hospedador de diferentes maneras, las bacterias que se presentan en el mucus, asociado al esqueleto calcáreo que secretan los corales tienen la capacidad de proporcionar una capa protectora que les brinda un mecanismo inmunológico al producir sus propias sustancias antimicrobianas o antifúngicas, o como un medio de alimentación al capturar zooplancton o bien brindan un medio nutritivo en el cual se pueden desarrollar bacterias y hongos de los cuales el coral puede alimentarse. Sin embargo, cuando las condiciones ambientales varían, podrían llegar a cambiar la composición del mucus y causar una alteración en las

poblaciones de bacterias lo cual origina enfermedades tales como la enfermedad de la Banda Blanca causada por *Vibrio carchariae*, Plaga Blanca en el Caribe presuntamente causada por *Aurantimonas coralicida*, Plaga Blanca en el Mar Rojo presuntamente causada por *Thalassomonas loyana*, Mancha Blanca presuntamente causada por *Serratia marcescens*, Mancha Amarilla presuntamente causada por *Vibrio alginolyticus* y Blanqueamiento presuntamente causada por *Vibrio shiloi* (Borneman, 2001; Cervino *et al.*, 2004; Denner *et al.*, 2003; Ducklow y Mitchell 1979; García *et al.*, 2004; Rosenberg *et al.*, 2007).

Por otro lado, los hongos también son microorganismos que se presentan en condiciones normales en los corales, pero pueden estar asociados a enfermedades como en el caso de bandas oscuras en donde el hongo ataca al alga y la destruye, provocando el oscurecimiento de la zona al secretar un pigmento que tiñe el esqueleto coralino, también se han encontrado asociados al Síndrome de Línea Rosa, Aspergillosis e incluso causando blanqueamiento (Priess *et al.*, 2000; Ravindran *et al.*, 2001; Rosenberg *et al.*, 2007). Más recientemente se ha determinado la presencia de partículas parecidas a virus, por lo que se les reconocen como posibles agentes patógenos (Vega *et al.*, 2008; Wilson y Chapman 2001; Rosenberg *et al.*, 2007). Un estudio realizado por Vega y colaboradores en 2008, demuestra que un virus parecido al del herpes puede estar presente en el coral *Porites compressa* cuando éste es sometido a factores estresantes abióticos como reducción del pH, aumento de nutrientes y estrés térmico. Lo anterior apoya la hipótesis de que los corales presentan infecciones virales comunes entre los cnidarios.

La Enfermedad de Mancha Negra (EMN), reconocida también como Síndrome de Mancha Negra (SMN) o Enfermedad de Lunares Oscuros (ELO), fue identificada a principios de los 1990's y descrita detalladamente en 1998 por Garzón-Ferreira y Gil-Agudelo. Se caracteriza por círculos o manchas irregulares oscuros (negro y/o café), rodeados por tejido saludable con pigmentación normal que aumentan en tamaño a lo largo del tiempo y se encuentran dispersas por toda la superficie de la colonia, en ocasiones la superficie afectada está ligeramente deprimida; sin embargo, actualmente se desconoce la causa de esta enfermedad (Borneman, 2001; Rosenberg y Loya., 2004; McField *et al.*, 2007).

Antecedentes

Aunque los estudios que se han realizado sobre la EMN no hacen referencia a microorganismos asociados a la misma, se tienen contempladas algunas situaciones como son la distribución, prevalencia, porcentaje y grado de infección en los corales. Richardson en 1998 determina que la EMN, se incrementa rápidamente en términos de números de colonias afectadas y el número de lesiones o pigmentación anómala presentes en colonias individuales desde inicios de 1990. Este mismo autor y colaboradores en 2000, reportan un incremento significativo de esta enfermedad en corales escleractinios del sur del Caribe. Por otro lado Santavy y colaboradores en 2001 reportaron a la EMN como la enfermedad más frecuente, aunque no fue la más abundante, se presentó en 9 estaciones de Key West, en 2 de New Grounds y en 5 de Dry Tortugas. En 2002, García realizó un estudio en Parque Nacional Archipiélago de Los Roques, en donde la EMN tuvo una mayor incidencia en colonias de tallas pequeñas que van de 0.01 – 0.19 m² en las especies *Montastraea*

annularis y *Siderastrea siderea*, aunque la población en general se reportó saludable. En 2003, éste mismo autor, realizó un estudio en el mismo sitio, en donde la EMN se reportó como una de las enfermedades de mayor incidencia con un total de 29.70 % en seis arrecifes del Parque Nacional en el periodo de 1999-2000. Sutherland en 2004 reporta la presencia de EMN en el Caribe y el Indo-Pacífico, con el incremento de temperatura como un factor abiótico de estrés, además se le considera que está relacionado con profundidades menores a 6 m y durante el verano cuando la temperatura del agua es elevada. La distribución grupal que se observó para esta enfermedad en los arrecifes de Colombia lleva a pensar que posiblemente se trate de una enfermedad contagiosa y por lo tanto de origen biótico. En 2005, Borger realizó un estudio en donde presentó que la EMN, puede ser una respuesta al estrés del organismo y aunque la mortalidad tisular no siempre está asociada con esta enfermedad, cuando se llega a presentar avanza 4 cm/mes, además, fue la única enfermedad de las tres observadas que presentó un incremento significativo durante los años del estudio (2000 a 2002).

En México, la diversidad de daños observados en corales es considerable y se reconoce como una contribución importante para la pérdida de arrecifes (Ward *et al.*, 2006, Voss y Richardson, 2006). En el Sistema Arrecifal Veracruzano (SAV) 4.2% de los corales presentan alguna enfermedad entre las que destaca la Enfermedad de Mancha Negra (EMN), ésta última tiene el impacto más considerable afectando el 2% del total de los corales principalmente *Siderastrea radians* (Figura 2) (Horta-Puga *et al.*, 2009). Debido al elevado porcentaje de corales afectados por la EMN, que afectan considerablemente a los arrecifes del SAV, es de valiosa importancia la determinación de los microorganismos

asociados a tejidos afectados por esta enfermedad en el coral escleractinio *Siderastrea radians* del Parque Marino Nacional SAV y reconocer al máximo grado taxonómico posible la identidad de los microorganismos asociados ya sean virus, hongos y/o bacterias.

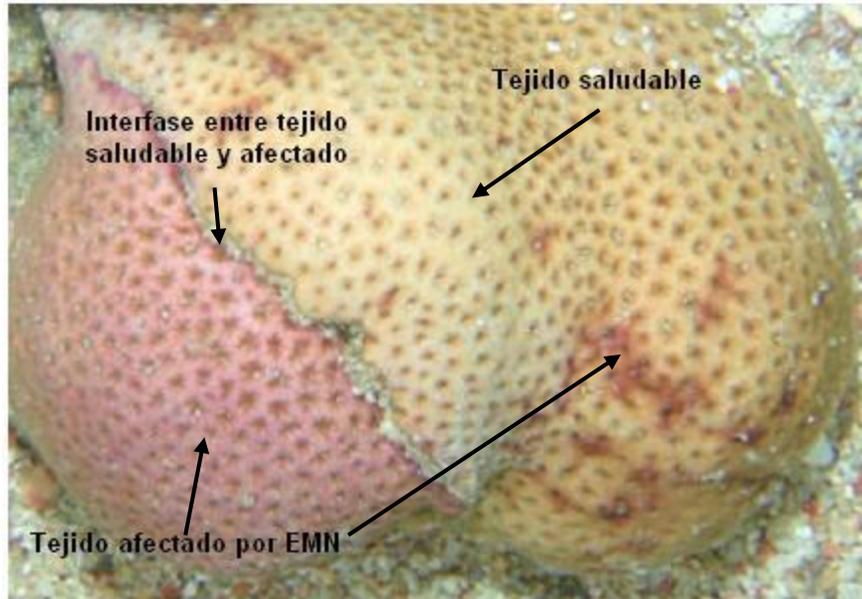


Figura 2.- *Siderastrea radians* afectada por la Enfermedad de la Mancha Negra

Hipótesis

Debido a que la Enfermedad de Mancha Negra es considerada una enfermedad, se espera encontrar evidencia de microorganismos asociados a la misma por medio de análisis moleculares.

Objetivo general

Determinar si existen microorganismos asociados a tejidos afectados por la EMN en el coral escleractinio *Siderastrea radians* del Parque Marino Nacional SAV.

Objetivos particulares

Determinar al máximo grado taxonómico posible la identidad de estos microorganismos asociados a la EMN ya sean hongos, bacterias y/o virus.

Determinar que método de extracción de material genético es el más adecuado para los fines del presente trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El Sistema Arrecifal Veracruzano (SAV) es considerado uno de los sistemas arrecifales más importantes del sur del Golfo de México, por la riqueza natural de sus 25 arrecifes de tipo costero y plataforma, que desde el punto de vista geológico están bien desarrollados (Carricart-Ganivet y Horta-Puga 1993, Tunnell et al. 2007). Al estar ubicado frente al Puerto de Veracruz, el impacto de las actividades humanas es de tal magnitud, que se le considera una de las áreas arrecifales con la mayor cantidad de problemas ambientales a nivel mundial (Vargas-Hernández et al. 1993, Lang et al. 1998, Horta-Puga 2009). Por su importancia el sistema fue decretado como área natural protegida en 1992, y desde entonces se le conoce como Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano (Gómez-Pompa y Dirzo, 1995). Debido a la influencia de la desembocadura del Río Jamapa el SAV se divide en dos grupos arrecifales, el Grupo Norte frente al Puerto de Veracruz, y el Grupo Sur frente al poblado de Antón Lizardo,. Las muestras utilizadas de este estudio se recolectaron en el arrecife Isla Verde, perteneciente al Grupo Norte, más precisamente en la zona SE de la planicie arrecifal a 1 m de profundidad, muy cerca del faro (19°11'55.10''N y 96°04'03.38''W) (Figura 3).

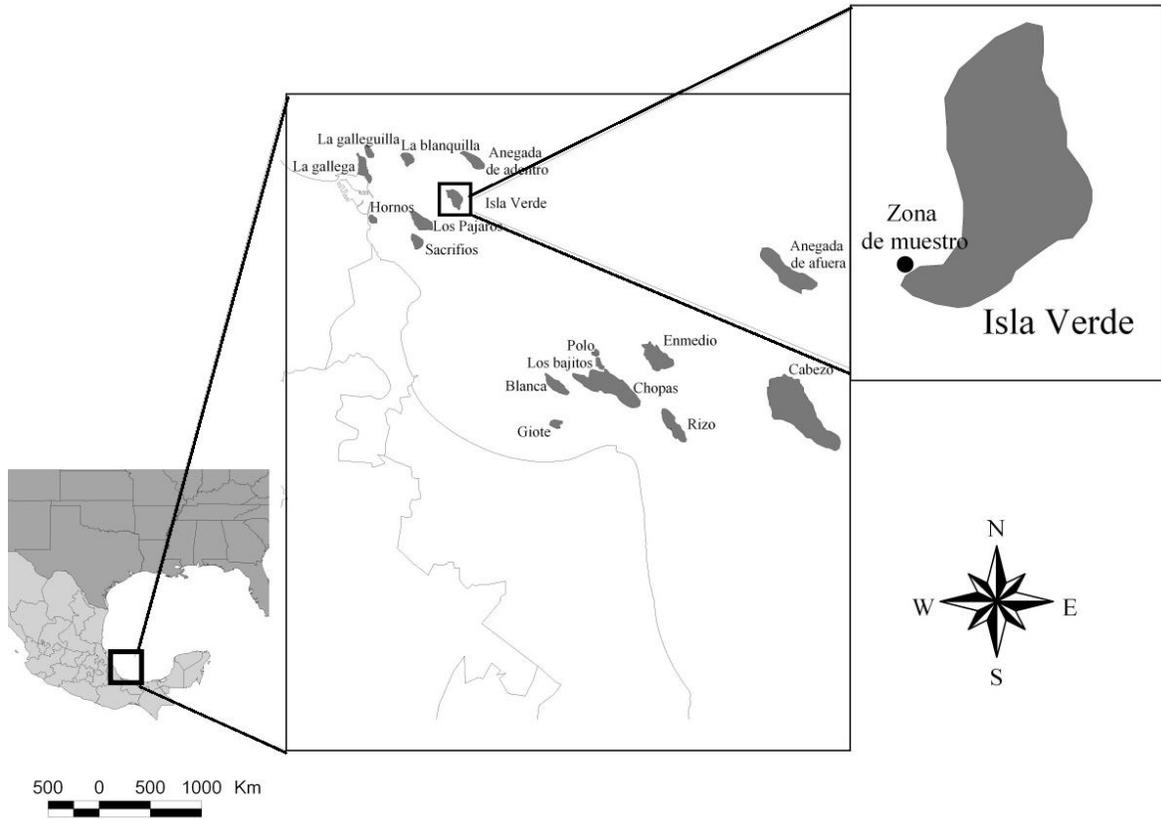


Figura 3. Isla Verde, Sistema Arrecifal Veracruzano, Veracruz, México.

Estrategia metodológica

La Enfermedad de la Mancha Negra (EMN) está afectando de manera considerable a los arrecifes del SAV para determinar qué tipo de microorganismos (virus, hongos y/o bacterias) están asociados a la EMN, se recolectaron corales aparentemente sanos y corales afectados por la enfermedad, del coral escleractinio hermatípico *Siderastrea radians* (Pallas, 1766). Se escogió esta especie ya que es la más abundante, además de ser la que presenta una mayor incidencia de esta enfermedad, en el SAV (Horta-Puga *et al.*, 2009). La determinación de microorganismos presentes en las muestras se realizó mediante análisis moleculares, que implicaron la obtención y aislamiento del material genético de los microorganismos para su posterior amplificación mediante la técnica estándar PCR (Polymerase Chain Reacton) (Rodríguez *et al.*, 2004; Watson *et al.*, 2005).

Recolección de muestras

Se recolectaron manualmente 20 ejemplares del coral *Siderastrea radians* (5 cm diámetro) los cuales se mantuvieron vivos en todo momento, es decir no se sacrificaron, y 6 muestras de agua de mar superficial en el arrecife Isla Verde, el 21 de abril del 2010 (Figura 4). Los organismos se enjuagaron inmediatamente con agua del medio, procurando eliminar residuos y/o material extraño adherido a la superficie, posteriormente a cada uno se le extrajo muestras del tejido coralino, utilizando una jeringa de 3 ml para succionar el tejido (efecto de vacío) siguiendo la metodología propuesta por Correa y colaboradores (2009). Este método fue utilizado debido a que garantiza una recolección suficiente del material genético causando un daño mínimo al coral. Las muestras de tejido y el agua de mar que se incorpora durante el proceso, fueron colocadas en tubos de centrifuga de 50 ml, previamente esterilizados y con 20 ml de solución fijadora (Figura 5). En total se recolectaron 20 colonias, 12 con los síntomas típicos de la EMN (Figura 2), y 8 con

apariencia saludable. Las muestras recolectadas se dividieron en dos lotes de 10 ejemplares (6 enfermos + 4 sanos), los que se fijaron utilizando dos tipos de soluciones:

Lote 1: Solución de Fenol-STE 1X (Valverde *et al.*, 1990).

Lote 2: Solución de etanol 95% (Cooney *et al.*, 2002).

Las muestras se colocaron en un contenedor, al que se agregó hielo, para ser trasladadas al Laboratorio de Fitopatología de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, para mantenerlas frescas y evitar cualquier daño que pudiera sufrir el material genético durante el trayecto. Las muestras de agua de mar superficial (25 ml) se recolectaron manualmente el 1 de octubre del 2010, y se colocaron en tubos de centrifuga con las mismas soluciones fijadoras.



Figura 4. Recolección de corales sanos y enfermos (*Siderastrea radians*).

Extracción y aislamiento de ácidos nucleicos

Para poder determinar la presencia/ausencia de microorganismos (virus, bacterias y/o hongos) asociados a la EMN, se utilizaron dos métodos de extracción de RNA y/o DNA ribosomal (rRNA y rDNA, respectivamente), el método de extracción de RNA de doble cadena, que se aplicó a las muestras del Lote 1, y el método de extracción de ácidos

nucleicos con silica, que se aplicó a las muestras del Lote 2 (Valverde *et al.*, 1990; Mackenzie *et al.*, 1997, De La Torre-Almaráz *et al.*, 2004). Es importante señalar que el método de extracción de RNA de doble cadena, tradicionalmente sólo se utiliza para la obtención de rRNA, sin embargo, en el Laboratorio de Fitopatología se ha demostrado que también se puede, y de hecho se obtiene también rDNA (De La Torre-Almaráz *et al.*, 2004), por lo cual también se utilizó en este estudio para obtener este tipo de ácido nucleico en las muestras coralinas.



Figura 5. Toma de muestras de tejido coralino

Método de extracción de rRNA de doble cadena

Las muestras del lote 1 fueron procesadas para la extracción de rRNA (ácido ribonucleico ribosomal) siguiendo la metodología de Valverde y colaboradores (1990). Se utilizó esta técnica porque la celulosa tiene la capacidad de adherirse al material genético ayudando a eliminar todas las demás sustancias innecesarias. Las muestras obtenidas fueron mantenidas en agitación constante durante 30 minutos, posteriormente se sometieron a centrifugación a 8000 rpm durante 15 min, la fase acuosa fue recuperada y se le adicionó 2.1 ml de etanol absoluto frío, a continuación las muestras fueron filtradas en un columna de celulosa y papel filtro, seguidamente se realizaron tres lavados de la columna de celulosa añadiendo 25 ml de STE 1X-etanol al 16% para eliminar sustancias que pudieran interferir en el método de PCR, el material genético capturado en la celulosa de la columna se recupera agregando 10 ml de STE 1X, el filtrado se recupera. Al filtrado se le agregan 20 ml de etanol absoluto frío y 0.5 ml de acetato de sodio 3M, se agita manualmente y se centrifuga (8000 rpm, 30 min), se elimina el sobrenadante, se deja secar el tubo a temperatura ambiente, y posteriormente se agregan 150 µl de H₂O libre de nucleasas, la que se recolecta con una micropipeta, y el extracto se conserva a -20 °C hasta su uso para la PCR (Valverde, *et al*, 1990).

Método de extracción de ácidos nucleicos con Sílica

Las muestras del Lote 2 se procesaron basándose en el método descrito por Mackenzie y colaboradores (1997), el cuál se basa en la capacidad de la sílica para poder obtener los ácidos nucleicos, ya que éstos presentan afinidad a esta sustancia. Cada muestra se homogenizó manualmente y se extrajeron 0.5 ml del homogenizado, y se coloca en un tubo vial al cuál se le agregó 1.5 ml de solución tampón de extracción (ver apéndice 1) y 150 µl de n-lauryl sarcosina 10%. Las muestras se incubaron por 10 min a 70 °C para lisar las

células, seguidamente de una incubación en hielo por 5 minutos, posteriormente fueron centrifugados (12000 rpm, 1 min, 4 °C). Se recuperaron 300 µl de sobrenadante de cada muestra, se colocaron en viales y se agregaron 150 µl de etanol absoluto frío, 300 µl de NaI 6M y 50 µl de sílica resuspendida, se dejaron incubar durante 30 min y fueron centrifugados (6000 rpm, 1 min). El sobrenadante fue eliminado y la pastilla (pellet) fue resuspendida en 1 ml de solución tampón de lavado (ver apéndice 1) y nuevamente centrifugada (6000 rpm, 1 min), este último lavado y centrifugado se repitió 3 veces, eliminando el sobrenadante. Posteriormente el pellet recuperado se resuspendió en 100 µl agua libre de nucleasas y fue incubado a 70 °C durante 4 minutos, centrifugado (12000 rpm, 3 min) y recuperando 100 µl del sobrenadante el cual se almacenó a -20 °C hasta su uso en la PCR (Mackenzie *et al.*, 1997).

Determinación de la presencia de Virus

Las muestras del Lote 1, que se procesaron por la técnica de extracción de doble cadena, para el aislamiento de rRNA, se analizaron por electroforesis en minigel de poliacrilamida (6%) montado en una cámara Biorad doble, para poder determinar la presencia de rRNA (Figura 6). El volumen de las muestras fue 50 µl por carril, utilizando como patrón de referencia *Nicotiana glauca*. Las condiciones de la electroforesis fueron a 100 V y 2.5 h a temperatura de laboratorio y la tinción se realizó con solución de nitrato de plata 0.011 M (Valverde *et al.*, 1990; Gutiérrez-Villegas *et al.*, 2004).

Determinación de la presencia de Hongos y Bacterias

Las muestras obtenidas por ambos métodos, y para ambos lotes, se procesaron para detectar la presencia de: (1) Hongos, amplificando el DNA utilizando los oligonucleótidos ITS'4-

ITS'5 que amplifican un segmento de 600-700 pb del gene rDNA 18S (fragmento de la subunidad ribosomal 18S); y (2) Bacterias, por amplificación de DNA con oligonucleótidos EuBac FD/RD que amplifican un segmento de 1600 pb del gene rDNA 16S (fragmento de la subunidad ribosomal 16S).

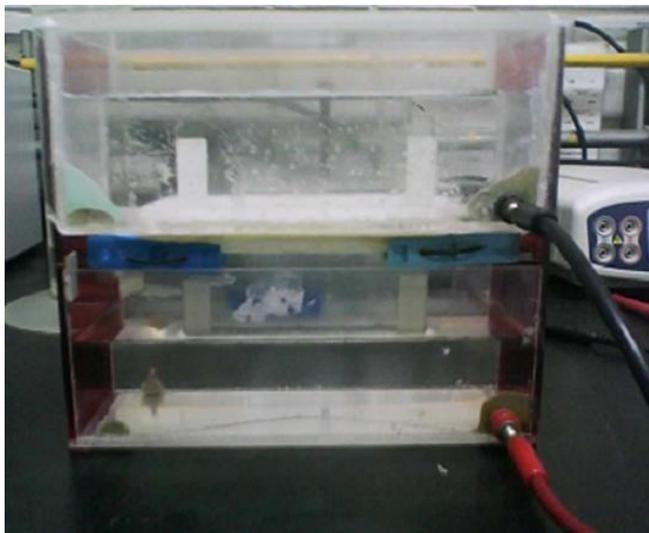


Figura 6. Prueba de patrón electroforético para determinar la presencia de rRNA.

Se tomaron 0.1 μl de cada muestra, a la que se agregó 4.9 μl de una mezcla para favorecer la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y por tanto la amplificación de los fragmentos de DNA. La mezcla estaba compuesta de 50 mM MgCl_2 , buffer de reacción 10X, 10mM de dNTP's, 10mM de cada oligonucleótido, 5 unidades por μL de *Taq* DNA polimerasa (*Taq* DNA polymerase Invitrogen). Las muestras fueron incubadas en un termociclador Applied Biosystems 2720, sometíéndolas por 5 minutos a 95 °C, 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 57°C, 1 minuto a 72°C y 7 minutos a 72°C, por 30 ciclos. Los productos de la PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% calculando su peso molecular por comparación con el marcador de peso molecular 1Kb el cual fue incluido en el mismo gel, al igual que un control positivo (DNA de hongos o bacterias,

respectivamente) y un control negativo (agua estéril); las condiciones de electroforesis fueron 100V durante 45 minutos (Sambrook *et al.*, 1989).

Purificación del DNA obtenido por el método de PCR

El DNA producto de la PCR fue purificado utilizando el KIT WIZARD, el cual consiste en disolver el gel con las bandas de DNA de interés en la solución 1 (membrana binding solution) en un tubo vial estéril a 60 °C, posteriormente se transfirió esta dilución a una minicolumna de sílica previamente ensamblada en un tubo colector y se incubó a temperatura ambiente durante 1 min, se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 min, posteriormente se decantó el sobrenadante del tubo colector y se ensambló de nuevo, se realizó un lavado de 700µl de la solución 2 (wash solution) y se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 min, éste lavado se repitió con 500µl de la solución 2 para posteriormente transferir la minicolumna a un tubo esteril de 1.5 ml adicionando 50µl de agua libre de nucleasas en la minicolumna e incubarlo a temperatura ambiente durante 5 minutos y seguidamente centrifugado a 10,000 rpm durante 1 minuto. Finalmente el DNA se concentró con ayuda de una centrífuga conectada a una cámara de vacío hasta evaporarlo a 10µl aproximadamente.

Secuenciación

El DNA purificado es procesado para su secuenciación en el laboratorio de Bioquímica molecular de la siguiente manera, 0.5 µl de la muestra es mezclado con 1 µl de cada oligonucleótido complementario a ambos extremo de la cadena, una mezcla de 4 µl de los cuatro desoxirribonucleósidos (dNTP, precursores normales de la síntesis de DNA), una mezcla de 0.5 µl de didesoxirribonucleósidos (ddNTP, que terminan la síntesis de DNA en

cuanto se incorporan a la cadena en crecimiento), 1 µl de DNA secuenasa (enzima encargada de la reacción) y 2 µl de formilamida que favorece la reacción. La mezcla anterior es sometida al termociclador durante 45 ciclos los cuales se componen de 95°C durante 5 min, 96°C durante 45 seg, 55°C durante 30 seg, 60°C durante 4 min y 60°C durante 6 min. Posteriormente las muestras son introducidas al secuenciador automático el cual contiene un rayo laser que basándose en la longitud de onda del ddNTP da lectura y crea un cromatograma en la pantalla de la computadora a la cual está conectado el secuenciador, este cromatograma puede obtener las secuencias buscadas.

Identificación de microorganismos por análisis de secuencias nucleotídicas

Las secuencias obtenidas, pretendían la identificación de los microorganismos la cuál sería realizada mediante el alineamiento y comparación de las secuencias nucleotídicas obtenidas de los productos de la PCR, con las disponibles en el GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), mediante el programa de análisis comparativo de secuencias génicas BLAST (Basic Local Alignment Search Tool: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

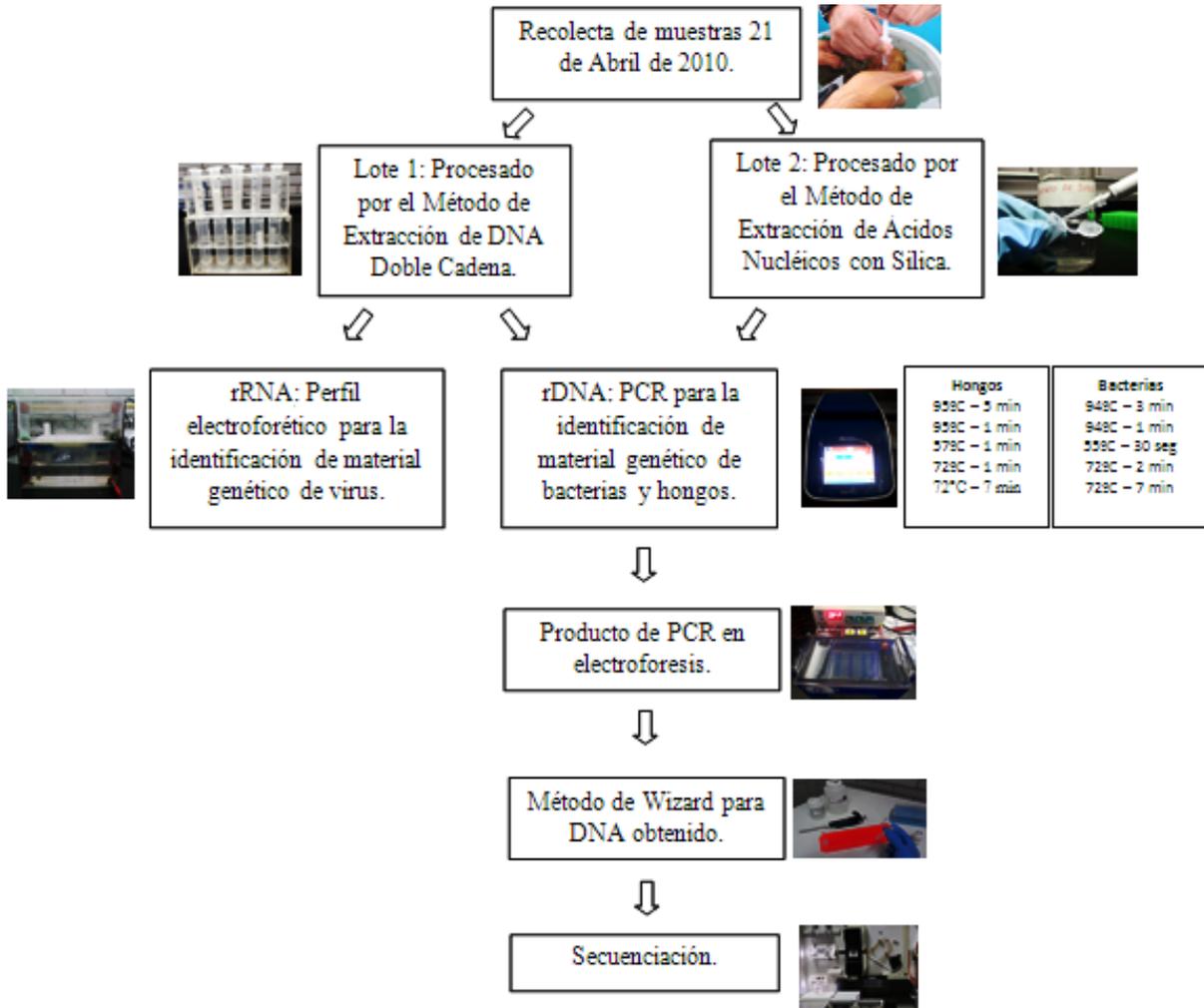


Figura 7. Diseño metodológico.

RESULTADOS

Pruebas diagnósticas para virus

La prueba del patrón electroforético para determinar la presencia de rRNA resultó negativa (Figura 8), tanto en las muestras de corales sanos, como enfermos. Por lo anterior, se considera que no existe evidencia que demuestre la presencia de virus en las muestras de corales recolectados, al menos con las pruebas realizadas en este estudio, sin embargo no se puede descartar categóricamente su presencia.

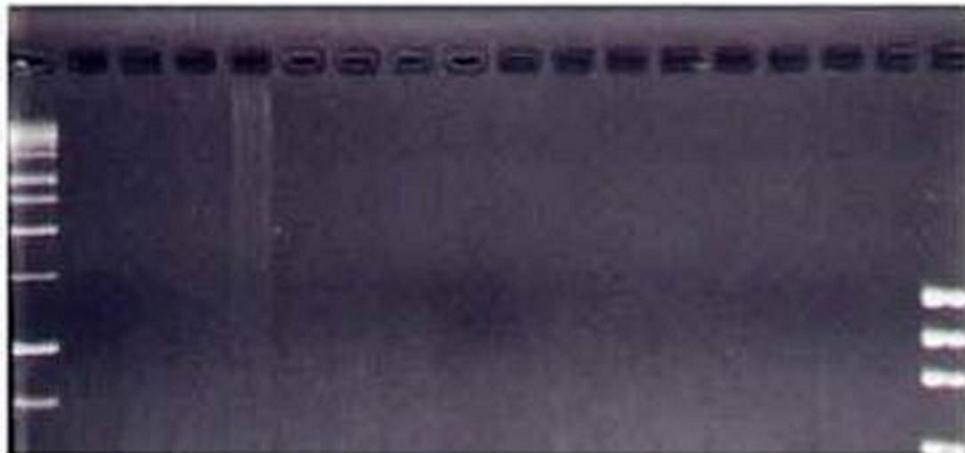


Figura 8. Perfil electroforético en donde no se presenta evidencia de material genético viral.

Tabla 1
Presencia de DNA fúngico en corales sanos y enfermos (EMN) del SAV

Muestra	Método Doble Cadena	Método Sílica	PE
Coral Sano (S1)	+	+	1, 3
Coral Sano (S2)	+	+	2, 4
Coral Sano (S3)	+	+	S/F
Coral Sano (S4)	-	-	S/F
Coral Enfermo EMN (E1)	-	++	5, 11
Coral Enfermo EMN (E2)	-	+	6, 12
Coral Enfermo EMN (E3)	-	++	7, 13
Coral Enfermo EMN (E4)	-	-	8, 14
Coral Enfermo EMN (E5)	-	++	9, 15
Coral Enfermo EMN (E6)	-	++	10, 16
Control Positivo	+	+	17
Control Negativo	-	-	18

+ = Presencia de DNA fúngico. ++ = Presencia abundante de DNA fúngico. - = Ausencia de DNA fúngico. PE= Posición de la muestra en la electroforesis de la Figura 9, S/F =No se fotografió.

Pruebas diagnósticas para hongos

El análisis electroforético del DNA obtenido por ambos métodos, presentó resultados positivos (Tabla 1), lo que indica la presencia de hongos en todos los corales sanos, excepto el ejemplar S4. En el caso de los corales enfermos, no se detectó la presencia de hongos por el método de extracción de doble cadena, pero sí con las muestras procesadas con el método de sílica, incluso en algunos casos se observó una mayor cantidad de DNA (E1, E3, E5 y E6). La Figura 9, muestra la electroforesis aplicada para la detección de hongos.

1. S1-DC

2. S2-DC

3. S1-SIL

4. S2-SIL

5. E1-DC

6. E2-DC

7. E3-DC

8. E4-DC

9. E5-DC

10. E6-DC

11. E1-SIL

12. E2-SIL

13. E3-SIL

14. E4-SIL

15. E5-SIL

16. E6-SIL

17. Control (+)

18. Control (-)

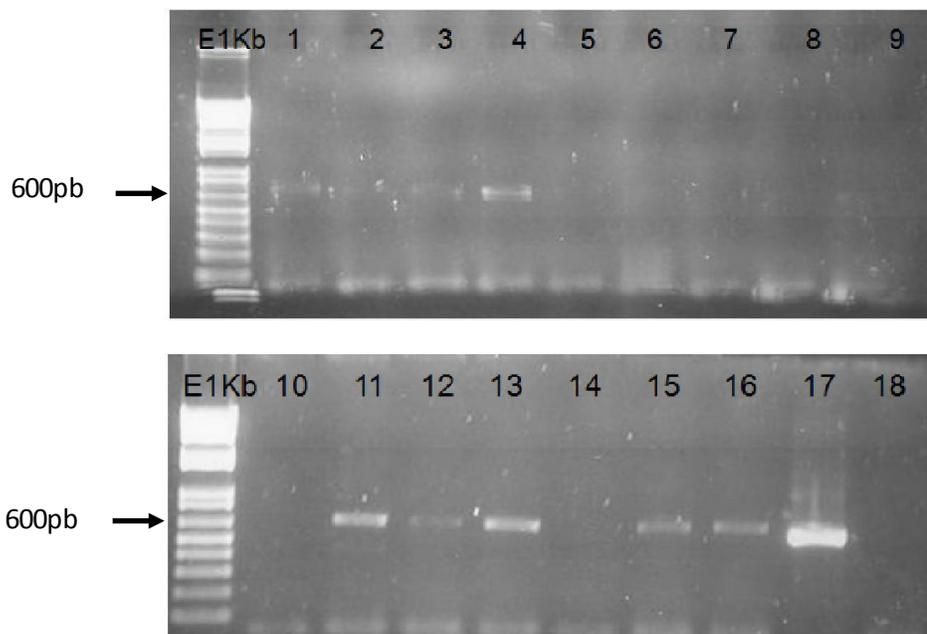


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa de producto de PCR donde se aprecian fragmentos 18S amplificados en corales afectados por la EMN y corales aparentemente saludables, que evidencian la presencia de hongos en las muestras. E1Kb=Escalera 1 Kilo base. S1-DC y S2-DC =Muestras 1 y 2 de coral saludable procesado por el método de Doble Cadena, S1-SIL y S2-SIL= Muestras 1 y 2 de coral saludable procesado por el método de Sílica, E1-DC, E2-DC, E3-DC, E4-DC, E5-DC, E6-DC=Muestras 1, 2, 3, 4, 5 y 6 de coral afectado por EMN procesados por el método de Doble Cadena, E1-SIL, E2-SIL, E3-SIL, E4-SIL, E5-SIL, E6-SIL= Muestras 1, 2, 3, 4, 5 y 6 de coral afectado por EMN procesados por el método de Sílica.

Pruebas diagnósticas para bacterias

Tabla 2
Presencia de DNA bacteriano en corales sanos y enfermos (EMN) del SAV

Muestra	Método Doble Cadena	Método Sílica	PE
Coral Sano (S1)	++	-	S/F
Coral Sano (S2)	++	-	S/F
Coral Sano (S3)	+	-	1, 3, 5, 7
Coral Sano (S4)	++	-	2, 4, 6, 8
Coral Enfermo EMN (E1)	-	-	S/F
Coral Enfermo EMN (E2)	+	-	9, 13
Coral Enfermo EMN (E3)	-	-	S/F
Coral Enfermo EMN (E4)	-	-	10, 14
Coral Enfermo EMN (E5)	-	-	11, 15
Coral Enfermo EMN (E6)	+	-	12, 16
Control Positivo	+	+	17
Control Negativo	-	-	18

+ = Presencia de DNA bacteriano. ++ = Presencia abundante de DNA bacteriano. - = Ausencia de DNA bacteriano. PE= Posición de la muestra en la electroforesis de la Figura 10, S/F= No se fotografió.

El perfil electroforético del DNA obtenido por el método de Doble Cadena presentó resultados positivos lo que indica la presencia de bacterias en los corales sanos, inclusive algunas de las muestras (S1, S2 y S4) presentaron una mayor cantidad de DNA (Tabla 2); en el caso de los corales enfermos los resultados fueron negativos en todos los casos excepto en dos de ellos (E2 y E6). Por otro lado las muestras procesadas por el Método de Sílica presentaron resultados negativos. La Figura 10 muestra la electroforesis para la detección de DNA de hongos. Los datos evidencian la presencia de bacterias en corales

sanos y enfermos por igual, lo que implica que no existen diferencias importantes que sugieran una posible patogenicidad causativa de la EMN en *Siderastrea radians*.

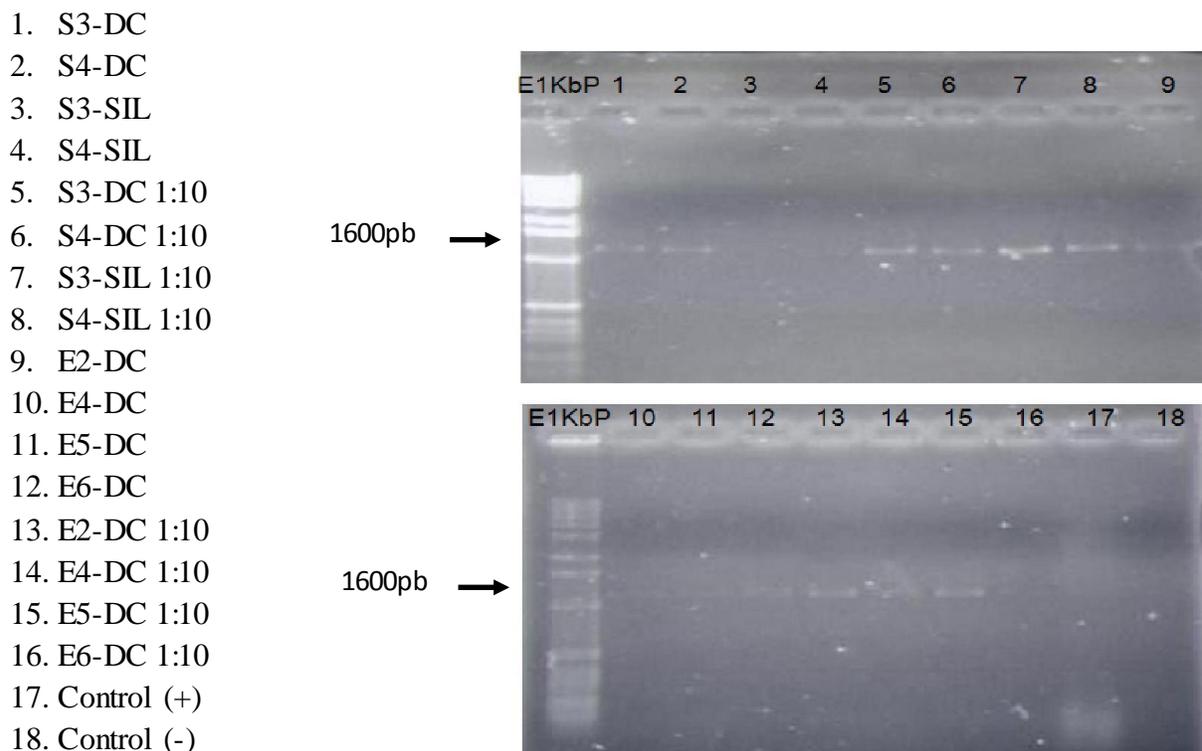


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de producto de PCR donde se aprecian fragmentos amplificados 16S de corales afectados por la EMN y corales aparentemente saludables, que evidencian la presencia de bacterias en las muestras. E1KbP=Escalera 1Kilo base Plus, S3-DC y S4-DC=Muestra 3 y 4 de coral saludable procesado por el método de Doble Cadena, S3-SIL y S4-SIL= Muestra 3 y 4 de coral saludable procesado por el método de Sílica, E2-DC, E4-DC, E5-DC y E6-DC=Muestras 2, 4, 5 y 6 de corales afectados por EMN procesados por el método de Doble Cadena, 1:10=Dilución 1:10

Agua de mar

Tabla 3
Presencia de DNA fúngico en agua de mar del SAV

Muestra	Método Doble Cadena	Método Sílica	PE
H ₂ O 1	-	-	1,4
H ₂ O 2	-	-	2,5
H ₂ O 3	-	-	3,6
Control Negativo	-	-	7
Control Positivo	+	+	8

+ = Presencia de DNA fúngico. ++ = Presencia abundante de DNA fúngico. - = Ausencia de DNA fúngico.
PE= Posición de la muestra en la electroforesis de la Figura 11.

El análisis electroforético de DNA fúngico obtenido por el Método de Doble Cadena y el Método de Sílica para las muestras de agua de mar, presentaron resultados negativos (Tabla 3), lo que indica la ausencia de hongos en todos los casos. La Figura 11 muestra la electroforesis para la detección de hongos.

1. H₂O-DC 1
2. H₂O-DC 2
3. H₂O-DC 3
4. H₂O-SIL 1
5. H₂O-SIL 2
6. H₂O-SIL 3
7. Control (-)
8. Control (+)

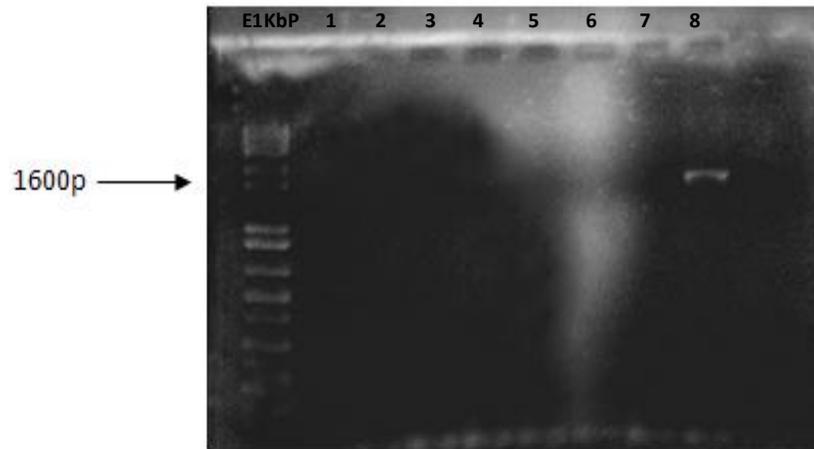


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de producto de PCR donde se aprecian fragmentos amplificados 18S de muestras de agua de mar para identificar la presencia de hongos. E1KbP=Escalera 1 Kilo base Plus. H₂O-DC 1, H₂O-DC 2, H₂O-DC 3=Muestras 1, 2 y 3 de agua de mar procesadas por el método de Doble Cadena, H₂O-SIL 1, H₂O-SIL 2, H₂O-SIL 3=Muestras 1, 2 y 3 de agua de mar procesadas por el método de Sílica.

Tabla 4
Presencia de DNA bacteriano en agua de mar del SAV

Muestra	Método Doble Cadena	Método Sílica	PE
H₂O 1	++	+	1,4
H₂O 2	++	+	2,5
H₂O 3	++	+	3,6
Control Positivo	+	+	7
Control Negativo	-	-	8

+ = Presencia de DNA bacteriano. ++ = Presencia abundante de DNA bacteriano. - = Ausencia de DNA bacteriano. PE= Posición de la muestra en la electroforesis de la Figura 12.

El análisis electroforético del DNA bacteriano obtenido por ambos métodos para las muestras de agua de mar, presentaron resultados positivos (Tabla 4), lo que indica la presencia de bacterias en todas las muestras; sin embargo, se aprecia una mayor concentración de DNA en las muestras de agua procesadas por el método de Doble Cadena que en las procesadas por el método de Sílica. La Figura 12 muestra la electroforesis para la detección de bacterias.

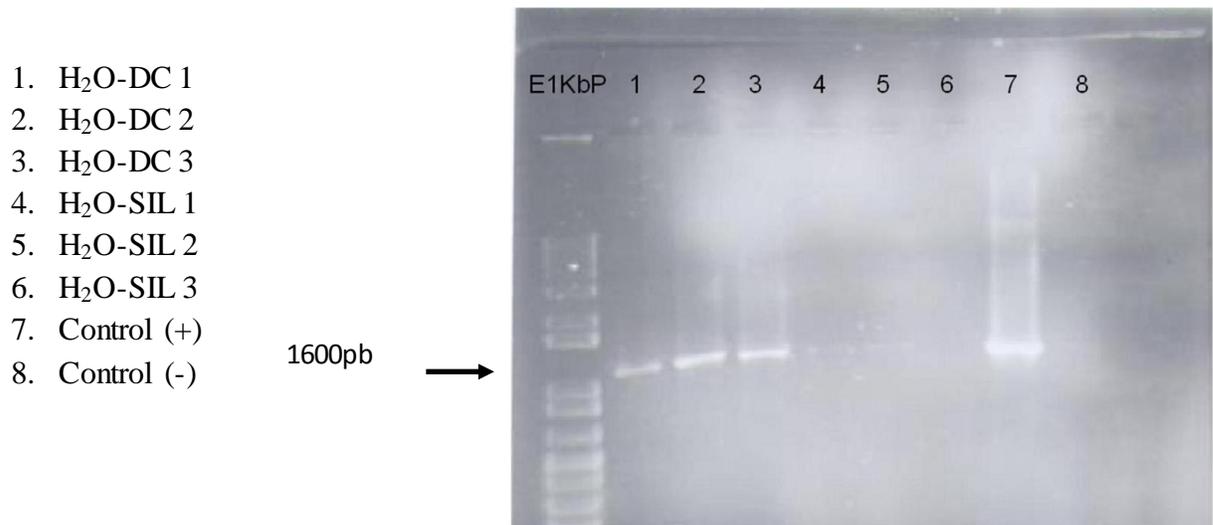


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de producto de PCR donde se aprecian fragmentos amplificados 16S de muestras de agua para identificar la presencia de bacterias. E1KbP=Escalera 1 Kilo base Plus. H₂O-DC 1, H₂O-DC 2, H₂O-DC 3=Muestras 1, 2 y 3 de agua de mar procesadas por el método de Doble Cadena, H₂O-SIL 1, H₂O-SIL 2, H₂O-SIL 3=Muestras 1, 2 y 3 de agua de mar procesadas por el método de Sílica.

Análisis de secuencias

En el electroferograma (Figura 13) se aprecia que los resultados de las secuencias para la determinación de los microorganismos asociados a la EMN, presentaron varios picos de diferentes bases, lo cual quiere decir que existe un gran número de secuencias superpuestas, esto es conocido como ruido y aunque suponemos que se trata de un hongo existen diversas regiones amplificadas, es decir una combinación de secuencias diferentes, lo que conlleva a que ninguna de ellas se establezca como dominante y consecuentemente, se hace imposible determinar la especie de la cual deriva con precisión.

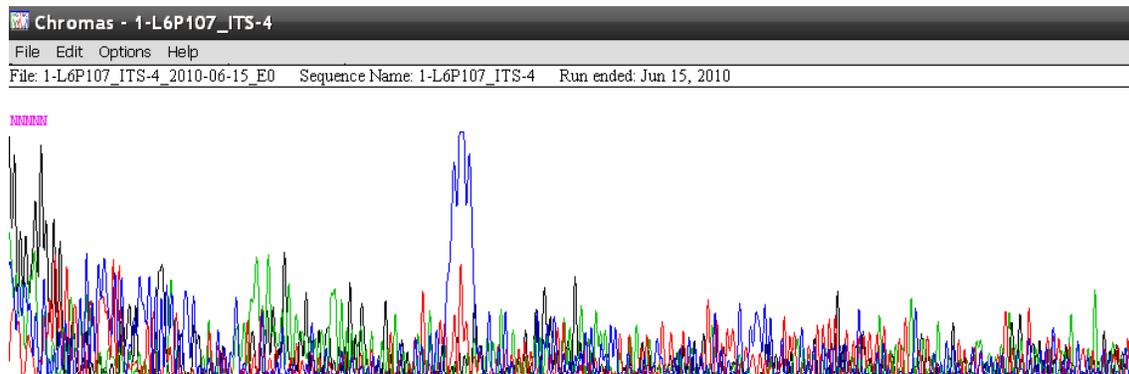


Figura 13.- Electroferograma de la secuencia indeterminada de una muestra de coral afectado por la EMN. Azul=Citocina, Rojo=Timina, Verde=Adenina, Negro=Guanina. Las letras “N” en color rosa, indican que las bases nitrogenadas del DNA no pudieron ser identificadas por el secuenciador.

DISCUSIÓN

El material genético de bacterias obtenido de corales enfermos fue menor que en corales aparentemente saludables lo cual sugiere que las bacterias están presentes en diferentes cantidades cuando la enfermedad está afectándolos. Tomando en cuenta que las bacterias se consideran los principales organismos probióticos en los corales (Correa *et al.* 2009), es indispensable su presencia en organismos saludables ya que actúan como un sistema de inmunidad (Borneman 2001, Rosenberg *et al.* 2007).

Por otra parte, el material genético de hongos presenta una mayor concentración en corales enfermos que en corales saludables, lo cual sugiere que éstos microorganismos podrían ser los causantes de la EMN y coincidiendo con el trabajo de Brandt (2009) en donde los estudios sugieren que la EMN en el Caribe es el resultado de la invasión del tejido coralino por hongos endolíticos. De manera similar, estudios histológicos realizados por Galloway (2007) muestran que en la interfase entre los canales vasculares profundos y el esqueleto se muestran acumulaciones multifocales densas de bulbos pleomórficos en partes gruesas no septadas de paredes irregulares, lo que parece ser hongos. Sin embargo, no se puede afirmar categóricamente que los hongos sean los causantes.

Las muestras de agua de mar procesadas por ambos métodos, no presentaron DNA fúngico, sin embargo las bandas de DNA bacteriano fueron notablemente más densas para las muestras procesadas por el método de extracción de RNA Doble Cadena que para el método de extracción de ácidos nucleicos con sílica. Esto es una posible indicación de que

la evidencia de la presencia de bacterias en corales es la misma que en agua, quizás se trate de los mismos grupos de bacterias.

Algunos autores afirman, que ciertos factores como carga y descarga de barcos, cambios en las corrientes oceánicas, acuicultura o descarga de drenaje pueden causar que los microorganismos se dispersen con gran facilidad en el medio marino (Raymundo, et al. 2008). En el SAV se realizan estas y otras actividades lo cual favorece la presencia de hongos, bacterias y virus en los arrecifes y por consiguiente en los corales, pudiendo causar alguna enfermedad incluso si estos microorganismos solo son oportunistas y se asocian a otros organismos de la zona (Rosenberg *et al.*, 2004).

Las pruebas realizadas muestran que el método de extracción de ácidos nucleicos con sílica arrojan mejores resultados en la obtención del material genético que el método de extracción de RNA doble cadena al menos para la obtención del fragmento 18S correspondiente a hongos. Por el contrario el método de extracción de RNA doble cadena mostró mejores resultados para la obtención del material genético que el método de extracción de ácidos nucleicos con sílica para la obtención del fragmento 16S correspondiente a bacterias.

Debido a que este estudio es uno de los primeros para tratar de identificar los microorganismos asociados a la EMN, estos resultados son importantes para el seguimiento de las pruebas de identificación ya que proporcionan un punto de partida para las investigaciones futuras. Los resultados obtenidos en este trabajo se comparan con algunos otros trabajos y posibles agentes causantes de diferentes enfermedades en la Tabla 4.

Cabe mencionar, que el método de colecta utilizado en este trabajo se ajustó a las posibilidades y permisiones del Parque Marino Nacional SAV y no es recomendable para trabajos posteriores, debido a que presenta inconvenientes tales como la falta del organismo completo para su análisis por medio de microscopía, además, la identificación de los microorganismos asociados a la EMN y la comparación de los microorganismos de las muestras de corales y agua de mar no pudo ser realizada debido a la falta de material genético y a la degradación prematura del mismo, posiblemente la toma de muestra fue un factor determinante para su conservación.

Análisis de secuencias

La identificación de un organismo puede realizarse de diferentes formas incluyendo métodos morfológicos, bioquímicos y moleculares, dentro de éstos últimos se encuentran los análisis de secuencias, las cuales se obtienen a partir de una región conservada del genoma, lo que vendría siendo equivalente a un carácter que ayuda a reconocer al organismo en cuestión (Rodríguez *et al.* 2004).

Para el caso de hongos, éstas regiones conservadas pueden obtenerse con ayuda de secuencias cortas de DNA que flanquean estas regiones (oligonucleótidos). Existe una gran variedad de oligonucleótidos para encontrar estas secuencias que pueden ser de cualquier hongo de los grupos basidiomicetes, ascomicetos y levaduras. En el presente trabajo se utilizó solo un par de estos oligonucleótidos los cuales fueron ITS4/ITS5 para la obtención del fragmento 18S debido a que es una región conservada altamente variable, es decir que estos oligonucleótidos identifican la presencia de DNA de cualquier hongo de los grupos

mencionados anteriormente, sin embargo y a pesar de que se obtuvo DNA fúngico, el electroferograma muestra que se amplificaron varios fragmentos, lo cual revela que los oligonucleótidos utilizados en éste trabajo probablemente no son los más adecuados, ya que pudieron hibridar en varias regiones en donde se producen varias secuencias, lo anterior se aprecia en la Figura 11.

Tabla 4**Enfermedades de corales y sus posibles agentes causantes**

Enfermedad o Síndrome	Posible agente causante	Referencia
Aspergilosis	Hongo <i>Aspergillus sydowii</i>	Borneman, 2001; Priess, 2000.
Banda Amarilla/ Línea Amarilla	ND	Borneman, 2001
Banda Blanca	Bacteria <i>Vibrio</i> sp. (TI) Bacteria <i>Vibrio charcharii</i> (TII).	Borneman, 2001
Banda Cafe	Cianobacterias	Borneman, 2001
Banda Negra	Cianobacteria <i>Phormidium corallyticum</i> , Bacteria <i>Desulfovibrio</i> sp.	Borneman, 2001; Conney, 2002.
Banda Roja	Cianobacterias <i>Schyzothrix</i> sp. Y <i>Oscillatoria</i> sp.	Borneman, 2001
Plaga Blanca TII	Bacteria <i>Sphingomonas</i> . Bacteria <i>Aurantimonas coralicida</i>	Borneman, 2001; Denner <i>et al.</i> , 2003.
Blanqueamiento	Bacteria <i>Vibrio ilio</i> .	Borneman, 2001; Kushmaro <i>et al.</i> , 1997; Kushumaro <i>et al.</i> , 2001; Banin, 2000.
Mancha Amarilla	Bacteria <i>Vibrio alginolyticus</i> y otras especies de <i>Vibrio</i>	Rosenberg, 2007.
Mancha/Anillos/Puntos Rosas/Morados	ND	Borneman, 2001
Mancha Negra	Hongos	En este trabajo

ND= No determinado

CONCLUSIONES

Las pruebas realizadas indican que los hongos están asociados a los corales enfermos, sin embargo aún, no se les puede considerar como agentes causantes de la enfermedad.

En base a los resultados obtenidos se considera que la cantidad de microorganismos es diferente en corales aparentemente saludables y en corales afectados por la EMN.

Los corales afectados por la EMN presentan mayor cantidad de DNA de hongos que los corales aparentemente saludables.

En base a este trabajo, se considera que el método de extracción de ácidos nucleicos con sílica permite obtener una concentración mayor de DNA fúngico, mientras que el método de extracción de RNA Doble Cadena permite una mayor obtención de DNA bacteriano.

RECOMENDACIONES

Cabe mencionar que los métodos de extracción y toma de muestra utilizados en este trabajo fueron ajustados para fines del mismo debido a que se evitó en la medida de lo posible dañar a los corales, respetando las permisiones del Parque, sin embargo, se sugiere lo siguiente:

Este trabajo es uno de los primeros intentos para conocer a los microorganismos asociados a una de las enfermedades en corales que existen y no se sabe cuál es el mejor método para la obtención del material genético por lo que se utilizaron los descritos en este trabajo, sin embargo, basándonos en los resultados se sugiere que en futuros estudios el método de extracción de RNA Doble Cadena sea utilizado para la obtención de DNA bacteriano y RNA viral mientras que el método de extracción de ácidos nucleicos con sílica sea utilizado para la obtención de DNA fúngico.

Se recomienda que las muestras obtenidas para trabajos posteriores sean colonias completas, para la realización de pruebas de microscopía.

Si se tiene la oportunidad, se sugiere que se realicen cultivos de los microorganismos asociados a los corales, para la realización de pruebas bioquímicas que ayuden a la identificación y la aplicación de los Postulados de Koch.

Es recomendable realizar un PCR tiempo real, con el cual se puede determinar cuantitativamente el material genético obtenido.

LITERATURA CITADA

Borger, J.L. y S.C.C. Steiner. 2005. The spatial and temporal dynamics of coral diseases in Dominica, West Indies. *Bulletin of Marine Science* 77:137-154.

Borneman, E.H. 2001. *Aquarium Corals: Selection, Husbandry and natural history*. Microcosm. Ltd., USA 463pp.

Brandt, M. E.y J. W. McManus. 2009. Disease incidence is related to bleaching extent in reef-building corals. *Ecology*. 90:2859-2867.

Carricart-Ganivet, J.P y Horta-Puga, G. 1993. Arrecifes de coral en México. Pags. 80-90. En: *Biodiversidad marina y costera de México*. S.I. Salazar-Vallejo y N.E. González (eds.). CONABIO y CIQRO, México.

Cervino, J.M., R. Hayets, T.J. Goreau y G.W. Smith. 2004. Zooxanthellae regulation in Yellow Blotch/Band and other coral diseases contrasted whit temperature related bleaching: *In situ* destruction vs expulsion. *Symbiosis* 37:63-85.

Cooney, P.R., O. Pantos, T.M.D.A. Le, M.R. Barer, A.G.O'Donnell y J.C. Bythell. 2002. Characterization of the bacterial consortium associated with black band disease in coral using molecular microbiological techniques. *Environmental Microbiology* 4:401-413.

Correa, A.M.S., M.E. Brandt, T.B. Smith, D.J. Thornhill y A.C. Baker. 2009. *Symbiodinium* associations with diseased and healthy scleractinian corals. *Coral Reefs*. 28:437-448.

De La Torre-Almaráz, R., A. C. Monsalvo-Reyes, J. Mendez-Lozano y R. F. Rivera-Bustamante, 2004. Caracterización de un Nuevo geminivirus asociado con los síntomas de moteado Amarillo de la okra (*Abelmoschus esculentus*) en México. *Agrociencia*. 38-226-238.

Denner, E.B.M., G.W. Smith, B. Hans-Jürgen, P. Schumann, T. Narzt, S.W. Polson, W. Lubitz y L.L. Richardson. 2003. *Aurantimonas coralicida* gen. nov., sp. Nov., the causative agent of white plague tipe II on Caribbean scleractinian corals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53:1115–1122.

Ducklow, H.W. y R. Mitchell. 1979. Bacterial populations and adaptations in the mucus layers on living corals. *Limnology and Oceanography* 24:715–725.

Galloway S. B, T. M.Work, V. S. Bochsler, R. A. Harley, E. Kramarsky-Winters, S. M. McLaughlin, C. U. Meteyer, J. F. Morado, J. H. Nicholson, P. G. Parnell, E. C. Peters, T. L. Reynolds, D. S. Rotstein, L. Sileo y C. M. Woodley. 2007. *Coral Disease and Health*

Workshop: Coral Histopathology II. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 56 and NOAA Technical Memorandum CRCP 4. National Oceanic and Atmospheric Administration, Silver Spring, MD. 84p.

García, A., A. Cróquer y N. Malaver. 2004. Algunas características funcionales de las comunidades bacterianas del mucus asociado a tejidos sanos y con síndrome de Banda Amarilla en *Montastrea annularis*. *Interciencia* 29:39–45.

García, A., A. Cróquer y S.M. Pauls, 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* 27:448-453.

García, A., A. Cróquer y S.M. Pauls. 2003. Estado actual de las enfermedades y otros signos de deterioro coralino en siete arrecifes del Parque Nacional de Los Roques, Venezuela. *Revista de Biología Tropical* 4:173-180.

Gutiérrez-Villegas, C., R. Ruíz-Medrano, E. Piedra-Ibarra y R. De La Torre-Almaráz. 2004. Caracterización de una variante del virus mosaico del pepino (CMV) asociada con los síntomas de moteado amarillo de la azucena (*Hippeastrumxhybridum* Leopoldii) en México. *Agrociencia*. 38:343-354.

Horta Puga, G. y J. L. Tello Musi. 2009. Sistema Arrecifal Veracruzano: condición actual y programa permanente de monitoreo: Primera Etapa. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. DM005. México D. F.

Lafferty, K. D., J.W. Porter y S.E. Ford. 2004. Are diseases increasing in the sea. *Review of Ecology Evolution and Systematics* 35:31-54.

Lang, J., P. Alcolado, J. P. Carricart-Ganivet, M. Chiappone, A. Curran, P. Dustan, G. Gaudian, F. Gerald, s. Gittings, R. Smith, W. Tunnell, and J. Wiener. 1998. Status of corals reefs in the northern areas of the wider Caribbean. Australian Institute of Marine Science on behalf of the Global Reef Monitoring Network, Australia.

Mackenzie, D. J., M. A. McLean, S. Mukerji y M. Green. 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 81:222-226.

McField, M. y P. Richards Kramer. 2007. Arrecifes Saludables para gente saludable: Guía de indicadores de salud de los arrecifes de la región del Sistema Arrecifal Mesoamericano. Con las contribuciones de M. Gorrez y M. McPherson. 208 págs.

Priess, K., T.L. Champion-Alsumard, S. Golubic, F. Gadel y B.A. Thomassin. 2000. Fungi in corals: black bands and density-banding of *Porites lutea* and *P. lobata* skeleton. *Marine Biology* 136:19–27.

Ravindran, J., C. Raghukumar y S. Raghukumar. 2001. Fungi in *Porites lutea*: association whit healthy and diseased corals. *Diseases of Aquatic Organisms* 47:219–228.

Raymundo, L; C. S. Couch y C. D. Harvell. 2008. *Coral Disease Handbook. Guidelines for Assessment, Monitoring and Management*. The University of Queensland. NOAA. 16 pp.

Richardson, L.L. 1998. Coral diseases: What is really known?. *Science* 13:438-443.

Richardson, L.L. y R. B. Aronson. 2000. Infectious diseases of reef corals. *Proceedings 9th International Coral Reef Symposium*. Vol. 2.

Rodríguez, S. y Barrera, S. H. 2004. Reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*. 7:323-335.

Rosenberg, E., O. Koren, L. Reshef, R. Efrony y I. Ziber-Rosenberg. 2007. The role of microorganisms in coral health, diseases and evolution. *Nature* 5:355–362.

Rosenberg, E. y Y. Loya. 2004. *Coral Health and disease*. Springer-Verlag. New York 485pp.

Sambrook J., E. F. Fritsch, y T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. NY.

Santavy, D.L., E. Mueller, E.C. Peters, L. MacLaughlin, J.W. Porter, K.L. Patterson y J. Campbell. 2001. Quantitative assessment of coral diseases in the Florida Keys: strategy and methodology. *Hydrobiology* 460:39-52.

Saura, F. 1991. *El arrecife de coral*. Ediciones del Serbal. Primera Edición. España. 191 p.

Gómez-Pompa, A. y R. Dirzo. Coords. 1995. *Reservas de la biosfera y otras áreas naturales protegidas de México*. Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAP y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. (Edición digital: Conabio 2006).

Sutherland, K.P., J.W. Porter y C. Torres. 2004. Disease and immunity in Caribbean and Indo-Pacific zooxanthellate corals. *Marine Ecology Progress Series* 266:273-302.

Tunnell, J. W., E. A. Chávez y K. Withers. 2007. *Coral Reefs of the Southern Gulf of Mexico*. Texas University Press. 194 pp.

Valverde, R.A., T.S. Nameth y L.R. Jordan. 1990. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Dis*. 74:255-258.

Vega, T.R., K.L. Barott, D. Hall, H. Liu, B. Rodríguez-Mueller, C. Desnues, R.A. Edwards, M. Haynes, L. Angly, y F.L. Rohwer. 2008. Metagenomic analysis indicates that stressors induce production of herpes-like viruses in the coral *Porites compressa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105:18413-18418.

Vargas-Hernández, J. M., A. Hernández-Gutiérrez, and L. F. Carrera-Parra. 1993. Sistema Arrecifal Veracruzano. In *Biodiversidad Marina y Costera de México*, ed. S. I. Salazar-Vallejo and N. E. González, 559-75. México. D.F. Comisión Nacional para la Biodiversidad y Centro de Investigaciones de Quintana Roo.

Voss, J. D. y L.L. Richardson, L.L. 2006. Nutrient enrichment enhances black band disease progression in corals. *Coral Reefs* 25:569–579.

Watson, J. D., T. A. Baker, S. B. Bell, A. Gann, M. Levine y R. Losick. 2005. *Biología molecular del gen*. Quinta Edición. Editorial Médica Panamericana. México. 776 pp.

Ward, J.R., K.L. Rypien, J.R. Bruno, C.D. Harvell, E. Jordan-Dahlgren, K.M. Mullen, R.E. Rodríguez-Martínez, J. Sánchez, y G. Smith. 2006. Coral diversity and disease in Mexico. *Diseases of Aquatic Organism* 69:23–31.

Wilkinson, C., 1998. Status of Coral Reefs of the World: 1998. Australian Institute of Marine Science. Global Coral Reef Monitoring Network. 184 pp.

Wilson, W.H. y D.M. Chapman. 2001. Observation of virus-like particles in thin sections of the plumose anemone, *Metridium senile*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 81:879–880.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Anexo

Tabla 1A

Secuencias de los oligonucleótidos utilizados

Nombre del oligonucleótido	Secuencia	Tamaño
ITS4	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'	20 bases
ITS5	5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'	22 bases
FD1 Eubac	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'	20 bases
RD1 Eubac	5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3'	17 bases

- **SOLUCIÓN STE 1X**

10 ml de STE 1X

1 ml de SDS al 10%

500µl de bentonita al 2 %

9 ml de fenol-STE 1X

- **REGULADOR DE EXTRACCIÓN STE 1X**

1 ml de STE 10X

9 ml de H₂O

- **REGULADOR DE EXTRACCIÓN STE 10X**

800 ml de agua destilada desionizada.

61g de tris base pH 8

58g de NaCl

3.7g de Na₂EDTA•2H₂O

Llevar a un volumen de 1000 ml y ajustar a un pH de 6.8 con HCl concentrado.

Para STE 1X se realiza una dilución: 1ml STE 10X y 9ml de H₂O

- SDS 10%

100 ml de H₂O Millipore con 10 gr de SDS 10%.

- BENTONITA AL 2%

100 ml de H₂O Millipore con 2 gr de bentonita

- FENOL-STE 1X

2/3 partes de ácido fénico y se le agrega buffer STE 1% hasta el borde, dejar separar las fases, la fase que se usa es la de abajo.