

UNIVERSIDAD NACIONAL
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO
POSGRADO REGIONAL EN CIENCIAS VETERINARIAS TROPICALES



**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS EN OCTOCORALES DEL
CARIBE DE COSTA RICA DURANTE EL NIÑO 2015-2016**

SUSTENTANTE
ALEJANDRA MARÍA CALDERÓN HERNÁNDEZ

“CAMPUS BENJAMÍN NÚÑEZ”

HEREDIA

2017

**Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado en
Ciencias Veterinarias Tropicales para aspirar por el grado de Magister
Scientiae en Medicina de la Conservación.**

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS EN OCTOCORALES DEL
CARIBE DE COSTA RICA DURANTE EL NIÑO 2015-2016**

SUSTENTANTE

ALEJANDRA MARÍA CALDERÓN HERNÁNDEZ

Tesis presentada para aspirar al grado de Magister Scientiae en Medicina de la
Conservación.
Cumple con los requisitos establecidos por el Sistema de Estudios de Posgrados
de la Universidad Nacional. Heredia, Costa Rica.

Miembros del Tribunal Examinador

Ph.D. Francisco San Lee Campos
Delegado del Consejo Central de Posgrado

Ph.D. Kinndle Blanco Peña
Representante del PCVET

M.Sc. Andrea Urbina Villalobos
Tutora

Ph.D. Jorge Cortés Núñez
Co-tutor

M.Sc. Ingrid Salas Campos
Asesora

Alejandra María Calderón Hernández
Sustentante

IV. Resumen

Los octocorales (Cnidaria: Octocorallia) son organismos importantes en los ecosistemas marinos. Los octocorales crean complejidad ambiental y por lo tanto aumentan la biodiversidad, son importantes productores de metabolitos secundarios y son de gran belleza, favoreciendo el turismo. Cuatro enfermedades infecciosas descritas en octocorales están asociadas con hongos y una de las cuales ha causado altas tasas de mortalidad en las poblaciones de abanicos de mar en distintos países del Caribe durante los últimos Fenómenos de El Niño. El objetivo de este estudio fue aislar e identificar hongos presentes en los octocorales del Caribe de Costa Rica, describir macroscópicamente y microscópicamente las lesiones presentes en ellos e investigar si había compromiso fúngico. Durante El Niño 2015 - 2016 se realizaron buceos en 11 sitios con arrecifes de coral de tres localidades (Cahuita, Punta Uva y Manzanillo) del Área de Conservación La Amistad Caribe, Limón, Costa Rica, con el fin de tomar muestras de tejido de octocorales para el objetivo propuesto. Se recolectó muestras de 55 octocorales, de los cuales 17 (30.9 %) tenían lesión y 38 (69.1 %) no tenían alteraciones evidentes. Las colonias fueron de cinco géneros: 23 individuos de *Gorgonia* spp. (41.8 %), 20 especímenes de *Eunicea* spp. (36.3 %), seis *Plexaurella* spp. (10.9 %), tres *Pseudopterogorgia acerosa* (5.4 %) y tres *Muricea atlantica* (5.4 %). Se aislaron hongos en 127 cultivos (50.4 %), en tejidos sanos se encontraron diez géneros de hongos y tres géneros en tejidos enfermos; siendo *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Zygosporium* los más frecuentes en colonias sanas y *Aspergillus*, *Penicillium* y *Zygosporium*, en zonas con lesión. No se encontró relación entre las dimensiones del octocoral y

parámetros abióticos con la presencia de lesiones y/o aislamientos de los hongos, pero sí hubo una mayor diversidad de hongos y mayor cantidad de octocorales con lesiones en los sitios 7 y 9. De los 17 individuos con lesiones, se pudo demostrar, mediante histopatología, un compromiso fúngico con una respuesta celular asociada en dos de ellos (11.7 %) y parasitismo por algas en siete (41.2 %). En cuatro colonias de *Eunicea* spp. (20 %) se evidenció una reacción de acumulación de escleritos y zonas de necrosis de causa no determinada. Diatomeas, cianobacterias y nematodos fueron observados en los lavados de los tejidos e histopatologías, pero no se asociaron con las lesiones. Este es el primer estudio en el que se analizan la micobiota e histopatología en octocorales de Costa Rica.

Summary

Octocorals (Cnidaria:Octocorallia) are important components of marine ecosystems. Octocorals create environmental complexity, leading to higher biodiversity, are important producers of secondary metabolites and are attractive animals, important for tourism. Four infectious diseases described in octocorals have been associated with fungi and one of them has caused high rates of mortalities in the sea fans populations in different countries of the Caribbean during the last El Niño event. The aim of this study was to isolate and identify fungi in octocorals from the Costa Rica Caribbean, describe macroscopic and microscopic lesions and investigate if there was fungal compromise. During El Niño 2015 - 2016 dives were conducted at 11 sites with coral reefs in three locations (Cahuita, Punta Uva and Manzanillo) of La Amistad Caribe Conservation Area, Limón, Costa Rica, in order to collect samples

of octocorals tissue to achieve the proposed objective. Samples were collected from 55 octocorals, 17 of them (30.9 %) had lesions and 38 (69.1 %) had no evident lesions. The colonies belong to five genera, 23 individuals were *Gorgonia* spp. (41.8 %), 20 specimens were *Eunicea* spp. (36.3 %), six *Plexaurella* spp. (10.9 %), three *Pseudopterogorgia acerosa* (5.4 %) and three *Muricea atlantica* (5.4 %). Fungi were isolated in 127 (50.4 %) of the cultures, in healthy tissues ten genera of fungi were found and three in the diseased tissues; the most frequent in healthy colonies were *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Zygosporium* while *Aspergillus*, *Penicillium* and *Zygosporium* in injured areas. No relationship between octocoral dimensions and abiotic parameters and the presence of lesions and / or isolation of fungus was found. But a spatial distribution with greater diversity of fungi and presence of lesions were seen in sites 7 and 9. Of the 17 individuals with lesions, tissue reaction to fungal hyphae was demonstrated by histopathology in two of them (11.7 %) and parasitism by algae in seven (41.2 %). In four *Eunicea* spp. (20%) a sclerite reaction with blackish coloration were seen with no apparent cause determined. Diatoms, cyanobacteria and nematodes were observed in the washings of tissues and histopathology, but not associated with injuries. This is the first study to analyze mycobiota and histopathology in octocorals of Costa Rica.

V. Agradecimientos

A toda mi familia, en especial a mi madre y mi hermano por su apoyo incondicional en todos los proyectos de mi vida.

A la Dra. Andrea Urbina, por siempre creer en mí, confiarme este proyecto, por todo el conocimiento que me ha transmitido y el apoyo que me ha brindado.

Al Dr. Jorge Cortés, por aceptar participar en este trabajo, su tiempo y enseñarme sobre un mundo maravilloso que habita bajo el mar.

Al Dr. Juan Alberto Morales, por contribuir en el análisis de las histopatologías y sus valiosos consejos de cómo registrar esos datos, así como a la Lic. Laura Alvarado y Dipl. Laura Orozco, por procesar los cortes histopatológicos y tinciones. Al Servicio de Patología (Medicina Veterinaria UNA), por subvencionar el costo de las histopatologías y el préstamo del microscopio para tomar las fotografías.

A la Dra. Ingrid Salas (Micología Médica UCR), por leer y revisar este documento.

A la Dra. Esther Peters (George Mason University) y al Prof. Pedro Crous (Westerdijk Fungal Biodiversity Institute), por su asesoría a distancia sobre histopatología en corales e identificación de algunos hongos respectivamente.

Al Bach. Cristian Mora y la Dra. Odalisca Breedy (CIMAR UCR), por identificar los octocorales. Al Lic. Nelson Muñoz (Escuela de Biología UNA), por la identificación de los microorganismos en sedimentos y a la Dra. Cindy Fernández (CIMAR UCR), por la identificación de las macroalgas en octocorales.

A los instructores de buceo Javier Araya, Gabriel Ortiz y Julio Arce, por sus enseñanzas y colaboración para realizar el trabajo de campo de una forma segura.

Al Bach. Randall Rubí, por su colaboración en campo y a los estudiantes asistentes y de internado por preparar medios de cultivo y apoyo.

Al pescador Rafael Hernández y su esposa, por su ayuda en la localización de los octocorales y el alquiler del bote. Así como, a Ciudad Perdida Ecology, Escape Caribeño y Cahuita Tours, por las tarifas especiales de hospedaje y alquiler de bote.

A mis compañeros de Diagnóstico Albéitar, por su apoyo para realizar la maestría y a la Dra. Maricruz Guevara por la donación de un reactivo para histopatología.

Al Ministerio de Ciencia y Tecnología y el Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Costa Rica, por financiar mis estudios de posgrado.

Al Laboratorio de Micología (Medicina Veterinaria UNA), por financiar esta investigación, el curso de actualización en el Instituto Pasteur (Francia) y el seminario de Micosis Emergentes en la Royal Society (Inglaterra).

Al Área de Conservación La Amistad Caribe y la Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad, por otorgar los permisos de investigación, en especial al Lic. Jorge González y Lic. Melania Muñoz, por su atención y respuesta a los trámites.

Al Centro de Investigación en Ciencias del Mar y Limnología (UCR) y el Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (UNA), por el préstamo de equipos.

Al Lic. Antony Solórzano y Dra. Gaby Dolz (Entomología UNA), por su asistencia para las PCR y por el apoyo económico para las secuenciaciones respectivamente.

Dedicada a mis sobrinos:

“Este mundo es un lugar increíble con millones de cosas por descubrir y también por conservar. Espero que encuentren las herramientas para poder hacerlo, así como también se rodeen de personas tan maravillosas que los impulsen a lograrlo, al que igual que yo tuve la oportunidad. Recuerden que si su tía pudo ir bajo el mar, ustedes pueden alcanzar las estrellas”

VI. Índice

IV. Resumen	4
Summary	5
V. Agradecimientos	7
VI. Índice	10
VII. Lista de cuadros	12
VIII. Lista de figuras	13
IX. Lista de abreviaturas	15
X. Descriptores	16
Introducción general	17
Generalidades, biología e importancia de los corales	17
Amenazas a las poblaciones de los corales	18
Respuesta inmune de los corales frente a los patógenos y otras amenazas	19
Factores bióticos asociados con lesiones en corales	22
<i>Tamaño de la colonia</i>	22
<i>Presencia de vectores</i>	23
Factores abióticos que intervienen en la presencia de enfermedades en los corales....	23
<i>Factores independientes del cambio climático</i>	24
<i>Factores asociados con el cambio climático</i>	24
Investigaciones en hongos marinos asociados a octocorales	26
Enfermedades y síndromes en los corales asociados con compromiso fúngico	28
<i>Anormalidades en el esqueleto</i>	28
<i>Síndrome fúngico-protzoario</i>	29
<i>Enfermedad de la Banda Negra (BBD)</i>	29
<i>Aspergilosis marina</i>	30
<i>Sobre crecimiento de Labyrinthulomycetes</i>	32
Herramientas para el diagnóstico e investigación de enfermedades en corales	33
Justificación	34
Características de la zona de estudio	37
Problema a investigar	38
Objetivos	38

Objetivo general.....	38
Objetivos específicos.....	39
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS EN OCTOCORALES DEL CARIBE DE COSTA RICA, DURANTE EL NIÑO 2015-2016.....	40
Introducción.....	42
Metodología.....	45
Área de estudio, estrategia de muestreo y recolección de las muestras.....	45
Procesamiento de muestras para estudio micológico.....	48
<i>Aislamiento e identificación.....</i>	<i>48</i>
<i>Análisis molecular de aislamientos con morfología compatible con Aspergillus sydowii y otros aislamientos del género.....</i>	<i>49</i>
Análisis de los datos.....	51
Resultados.....	51
Géneros de octocorales y condición de salud de las colonias.....	51
Aislamientos fúngicos.....	52
Hallazgos micológicos según sitio de muestreo.....	58
Análisis del sedimento de los lavados del tejido con agua marina estéril.....	61
Identificación molecular de hongos con morfología similar a <i>Aspergillus sydowii</i>	62
Mediciones abióticas.....	64
Mediciones del tamaño de la colonia.....	64
Discusión.....	65
DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA E HISTOPATOLÓGICA DE LESIONES EN OCTOCORALES DEL CARIBE DE COSTA RICA, DURANTE EL NIÑO 2015-2016.....	71
Introducción.....	73
Metodología.....	75
Área de estudio, estrategia de muestreo y recolección de las muestras.....	75
Procesamiento de muestras para estudio histopatológico.....	77
Procesamiento de muestras para estudio micológico.....	78
Análisis de datos.....	79
Resultados.....	79
Hallazgos histopatológicos.....	83
Aislamientos fúngicos en las colonias con lesiones.....	86

Discusión	87
Conclusión general	92
Recomendaciones	94
Bibliografía	96
Anexos	114

VII. Lista de cuadros

Cuadro 1.1. Información sobre sitios y fechas de recolección de las muestras de los 55 octocorales en el Caribe de Costa Rica, estudiados durante El Niño 2015-2016.	52
Cuadro 1.2. Distribución de los hongos aislados según condición del tejido en <i>Gorgonia</i> spp. del Caribe de Costa Rica, estudiados durante El Niño 2015-2016. Sano = muestras de colonias sin ninguna lesión. Sano-enfermo = muestras de las zonas sin lesión de colonias enfermas. Enfermo= muestras de zonas con lesión de colonias enfermas.	55
Cuadro 1.3. Distribución de los hongos aislados según condición del tejido en <i>Eunicea</i> spp. del Caribe de Costa Rica, estudiados durante El Niño 2015-2016..	56
Cuadro 1.4. Distribución de los hongos aislados según condición del tejido en <i>Plexaurella</i> sp. del Caribe de Costa Rica, estudiados durante El Niño 2015-2016. Sano= muestras de colonias sin ninguna lesión. Sano-enfermo= muestras de las zonas sin lesión de colonias enfermas. Enfermo= muestras de zonas con lesión de colonias enfermas.	57
Cuadro 1.5. Distribución de los hongos aislados en <i>Muricea atlantica</i> y <i>Pseudopterogorgia acerosa</i> del Caribe de Costa Rica, estudiados durante El Niño 2015-2016.....	58
Cuadro 1.6. Distribución de los hongos según los sitios de recolección de las muestras de 55 octocorales del Caribe de Costa Rica, estudiados durante El Niño 2015-2016.....	59
Cuadro 1.7. Aislamientos de hongos en muestras de agua de mar en los sitios donde se recolectaron las muestras de los 55 octocorales del Caribe de Costa Rica, estudiados durante El Niño 2015-2016.	61
Cuadro 1.8. Resultados del examen microscópico de 126 sedimentos de lavados de tejidos de 55 octocorales del Caribe de Costa Rica, según tipo de muestra,	

estudiados durante El Niño 2015-2016. * = No se observó ninguna estructura en las muestras de <i>Pseudopterogorgia acerosa</i> (n=6).	62
Cuadro 1.9. Identificación molecular de aislamientos de los géneros <i>Aspergillus</i> y <i>Penicillium</i> en muestras de octocorales del Caribe de Costa Rica, estudiados durante El Niño 2015-2016. * = Secuencias comparadas en BLAST con el GenBank.	63
Cuadro 1.10. Mediciones abióticas adyacentes a octocorales del Caribe de Costa Rica, estudiados durante El Niño 2015-2016. * = Diferencias significativas según las desviaciones estándar para cada medición. Nota: la salinidad y pH se omitieron de los resultados porque las mediciones no fueron consecuentes con las condiciones esperadas para el Caribe.	64
Cuadro 2.1. Información sobre sitios y fechas de recolección de las muestras de los 55 octocorales del Caribe de Costa Rica, estudiados durante El Niño 2015-2016.	76
Cuadro 2.2. Distribución según sitio de recolección, género y especie de las 17 colonias de octocorales con lesión, estudiadas durante El Niño 2015-2016.	79

VIII. Lista de figuras

Figura 1.1. Mapa de Costa Rica con los puntos geográficos del Área de Conservación La Amistad Caribe (Limón) donde se tomaron las muestras de los octocorales, estudiados durante El Niño 2015-2016.	46
Figura 1.2. Hongos identificados en octocorales del Caribe de Costa Rica, estudiados durante El Niño 2015-2016. * = Estos hongos no esporularon a pesar de ser sub-cultivados en Agar Marino con Papa Dextrosa. ** = Los perfiles bioquímicos obtenidos mediante el Vitek 2 Compact ® no fueron concluyentes.	53
Figura 1.3. Distribución de los 127 cultivos positivos según condición del tejido en los 55 octocorales del Caribe de Costa Rica, estudiados durante El Niño 2015-2016. Sanos= muestras de colonias sin ninguna lesión. Sanos-enfermos= muestras de las zonas sin lesión de colonias enfermas. Enfermos= muestras de zonas con lesión de colonias enfermas.	54
Figura 1.4. Diversidad de aislamientos fúngicos según condición del tejido en los 55 octocorales del Caribe de Costa Rica, estudiados durante El Niño 2015-2016. Sanos= muestras de colonias sin ninguna lesión. Sanos-enfermos= muestras de las zonas sin lesión de colonias enfermas. Enfermos= muestras de zonas con lesión de colonias enfermas.	54

Figura 1.5. Diversidad de géneros de hongos identificados por sitio de recolección de octocorales del Caribe de Costa Rica, estudiados durante El Niño 2015-2016.	60
Figura 1.6. Comparación de las dimensiones de los octocorales con lesión y sin lesión del Caribe de Costa Rica, estudiados durante El Niño 2015-2016.	65
Figura 2.1. Distribución según sitio de recolección de las 17 colonias de octocorales con lesión en el Caribe de Costa Rica, estudiadas durante El Niño 2015-2016. ..	80
Figura 2.2. Patrones de las lesiones observadas en 17 colonias de octocorales del Caribe de Costa Rica, estudiadas durante El Niño 2015-2016.	80
Figura 2.3. Distribución anatómica de las lesiones en las 17 colonias de octocorales del Caribe de Costa Rica, estudiadas durante El Niño 2015-2016. Nota: en la colonia de <i>P. dichotoma</i> se encontró una lesión a nivel medial.	81
Figura 2.4. Alteraciones macroscópicas en las 17 colonias de octocorales enfermas, del Caribe de Costa Rica, estudiadas durante El Niño 2015-2016. Nota: la lesión en <i>P. dichotoma</i> fue de color negro	82
Figura 2.5. Hallazgos histopatológicos en las lesiones de 17 octocorales del Caribe de Costa Rica, estudiados durante El Niño 2015-2016. E.A.= esqueleto axial. Nota: 1) En la histopatología de <i>P. dichotoma</i> se observaron cianobacterias y bacilos Gram negativos. 2) Los pólipos en las zonas con lesión estaban necróticos	83
Figura 2.6. Corte histopatológico de <i>Gorgonia ventalina</i> con presencia de hifas fuliginosas septadas en el axis. Nótese a la izquierda la presencia de pólipos necróticos (P), exposición de loculi (L), hipermelanización (fechas), presencia de algas (óvalo) e hifas pigmentadas septadas (recuadro) en el esqueleto axial (EA). Hematoxilina & Eosina 4x y 60x.	84
Figura 2.7. Corte histopatológico de una <i>Gorgonia ventalina</i> con hifas en la gastrodermis. Hifas septadas hialinas (flechas), cianobacterias (C) y algas (A), rodeadas de una hipermelanización (HM) y reacción eosinofílica (RE). Hematoxilina & Eosina, 60x.	85
Figura. 2.8. <i>Eunicea succinea</i> con cúmulo de escleritos y zona de necrosis desprovista de pólipos. A. Se observa la zona de necrosis desprovista de pólipos (círculo) y el cúmulo de escleritos (flecha). B. Histopatología de un pólipo con gránulos de melanina en su interior (óvalo). Fontana Masson 20x.	86
Figura 2.9. Resultados de los 32 cultivos de muestras de zonas con lesiones de octocorales del Caribe de Costa Rica, estudiados durante El Niño 2015-2016. ...	87

IX. Lista de abreviaturas

ACLAC	Área de Conservación La Amistad Caribe
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CIMAR	Centro de Investigación en Ciencias del Mar y Limnología
CMP	Capa de mucopolisacáridos
CO₂	Dióxido de carbono
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMV-UNA	Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional
ENOS	Fenómeno de El Niño-Oscilación del Sur
ERON	Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno
GPS	Sistema de Posicionamiento Global
GPYA	Agar Glucosa Levadura Peptonada
H & E	Hematoxilina & Eosina
NaOH	Hidróxido de sodio
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
rADN	ADN ribosomal
SCUBA	Self-contained underwater breathing apparatus
UCR	Universidad de Costa Rica
UFC	Unidades formadoras de colonia
UNA	Universidad Nacional

X. Descriptores

Aspergillus spp.

Caribe

Costa Rica

Identificación micológica

Eunicea spp.

Gorgonia spp.

Histopatología

Hongos marinos

Muricea atlantica

Plexaurella spp.

Pseudopterogorgia acerosa

Introducción general

Generalidades, biología e importancia de los corales

Los corales son invertebrados marinos, cuya existencia data desde el Período Precámbrico hace 605 millones de años (Brusca & Brusca, 2005). Estos animales pertenecen al filo Cnidaria, clase Anthozoa, la cual posee dos subclases: Hexacorallia y Octocorallia. A los primeros se les conocen como corales duros por su esqueleto calcáreo y los segundos son llamados suaves por la ausencia de esta característica. Dentro de los octocorales, se encuentran tres órdenes: Alcyonacea (corales suaves y gorgonias), Helioporeacea (coral azul) y Pennatulacea (plumas de mar), los cuales están distribuidos tanto en aguas superficiales como profundas (Breedy, 2009).

Los octocorales poseen dos capas embrionarias: el ectodermo, que da origen a la epidermis, y el endodermo, que se convierte en el gastrodermo y forma una capa intermedia conocida como mesoglea o mesénquima, donde se encuentran los pólipos y se dan los procesos reproductivos. Estos organismos forman colonias mediante reproducción sexual y asexual (Brazeau & Lasker, 1989; Coma et al., 1995), no poseen sistema nervioso central, órganos respiratorios y excretorios completos, sino que estas funciones las realiza el gastrodermo. La nutrición se da mediante la fotosíntesis que realizan algas simbiotas (zooxantelas) ubicadas en el ectodermo y mediante la captura de microorganismos planctónicos por medio de tentáculos y adhesión de nutrientes a su barrera de mucopolisacáridos (Brusca & Brusca, 2005).

Los arrecifes de coral aportan gran cantidad de beneficios al planeta: como fijar carbono, evitar la erosión de las costas al ser rompeolas naturales contra el fuerte oleaje, ser sitios de refugio, anidación y de alimentación de casi una cuarta parte de las especies marinas en el mundo (Cesar et al., 2003), además de ser sitios para el turismo (Alvarado et al., 2006; AIDA, 2012). Debido a su particularidad biológica de estar adheridos a un sustrato, los corales son buenos bioindicadores de los ecosistemas acuáticos con respecto a la presencia de contaminación, ya que algunas especies disminuyen en condiciones de baja calidad de agua y otras ejercen dominancia en ambientes contaminados (Hernández-Muñoz et al., 2008; Cooper et al., 2009).

Los corales hacen su aporte en el campo de la medicina, suministrando materia prima de fármacos, tales como la Zidovudina (AZT), componente del tratamiento que se prescribe a los pacientes con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), el cual es extraído de estos animales (Cesar et al., 2003; AIDA, 2012).

Amenazas a las poblaciones de los corales

Las poblaciones de corales a nivel mundial están constantemente amenazadas por fenómenos ambientales y acciones antropogénicas directas, como: la contaminación, la escorrentía, la sobreexplotación pesquera y turística o acciones indirectas como el cambio climático (Cortés & León, 2002; Cesar et al., 2003; Harvell et al., 2007; Fabry et al., 2008; Burge et al., 2014; Mumby et al., 2014). Debido a esto han sido sujetas a diversos estudios ecológicos y no ha sido sino hasta años recientes en que se ha iniciado la investigación de la relación de los corales con su

microbiota, así como de agentes infecciosos que podrían afectar el equilibrio de estos seres vivos (Sutherland et al., 2004).

En las últimas cuatro décadas, las enfermedades marinas se han incrementado notablemente, tal es el caso de las tortugas, mamíferos, erizos, moluscos, tiburones, decápodos y especialmente en corales (Ward & Lafferty, 2004; Lafferty et al., 2004; Sarmiento-Ramírez et al.; 2010, Work & Meteyer, 2014). Una revisión de literatura realizada por Sutherland et al. (2004) y que aún continúa vigente (Burge et al., 2014), indica que se han descrito 18 enfermedades en los corales, de las cuales solamente en cinco han sido demostrados los agentes etiológicos mediante los postulados de Koch. Cuatro de estas son causadas por bacterias, a saber: la Plaga Blanca, causada por *Aurantimonas coralicida*, “White Pox”, por *Serratia marcescens*, blanqueamiento por *Vibrio shiloi* y *Vibrio corallilyticus* y la Aspergilosis Marina, causada por el hongo *Aspergillus sydowii*. Más recientemente se han identificado partículas virales como componentes de la holobiota (Hewson et al., 2012) así como asociadas con patología en estos animales (Correa et al., 2016). Estos agentes se han encontrado causando enfermedad de forma oportunista luego de eventos de elevada temperatura marina, sedimentación, contaminación y baja calidad de agua (Rosenberg & Ben-Haim, 2002; Sutherland et al., 2004; Harvell et al., 2007).

Respuesta inmune de los corales frente a los patógenos y otras amenazas

El sistema inmune de los corales, al igual que otros invertebrados, se basa en tres mecanismos: a) el alorreconocimiento o reconocimiento de lo propio y no propio, b) procesos celulares y c) procesos humorales (Mydlarz et al., 2006).

Estos animales poseen barreras físicas como la primera línea de defensa situadas sobre la superficie del ectodermo y están compuestas de una capa de mucopolisacáridos (CMP) y de un estrato de escleritos, los cuales, junto con los holobiontes o microorganismos simbios (como las zooxantelas y comunidades microbianas) previenen la adhesión de patógenos a la superficie de la colonia (Mullen et al., 2004; Gil-Agudelo et al., 2006; Harvell et al., 2007; Toledo-Hernández & Ruiz-Díaz, 2014). La CMP es producida por los mucocitos y funciona también para la alimentación y como protección contra los rayos ultravioleta. Los escleritos son cristales de carbonato de calcio secretados por los escleroblastos (células del mesénquima) y además de ser los responsables de proporcionar el color y la textura de las colonias, previenen o retardan la invasión de los microorganismos (Sutherland et al., 2004; Brusca & Brusca, 2005; Gil-Agudelo et al., 2006; Toledo-Hernández & Ruiz-Díaz, 2014). Una vez que un patógeno ha pasado la barrera física, se activa el sistema inmune innato por medio del reconocimiento (Mydlarz & Harvell, 2007).

En los cnidarios se han descrito respuestas celulares mediante amebocitos (células fagocíticas) que producen enzimas antioxidantes, especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ERON), péptidos antimicrobianos, metabolitos secundarios, peroxidasas y gránulos de melanina (Mydlarz & Harvell, 2007). Los amebocitos granulares están asociados con la respuesta inflamatoria y la reparación de heridas, así como la fagocitosis de elementos ajenos por medio de partículas acidofílicas con proteínas citotóxicas (Couch et al., 2013). Las enzimas antioxidantes y los ERON, funcionan como moléculas de señalización para la apoptosis e inducen un estrés

oxidativo en caso de lesiones o estrés térmico (Toledo-Hernández & Ruiz-Díaz, 2014).

Los péptidos antimicrobianos y metabolitos secundarios con actividad microbicida producen inhibición de la reproducción de patógenos sobre el animal por medio de la regulación de genes de transcripción (Toledo-Hernández & Ruiz-Díaz, 2014). La producción de enzimas peroxidasas, lisozimas y enzimas lisosomales (sustancias bactericidas e hidrolíticas) contribuyen con la formación de ERON, destrucción del agente infeccioso, que junto con metabolitos secundarios realizan la opsonización y aglutinación del invasor, lisis de la membrana celular del microorganismo o interrupción del metabolismo (Sutherland et al., 2004; Toledo-Hernández & Ruiz-Díaz, 2014).

La melanización es resultado de la síntesis de melanina y migración de amebocitos con gránulos de este pigmento, como una respuesta del coral frente a agresiones del entorno, con el fin de proteger su estructura, mediante el aislamiento de la zona enferma del resto del tejido y posteriormente se producen proteasas, quinonas citotóxicas y ERON que continúan con el proceso de reacción contra el agente (Toledo-Hernández & Ruiz-Díaz, 2014). En las gorgonias con aspergilosis, se ha visto un aumento en la producción de melanina, con el fin de restringir los hongos en la gorgonina, compuesto de proteínas y mucopolisacáridos secretado por el coral (Brusca & Brusca, 2005). Este proceso da como resultado las áreas de color púrpura que han sido asociadas con esta enfermedad (Couch et al., 2013).

Ante la invasión fúngica, los abanicos de mar producen sustancias antifúngicas tales como metabolitos lípidicos, quitinasas y depósito de melanina para prevenir la diseminación por el tejido (Ellner et al., 2007). Las peroxidasas y metabolitos antifúngicos son factores importantes para controlar la infección y su producción se disminuye en las colonias viejas o cuando el sistema inmune está comprometido (Sutherland et al., 2004). En el estudio de Mydlarz y Harvell (2007), las colonias infectadas con *A. sydowii* producían menor cantidad de peroxidasas y sustancias antifúngicas aún en zonas sin lesión, sugiriendo un compromiso generalizado.

Según Couch et al. (2013), en su estudio *in vitro* e *in situ* para demostrar la plasticidad en la respuesta inmune celular del abanico de mar frente a la aspergilosis, la respuesta celular de los amebocitos ante la enfermedad tiene un pico a los seis días y después empieza a declinar hasta los 14 días, por lo que eventos prolongados de enfermedad pueden causar mayor mortalidad.

Factores bióticos asociados con lesiones en corales

Dos factores bióticos que se han reportado en asociación con o perpetuando las lesiones en corales han sido: el tamaño de la colonia y la presencia de vectores.

Tamaño de la colonia

Los corales de mayor tamaño son también los más viejos. En estos individuos, la producción de sustancias microbicidas, tales como peroxidasas y cantidad de células fagocíticas, es menor comparada con individuos de menor tamaño y por ende, más jóvenes. Esta condición hace a las colonias de mayor tamaño, más

susceptibles a las enfermedades y a los cambios en el entorno (Sutherland et al., 2004; Ellner et al., 2007; Toledo-Hernández & Ruiz-Díaz, 2014).

Presencia de vectores

Se ha propuesto que la aspergilosis puede transmitirse por un vector, el caracol *Cyphoma gibbosum*, por su predilección de alimentarse de gorgonias (Rypien & Barker, 2009). Este caracol se ha encontrado en mayor cantidad en individuos enfermos y se cree que las lesiones que provoca abren una puerta de entrada a los patógenos al exponer el interior del animal al ambiente marino (Nagelkerken et al., 1997). Rypien y Barker (2009) realizaron un experimento donde demostraron que el *A. sydowii* puede pasar exitosamente por el intestino del depredador y al ser excretado en las heces, las conidias son viables para reproducirse. Por su parte, Nagelkerken et al. (1997) encontraron que estos caracoles podrían tener una predilección por alimentarse de corales enfermos más que de los sanos (aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas), lo que podría explicar por qué se encuentran en mayor cantidad en los animales con lesiones.

Factores abióticos que intervienen en la presencia de enfermedades en los corales

Diferentes factores abióticos han sido estudiados como posibles determinantes en la presencia de enfermedades en invertebrados marinos, la mayoría de los cuales son consecuencia del cambio climático (acidificación, aumento de la temperatura marina y cambios en la salinidad) (Burge et al., 2014). Sin embargo, la profundidad, independientemente de los factores climáticos, también ha sido correlacionada con

eventos de morbilidad en fauna marina (Nagelkerken et al., 1997; Rosenberg & Bein-Ham, 2002).

Factores independientes del cambio climático

Profundidad

Rosenberg y Ben-Haim (2002) mencionan que los corales de aguas superficiales presentan menor blanqueamiento que las colonias que se encuentran a mayor profundidad, esto debido al efecto microbicida de la radiación solar. Un ejemplo de este efecto es el que se produce sobre la bacteria *V. shiloi* (causante del blanqueamiento en *Oculina patagonica*), cuyo crecimiento se ve significativamente inhibido por los rayos ultravioleta (Rosenberg & Ben-Haim, 2002).

Durante la investigación realizada por Nagelkerken et al. (1997) se encontró que los abanicos de mar (*Gorgonia* spp.) que se situaban en aguas superficiales y en zonas con actividad de oleaje alto, presentaban menor cantidad de lesiones compatibles con aspergilosis con respecto a los ubicados en profundidades mayores a 12 m, lo que fue atribuido a un posible efecto de remoción mecánica de los patógenos por parte de las olas.

Factores asociados con el cambio climático

Acidificación de los mares

Este evento sucede en respuesta a las elevadas concentraciones ambientales de dióxido de carbono (CO₂) que aumentan las concentraciones oceánicas de este compuesto, y por medio de reacciones químicas, resultan en una disminución en el

pH marino. Los niveles de acidificación marina han ido en aumento y son un 30 % mayores en los últimos 100 años (Burge et al., 2014).

Según Fabry et al. (2008), “la hipercapnia -presión de dióxido de carbono elevada- en los mares, afecta los organismos marinos disminuyendo la saturación de carbonato de calcio, afectando las tasas de calcificación y bajando el pH”. En los corales, la calcificación es necesaria para el crecimiento de las colonias, pero un medio ácido induce la liberación de las algas simbiotas (quienes contribuyen con la calcificación), provocando el blanqueamiento y la muerte del coral (Langdon & Atkinson, 2005).

Aumento de la temperatura marina

Muchos eventos de mortalidad en organismos marinos como corales, peces y moluscos han sido precedidos por aumentos en la temperatura de los océanos, particularmente luego de fenómenos ambientales como El Niño (Harvell et al., 1999; Harvell et al., 2009; Burge et al., 2014). Algunos ejemplos de mortalidades en corales asociadas a las elevadas temperaturas han sido en octocorales del Caribe (Guzmán & Cortés, 1984; Nagelkerken et al., 1997; Burge et al., 2014) y del Mediterráneo (Burge et al., 2014), así como en corales escleractinios a nivel mundial (Harvell et al., 2009; Burge et al., 2014).

Los fenómenos de El Niño-Oscilación del Sur (ENOS) suceden en promedio cada 7 años, sin embargo, desde mediados de 1970 sus efectos se manifiestan por más tiempo, con impactos devastadores en la fauna marina. Un ejemplo notable fue el fenómeno de blanqueamiento de corales en 1998, que causó la muerte de estos

animales a nivel mundial, consecuencia que fue atribuida a las elevadas temperaturas marinas luego de que este ENOS se prolongó considerablemente (Harvell et al., 1999). Las altas temperaturas contribuyen al desprendimiento de las zooxantelas y cambios en el microbioma que posteriormente ocasiona la muerte de los tejidos, tanto por falta de nutrientes, como por la colonización con agentes infecciosos (Harvell et al., 1999; Burge et al., 2014).

Según Burge et al. (2014), el aumento de la temperatura influye tanto en el hospedador como en el agente infeccioso, causando cambios en el comportamiento (disminución en la reproducción y crecimiento de la colonia), aumento en la susceptibilidad del hospedador a las enfermedades e incremento de la virulencia, actividad y emergencia de los patógenos.

Variación en la salinidad

Los cambios en la salinidad están asociados a los fenómenos de La Niña, los cuales producen condiciones frías y secas, provocando un aumento en la salinidad (Burge et al., 2014). Estos incrementos se han visto asociados con una mayor proliferación de microorganismos, tales como los parásitos *Perkinsus marinus* y *Haplosporidium nelsoni*, responsables de la muerte de ostras en la costa Atlántica de los Estados Unidos (Burge et al., 2014), y el incremento en la colonización de los pastos marinos por algas Labyrinthulomycetes (Burge et al., 2013).

Investigaciones en hongos marinos asociados a octocorales

Los hongos marinos pueden adaptarse a diferentes factores como temperatura y salinidad o a distintos ambientes, según la disponibilidad del sustrato. Así, se

clasifican en hongos marinos (asociados a las costas y aguas superficiales), oceánicos (aquellos identificados en lugares más béticos), manglícolas (encontrados en manglares), arenícolas (crecen en la arena) y estuarinos (están en los estuarios) (Jones, 2000). Con respecto a los corales, los hongos pueden ser autóctonos o nativos de los corales como el género *Koralionastes*, o bien, no nativos o aloautóctonos, que provienen de ambientes terrestres o marinos y se encuentran como endolíticos (crecen dentro del coral), endobiontes (están dentro del coral de forma simbiótica), saprofíticos (descomponedores del medio marino) y/o patógenos (Raghukumar & Ravindran, 2012). Los estudios de hongos realizados en octocorales, se han centrado en aquellos que pueden asociarse a colonias de gorgonias, tanto sanas como enfermas (Koh et al., 2000; Toledo-Hernández et al., 2008; Smith, 2013), por ser la principal familia afectada por la aspergilosis marina. Sin embargo, se han reportado lesiones compatibles con esta enfermedad en especímenes de la familia Plexauridae, evidenciando un posible aumento en el rango de susceptibilidad de individuos a esta micosis (Smith & Weil, 2004).

Caballero-George et al. (2010) destacan que los hongos marinos son “sub explorados en términos de biodiversidad, asociaciones ecológicas y metabolitos secundarios pero que son considerados como los nuevos recursos en la industria farmacéutica”. Esta aseveración es apoyada por los ya conocidos ejemplos de aplicaciones de los hongos ambientales en la medicina, como materia prima para la elaboración de antibióticos como la penicilina (un metabolito producido por varias especies del género *Penicillium*), o medicamentos para el control del colesterol como la lovastatina (obtenida de *Aspergillus terreus*). De igual manera, los hongos

marinos también pueden producir metabolitos y enzimas con aplicaciones en la medicina, prueba de esto es que para el 2010, se habían registrado más de 1100 productos naturales a partir de estos microorganismos (Ebel, 2012), por ejemplo la sorbicilactona A (obtenida de un hongo aislado de esponjas marinas), que tiene efecto contra las células cancerígenas de la leucemia (Caballero-George et al., 2010).

Enfermedades y síndromes en los corales asociados con compromiso fúngico

Se han descrito dos síndromes y dos enfermedades asociados con la presencia simultánea de hongos: anormalidades en el esqueleto, síndrome fúngico-protozoario, enfermedad de la banda negra (BBD, por sus siglas en inglés) y aspergilosis. Sin embargo, los Labyrinthulomycetes (algas que antes fueron consideradas hongos) también han sido descritos como patógenos oportunistas marinos, que causan lesiones en los abanicos de mar (Burge et al., 2012).

Anormalidades en el esqueleto

Las anormalidades en el esqueleto se refieren a una variedad de alteraciones como lesiones elevadas, tumoraciones causadas por algas, discontinuidades de la superficie externa y fracturas, entre otras. Se presentan tanto en corales duros como suaves, sobre las que los hongos y otros microorganismos actúan como oportunistas, aprovechando esas lesiones para alimentarse y reproducirse (Sutherland et al., 2004).

Síndrome fúngico-protozoario

El síndrome fúngico-protozoario fue el nombre dado a la mortalidad masiva de gorgónidos y otros organismos en el Mar de Liguria (Italia) en el verano de 1999, donde hubo un aumento inusual de la temperatura marina que proporcionó las condiciones para que hongos de los géneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Humicola* y *Cladosporium* infectaran tejidos internos, mientras que los protozoarios lo hicieran en las capas externas de estos animales (Sutherland et al., 2004).

Enfermedad de la Banda Negra (BBD)

La Enfermedad de la Banda Negra es llamada así porque la lesión que se manifiesta en el coral duro y suave es una banda de necrosis en la superficie, y es provocada por la interacción de un conjunto de microorganismos, entre ellos cianobacterias (*Phormidium corallyticum*, *Oscillatoria* spp. y *Thichodesmium* spp.), bacterias oxidadoras de sulfuro (*Beggiatoa* spp.), bacterias sulfato reductoras (*Desulfovibrio* spp.), otras bacterias heterótrofas y hongos oportunistas (Rosenberg & Bein-Haim, 2002; Gil-Agudelo et al., 2009). Con respecto al papel de los hongos en esta enfermedad, Ramos-Flores (1983) demostró la presencia de hifas pigmentadas en cortes histológicos de lesiones en corales de estrella (*Orbicella annularis*), pero no en áreas aparentemente sanas. Por otro lado, en un estudio realizado por Priess et al. (2000), se asoció la aparición de estas bandas negras con el final de la estación lluviosa, que provee condiciones para el sobre-crecimiento de algas endolíticas (componentes normales de la microbiota). Estas algas son fuente de alimento para hongos oportunistas que al reproducirse, producen el pigmento negro.

Aspergilosis marina

La aspergilosis marina es una enfermedad que ha sido documentada solamente en octocorales. El agente causal es *A. sydowii* (Smith et al., 1996; Geiser et al., 1998), un hongo filamentoso, distribuido ampliamente en la naturaleza, especialmente en ambientes marinos debido a su afinidad por entornos salinos (Geiser et al., 1998; Ein-Gil et al., 2009; De Hoog et al., 2014; Samson et al., 2010). Las lesiones causadas por este hongo se caracterizan por ser focales o multifocales, rodeadas por un anillo necrótico color morado (Nagelkerken et al., 1997; Kim et al., 2006; Gil-Agudelo et al., 2009) correspondiente a la melanización como respuesta del coral a la infección (Petes et al., 2003; Ellner et al., 2007).

Varias teorías han surgido en torno a esta enfermedad en abanicos del Caribe: una fue expuesta por Smith et al. (1996), en la que atribuía la colonización del hongo a la escorrentía. Esta teoría fue posteriormente desacreditada porque la enfermedad también se estaba manifestando cerca de islas como San Salvador en el Caribe, donde este acontecimiento no se manifestaba (Shinn et al., 2000). Otra teoría es la que propone que el hongo fue transportado y depositado en el Océano Atlántico por tormentas de las arenas del Sahara (Shinn et al., 2000). Dichos vientos, también transportan minerales que pueden funcionar como fuente de nutrientes para proveer un ambiente óptimo para el desarrollo del hongo. Para probar esta teoría, Weir-Brush et al. (2004) realizaron infecciones experimentales en abanicos sanos utilizando cepas de *A. sydowii* aisladas de arena de tormentas del desierto y una cepa terrestre de referencia, encontrando que sólo los aislamientos provenientes de

la arena fueron capaces de producir la enfermedad y cumplir con los postulados de Koch (Weir-Brush et al., 2004).

Alker et al. (2001), realizaron una investigación *in vitro* con tres cepas marinas y una terrestre de *A. sydowii* para dilucidar los factores involucrados en la presentación de esta enfermedad y encontraron que la temperatura óptima de crecimiento del hongo es 30 °C, misma a la cual los sistemas de defensa del coral se ven severamente comprometidos lo cual facilitaría la colonización. Así mismo, demostraron que a temperaturas inferiores el coral produce extractos con propiedades antifúngicas que evitan la proliferación de este agente.

Finalmente, Rypien et al. (2008) recopilaron los aislamientos disponibles de *A. sydowii*, sin importar si fuesen terrestres o marinos, con el fin de investigar la estructura genética y dilucidar el origen del mismo (marino, terrestre proveniente de la escorrentía o terrestre proveniente de las arenas de África). Encontraron una gran diversidad genética en los aislamientos pero ninguna diferencia morfológica entre las cepas, sugiriendo que cualquier cepa puede ser potencialmente patógena. La falta de aislamientos de hongos en los corales previo a los eventos de aspergilosis no ha permitido comprobar si *A. sydowii* ya se encontraba en los ecosistemas acuáticos y si los cambios ambientales han sido los que han favorecido que este agente cause la patología de manera oportunista (Rypien et al., 2008).

Según Toledo-Hernández et al. (2007), a pesar de la relevancia de las infecciones causadas por *A. sydowii*, poco se conoce sobre la microbiota de los octocorales sanos y enfermos. Estos investigadores y la información a mano cuestionan si las

micotoxinas producidas por este hongo (sydowinol, ácido sydowico y sydowinina A y B) (Smith & Weil, 2004) tienen un rol en la patogénesis de la aspergilosis. Gil-Agudelo et al. (2006) resaltan la importancia de conocer los microorganismos presentes en estos animales para entender los cambios que ocurren en la microbiota durante las enfermedades, ya que los microorganismos residentes pueden proveer protección al producir sustancias antimicrobianas y por ocupar nichos que no pueden ser utilizados por los patógenos.

Sobre crecimiento de Labyrinthulomycetes

Los Labyrinthulomycetes que actualmente pertenecen al reino Straminipila (Beakes et al., 2014), son causantes de la enfermedad debilitante de los pastos marinos *Zostera marina*, particularmente por *Labyrinthula zosterae*. Sin embargo, estas algas han sido encontradas en asociación con *A. sydowii* en cortes histológicos de especímenes de *G. ventalina*, estudiados durante los eventos de aspergilosis en Florida, Puerto Rico y México en 1990 (Burge et al., 2013).

Recientemente se han descrito lesiones multifocales púrpuras en abanicos de aguas superficiales de La Paguera, Puerto Rico, por lo que del 2006 al 2010 se realizaron muestreos para identificar la causa. Así, fueron aislados en cultivo e identificados mediante secuenciación, dos géneros de Labyrinthulomycetes: *Aplanochytrium* y *Thraustochytrium*. A la vez, se visualizaron estructuras fusiformes compatibles con estas algas en los cortes histológicos de tejidos, pólipos y sistema gastrovascular de estos individuos (Burge et al., 2013).

Herramientas para el diagnóstico e investigación de enfermedades en corales

Varios autores coinciden en la necesidad de investigación de enfermedades en corales mediante un diagnóstico integrado, donde además de describir las características macroscópicas de las lesiones y las especies afectadas, se conozca la microbiota y su interacción con el hospedador, se investigue sobre factores bióticos y abióticos que puedan alterar el equilibrio del animal con estos microorganismos, se determinen fuentes de infección, vectores y reservorios y posteriormente se utilice métodos de detección de enfermedades (Harvell et al., 2004; Work et al., 2008; Pollock et al., 2011).

El uso de herramientas diagnósticas para la detección de agentes infecciosos ha sido implementado solo en corales escleractinios. En una revisión realizada por Pollock et al. (2011) se citan las principales técnicas aplicadas en estos invertebrados, de las cuáles sólo los cultivos microbiológicos se han hecho en octocorales (Koh et al., 2000, Toledo-Hernández et al., 2007). Las técnicas descritas en esta revisión fueron:

- Cultivos microbiológicos: de esta forma se han aislado patógenos oportunistas como *V. shiloi*, *V. corallilyticus*, *S. marcescens* y *A. sydowii*.
- Ensayos inmunológicos: se han utilizado anticuerpos policlonales anti-*V. shiloi* para determinar la presencia de estas bacterias en colonias de *O. patagonica*.
- Hibridación *in situ* fluorescente: mediante esta técnica se ha podido identificar al poliqueto *Hermodice carunculata* como reservorio y vector de *V. shiloi* un causante del blanqueamiento en corales.

- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Polson et al. (2008) diseñaron una PCR patógeno específica amplificando el segmento 16S rADN para detectar cuatro bacterias oportunistas *A. coralicida*, *S. marcescens*, *V. shiloi*, y *V. coralliilyticus* en muestras de corales.
- PCR en tiempo real: ha sido utilizada para detectar *V. coralliilyticus* tanto en agua de mar como en fragmentos de coral.

El estudio histopatológico (no incluido en la revisión de Pollock et al., 2011), es un método utilizado tanto en octocorales como en corales escleractinios que, además de detectar la presencia de agentes infecciosos, demuestra el compromiso en el tejido, así como otras causas de enfermedad como las de carácter tumoral (Gallowey et al., 2006; Work & Meteyer, 2014).

Bajo la premisa del concepto de medicina de la conservación, que promueve investigaciones multidisciplinarias que relacionen la interacción de los patógenos con los vertebrados, invertebrados y cambios en el ambiente, se podrá tener un mayor entendimiento de las patologías en fauna, así como de los factores que intervienen en la presentación de enfermedad (Bourne et al., 2009).

Justificación

Costa Rica posee un área de 970 km² de arrecifes coralinos (Spalding et al., 2001; Alvarado et al., 2006; AIDA, 2012) en el que viven 56 especies de octocorales, 26 de las cuales se ubican en el Caribe (Breedy, 2009). Se estima que el valor económico que los arrecifes aportan al país asciende a US\$1 000 000 por hectárea, además del valor intrínseco, que es incalculable (AIDA, 2012).

En Costa Rica, las poblaciones de octocorales están siendo amenazadas por la sedimentación, contaminación, turismo, desarrollo hotelero, pesca y extracción ilegal, así como por el ENOS (Alvarado et al., 2006; Cortés et al., 2010). Este último ocasionó el aumento de la temperatura del mar durante los períodos 1982-1983 y 1997-1998, llevando a la muerte a una gran cantidad de octocorales y corales escleractinios en ambas costas (Guzmán & Cortés, 1984, 2001, 2007).

Con la finalidad de minimizar los efectos de la actividad humana sobre los ecosistemas marinos, la Comisión Interdisciplinaria Marino Costera de la Zona Económica Exclusiva de Costa Rica, elaboró en el 2006, el "Informe Técnico sobre Ambientes Marinos Costeros de Costa Rica", donde se hacen varias recomendaciones para conservar los hábitats costeros, destacando la investigación de enfermedades (Alvarado et al., 2006).

En el país existe solo un estudio sobre hongos marinos realizado en arenas del manglar de Punta Morales (Golfo de Nicoya, Puntarenas), el cual se centró en encontrar microorganismos quitinolíticos y su potencial efecto en el manglar. La investigación se realizó durante la estación seca de 1987 y la época lluviosa de 1988, detectándose mayor cantidad de hongos durante los meses húmedos, pero mayor diversidad durante la época seca. Durante la época seca la materia orgánica provee un sustrato para el crecimiento de agentes como *Labyrinthula* spp., alga recolectada solamente en esta época y que puede perjudicar los pastos marinos, crustáceos y otros organismos marinos (Ulken et al., 1990). Estos resultados sentaron un precedente sobre los posibles efectos negativos de los cambios de estación en estos ecosistemas.

Con respecto a eventos de mortalidades masivas en octocorales en Costa Rica, Guzmán y Cortés (1984), reportaron una reducción de hasta el 90 % en las poblaciones de *G. flabellum* en toda la costa Caribe. Estos investigadores descartaron que los cambios de temperatura, salinidad, sedimentación, contaminación y oleajes hayan sido la causa pues eran factores comunes con otras poblaciones que no fueron afectadas. También cuestionaron que la mortalidad hubiera sido inducida por depredadores y erosión del sustrato porque los cambios que estos factores pueden provocar son de menor escala. Por último, llegaron a la conclusión de que el causante del suceso debió haber sido un agente infeccioso, que se expandió rápidamente por la población y tuvo preferencia sólo por esa especie de octocorales. Sin embargo, se sigue careciendo de investigaciones sobre enfermedades y agentes infecciosos en estos invertebrados, particularmente si hay presencia de hongos o enfermedades causadas por estos.

Por las razones anteriores es importante realizar estudios en las poblaciones de octocorales de Costa Rica con el fin de determinar la microbiota que se encuentra presente, poniendo especial énfasis en la detección de *A. sydowii*, a la vez investigando si existen lesiones compatibles con la infección. La investigación debe acompañarse de mediciones de componentes abióticos como profundidad, pH, salinidad y temperatura, como posibles factores precipitantes de la enfermedad y de la distribución de los agentes micóticos, información que en conjunto, contribuya a conocer la relación de los corales y su microbiota, el control y prevención de enfermedades y a su conservación.

Características de la zona de estudio

El Área de Conservación La Amistad Caribe, se encuentra ubicado en los cantones de Siquirres, Matina, Limón y Talamanca, de la provincia de Limón y tiene una extensión de 620 967.72 ha. De esa área 26 386 ha corresponden a territorio marino (Sistema Nacional de Áreas de Conservación de Costa Rica, s.f.), donde se encuentran los arrecifes de coral mejor desarrollados y con mayor extensión del país (Alvarado et al., 2006; Cortés et al., 2010).

Datos del Instituto Meteorológico Nacional, de 2005 a 2015, indican que los meses de mayor precipitación fueron mayo, julio y diciembre, mientras los menos lluviosos fueron abril, setiembre y octubre (Anexos 1 y 2).

La zona sur de Cahuita está irrigada por los ríos Carbón, Cocles y Suárez. La estructura del paisaje terrestre es mayoritariamente de bosque denso o de baja cobertura, vegetación riparia y de lagunas, que han tenido una reducción de un 21 % en 24 años (Morera-Beita y Sandoval-Murillo, 2012). Con respecto al paisaje marino, los arrecifes del Parque Nacional Cahuita se redujeron en un 37.5 % en un período de diez años debido a la sedimentación, y en Manzanillo la cobertura de coral vivo es menor al 10 % debido a la presencia mayoritaria de algas (Cortés et al., 2010).

La actividad turística es la fuente primaria de la economía del distrito de Cahuita desde finales de la década de 1990, caracterizada por pequeñas y medianas empresas, donde el 60 % de los propietarios son costarricenses con una diversidad

cultural afrocaribeña, indígena y campesina (Morera-Beita y Sandoval-Murillo, 2012).

Problema a investigar

En Costa Rica no se ha realizado investigación sobre enfermedades en octocorales y no hay información sobre la microbiota de estos invertebrados, desconociéndose si está o no *A. sydowii* y la aspergilosis marina, por lo que es necesario realizar estudios microbiológicos e histopatológicos, incluyendo factores ambientales que contribuya a establecer lo que podría considerarse normal, para posteriormente analizar posibles etiologías en eventos como el descrito por Guzmán y Cortés (1984) y que dé un aporte al conocimiento sobre los hongos que podrían estar implicados o no como agentes causales de lesiones.

Objetivos

Objetivo general

Conocer la microbiota presente en octocorales de arrecifes del Caribe de Costa Rica mediante estudios micológicos e histopatológicos, asociando los hallazgos con el tamaño de la colonia, mediciones abióticas del ambiente marino y presencia de lesiones.

Objetivos específicos

- Aislar e identificar mediante pruebas de laboratorio hongos filamentosos y levaduriformes en muestras de tejidos de octocorales para evaluar su rol como agentes micóticos causantes de enfermedad en estos animales.
- Analizar mediante técnicas moleculares hongos con fenotipo compatible con *Aspegillus sydowii* aislados de muestras de tejido para corroborar o descartar la especie del hongo.
- Relacionar los hallazgos micológicos con el tamaño de la colonia y mediciones abióticas con el fin de identificar asociaciones entre los aislamientos y componentes del ambiente y estos parámetros.
- Realizar estudio histopatológico de octocorales con lesiones para verificar la invasión fúngica.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS EN OCTOCORALES DEL CARIBE DE COSTA RICA, DURANTE EL NIÑO 2015-2016

Resumen: Las poblaciones de corales a nivel mundial están siendo amenazadas por fenómenos ambientales y acciones antropogénicas, razón por la que han sido sujetas a diversos estudios ecológicos y en las últimas décadas se ha iniciado la investigación de agentes infecciosos que podrían estar comprometiendo su salud y la del ecosistema. Dentro de las enfermedades infecciosas descritas en octocorales cuatro están asociadas con hongos y una de las cuales ha causado altas tasas de mortalidad en las poblaciones de abanicos de mar en distintos países del Caribe durante los últimos Fenómenos de El Niño. El objetivo de este estudio fue aislar e identificar hongos presentes en los octocorales del Caribe de Costa Rica y relacionar los hallazgos con las dimensiones de la colonia, presencia o no de lesiones y mediciones de temperatura y profundidad. Durante El Niño 2015-2016 se realizaron buceos en tres localidades del Área de Conservación La Amistad Caribe, Limón, Costa Rica, para tomar muestras de tejido de octocorales, medidas abióticas (profundidad, temperatura, salinidad y pH) y medidas bióticas (tamaño de los octocorales y presencia de *Cyphomma gibbosum*). De los 252 cultivos realizados, se aislaron hongos en 127 de ellos (50.4 %), en tejidos sanos se encontraron diez géneros de hongos y tres en tejidos enfermos; siendo *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Zygosporium* los más frecuentes en colonias sanas y *Aspergillus*, *Penicillium* y *Zygosporium* en zonas con lesión. No se encontró relación entre las dimensiones del octocoral y parámetros abióticos con la presencia de lesiones y/o aislamientos de los hongos. Sin embargo, se encontró una mayor diversidad de

hongos y presencia de octocorales con lesiones en los sitios 7 y 9. Este es el primer estudio sobre identificación micológica en octocorales de Costa Rica, que contribuye al conocimiento del microbioma en estos animales. Son necesarios estudios longitudinales para determinar si hay estacionalidad de los hongos y monitorizar el estado de salud de los octocorales mediante la presencia de lesiones.

Palabras clave: *Aspergillus*, Caribe, Costa Rica, *Eunicea*, *Gorgonia*, hongos marinos, *Muricea*, octocorales, *Plexaurella*, *Pseudopterogorgia*

Abstract: Coral populations worldwide are threatened by environmental conditions and anthropogenic actions, for this reason they have been the subject of numerous ecological studies, and in recent decades the investigation of infectious agents that could be compromising the ecosystem and their health. Within the infectious diseases described in octocorals four have been associated with fungi and one of them has caused high rates of mortalities in the sea fans populations in different countries of the Caribbean during the last El Niño event. The aim of this study was to isolate and identify fungi in octocorals from the Costa Rican Caribbean and correlate such findings with colony dimensions, presence or not of lesions and temperature and depth measurements. During El Niño 2015-2016 SCUBA diving at three locations in Área de Conservación La Amistad Caribe, Limón, Costa Rica, were performed to collect samples of healthy and diseased octocorals, as well as abiotic (depth, temperature, salinity and pH) and biotic measurements (size of the colonies and presence of *Cyphomma gibbosum*). From 252 cultures performed, fungi were isolated in 127 of them (50.4 %), ten genera of fungi were found from healthy colonies and three from diseased tissues; been *Aspergillus*, *Penicillium*,

Fusarium and *Zygosporium* were the more frequent in healthy tissues and *Aspergillus*, *Penicillium* and *Zygosporium* from diseased colonies. There was no correlation between octocoral dimensions and abiotic measurements with the presence of lesions and/or fungal isolates. But a greater fungi diversity and presence of lesions in octocorals was detected in sites 7 and 9. This is the first study on identification of fungi in octocorals in Costa Rica, which contributes to the knowledge of the microbioma in this animals. Longitudinal assays to determinate fungal or presence of lesions seasonality are necessary in order to evaluate octocoral health status.

Key words: *Aspergillus*, Caribbean, Costa Rica, *Eunicea*, *Gorgonia*, marine fungi, *Muricea*, octocorals, *Plexaurella*, *Pseudopterogorgia*

Introducción

Los corales escleractinios junto con los octocorales aportan gran cantidad de beneficios al planeta, como fijar carbono, evitar la erosión de las costas al ser rompeolas naturales contra el fuerte oleaje, ser sitios de refugio, anidación y de alimentación de casi una cuarta parte de las especies marinas en el mundo (Cesar et al., 2003), además de ser sitios para el turismo (Alvarado et al., 2006; AIDA, 2012).

Las poblaciones de estos invertebrados a nivel mundial están siendo constantemente amenazadas por fenómenos ambientales y acciones antropogénicas directas, como la contaminación, la escorrentía, la sobreexplotación pesquera y turística o acciones indirectas como el cambio climático (Cortés y León,

2002; Cesar et al., 2003; Fabry et al., 2008; Burge et al., 2014; Mumby et al., 2014). Debido a esto han sido sujetos de diversos estudios ecológicos y en años recientes se ha iniciado la investigación de agentes infecciosos que podrían afectar el equilibrio de estos seres vivos (Sutherland et al., 2004).

Una revisión de literatura realizada por Sutherland et al. (2004) y que aún continúa vigente (Burge et al., 2014), indica que se han descrito 18 enfermedades en los corales, de las cuales solamente en cinco han sido demostrados los agentes etiológicos mediante los postulados de Koch. Cuatro de estas son causadas por bacterias, a saber: la Plaga Blanca causada por *Aurantimonas coralicida*, “White Pox” por *Serratia marcescens*, blanqueamiento por *Vibrio shiloi* y *Vibrio corallilyticus* y la Aspergilosis Marina causada por el hongo *Aspergillus sydowii*. Estos agentes se han encontrado causando enfermedad de forma oportunista luego de eventos de elevada temperatura marina, sedimentación, contaminación y baja calidad de agua (Rosenberg & Ben-Haim, 2002; Sutherland et al., 2004; Harvell et al., 2007).

Varios autores coinciden en la necesidad de investigar enfermedades en corales mediante un diagnóstico integrado, donde además de describir las características macroscópicas de las lesiones y las especies afectadas, se conozca la microbiota y su interacción con el hospedador, se investigue, además, sobre factores bióticos y abióticos que puedan alterar el equilibrio del animal con estos microorganismos, se determinen fuentes de infección, vectores y reservorios y posteriormente se implementen las herramientas para la detección de enfermedades (Harvell et al., 2004; Work et al., 2008; Pollock et al., 2011).

Con respecto a la investigación de hongos marinos, generalmente ha sido enfocada en aquellos que se encuentran en los sedimentos del fondo del marino (Samuel & Prabakaran, 2011; Zhang et al., 2013; Bubnova et al., 2014), pero recientemente han tomado relevancia desde que la aspergilosis marina causara la muerte de poblaciones de octocorales en el Caribe (Nagelkerken et al., 1997). Se han descrito dos síndromes y dos enfermedades asociados con la presencia de hongos en los corales duros y suaves: anomalías en el esqueleto, síndrome fúngico-protozoario, la enfermedad de la banda negra y aspergilosis. Sin embargo, los Labyrinthulomycetes (algas que antes fueron consideradas hongos) también han sido descritos como patógenos oportunistas marinos, que causan lesiones en los abanicos de mar (Burge et al., 2012).

Los estudios de hongos realizados en octocorales se han centrado en aquellos que pueden asociarse a colonias de gorgonias, tanto sanas como enfermas (Koh et al., 2000; Toledo-Hernández et al., 2008; Smith, 2013), por ser el principal grupo afectado por la aspergilosis marina. Sin embargo, se han reportado lesiones compatibles con esta enfermedad en especímenes de la familia Plexauridae, sugiriendo un aumento en el rango de susceptibilidad de individuos a esta micosis (Smith & Weil, 2004).

Con respecto a eventos de mortalidades masivas en octocorales en Costa Rica, Guzmán y Cortés (1984), reportaron una reducción de hasta el 90 % en las poblaciones de *Gorgonia flabellum* en toda la costa Caribe. Estos investigadores descartaron que los cambios de temperatura, salinidad, sedimentación, contaminación y oleajes hayan sido la causa pues eran factores comunes con otras poblaciones que no fueron afectadas. También cuestionaron que la mortalidad

hubiera sido inducida por depredadores y erosión del sustrato porque los cambios que estos factores pueden provocar son de menor escala. Por último, llegaron a la conclusión de que el causante del suceso debió haber sido un agente infeccioso, ya que se expandió rápidamente por la población y tuvo preferencia sólo por esta especie de octocorales. Sin embargo, se sigue careciendo de investigaciones sobre enfermedades y agentes infecciosos en estos invertebrados, particularmente si hay presencia de hongos o enfermedades causadas por estos.

Esta investigación tuvo como objetivo investigar los hongos presentes en tejido de colonias de octocorales sanos y enfermos, hacer mediciones abióticas del entorno (temperatura, pH, salinidad y profundidad) y bióticas (*Cyphomma gibbosum* y dimensiones de las colonias) para estudiar posibles relaciones entre los aislamientos y la presencia o no de lesiones.

Metodología

Área de estudio, estrategia de muestreo y recolección de las muestras

Se realizó un estudio descriptivo, observacional y transversal durante El Niño 2015-2016, en los meses de menor y mayor precipitación (en agosto, setiembre y octubre de 2015 y mayo 2016), en el que se tomaron muestras mediante buceo SCUBA en 11 sitios de tres localidades del Área de Conservación La Amistad Caribe, Limón, Costa Rica (Figura 1.1).

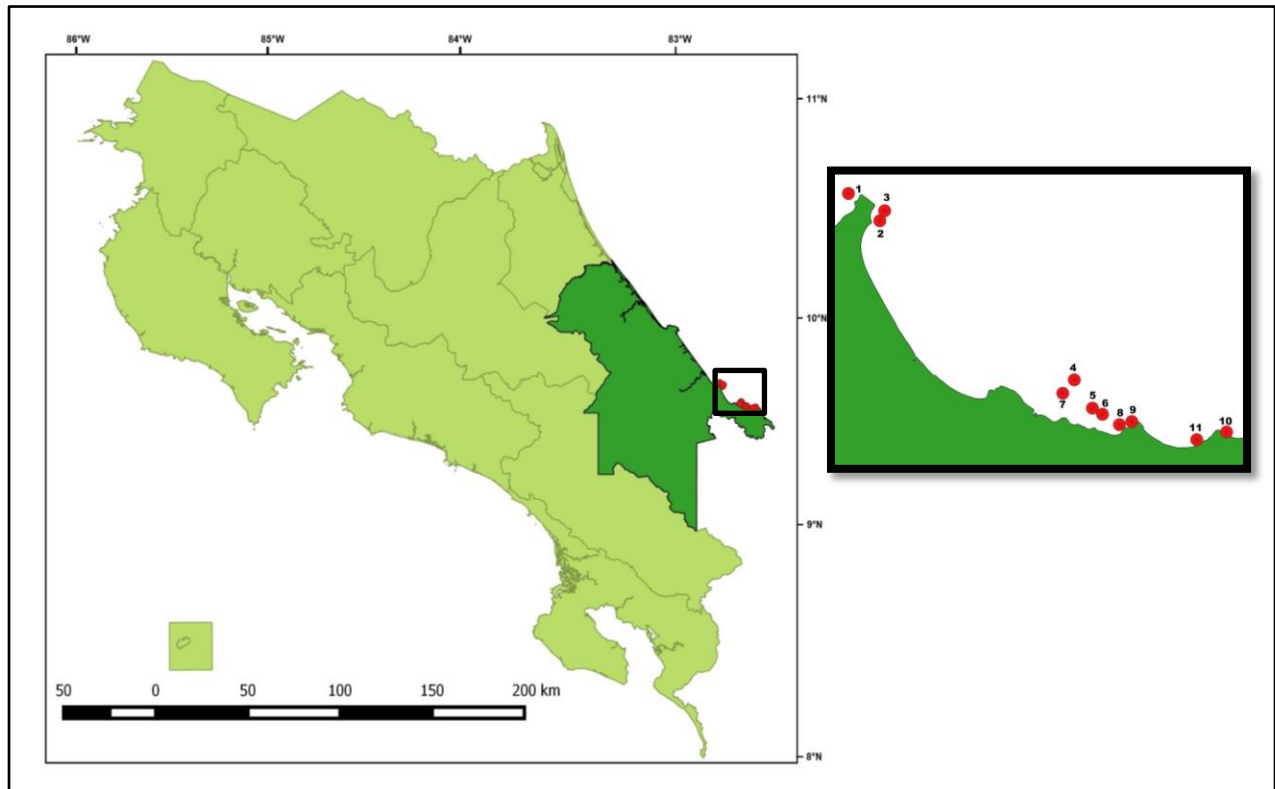


Figura 1.1. Mapa de Costa Rica con los puntos geográficos del Área de Conservación La Amistad Caribe (Limón) donde se tomaron las muestras de los octocorales, estudiados durante El Niño 2015-2016.

Los sitios fueron seleccionados con base en la información suministrada por una empresa de turismo y un pescador de la zona, a quienes se les mostraron imágenes de octocorales e indicaron los lugares donde recordaban haber visto colonias similares. En las zonas donde se localizaron los especímenes, se registraron las coordenadas geográficas mediante un sistema de posicionamiento global (GPS) y los datos de profundidad, temperatura mediante un monitor de buceo, pH y salinidad con sondas multiparamétricas YSI 550 y Oakton 600 series. A la vez, se anotaron las medidas de cada octocoral en los extremos de mayor longitud (largo por ancho) y se tomaron fotografías. Se consideraron como lesiones las anomalías en el

esqueleto, protuberancias, discontinuidades o cambios de color. Estos hallazgos se registraron y se describieron siguiendo la guía de Work & Aeby (2006) y Raymundo et al. (2008).

Los octocorales fueron identificados en el Centro de Investigación del Mar y Limnología (CIMAR) de la Universidad de Costa Rica, siguiendo las claves de campo recomendadas por Sánchez & Wirshing (2005) y por la morfología de las escleritas.

Las muestras de tejido se recolectaron según las recomendaciones de Toledo-Hernández et al. (2007). Por lo tanto, se cortó con tijeras cuatro porciones de 1 cm x 1cm (dos de la zona apical de la colonia y dos de la zona media) y se colocaron por separado en bolsas Ziploc® numeradas. En la superficie, las muestras fueron identificadas con un código compuesto por la inicial del género del octocoral, una "A" si era apical, una "M" si correspondía a una muestra de la zona media, además las dos primeras letras del sitio de muestreo y un número consecutivo (por ejemplo, EM-CA-01 para identificar la primera muestra tomada en Cahuita, que correspondió a una porción media de un individuo de *Eunicea* spp.). Las muestras se procesaron dentro de las siguientes 24 horas.

Cuando las colonias presentaron lesiones, se tomaron dos porciones adicionales del área con lesión.

Procesamiento de muestras para estudio micológico

Aislamiento e identificación

Los cultivos micológicos se realizaron en las siguientes ocho horas posteriores a la recolección. Los análisis micológicos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Micología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional (EMV-UNA). Se siguió la recomendación de Toledo-Hernández et al. (2007), combinando la técnica de cultivo de porciones pequeñas y homogenización del tejido, con el fin de obtener un mayor número de aislamientos fúngicos. Se realizó un lavado previo con alcohol de 70 % durante 30 segundos y posteriormente se enjuagó por 30 segundos con agua de mar estéril y filtrada (para disminuir el efecto antifúngico de las bacterias residentes de la capa de mucopolisacáridos (Toledo-Hernández et al., 2014). Los fragmentos fueron cortados en porciones más pequeñas y cultivados en Agar Glucosa Levadura Peptonada (GPYA por sus siglas en inglés) para hongos marinos (3 g de glucosa, 0.3 g de extracto de levadura, 0.3 g de peptona, 20 g de agar, 1 litro agua marina filtrada). Al GPYA se le adicionó estreptomycin y penicilina (0.010 g y 0.100 g por litro de medio de cultivo respectivamente) para inhibir el crecimiento bacteriano (Caballero-George et al., 2010). Los fragmentos restantes se homogenizaron por agitación con 10 ml de agua de mar estéril y filtrada, se dejaron sedimentar y se tomó una alícuota de 0.5 ml del sedimento para cultivar mediante goteo. Todos los cultivos se incubaron a 28°C en la oscuridad, revisándolos cada 2 días hasta por un mes después del cual se reportaron negativos si no hubo crecimiento (Toledo-Hernández et al., 2007, 2008). También se realizó un examen microscópico directo del sedimento que quedó posterior a la

homegenización manual de los tejidos, para visualizar hifas o levaduras y otras estructuras presentes en estos animales.

Se efectuó el recuento en término de unidades formadoras de colonias (UFC) de todos los aislamientos. Las colonias filamentosas aisladas se identificaron con base en su morfología macroscópica y microscópica sensu Samson et al. (2010) y De Hoog et al. (2014). Se realizaron cultivos en lámina en Agar Papa Dextrosa (Oxoid, New Hampshire) con agua marina filtrada y esterilizada, según Larone (2011), para inducir la esporulación de los hongos filamentosos e identificarlos de acuerdo con la forma del conidióforo.

Las levaduras aisladas se describieron morfológicamente y se cuantificaron las UFC. Posteriormente, se identificaron empleando el sistema automatizado Vitek® 2 Compact (BioMérieux, Francia). Todos los resultados de laboratorio fueron registrados en una hoja de Microsoft Excel® para su posterior análisis.

Para descartar posibles fuentes externas de contaminación, se cultivó agua marina de cada sitio de muestreo. Estas muestras se incubaron simultáneamente con agar marino sin exponer y con placas de GYPA que se expusieron al ambiente del laboratorio por 20 minutos y se mantuvieron en incubación durante un mes según Caballero-George et al. (2010).

Análisis molecular de aislamientos con morfología compatible con Aspergillus sydowii y otros aislamientos del género

Los aislamientos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* que presentaron una morfología microscópica y/o macroscópica similar a *A. sydowii* (comparado con la

cepa de referencia CBS 593.65), así como otros hongos de estos géneros, fueron analizados por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y los productos amplificados fueron enviados a secuenciar. El protocolo fue estandarizado previamente para las condiciones del laboratorio utilizando la cepa de referencia. Para ello, los hongos fueron transferidos al medio Papa Dextrosa líquido (Oxoid, New Hampshire, Inglaterra), hecho con agua marina filtrada y esterilizada, donde se dejaron crecer durante cinco días, con el fin de obtener aislamientos más puros y mayor cantidad de ADN (Toledo-Hernández et al., 2008). Posteriormente, se llevó a cabo la extracción de ADN utilizando el DNeasy Plant DNA Extraction Kit® de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen Sciences) (Weir-Brush et al., 2004; Toledo-Hernández et al., 2008).

Se realizó la PCR siguiendo el protocolo establecido por Glas y Donaldson (1995), utilizando un par de cebadores de β -tubulina universales para el género *Aspergillus*: el cebador directo Bt2a (5' GGTACCAAATCGGTGCTGCTTTC 3') y el reverso, Bt2b (5' ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC 3'), utilizando 25.0 μ l de Dream Taq™ PCR Master Mix 2X (Thermo Scientific, Waltham, USA), 1.0 μ M de cada cebador (directo y reversa), 3.0 μ l de ADN y 20 μ l de agua ultra purificada. El protocolo de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 45 segundos y 72 °C por un minuto. Los productos de la PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2 % y fueron visualizados con 2 μ L de Gel Red. Los productos que tuvieran un peso molecular entre 550 y 600 pares de bases se enviaron a secuenciar a MacroGen® Corea. Los resultados fueron comparados con secuencias de la base

de datos MycoBank, sin embargo, si la información de las secuencias más cercana no estaba disponible por ser de uso restringido, se comparó con la información disponible en BLAST. Los porcentajes de similitud ≥ 98 % permitieron la identificación de la especie (Toledo-Hernández, 2008; Caballero-George et al., 2010).

Análisis de los datos

Se calculó la proporción de individuos en los que se detectó la presencia de hongos y si fueron obtenidos de colonias sanas o con lesiones. Además, se analizó si la distribución de los hongos aislados presentó una tendencia espacial de acuerdo con los sitios donde fueron tomadas las muestras. Se determinó además, la desviación estándar y error estándar de la suma de las mediciones abióticas de pH y salinidad de los sitios estudiados y temperatura y profundidad adyacentes a cada octocoral, para determinar si había alguna diferencia entre ellos. De igual manera, se analizaron las diferencias de tamaño de los corales sanos con respecto a los que presentaron lesiones.

Resultados

Géneros de octocorales y condición de salud de las colonias

Se recolectaron muestras de 55 colonias de octocorales, de las cuales 38 (69.1 %) no presentaron lesiones visibles, mientras que 17 (30.9 %) sí las tuvieron. Los individuos estudiados fueron 23 *Gorgonia* spp. (41.8 %), 20 *Eunicea* spp. (36.3 %), seis *Plexaurella* spp. (10.9 %), tres *Muricea atlantica* (5.4 %) y tres *Pseudopterogorgia acerosa* (5.4 %). Estas colonias se encontraron en tres sitios de

muestreo, a saber: ocho en Cahuita (14.5 %), 27 en Punta Uva (49.1 %) y 20 en Manzanillo (36.3 %) (Cuadro 1.1).

Cuadro 1.1. Información sobre sitios y fechas de recolección de las muestras de los 55 octocorales en el Caribe de Costa Rica, estudiados durante El Niño 2015-2016.

Sitio de recolección	Localidad	Latitud	Longitud	Fecha de muestreo	Octocorales estudiados (n)
1	Cahuita	9°45'0,35''N	82°49'15,9''W	27-Ago-2015	<i>G. ventalina</i> (1)
2	Cahuita	9°44'14,5''N	82°48'23,1''W	28-Ago-2015	<i>G. ventalina</i> (4)
3	Cahuita	9°44'31,3''N	82°48'15,0''W	28-Ago-2015	<i>G. ventalina</i> (1) <i>E. succinea</i> (2)
4	Punta Uva	9°39'47,5''N	82°42'55,5''W	24-Sept-2015	<i>G. ventalina</i> (1)
5	Punta Uva	9°39'00''N	82°42'25,0''W	25-Sept-2015	<i>Pseudopterorgorgia acerosa</i> (3)
6	Punta Uva	9°38'49,7''N	82°42'08,0''W	25-Sept-2015	<i>Eunicea</i> sp. (5)
7	Punta Uva	9°38'84,9''N	82°43'14,9''W	29-Oct-2015	<i>G. flabellum</i> (2) <i>E. tournefortii</i> (4)
8	Manzanillo	9°38'20,0''N	82°38'39,0''W	30-Oct-2015	<i>G. flabellum</i> (6) <i>G. ventalina</i> (1) <i>E. tournefortii</i> (2) <i>E. succinea</i> (4)
9	Punta Uva	9°38'37,5''N	82°41'18,6''W	27-May-2016	<i>G. ventalina</i> (3) <i>Plexaurella</i> sp. cf <i>fusifera</i> (2) <i>P. dichotoma</i> (3)
10	Manzanillo	9°38'07,1''N	82°39'29,3''W	28-May-2016	<i>G. ventalina</i> (2) <i>E. flexuosa</i> (2) <i>M. atlantica</i> (3)
11	Punta Uva	9°38'32,2''N	82°41'39,5''W	28-May-2016	<i>G. ventalina</i> (2) <i>E. tournefortii</i> (1) <i>Plexaurella</i> sp. cf <i>grisea</i> (1)

De los individuos con lesiones, se encontraron siete *Eunicea* spp. (41.1 %), nueve *Gorgonia* spp. (52.9 %) y una *Plexaurella dichotoma* (5.8 %).

Aislamientos fúngicos

Se realizaron 252 cultivos de muestras de tejidos y sedimentos de lavados de tejidos, en los cuales se aisló al menos una unidad formadora (UFC) de hongo filamentoso o levaduriforme en 127 de ellos (50.4 %). Los hongos hialinos que no

esporularon fueron los más frecuentemente aislados. Se identificaron diez géneros de hongos, siendo *Aspergillus* el más común, seguido por *Penicillium*, *Fusarium* y *Zygosporium* (Figura 1.2).

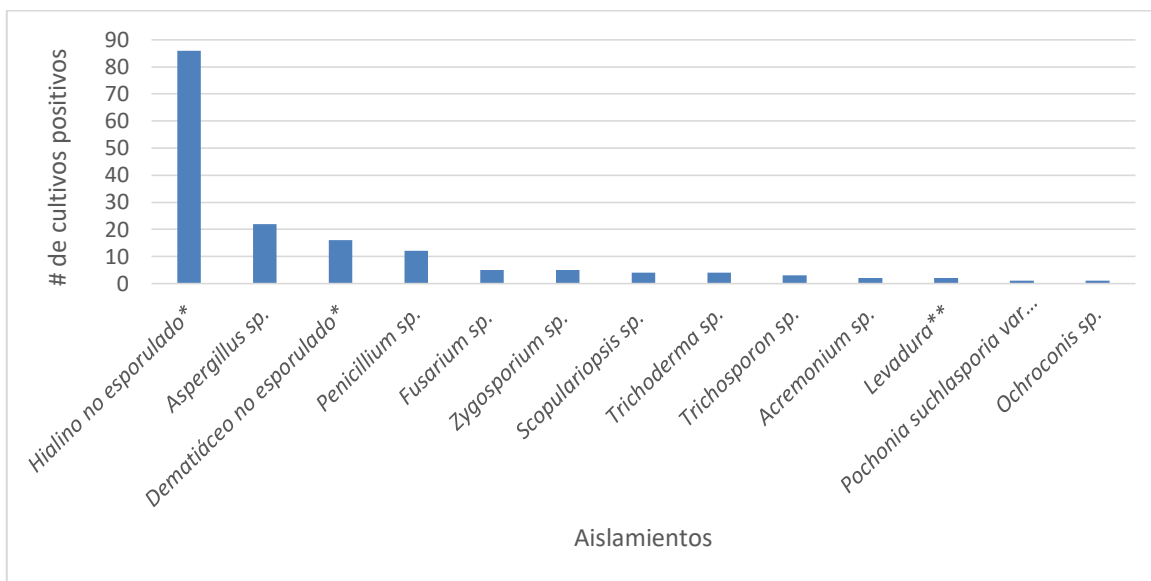


Figura 1.2. Hongos identificados en octocorales del Caribe de Costa Rica, estudiados durante El Niño 2015-2016. * = Estos hongos no esporularon a pesar de ser sub-cultivados en Agar Marino con Papa Dextrosa. ** = Los perfiles bioquímicos obtenidos mediante el Vitek 2 Compact ® no fueron concluyentes.

Los perfiles bioquímicos obtenidos para las levaduras no fueron concluyentes y aunque en uno de los casos el resultado obtenido fue *Cryptococcus neoformans* con una probabilidad del 93 % (bionúmero 4102144051333771) y se comportó como *C. gattii* en el medio Glicina Canavalina Azul de Bromotimol, el género no se confirmó mediante la prueba de la ureasa que dio negativa.

La proporción de cultivos positivos fue ligeramente mayor en tejidos enfermos (59.3 %) con respecto a los tejidos sanos (47.3 %), independientemente del género del octocoral estudiado (Fig. 1.3). Sin embargo, hubo mayor diversidad de hongos en

las muestras de zonas sin lesión (n=12) en comparación con aquellas de zonas con lesión (n=6) (Fig. 1.4).

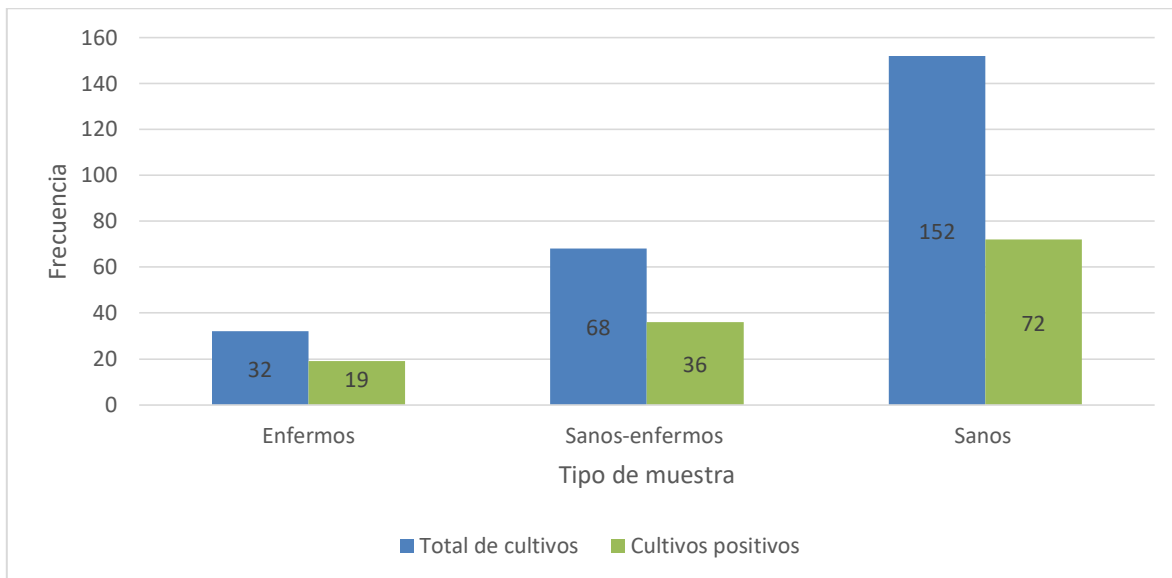


Figura 1.3. Distribución de los 127 cultivos positivos según condición del tejido en los 55 octocorales del Caribe de Costa Rica, estudiados durante El Niño 2015-2016. Sanos= muestras de colonias sin ninguna lesión. Sanos-enfermos= muestras de las zonas sin lesión de colonias enfermas. Enfermos= muestras de zonas con lesión de colonias enfermas.



Figura 1.4. Diversidad de aislamientos fúngicos según condición del tejido en los 55 octocorales del Caribe de Costa Rica, estudiados durante El Niño 2015-2016. Sanos= muestras de colonias sin ninguna lesión. Sanos-enfermos= muestras de las zonas sin lesión de colonias enfermas. Enfermos= muestras de zonas con lesión de colonias enfermas.

En *Gorgonia* spp. se obtuvieron 58 cultivos positivos (52.7 %), en los cuales se aisló 78 hongos y dentro de los géneros identificados, *Aspergillus* (11.5 %) fue el más frecuente, seguido de *Penicillium* y *Scopulariopsis* en igual proporción (5.1 %). Hubo un mayor porcentaje de positividad en cultivos de muestras de tejidos enfermos que en las que provenían de animales sin lesión (Cuadro 1.2).

Cuadro 1.2. Distribución de los hongos aislados según condición del tejido en *Gorgonia* spp. del Caribe de Costa Rica, estudiados durante El Niño 2015-2016. Sano = muestras de colonias sin ninguna lesión. Sano-enfermo = muestras de las zonas sin lesión de colonias enfermas. Enfermo= muestras de zonas con lesión de colonias enfermas.

Género (n=muestras)	<i>Gorgonia</i> (n=110)				% de aislamiento
	# cultivos según condición del tejido*	Sano (n=56)	Sano Enfermo (n=36)	Enfermo (n=18)	
Hongo aislado					
<i>Acremonium</i> sp.	-	1	-	1	1.3
A. sección <i>Flavi</i>	1	-	-	1	
A. sección <i>Fumigati</i>	-	-	1	1	11.5
A. sección <i>Nigri</i>	-	-	2	2	
<i>Aspergillus</i> spp.	4	-	1	5	
Dematiáceo no esporulado	3	2	1	6	7.7
<i>Fusarium</i> spp.	2	1	-	3	3.8
Hialino no esporulado	21	15	7	43	55.1
Levadura	-	1	-	1	1.3
<i>Ochroconis</i> sp.	-	1	-	1	1.3
<i>Penicillium</i> spp.	3	-	1	4	5.1
<i>Pochonia suchlasporia</i> var <i>catenulata</i>	1	-	-	1	1.3
<i>Scopulariopsis</i> spp.	4	-	-	4	5.1
<i>Trichoderma</i> sp.	1	-	-	1	1.3
<i>Trichosporon</i> sp.	-	1	-	1	1.3
<i>Zygosporium</i> spp.	-	2	1	3	3.8
Total de aislamientos	40	24	13	78	-
Total cultivos negativos (%)	26 (46.4)	21 (58.3)	5 (27.7)	52 (47.2)	-
Total cultivos positivos (%)	30 (53.6)	15 (41.6)	13 (72.3)	58 (52.7)	-

Con respecto a los cultivos realizados a muestras de *Eunicea* spp. hubo crecimiento de al menos un hongo en 41 de ellos (44.5 %), con un total de 47 aislamientos, siendo la mayoría de zonas sanas de animales enfermos y al igual que en las gorgonias *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. fueron los más frecuentemente aislados (Cuadro 1.3).

Cuadro 1.3. Distribución de los hongos aislados según condición del tejido en *Eunicea* spp. del Caribe de Costa Rica, estudiados durante El Niño 2015-2016. Sano= muestras de colonias sin ninguna lesión. Sano-enfermo= muestras de las zonas sin lesión de colonias enfermas. Enfermo= muestras de zonas con lesión de colonias enfermas.

Género (n=muestras)	<i>Eunicea</i> (n=92)				% de aislamiento
	# cultivos según condición del tejido*	Sano (n=52)	Sano Enfermo (n=28)	Enfermo (n=12)	
Hongo aislado					
<i>A. sección Circumdati</i>	-	1	-	1	
<i>A. sección Flavi</i>	2	-	-	2	14.9
<i>Aspergillus</i> spp.	-	4	-	4	
Dematiáceo no esporulado	3	1	4	8	17
<i>Fusarium</i> spp.	1	-	-	1	2.1
Hialino no esporulado	12	9	2	23	48.9
Levadura	1	-	-	1	2.1
<i>Penicillium</i> spp.	2	3	-	5	10.6
<i>Trichoderma</i> sp.	1	-	-	1	2.1
<i>Trichosporon</i> sp.	1	-	-	1	2.1
Total de aislamientos	23	18	6	47	-
Total de cultivos negativos (%)	33 (66.4)	11 (39.3)	7 (58.3)	51 (55.4)	-
Total de cultivos positivos (%)	19 (33.6)	17 (60.7)	5 (41.7)	41 (44.5)	-

Se obtuvieron 22 cultivos positivos de las muestras tomadas a *Plexaurella* spp. (84.6 %) y 29 aislamientos en los que los más comunes fueron los mismos que en los casos anteriores (Cuadro 1.4).

Cuadro 1.4. Distribución de los hongos aislados según condición del tejido en *Plexaurella* spp. del Caribe de Costa Rica, estudiados durante El Niño 2015-2016. Sano= muestras de colonias sin ninguna lesión. Sano-enfermo= muestras de las zonas sin lesión de colonias enfermas. Enfermo= muestras de zonas con lesión de colonias enfermas.

Género (n=muestras)	<i>Plexaurella</i> (n=26)			Total	% de aislamiento
	Sano (n=20)	Sano Enfermo (n=4)	Enfermo (n=2)		
# cultivos según condición del tejido*					
Hongo aislado					
<i>Acremonium</i> sp.	-	1	-	1	3.4
<i>Aspergillus</i> sección <i>Aspergillus</i>	2	-	-	2	17.2
<i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i>	-	1	-	1	
<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	1	-	1	2	
Dematiáceo sin esporular	1	-	-	1	3.4
<i>Fusarium</i> sp.	1	-	-	1	3.4
Hialino no esporulado	14	2	-	16	55.2
<i>Penicillium</i> spp.	1	1	-	2	6.9
<i>Trichosporon</i> sp.	1	-	-	1	3.4
<i>Zygosporium</i> spp.	2	-	-	2	6.9
Total de aislamientos	23	5	1	29	-
Total de cultivos negativos (%)	3 (15)	-	1 (50)	4 (15.4)	-
Total de cultivos positivos (%)	17 (85)	4 (100)	1 (50)	22 (84.6)	-

Los cultivos de los tejidos de *M. atlantica* fueron en los que más negatividad se encontró (91.6 %) y solo un aislamiento, mientras que en *P. acerosa* siete cultivos fueron negativos (58.3 %) y crecieron ocho tipos de hongos (Cuadro 1.5).

Cuadro 1.5. Distribución de los hongos aislados en *Muricea atlantica* y *Pseudopterogorgia acerosa* del Caribe de Costa Rica, estudiados durante El Niño 2015-2016.

Género (n=muestras) Hongo aislado	<i>M. atlantica</i> (n=12)	<i>P. acerosa</i> (n=12)
<i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i>	-	1
Dematiáceo no esporulado	-	1
Hialino no esporulado	1	3
<i>Penicillium</i> sp.	-	1
<i>Trichoderma</i> spp.	-	2
Total de aislamientos	1	8
Total de cultivos negativos (%)	11 (91.6)	7 (58.3)
Total de cultivos positivos (%)	1 (8.4)	5 (41.7)

Hallazgos micológicos según sitio de muestreo

Según el tipo de hongo aislado por localidad de muestreo, se obtuvieron hongos hialinos no esporulados en octocorales de todos los sitios visitados (n=11) y tomando en cuenta los géneros de hongos identificados, los más frecuentes fueron *Penicillium* (n=6) y *Aspergillus* (n=5) (Cuadro 1.6).

Cuadro 1.6. Distribución de los hongos según los sitios de recolección de las muestras de 55 octocorales del Caribe de Costa Rica, estudiados durante El Niño 2015-2016.

Hongo aislado	Sitio (n=11)	Total de sitios donde se aisló el género de hongo
<i>Acremonium</i> sp.	9	1
<i>Aspergillus</i> sección <i>Aspergillus</i>	9	
<i>Aspergillus</i> sección <i>Circumdati</i>	7	
<i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i>	5-7, 9	5
<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	8	
<i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i>	9	
<i>Aspergillus</i> spp.	3, 6-8	
Dematiáceo no esporulado	1, 5-7	
<i>Fusarium</i> spp.	1, 2, 3	3
Hialino no esporulado	1-11	11
Levadura	8, 10	2
<i>Ochroconis</i> sp.	9	1
<i>Penicillium</i> spp.	3, 5-9	6
<i>Pochonia suchlasporia</i> var <i>catenulata</i>	2	1
<i>Scopulariopsis</i> spp.	2	1
<i>Trichoderma</i> spp.	2, 5, 7	3
<i>Trichosporon</i> spp.	9, 10	2
<i>Zygosporium</i> spp.	9	1

El sitio 9 fue el que presentó mayor diversidad con nueve géneros diferentes, seguido de la localidad 7 con siete taxones de hongos. Los lugares con menor diversidad de hongos fueron el 4 y 11 con uno cada uno (Fig. 1.5).

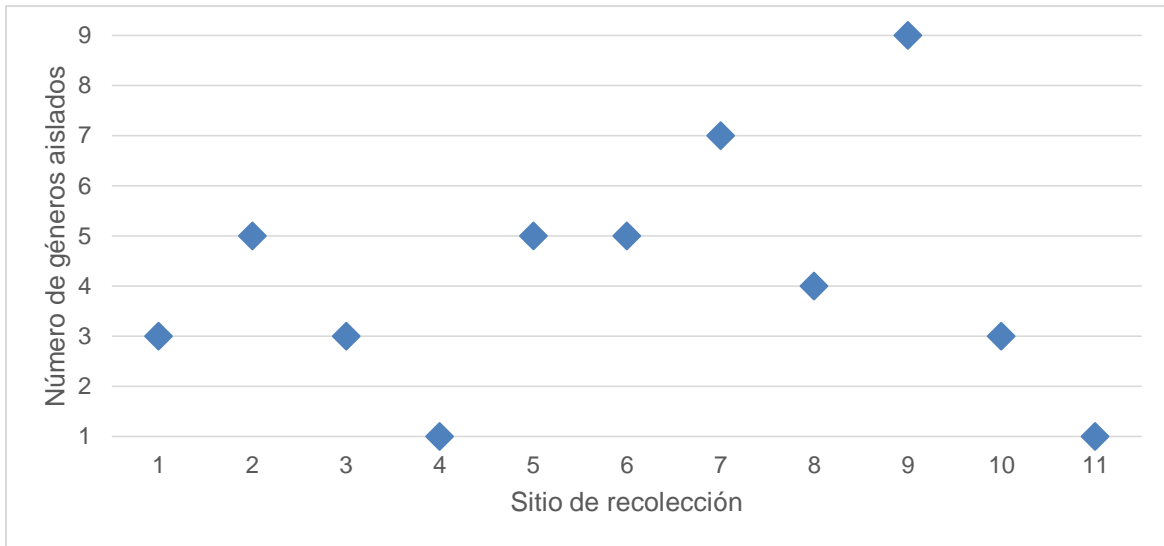


Figura 1.5. Diversidad de géneros de hongos identificados por sitio de recolección de octocorales del Caribe de Costa Rica, estudiados durante El Niño 2015-2016.

En los medios de cultivo sin exponer utilizados como controles no hubo crecimiento de hongos, mientras que en una de las placas que se expuso al ambiente solamente hubo crecimiento de 2 UFC de hongos fuliginosos que no esporularon.

En los cultivos de agua marina recolectada simultáneamente en los sitios donde se tomaron las muestras de los corales se aisló, en su mayoría, hongos hialinos septados que no esporularon (Cuadro 1.7).

Cuadro 1.7. Aislamientos de hongos en muestras de agua de mar en los sitios donde se recolectaron las muestras de los 55 octocorales del Caribe de Costa Rica, estudiados durante El Niño 2015-2016.

Sitio	Aislamientos
1	Negativo
2	Negativo
3	Negativo
4	<i>Fusarium</i> sp. 1 UFC
5	Negativo
6	Negativo
7	Negativo
8	Negativo
9	Hongo hialino 1 UFC, <i>Zygosporium</i> sp. 1 UFC
10	Hongo hialino 2 UFC
11	Hongo hialino 4 UFC

Análisis del sedimento de los lavados del tejido con agua marina estéril

Los principales hallazgos obtenidos en los 126 exámenes microscópicos directos de los sedimentos de los lavados fueron las diatomeas, seguidas de huevos y cianobacterias. Se encontraron nematodos, hifas septadas hialinas y algas en menor proporción (Cuadro 1.8).

Cuadro 1.8. Resultados del examen microscópico de 126 sedimentos de lavados de tejidos de 55 octocorales del Caribe de Costa Rica, según tipo de muestra, estudiados durante El Niño 2015-2016. * = No se observó ninguna estructura en las muestras de *Pseudopterogorgia acerosa* (n=6).

Género	<i>Eunicea</i> (n=57)		<i>Gorgonia</i> (n=55)		<i>Muricea</i> (n=6)	<i>Plexaurella</i> (n=13)		Total* (n=126)
	Sin lesión (n=40)	Con lesión (n=6)	Sin lesión (n=46)	Con lesión (n=9)	Sin lesión (n=6)	Sin lesión (n=12)	Con lesión (n=1)	
Anfípodos	0	0	0	1	0	0	0	1
Alga verde	1	0	1	1	1	0	0	4
Alga roja	1	0	0	2	0	0	0	3
Cianobacterias	3	0	2	4	0	0	0	9
Copépodos	2	0	0	0	0	0	0	2
Diatomea	2	0	3	6	3	7	1	22
Foraminíferos	0	1	0	1	1	0	1	4
Hifas septadas hialinas	0	0	2	1	0	0	0	3
Huevos	7	1	8	1	3	1	1	22
Nematodos	1	0	1	3	0	0	1	6

Identificación molecular de hongos con morfología similar a *Aspergillus sydowii*

Mediante la comparación de las características macro y microscópicas de las colonias aisladas, se identificaron siete aislamientos con la morfología similar a *A. sydowii*, pero en el análisis molecular se corroboró que se trataban de otras especies. Otros seis aislamientos del género *Aspergillus* también fueron identificados por medios moleculares (Cuadro 1.9).

Cuadro 1.9. Identificación molecular de aislamientos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* en muestras de octocorales del Caribe de Costa Rica, estudiados durante El Niño 2015-2016. * = Secuencias comparadas en BLAST con el GenBank.

Identificación	Fuente (tipo de tejido)	Sitio	Secuencia más cercana en Mycobank o BLAST*	%Similitud / Alineamiento
Aislamientos similares a <i>A. sydowii</i>				
Sección <i>Versicolores</i>				
<i>A. protuberus</i>	<i>E. tournefortii</i> (sano)	7	JN853963.1*	99/99
	<i>G. ventalina</i> (sano)	2	JN853963.1*	98/88
<i>A. versicolor</i>	<i>P. dichotoma</i> (sano-enfermo)	9	CBS 583.65	99.7/99.1
Sección <i>Penicillium</i>				
<i>P. citrinum</i>	<i>G. ventalina</i> (enfermo)	9	LT559012.1*	100/100
<i>P. copticola</i>	<i>G. flabellum</i> (sano)	7	JN606805.1*	99/94
<i>P. paxilli</i>	<i>P. dichotoma</i> (sano-enfermo)	9	CBS 360.48	100/98.8
<i>P. steckii</i>	<i>E. succinea</i> (sano)	8	CBS 560.55	100/96.1
Otros aislamientos del género <i>Aspergillus</i>				
Sección <i>Nigri</i>				
<i>A. aculeatinus</i>	<i>Plexaurella</i> sp. c.f. <i>fusifera</i> (sano)	9	HE984407.1*	99/99
Sección <i>Fumigati</i>				
<i>A. fumigatus</i>	<i>G. flabellum</i> (lesión)	8	CRNMA15.469	99/96.6
Sección <i>Flavi</i>				
<i>A. nomius</i>	<i>E. tournefortii</i> (sano)	7	CBS 260.88	99.5/98.3
Sección <i>Circumdati</i>				
<i>Aspergillus</i> sp.	<i>G. ventalina</i> (sano-enfermo)	9	EF661344.1*	99/97
<i>A. westerdijkiae</i>	<i>E. tournefortii</i> (sano-enfermo)	7	KP329877.1*	99/98
Sección <i>Aspergillus</i>				
<i>A. ruber</i>	<i>P. dichotoma</i> (sano)	9	HE578087.2*	100/99

Mediciones abióticas

Las temperaturas en las locaciones 5, 7 y 11 fueron las mayores, mientras que en el sitio 4 fue la menor con respecto a la moda de las temperaturas de otras zonas y este último sitio fue el más profundo de todos (Cuadro 1.10).

Cuadro 1.10. Mediciones abióticas adyacentes a octocorales del Caribe de Costa Rica, estudiados durante El Niño 2015-2016. * = Diferencias significativas según las desviaciones estándar para cada medición. Nota: la salinidad y pH se omitieron de los resultados porque las mediciones no fueron consecuentes con las condiciones esperadas para el Caribe.

Sitio de recolección	Temperatura (°C) Moda por sitio	Profundidad (m) Ámbito (Promedio)
1	29	4.25
2	29	2.4-3 (2.7)
3	29	2.4-4.2 (3.3)
4	28.3*	14.2*
5	30*	3.9-5.2 (4.5)
6	29	3.9-4.9 (4.5)
7	30*	3.3-4.9 (4.2)
8	29	1.5-3.9 (3.0)
9	29	0.3-2.6 (1.1)
10	29	2.3-4.2 (3.7)
11	29 y 31*	3.3-5.8 (4.7)
Promedio	29.3	3.3
Desviación Estándar	0.55	2.02
Error Estándar	0.07	0.27

Mediciones del tamaño de la colonia

No se encontraron diferencias significativas entre las dimensiones de las colonias, con respecto a la presencia o ausencia de lesiones (Fig. 1.6).

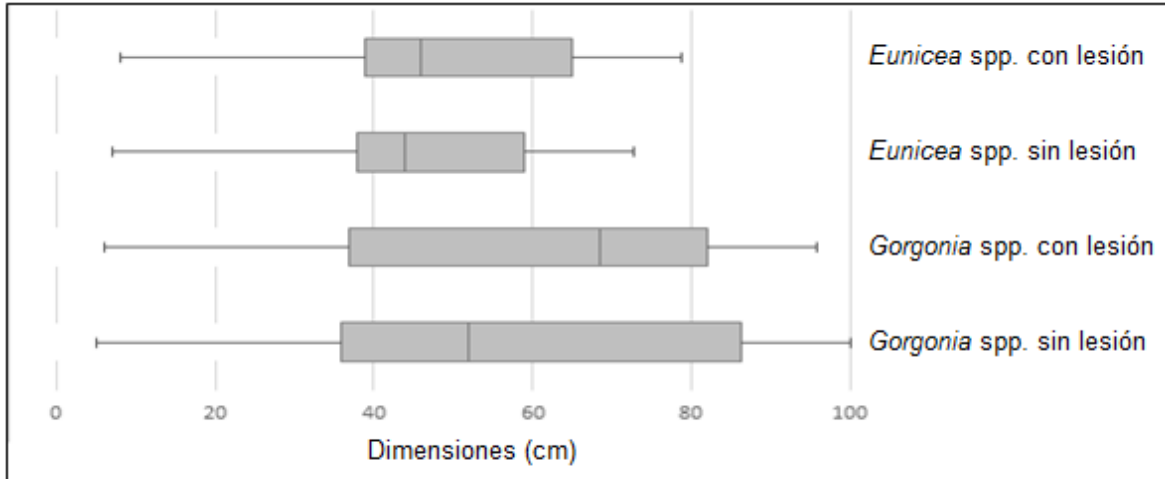


Figura 1.6. Comparación de las dimensiones de los octocorales con lesión y sin lesión del Caribe de Costa Rica, estudiados durante El Niño 2015-2016.

Discusión

En esta investigación los hongos identificados en colonias sanas y enfermas fueron en su mayoría marinos facultativos de la división Ascomycota, lo que concuerda con lo reportado por Koh et al. (2000) y Toledo-Hernández et al. (2007) en octocorales. Así mismo, este estudio describe por primera vez la microbiota presente en colonias de los géneros *Eunicea*, *Plexaurella*, *Muricea* y *Pseudopterogorgia*, en los cuales no hay reportes de biodetección y representa el primer reporte de *A. nomius*, *A. protuberus*, *A. ruber*, *A. westerdijkiae*, *Ochroconis* sp., *P. copticola*, *Pochonia suchlasporia* var *catenulata* y *Zygosporium* spp. en octocorales sanos y enfermos.

Se encontró una mayor diversidad de hongos en colonias sanas con respecto a las colonias con lesiones, al igual que en las investigaciones llevadas a cabo con especímenes sanos y enfermos de corales escleractíneos *Acropora formosa* (Yarden et al., 2007), octocorales (Koh et al., 2000) y abanicos de mar (*G. ventalina*)

(Toledo-Hernández et al., 2008). Toledo-Hernández et al. (2008) atribuyeron estas diferencias a tres posibles razones: a) en las colonias enfermas hay una dominancia de hongos patógenos sobre otros hongos, b) hay una mayor susceptibilidad del hospedero a esos patógenos debido a cambios en el ambiente y c) a una respuesta generalizada del tejido frente a una infección local que reduce la presencia de hongos comensales y saprófitos (Toledo-Hernández et al., 2008). A estas hipótesis se puede agregar los cambios demostrados en las comunidades microbianas del ecosistema o de estos animales consecuencia de factores bióticos y abióticos como los fenómenos de El Niño (Harvell et al., 2007; Ainsworth & Gates, 2016; Glasl et al., 2016).

En este estudio no se observó diferencias en las dimensiones de las colonias de *Gorgonia* spp. sanas con respecto a las que tenían lesiones, contrario con lo descrito por Nagelkerken et al. (1997). Ellos encontraron que las colonias de mayor tamaño (entre 91 a 110 cm de altura) fueron las que presentaron más lesiones durante el brote de aspergilosis en varias islas del Caribe. La explicación que ellos consideraron fue que los individuos más grandes son también los más viejos y por ello más susceptibles a la infección. Sobre este tema, Ellner et al. (2007) en su modelo de interacción del coral con el patógeno *A. sydowii*, expusieron que el tejido más viejo tenía una respuesta inmune más débil por lo que el patógeno podría invadir más rápidamente. En las colonias de octocorales del Caribe costarricense estudiadas, estas diferencias no se observaron probablemente porque la aspergilosis no fue detectada.

Con respecto a las mediciones abióticas, se observó que el sitio 4, en el cual no se encontró animales con lesiones, fue donde se registró la menor temperatura y mayor profundidad. Sin embargo, no se puede afirmar que hay menor presencia de lesiones a menor temperatura y mayor profundidad (en contra posición a lo expuesto por Nagelkerken et al. 1997), pues el número de muestras es insuficiente ya que solo se encontró una colonia en ese sitio. La temperatura tampoco fue un factor influyente en la detección de hongos y/o presencia de lesiones, ya que los sitios más diversos (9 y 7) presentaron temperaturas similares a los demás, no obstante, al ser este un estudio transversal no se tomó en cuenta las variaciones diarias y estacionales que suelen darse pero tampoco hay estudios que hayan considerado estas variables, por lo que es necesario tomarlo en cuenta para futuras investigaciones.

Entre los hongos identificados en colonias sanas y enfermas destacan *Ochroconis* sp. y *Fusarium* spp., dos reconocidos patógenos de crustáceos y peces comerciales (Hatai, 2012). No obstante, *Fusarium* spp., aún cuando ha sido aislado en muestras de corales (Koh et al., 2000; Yarden et al., 2007; Toledo-Hernández et al., 2008), sedimento, y agua de mar (Samuel & Prabakaran, 2011; Bubnova et al., 2014), es recientemente considerado un patógeno oportunista de la vida marina, al haber sido reportado causando enfermedad en tiburones martillo (Crow et al., 1995) y en tortugas marinas adultas (Cabañes et al., 1997). Más recientemente se ha asociado a mortalidades masivas de huevos de tortuga marina *Caretta caretta* (Sarmiento-Ramírez et al., 2010) debido a la necesidad del hongo por absorber el calcio necesario para el desarrollo del embrión (Phillot et al., 2006). Considerando que el

calcio es un componente muy importante de la estructura de los octocorales (Bayer y Macintyre, 2001), debe considerarse a *Fusarium* sp. como una posible amenaza, ya que podría causar lesiones en presencia de factores que favorezcan su desarrollo.

Otro hallazgo notable es *Zygosporium* spp., un hongo de hábitat terrestre, asociado a plantas de la familia Pandanaceae (Whitton et al., 2003). A pesar que se desconoce si es metabólicamente activo en ambientes oceánicos, ha sido recuperado a partir de cianobacterias marinas (Oh et al., 2006) y de manglares (Sarma, 2012), pero según la literatura consultada, no existen registros en octocorales. En esta investigación tuvo una distribución espacial y temporal, encontrándose en las muestras del sitio 9 que en promedio tuvo una menor profundidad y durante mayo, un mes de alta precipitación en el Caribe (Anexos 1, 2). Una posible explicación de esta distribución puede darse por el aumento en la cantidad de sedimentos en la columna de agua consecuencia de las lluvias (Wernberg et al., 2011). No obstante, debe comprobarse si puede ser aislado en otra época del año y en otros sitios en un estudio longitudinal.

La identificación molecular de hongos similares morfológicamente con *A. sydowii* permitió una correcta clasificación y diferenciación de las especies, entre ellos *A. protuberus* y *A. versicolor* pertenecientes a la sección *Versicolores*, misma en la que se ubica *A. sydowii* (Jurjevic et al., 2012) y *P. citrinum*, un hongo que se ha aislado en mayor cantidad de octocorales con lesión (Koh et al., 2000; Toledo-Hernández et al., 2008).

Por otro lado, la identificación por métodos bioquímicos de las levaduras marinas aisladas en los octocorales del Caribe de Costa Rica, no fueron suficientes para determinar el género y la especie. Esto probablemente debido a que existen cinco familias del orden Saccharomycetales asociadas en su mayoría con ambientes marinos que no se encuentran en las bases de datos con los que se comparan los algoritmos en los sistemas automatizados (Fell, 2012). El uso de PCR y posterior secuenciación de los productos, dilucidaría el caso cuyo perfil fue compatible con *C. neoformans* y tuvo un resultado igual al que da *C. gattii* en el medio Glicina Canavalina Azul de Bromotimol, que al tener un resultado negativo en la prueba de la ureasa, se descartó el género *Cryptococcus* ya que al ser un basidiomicete solo se aceptaría un resultado positivo en esta prueba (Larone, 2011).

Las cianobacterias, diatomeas, huevos, nematodos, copépodos y foraminíferos en octocorales han sido asociados mediante histología al forrajeo, como componentes del plancton y como un hallazgo normal (Burge et al., 2012; Gomes et al., 2012). En este estudio, se comprobó su presencia mediante el examen microscópico directo del sedimento de lavado del tejido, por lo que su rol patogénico no se esclareció, sobre todo considerando que las cianobacterias y las diatomeas han sido identificadas previamente en diferentes tipos de sustrato en el Caribe costarricense (Bernecker, 2009; Muñoz-Simón, 2012) y que los nematodos están ampliamente distribuidos en el mar (Vanreusel et al., 2010).

Sobre el posible origen de los hongos identificados, se considera que la mayoría pueden ser aloautóctonos endolíticos del tejido del octocoral, de las algas y/o de las cianobacterias, porque sólo fueron encontrados en las muestras de tejidos o lavados

del sedimento. No obstante, la procedencia de los hongos hialinos no esporulados, *Fusarium* spp. y *Zygosporium* spp. pudo haber sido del agua marina al ser aislados también allí. Es poco probable que los aislamientos de ascomicetes, como *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp., hayan provenido de una contaminación ambiental durante el procesamiento de la muestra, ya que no hubo crecimiento de estos hongos en las placas del medio de cultivo GPYA expuestas al ambiente, en las cuales sólo crecieron hongos negros que no esporularon y en reportes anteriores de octocorales han sido los géneros aislados con mayor frecuencia (Koh et al., 2000; Toledo-Hernández et al., 2008).

Esta investigación demuestra la presencia de hongos filamentosos y levaduriformes en los octocorales estudiados, que difieren en diversidad según el estado de salud de estos invertebrados y las condiciones de temperatura y profundidad de los sitios donde se encuentran. Las condiciones mencionadas podrían tener variaciones según los escenarios de mayor o menor precipitación, que arrastrarían sedimentos y provocarían situaciones de enriquecimiento nutricional, propiciando cambios en las comunidades microbianas. Por lo tanto, es necesario realizar estudios longitudinales para investigar el papel que están desempeñando estos hongos en los octocorales, ya sea como simbioses, comensales o patógenos. Estos estudios deberán incluir herramientas microbiológicas, histopatológicas y moleculares, así como considerar otras mediciones abióticas que representen factores de riesgo para la conservación de estos animales esenciales para el ecosistema.

DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA E HISTOPATOLÓGICA DE LESIONES EN OCTOCORALES DEL CARIBE DE COSTA RICA, DURANTE EL NIÑO 2015-2016

Resumen: En los últimos 40 años, la investigación de enfermedades en octocorales se ha enfocado en la identificación de lesiones durante exploraciones de campo y detección de microorganismos mediante cultivos, dejando de lado los análisis histopatológicos, por lo que son escasos los informes que describan los hallazgos a nivel tisular. Los objetivos de este estudio fueron: identificar y describir lesiones en octocorales y realizar estudio micológico e histopatológico para evidenciar compromiso fúngico. Durante El Niño 2015-2016 se estudiaron tres localidades del Área de Conservación La Amistad Caribe, Limón, Costa Rica. Se recolectaron muestras de 55 octocorales, de los cuales 17 tenían al menos una alteración en su estructura (30.9 %), nueve *Gorgonia* spp. (52.9 %), siete *Eunicea* spp. (41.1 %), y una *Plexaurella dichotoma* (5.9 %). De los 11 sitios estudiados, en siete se detectaron colonias con lesiones, en dos se halló la mayor proporción de colonias enfermas y en tres, los octocorales estaban sanos. Se observó lesiones independientemente de la región anatómica del octocoral, con una distribución tipo focal en *Eunicea* spp. y sin un patrón específico en *Gorgonia* spp. Los cambios en la coloración del tejido fueron el hallazgo más frecuente, detectándose en ocho *Gorgonia* spp. (88.8 %), en cuatro *Eunicea* spp. (57.1 %) y en el único ejemplar de *P. dichotoma* con lesión. Mediante histopatología, se pudo demostrar que las lesiones tenían un compromiso fúngico con una respuesta celular asociada en dos *Gorgonia* spp. (11.7 %), y en cuatro especímenes de *Eunicea* spp. (23.5 %) se evidenció una reacción de acumulación de escleritos y zonas de necrosis de causa

desconocida. Adicionalmente, se hallaron diatomeas, cianobacterias y nematodos pero no se asociaron con las lesiones. Los estudios histopatológicos son indispensables para analizar los cambios que suceden en un tejido para evaluar el estado de salud de los octocorales.

Palabras clave: Caribe, Costa Rica, *Eunicea*, *Gorgonia*, histopatología, hongos marinos, octocorales, *Plexaurella*.

Abstract: In the last 40 years, octocoral disease research has focus on lesion identification in the field and microorganisms detection by culture, with very few histopathologic analysis resulting in a shortage of reports that describe tissue damage. The aim of this study was to describe and identify lesions in octocorals, performing mycological and histopathological assays in order to verify fungal compromise. During the 2015-2016 El Niño three locations of La Amistad Caribe Conservation Area, Limón, Costa Rica, were studied. Tissue samples from Fifty five octocorals colonies were taken, 17 of them presented lesions (30.9 %), nine *Gorgonia* spp. (52.9 %), seven *Eunicea* spp. (41.1 %) and one *Plexaurella dichotoma* (5.9 %). Of the 11 sites visited, diseased octocoral were seen in seven, the majority of diseases colonies were detected in two and in three sites all the colonies were healthy. Lesions were present indistinctly of anatomic region of the colony collected with a focal distribution in *Eunicea* spp. and no specific pattern in *Gorgonia* spp. Changes in tissue coloration were the more frequent finding, observed in eighth *Gorgonia* spp. (88.8%), four *Eunicea* spp. (57.1 %) and in the only *P. dichotoma* colony with lesions. By histopathology, reaction to fungal hyphae was found in two sea fan tissue (11.7 %), and in four *Eunicea* spp. (23.5 %) had a sclerite

reaction with necrosis from an indeterminate cause. Diatoms, cyanobacteria and nematodes were found, but not associated with injuries. Histopathological studies are indispensable for the analysis of the tissue changes in order to evaluate the health status of octocorals.

Key words: Caribbean, Costa Rica, *Eunicea*, *Gorgonia*, histopathology, marine fungi, octocorals, *Plexaurella*.

Introducción

Los octocorales, junto con los corales escleractinios, son piezas clave de los ecosistemas marinos al contribuir con la fijación de carbono, proveer refugio, anidación y alimentación a especies marinas (Cesar et al., 2003; Work & Meteyer, 2014), y ser fuente de ingresos económicos para el turismo (Alvarado et al., 2006; AIDA, 2012). Además, debido a su particularidad biológica de estar adheridos a un sustrato, son buenos bioindicadores de los ecosistemas acuáticos con respecto a la presencia de contaminación, ya que algunas especies se disminuyen en condiciones de baja calidad de agua y otras ejercen dominancia en ambientes contaminados (Hernández-Muñoz et al., 2008; Cooper et al., 2009).

Mundialmente se encuentran amenazados por acciones antropogénicas, fenómenos ambientales y enfermedades (Sutherland et al., 2004; Mumby et al., 2014), factores que en conjunto, han ocasionado altas mortalidades tanto de octocorales como en corales escleractinios (Nagelkerken et al., 1997; Harvell et al., 1999; Burge et al., 2014).

Se han descrito dos síndromes y tres enfermedades en octocorales (Sutherland et al., 2004; Burge et al., 2013), cuatro de los cuales han sido asociados de alguna manera con sobre crecimiento de hongos (anormalidades del esqueleto, síndrome fúngico-protozoario, enfermedad de la banda negra y aspergilosis) y uno con invasión de algas (sobre crecimiento de Labyrinthulomycetes). Pero solamente en la aspergilosis se ha logrado demostrar, por los postulados de Koch, que el agente causal es *Aspergillus sydowii* (Sutherland et al., 2004).

Un estudio retrospectivo realizado por Work y Meteyer (2014), sobre la investigación de enfermedades en corales durante los últimos 50 años, reveló que de 492 publicaciones disponibles, la mayoría ha sido enfocada a la identificación de signos de enfermedad durante exploraciones de campo y detección de agentes infecciosos mediante cultivos. Sin embargo, en muy pocas ocasiones se realizaron experimentos *in situ* para reproducir la enfermedad o bien un análisis histopatológico que permitiera estudiar los cambios a nivel celular y analizar la eventual participación del microorganismo en los cambios tisulares. Los autores exhortaron a que los futuros esfuerzos en este campo sean focalizados tanto en la descripción macroscópica de las lesiones, como en su evolución y en el estudio de factores ambientales asociados a la presencia de estas lesiones. Además destacaron la importancia de realizar cultivos para el aislamiento del agente causal, incluir estudios histopatológicos y reproducir los signos de la enfermedad en individuos sanos a partir del contacto con tejido enfermo.

En Costa Rica, no hay información sobre la presencia de enfermedades en octocorales y los reportes disponibles en corales escleractinios corresponden a la

observación macroscópica de lesiones durante exploraciones de campo (Alvarado-Barrientos, 2006) o evaluaciones del hábitat (Fonseca, 2003), pero no se ha realizado estudios histopatológicos.

La presente investigación se llevó a cabo en forma simultánea con una biodetección de hongos en octocorales sanos y enfermos en el Caribe de Costa Rica. Tuvo como objetivo describir las lesiones macroscópicas en estos cnidarios, así como realizar análisis histopatológicos para evidenciar si había o no compromiso tisular por hongos y compararlo con los resultados de cultivos micológicos.

Metodología

Área de estudio, estrategia de muestreo y recolección de las muestras

Se realizó un estudio descriptivo, observacional y transversal durante El Niño 2015-2016 (en agosto, setiembre y octubre de 2015 y mayo 2016), donde se tomaron muestras mediante buceo SCUBA en 11 sitios de tres localidades del Área de Conservación La Amistad Caribe, Limón, Costa Rica (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1. Información sobre sitios y fechas de recolección de las muestras de los 55 octocorales del Caribe de Costa Rica, estudiados durante El Niño 2015-2016.

Sitio de recolección	Localidad	Latitud	Longitud	Fecha de muestreo	Octocorales estudiados (n)
1	Cahuita	9°45'0,35''N	82°49'15,9''W	27-Ago-2015	<i>G. ventalina</i> (1)
2	Cahuita	9°44'14,5''N	82°48'23,1''W	28-Ago-2015	<i>G. ventalina</i> (4)
3	Cahuita	9°44'31,3''N	82°48'15,0''W	28-Ago-2015	<i>G. ventalina</i> (1) <i>E. succinea</i> (2)
4	Punta Uva	9°39'47,5''N	82°42'55,5''W	24-Sept-2015	<i>G. ventalina</i> (1)
5	Punta Uva	9°39'00''N	82°42'25,0''W	25-Sept-2015	<i>Pseudopterorgorgia acerosa</i> (3)
6	Punta Uva	9°38'49,7''N	82°42'08,0''W	25-Sept-2015	<i>Eunicea</i> sp. (5)
7	Punta Uva	9°38'84,9''N	82°43'14,9''W	29-Oct-2015	<i>G. flabellum</i> (2) <i>E. tournefortii</i> (4)
8	Manzanillo	9°38'20,0''N	82°38'39,0''W	30-Oct-2015	<i>G. flabellum</i> (6) <i>G. ventalina</i> (1) <i>E. tournefortii</i> (2) <i>E. succinea</i> (4)
9	Punta Uva	9°38'37,5''N	82°41'18,6''W	27-May-2016	<i>G. ventalina</i> (3) <i>Plexaurella</i> sp. cf <i>fusifera</i> (2) <i>P. dichotoma</i> (3)
10	Manzanillo	9°38'07,1''N	82°39'29,3''W	28-May-2016	<i>G. ventalina</i> (2) <i>E. flexuosa</i> (2) <i>M. atlantica</i> (3)
11	Punta Uva	9°38'32,2''N	82°41'39,5''W	28-May-2016	<i>G. ventalina</i> (2) <i>E. tournefortii</i> (1) <i>Plexaurella</i> sp. cf <i>grisea</i> (1)

Los sitios fueron seleccionados con base en la información suministrada por una empresa de turismo y un pescador de la zona, a quienes se les mostraron imágenes de octocorales y quienes indicaron los lugares donde recordaban haber visto colonias similares. En las zonas donde se localizaron los especímenes, se registraron las coordenadas geográficas mediante un sistema de posicionamiento global (GPS). A cada colonia se le tomó fotografías y posteriormente se identificaron en el Centro de Investigación en Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad de Costa Rica (CIMAR-UCR), siguiendo las claves de campo sugeridas por Sánchez & Wirshing (2005).

Se consideró como lesión cualquier anomalía en el esqueleto, protuberancias, discontinuidades o cambios de color. La selección de las colonias enfermas fue al azar según se fueran encontrando mediante SCUBA y las lesiones fueron descritas y contabilizadas siguiendo la nomenclatura de Work y Aeby (2006) y de Raymundo et al. (2008). Para recolectar las muestras de los especímenes, se cortaron dos porciones de aproximadamente 1 cm x 1 cm (una de la zona sin lesión y otra del área afectada). Las muestras de tejido fueron tomadas con tijera y se transportaron hasta el bote en bolsas Ziploc® con agua de mar. Posteriormente se fijaron con formalina en dilución 1 parte de formalina y 9 partes de agua marina filtrada (Petes et al., 2003; Burge et al., 2012).

Procesamiento de muestras para estudio histopatológico

Las muestras fueron procesadas y analizadas en el Servicio de Patología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional (EMV-UNA), donde se les realizó una descalcificación con EDTA al 10 % ajustado a pH 7 con hidróxido de sodio (NaOH). La solución fue preparada siguiendo el procedimiento utilizado en el Laboratorio de Histología de George Mason University (Estados Unidos): se preparó una solución de dos litros de agua destilada con 200 g de EDTA, se dejó en agitación durante 45 minutos y se agregaron 18 g de NaOH, la porción de tejido se dejó entrar en contacto con la solución durante 24 horas, posteriormente se lavaron los tejidos con agua del grifo durante 30 minutos (E.C. Peters, comunicación personal, 2014). Los tejidos fueron preparados mediante el sistema automatizado Leica TP 1020, donde se mantuvo en formalina 45 minutos, etanol al 50 % durante 30 minutos, etanol al 70 % una hora, etanol al 80 % 1 hora, etanol al 90 % 45

minutos, dos ciclos en 2-propanol 100 % de 1 hora cada uno, dos ciclos de xilol de 2 horas cada uno y finalmente tres ciclos de parafina de hora y media cada uno. Posteriormente se realizaron los cortes y fueron colocados en portaobjetos y teñidos con Hematoxilina y Eosina. Para verificar si existía invasión de hongos en las zonas con lesión se realizaron tinciones de Grocott y/o Ácido Peryódico de Shiff y para visibilizar las áreas con melanina se realizó tinción de Fontana Masson (Gallowey et al., 2006; Burge et al., 2012).

Procesamiento de muestras para estudio micológico

Se realizaron cultivos micológicos de las zonas con lesión siguiendo las recomendaciones de Toledo-Hernández et al. (2007) y adicionando estreptomycin y penicilina (0.010 g y 0.100 g por litro de medio de cultivo respectivamente) para inhibir el crecimiento bacteriano (Caballero-George et al., 2010). Todos los cultivos se incubaron a 28°C en la oscuridad, revisándolos cada dos días hasta que hubo crecimiento; se reportaron negativos después de un mes (Toledo-Hernández et al., 2007, 2008).

Las colonias se identificaron por su morfología macroscópica y microscópica según Samson et al. (2010) y De Hoog et al. (2014). Se realizaron cultivos en lámina en Agar Papa Dextrosa (Oxoid, New Hampshire) con agua marina filtrada y esterilizada, según Larone (2011), para inducir la esporulación e identificarlos de acuerdo con la forma del conidióforo.

Análisis de datos

Se calculó la proporción de individuos con lesiones en los que se detectó la presencia de hongos en los tejidos, así como un análisis para verificar si hubo una distribución espacial de la presencia colonias con lesiones.

Resultados

De las 55 colonias que se incluyeron, 17 presentaron lesiones (30.9 %), representadas por tres géneros: nueve *Gorgonia* (52.9 %), siete *Eunicea* (41.1 %) y una *Plexaurella dichotoma* (5.9 %); se encontraron de una a siete lesiones por individuo. En general, los abanicos fueron los más afectados, siendo *G. ventalina* la especie con mayor proporción de colonias con lesión sobre el total de individuos estudiados de la misma especie (Cuadro 2.2).

Cuadro 2.2. Distribución según sitio de recolección, género y especie de las 17 colonias de octocorales con lesión, estudiadas durante El Niño 2015-2016.

Sitios de recolección	Taxón	Colonias con lesión / total de colonias del taxón (%)	Colonias con lesión / total de colonias del género (%)	Colonias con lesión / total de colonias enfermas (%)
1, 9-11	<i>Gorgonia ventalina</i>	6/15 (40)	9/23 (39.1)	9/17 (52.9)
8	<i>Gorgonia flabellum</i>	3/8 (37.5)		
9	<i>Plexaurella dichotoma</i>	1/3 (33.3)	1/6 (16.6)	1/17 (5.9)
6	<i>Eunicea</i> spp.	3/5 (60)		
3, 8	<i>Eunicea succinea</i>	2/6 (33.3)	7/20 (35)	7/17 (41.1)
7	<i>Eunicea tournefortii</i>	2/7 (28.5)		

Según la distribución por localidad de muestreo, los sitios 6, 8 y 9 fueron en los que se encontró un mayor número de colonias con lesión, en el primero sólo se encontró *Eunicea* spp. con lesión y en los siguientes la mayoría fueron *Gorgonia* spp. con alguna alteración en el tejido. En los sitios 2, 4 y 5 se encontraron únicamente animales sanos (Fig. 2.1).

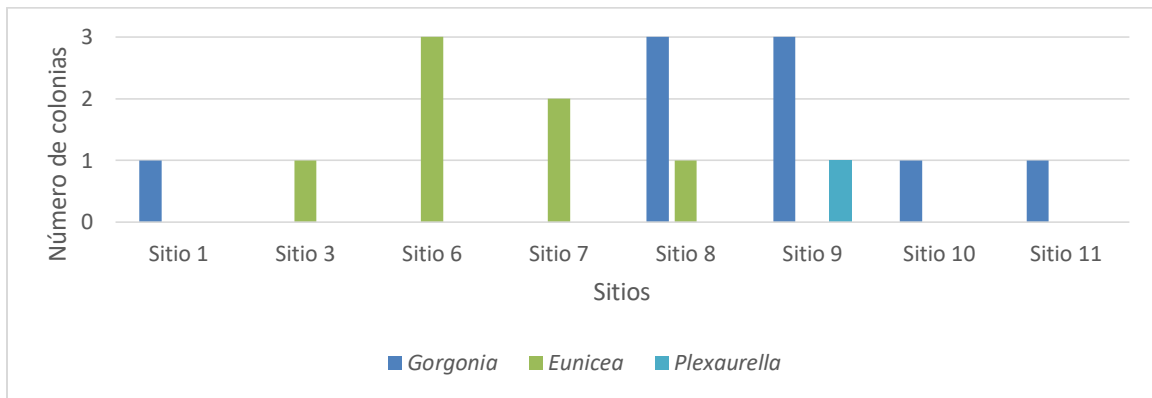


Figura 2.1. Distribución según sitio de recolección de las 17 colonias de octocorales con lesión en el Caribe de Costa Rica, estudiadas durante El Niño 2015-2016.

En todos los especímenes de *Eunicea* spp. se presentaron lesiones de distribución focal, mientras que en *Gorgonia* spp. no hubo un patrón que sobresaliera (Fig. 2.2).

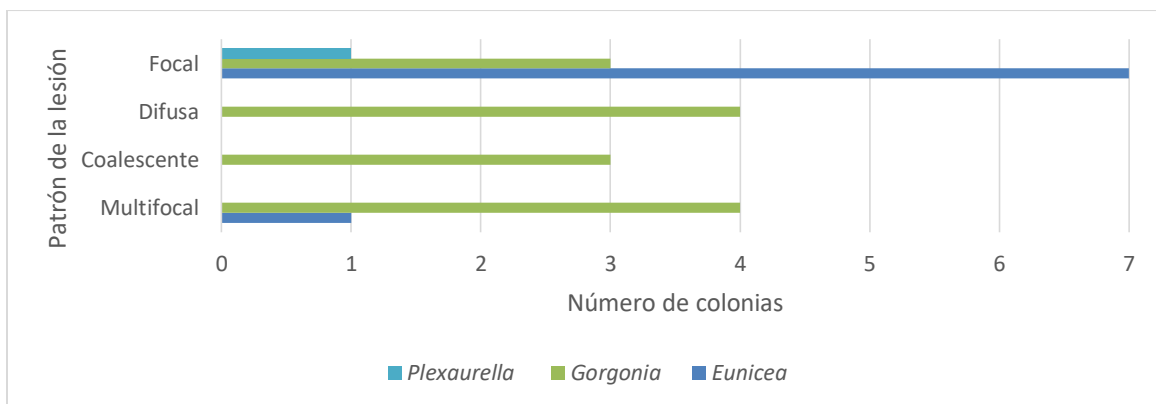


Figura 2.2. Patrones de las lesiones observadas en 17 colonias de octocorales del Caribe de Costa Rica, estudiadas durante El Niño 2015-2016.

Las lesiones se presentaron independientemente de la región anatómica (periférica, apical, central o medial) de los octocorales estudiados (Fig. 2.3).

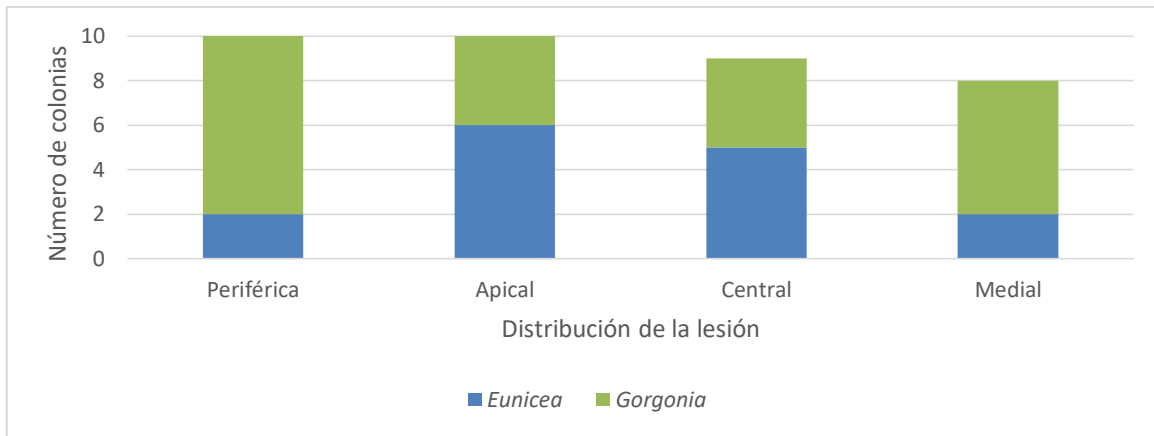


Figura 2.3. Distribución anatómica de las lesiones en las 17 colonias de octocorales del Caribe de Costa Rica, estudiadas durante El Niño 2015-2016. Nota: en la colonia de *P. dichotoma* se encontró una lesión a nivel medial.

Dentro de las alteraciones macroscópicas observadas, el cambio en la coloración de los tejidos fue lo más evidente, encontrándose un color púrpura en ocho de nueve *Gorgonia* spp. (88.8 %) con lesión y una pigmentación negra con cúmulo de escleritos en cuatro de siete *Eunicea* spp. enfermas (57.1 %). El parasitismo por algas y crustáceos también fue un hallazgo frecuente (Fig. 2.4).

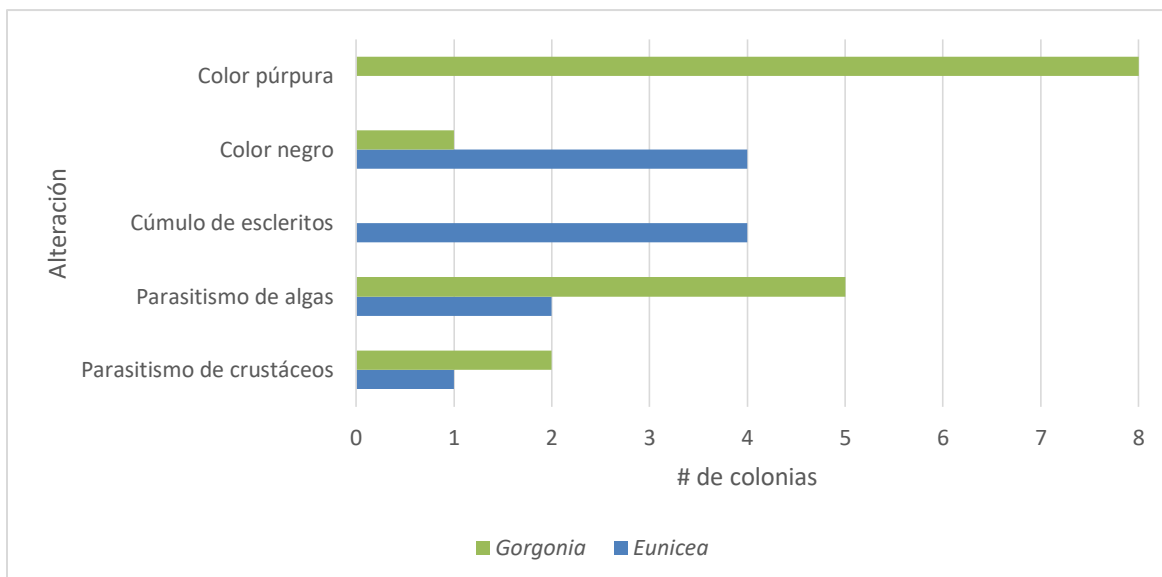


Figura 2.4. Alteraciones macroscópicas en las 17 colonias de octocorales enfermas, del Caribe de Costa Rica, estudiadas durante El Niño 2015-2016. Nota: la lesión en *P. dichotoma* fue de color negro

Se encontró el alga rodófito *Polysiphonia* sp. en *E. tournefortii* (1 de 4, 25 %) del sitio 7, *Amphiroa* sp. y *Ceramium* sp. en *E. succinea* (1 de 4, 25 %) del sitio 8. A la vez, algas de los géneros *Codium* y *Padina*, fueron detectadas en *G. flabellum* (2 de 6, 33.3 % y 1 de 6, 16.6 % respectivamente) del sitio 8.

Se observó un cúmulo de escleritos en *Eunicea* spp. (3 de 6, 50 %) del sitio 6 y en *E. succinea* (1 de 4, 25 %) del sitio 8 y presencia de crustáceos en *G. ventalina* (1 de 1, 100 %), *Eunicea* spp. (1 de 6, 16.6 %) y *G. flabellum* (1 de 6, 16.6 %) de los sitios 1, 6 y 8 respectivamente. Adicionalmente, en el sitio 9, se observó un espécimen de *C. gibbosum* alimentándose de *G. ventalina* (1 de 3, 33.3 %).

Hallazgos histopatológicos

En el examen histopatológico se detectó cambios en el color del esqueleto axial de las gorgonias de rosa intenso a amarillo pardo, exposición de los loculi o fibras del axis tanto en *Eunicea* spp. como en *Gorgonia* spp. e hipermelanización cerca de eje axial principalmente en los abanicos. Así mismo, se evidenció una reacción eosinofílica cerca de las algas, cianobacterias e hifas principalmente en los abanicos. Pólipos y gónadas fueron vistos en ambos tipos de colonias (Fig. 2.5).

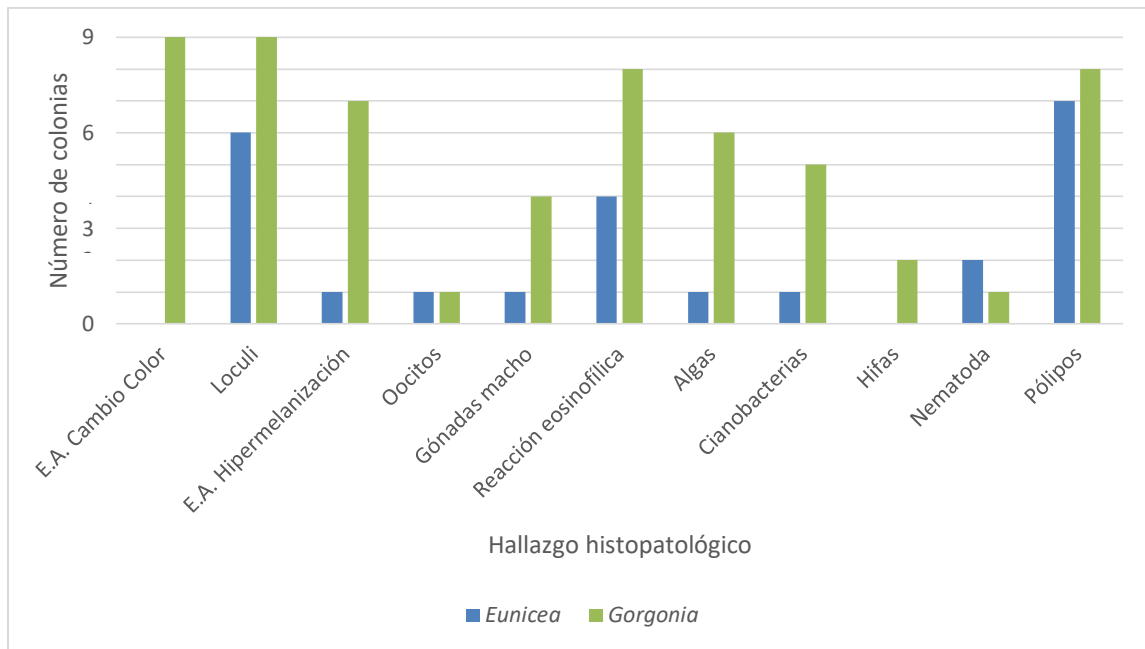


Figura 2.5. Hallazgos histopatológicos en las lesiones de 17 octocorales del Caribe de Costa Rica, estudiados durante El Niño 2015-2016. E.A.= esqueleto axial. Nota: 1) En la histopatología de *P. dichotoma* se observaron cianobacterias y bacilos Gram negativos. 2) Los pólipos en las zonas con lesión estaban necróticos

Se observó micelio septado dematiáceo en el esqueleto axial de una *G. ventalina* del sitio 11 (Fig 2.6) e hifas septadas hialinas con bifurcación dicotómica en la gastrodermis de otro ejemplar de *G. ventalina* del sitio 9 (Fig. 2.7). En ambos individuos se encontraron también, algas parásitas, hipermelanización y reacción eosinofílica rodeando las estructuras antes descritas.

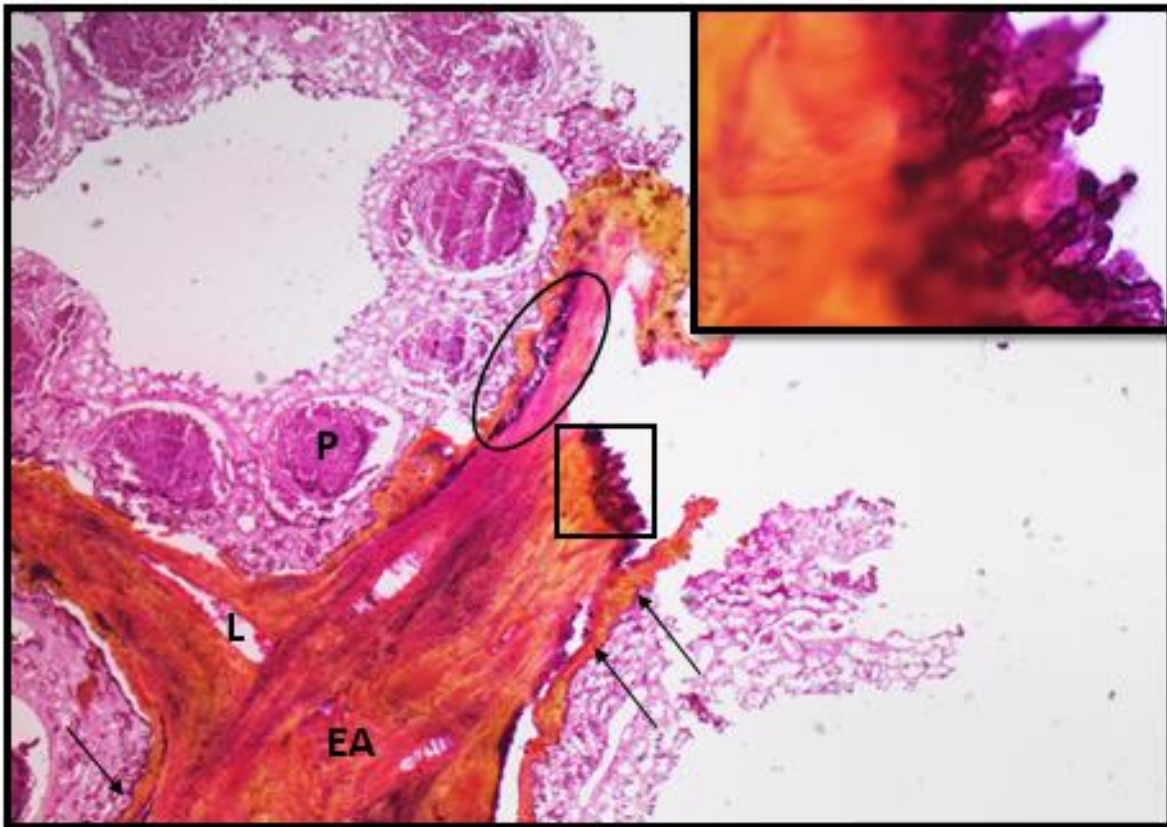


Figura 2.6. Corte histopatológico de *Gorgonia ventalina* con presencia de hifas fuliginosas septadas en el axis. Nótese a la izquierda la presencia de pólipos necróticos (P), exposición de loculi (L), hipermelanización (fechas), presencia de algas (óvalo) e hifas pigmentadas septadas (recuadro) en el esqueleto axial (EA). Hematoxilina & Eosina 4x y 60x.

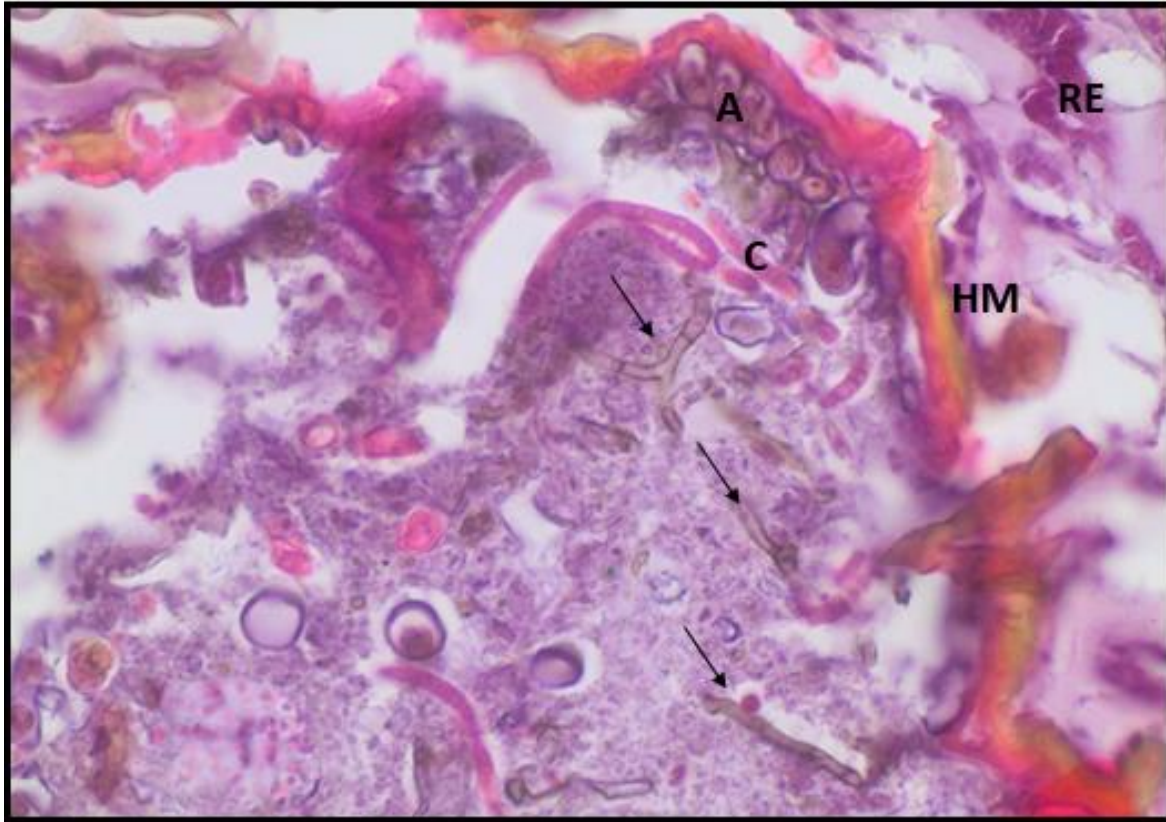


Figura 2.7. Corte histopatológico de una *Gorgonia ventalina* con hifas en la gastrodermis. Hifas septadas hialinas (flechas), cianobacterias (C) y algas (A), rodeadas de una hipermelanización (HM) y reacción eosinofílica (RE). Hematoxilina & Eosina, 60x.

En las histopatologías de *Eunicea* spp. y *E. succinea* que presentaron macroscópicamente el cúmulo de escleritos no se evidenció hipermelanización o reacción eosinofílica a nivel microscópico. Pero al hacer la tinción de Fontana Masson se observó presencia de gránulos con melanina en algunas de las células de la zona con lesión (Fig. 2.8).

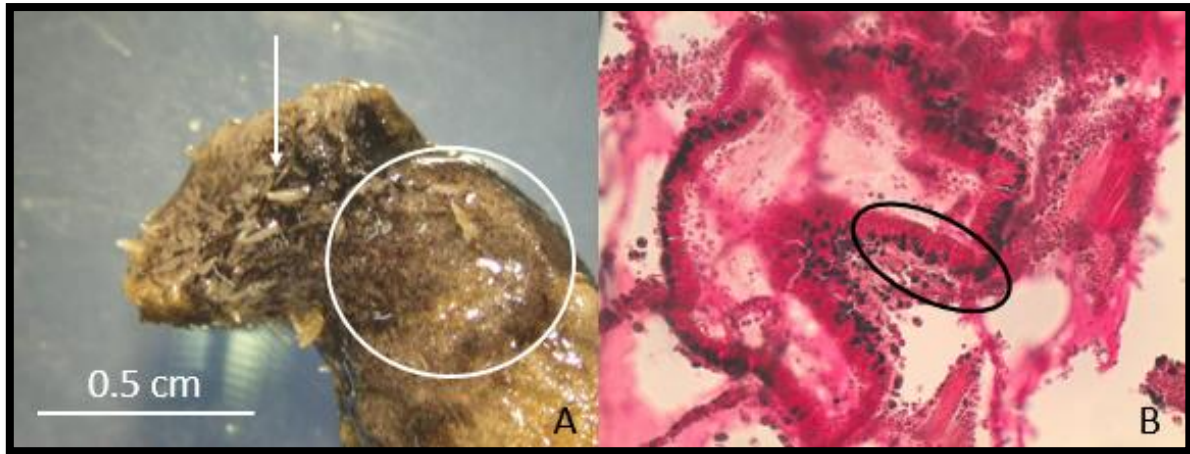


Figura. 2.8. *Eunicea succinea* con cúmulo de escleritos y zona de necrosis desprovista de pólipos. A. Se observa la zona de necrosis desprovista de pólipos (círculo) y el cúmulo de escleritos (flecha). B. Histopatología de un pólipo con gránulos de melanina en su interior (óvalo). Fontana Masson 20x.

Aislamientos fúngicos en las colonias con lesiones

Se realizaron 32 cultivos de las zonas con lesión de los 17 octocorales con alteraciones, de los cuales se obtuvo al menos un aislamiento fúngico en 19 de ellos (59.37 %). La mayoría de los hongos aislados fueron hialinos sin esporular, seguido de dematiáceos sin esporular y *Aspergillus* sección *Nigri* (Fig. 2.9).

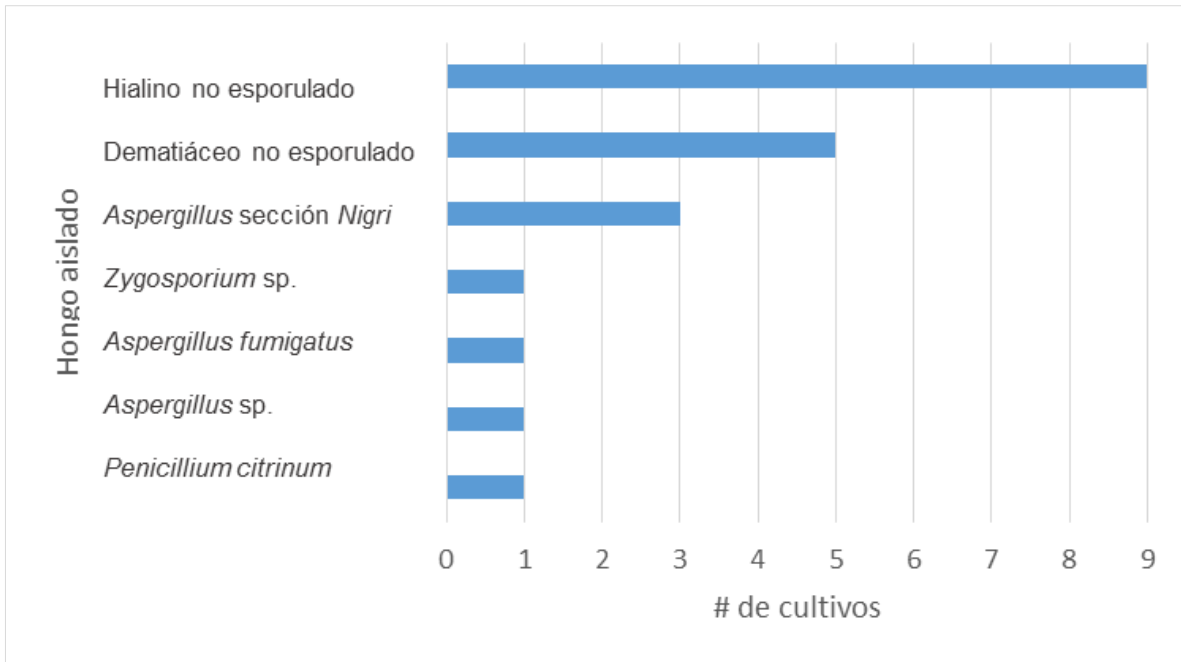


Figura 2.9. Resultados de los 32 cultivos de muestras de zonas con lesiones de octocorales del Caribe de Costa Rica, estudiados durante El Niño 2015-2016.

Un hongo dematiáceo se aisló en el cultivo del tejido de la gorgonia donde se observó las hifas septadas pigmentadas, mientras que *Penicillium citrinum* creció en el cultivo del abanico donde se detectó las hifas septadas hialinas.

Discusión

Este es el primer estudio realizado en octocorales dirigido a la descripción de lesiones tomando en cuenta sistemas de nomenclatura macroscópicos (Work & Aeby, 2006; Raymundo et al., 2008) y microscópicos (Gallowey et al., 2006) mediante histopatología para observar los cambios en el tejido. Considerando el concepto de enfermedad argumentado por Raymundo et al. (2008), en el cual afirman que “es la ausencia de salud manifestada por la presencia de una lesión o

alteración morfológica” y por lo tanto “la lesión es el signo típico de un coral enfermo”, la presente investigación evidenció que tres de cada diez octocorales de las zonas estudiadas tenían comprometido su estado de salud.

Las áreas púrpuras observadas en el 88.8 % de las colonias de *G. ventalina* y *G. flabellum* con lesión corresponden a una reacción tisular ante la agresión de un agente biótico, llámese patógeno, depredador o parásito, como lo describe Alker et al. (2004). Estos autores realizaron experimentos en campo y de laboratorio donde demostraron que el aumento en la concentración de escleritos púrpuras alrededor de las lesiones, formando agallas o tumores por el cúmulo de gorgonina, fue inducido por el contacto con el coral cuerno de alce (*Millepora cervicornis*), tejido enfermo por aspergilosis, el caracol raspador *C. gibbosum* y el sobre crecimiento de macroalgas, pero no por artículos punzocortantes. Además, expusieron que si el estímulo producido por el roce constante de alguno de estos agentes bióticos, se mantiene por tiempo prolongado, podría inducir una reacción similar a una hipersensibilidad, ya que este cambio estructural en las zonas afectadas se mantuvo hasta por siete meses posterior al retiro del estresor. Lo anterior explicaría por qué este color se observa en diferentes tonalidades, un color más claro indicaría que el animal estuvo expuesto al agente biótico (lesiones crónicas) y un color intenso que la exposición aún se está dando o fue reciente (lesiones agudas).

Los tumores ocasionados por algas o “*algal tumors*”, fueron reportados por Nagelkerken et al. (1997) en el 44.1 % de los abanicos muestreados en Curaçao. Estas lesiones fueron encontradas tanto en colonias consideradas sanas como en las enfermas por aspergilosis, cifra ligeramente menor al 55.5 % encontrado en las

gorgonias de esta investigación. Una posible explicación para el sobre crecimiento de algas y algunos hongos en los tejidos, puede ser un aumento en la concentración de fósforo y nitrógeno por un enriquecimiento nutricional consecuencia del depósito de sedimentos de agricultura, aguas residuales y abundante precipitación (Harvell et al., 2007; Raymundo et al., 2008; Rivest et al., 2010; Wernberg et al., 2011; Bartley et al., 2014) traídos por los ríos que desembocan en las zonas del estudio (Cortés et al., 2010). El aumento de nutrientes en el entorno marino incrementa el nitrógeno disponible, el mismo que es aprovechado por hongos como *A. sydowii* para causar infección (Bruno et al., 2003; Rivest et al., 2010). Adicionalmente, algunas especies de algas del género *Codium* son consideradas invasoras y han sido asociadas con aumentos en los niveles de nitratos y nitritos en el agua. Cuando estas algas parasitan invertebrados marinos como las ostras y los crustáceos, se ha visto que perjudican al hospedador al limitar el crecimiento, movimiento y al aumentar la susceptibilidad hacia los depredadores, presuntamente por el gasto energético que estos animales realizan al tratar de limitar el sobre crecimiento de estos organismos (Trowbridge, 1998). *Padina* sp., al ser un alga ampliamente distribuida en la zona estudiada (Fernández y Alvarado, 2004), se entiende que está parasitando de manera oportunista las gorgonias muestreadas. Debe investigarse si esta alga tiene una preferencia por el sustrato de estos octocorales o bien que su crecimiento se deba también a la posible disponibilidad de fuentes de nitrógeno, elemento con el cuál se asocia positivamente su desarrollo (Vasuki et al., 2001).

Se evidenció acumulación de escleritos en *Eunicea* spp. y *E. succinea*, pero no se pudo determinar su causa. Este género de octocoral está reaccionando a algún

estresor puesto que las zonas afectadas presentaron un color negro, el cual ha sido asociado con necrosis en corales escleractinios (Raymundo et al., 2008). Además, los pólipos de las zonas afectadas estaban necrotizados y se detectó la presencia de gránulos de melanina en los amebocitos de las zonas con lesión, visualizados mediante la tinción de Fontana Masson, lo que indica una reacción a un agente biótico similar a la que sucede en gorgonias (Alker et al., 2004; Burge et al., 2012).

La presencia de cianobacterias, diatomeas y nematodos, en la histopatología de octocorales, ha sido descrita asociada al forrajeo y al plancton (Gomes et al., 2012) y como un hallazgo normal (Burge et al., 2012). En esta investigación, se asume que la presencia de estos organismos no es sinónimo de invasión, debido a que no hubo cambios tisulares asociados, como los observados en el caso de las algas. Los nematodos están presentes en una gran diversidad de sustratos y hábitats en el mar (incluyendo los octocorales), sin importar profundidad o presencia de oxígeno (Vanreusel et al., 2010). Las cianobacterias y diatomeas han sido identificadas previamente en diferentes tipos de sustratos en el Caribe costarricense (Bernecker, 2009; Muñoz-Simón, 2012). No obstante, es importante mencionar que las cianobacterias han sido consistentemente observadas en muestras de individuos enfermos con Banda Negra (Richardson, 2004). En esta investigación fueron observadas en zonas de lesión color negro en los individuos del género *Eunicea*, por lo que no puede descartarse que estén asociadas de forma oportunista.

Los otros aislamientos de esta investigación no pueden asociarse con las lesiones a pesar de provenir de los tejidos enfermos ya que no se observaron hifas en el tejido, con excepción de dos casos en los que se pudo demostrar por medio de

histopatología el compromiso tisular de los hongos. El primer caso fue un hongo dematiáceo observado en el tejido enfermo de una *G. ventalina* donde también se aisló un hongo fuliginoso en el cultivo y la segunda fue el caso de otro ejemplar de *G. ventalina*, donde en el tejido se observaron hifas septadas hialinas y creció *P. citrinum* en el cultivo. En ambos casos, se observó la adaptación parasitaria esperada para esos hongos (Mok et al., 1997; Larone, 2011) y una respuesta celular asociada. El aislamiento de *P. citrinum* es notable, ya que en las investigaciones de Koh et al. (2000) y Toledo-Hernández et al. (2008), fue aislado en mayor cantidad en octocorales enfermos. Estos hallazgos son muy importantes, ya que demuestran que otros hongos diferentes a *A. sydowii* pueden causar enfermedad, pero su rol primario o secundario debe demostrarse mediante los postulados de Koch tomando en cuenta condiciones ambientales similares a las de los sitios 9 y 11 donde se encontraron estos abanicos.

Esta investigación aporta conocimiento sobre el estado de salud de octocorales del Caribe costarricense, detectando no solo a nivel macroscópico, sino también a nivel tisular la presencia de lesiones y los posibles agentes causales mediante la visualización de los cambios ocasionados en el tejido. Adicionalmente, reporta la aglutinación de escleritos en colonias del género *Eunicea* como una reacción a un estresor no determinado y pone en evidencia la presencia de gránulos de melanina en las células de estos individuos. La pérdida de pólipos funcionales identificados en los tejidos con lesión, representa un serio desafío para la sobrevivencia de los octocorales estudiados, ya que dependiendo del área afectada, se disminuye la tasa de alimentación y reproducción. Es necesario incorporar análisis histopatológicos

en la investigación del estado de salud de los octocorales para detectar cambios en el tejido, evaluar el estado reproductivo, visualizar agentes infecciosos y su compromiso en el desarrollo de lesiones que pueden amenazar la conservación de estos invertebrados.

Conclusión general

Este es el primer estudio realizado en octocorales en el país, donde se utilizó herramientas de laboratorio microbiológico e histopatología para la identificación de hongos y su posible compromiso en el tejido, que servirá como línea de base para la implementación de estas técnicas en el diagnóstico y vigilancia de enfermedades y posibles agentes infecciosos en corales.

Se demostró la presencia de hongos filamentosos y levaduriformes probablemente aloautóctonos endolíticos de los tejidos sanos y enfermos de los octocorales estudiados, los cuales en su mayoría fueron ascomicetes marinos facultativos, entre los que destacan *Aspergillus versicolor* y *A. protuberus*, hongos de la misma sección de *A. sydowii*, así como ocho hongos que se reportan por primera vez en estos invertebrados. Se desconoce si los hongos aislados están causando patología por sí solos, pues en las colonias con lesiones donde se encontraron hifas en el tejido también había algas y su presencia generó una reacción por parte de hospedero que indica una infección mixta.

Aunque no se comprobó la presencia de aspergilosis, los sitios visitados representan territorios nosogénicos para la presentación de la enfermedad durante

fenómenos de El Niño, debido a que fue encontrado el vector *C. gibbosum*, las temperaturas marinas tuvieron registros superiores a los 28 °C y las precipitaciones constantes traen consigo gran cantidad de sedimentación que pueden inducir a un enriquecimiento nutricional y abundancia en nitrógeno apto para el crecimiento del hongo. No se puede descartar que esta enfermedad no esté afectando a estos animales en nuestro país o que otros hongos puedan tener un rol en la patología debido al importante hallazgo de *P. citrinum* en una gorgonia en la que su adaptación parasitaria fue observada en la histopatología.

El aislamiento de hongos y presencia de lesiones se presentó independientemente de las condiciones de temperatura, profundidad y dimensiones de los octocorales. Sin embargo, se encontró una tendencia espacial de presencia de lesiones y diversidad en los aislamientos fúngicos en algunos de los sitios estudiados, por lo que es necesario realizar muestreos sucesivos e indagar otras variables como la sedimentación, tipo de sustrato o contaminantes ambientales que puedan predisponer al parasitismo de algas o sobre crecimiento de hongos, para determinar factores ambientales o bióticos que pueden estar propiciando esta situación.

Se demostró que aunque el parasitismo por algas predomina en los tejidos enfermos, otros hongos filamentosos hialinos y dematiáceos pueden estar involucrados en las patologías. En estos casos la respuesta tisular indica que el octocoral reacciona para controlar la infección, por lo que es necesario monitorizar estos individuos para observar si los animales pudieron controlar la invasión, las lesiones se han extendido o hay más animales afectados. Es indispensable incluir la histopatología en estudios integrales de las enfermedades de octocorales para

conocer mejor las causas y efectos de los agentes bióticos. Estudios multi e interdisciplinarios permitirán dilucidar nuevos agentes etiológicos, factores intrínsecos y extrínsecos a los corales en la búsqueda de amenazas para estos cnidarios y su ecosistema.

Recomendaciones

Al Ministerio de Ciencia y Tecnología y Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Costa Rica: incluir a la Medicina de la Conservación, Salud Ecosistémica y Recurso Marino dentro de las áreas prioritarias de investigación, esto con el fin de conocer las amenazas a la flora y fauna de nuestro país, estar acorde con la percepción de un país ecológico y contribuir para alcanzar la meta de la carbono neutralidad para el 2021.

A la comunidad científica costarricense: realizar estudios de estimación poblacional y diversidad, comportamiento y reproducción de los octocorales del Caribe y ampliar la investigación a otros posibles agentes infecciosos o toxicológicos que podrían comprometer el estado de salud de estos animales y su ecosistema.

Al Gobierno de Costa Rica: implementar leyes para el tratamiento de aguas residuales a nivel nacional, para disminuir el impacto que estas tienen sobre la vida silvestre y Salud Pública. Reforzar los recursos económicos y humanos en las Áreas de Conservación y en la Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad con la finalidad de asegurar la conservación y protección de la vida silvestre.

A la Escuelas de Medicina Veterinaria, Biología, Microbiología, Farmacia, Medicina y Química de las Universidades: coordinar proyectos de investigación multidisciplinarios para el estudio integral de factores bióticos y abióticos, agentes infecciosos y tóxicos, que pueden estar afectando la fauna considerando no solo las que impliquen un efecto sobre la Salud Pública.

Bibliografía

- AIDA (2012). *Los Arrecifes de coral en Costa Rica: valor económico, amenazas y compromisos legales internacionales que obligan a protegerlos*. San José, Costa Rica: Asociación Interamericana para la Defensa del Ambiente. 36 p.
- Ainsworth T.D., & Gates R.D. (2016). Corals' microbial sentinels. The coral microbiome will be key to future reef health. *Science*, 352(6253), 518-519. doi: 10.1126/science.aad9957
- Alker A.P., Smith G.W., & Kim K. (2001). Characterization of *Aspergillus sydowii* (Thom et Church), a fungal pathogen of Caribbean sea corals. *Hydrobiologia*, 460, 105-111.
- Alker A.P., Kim K., Dube D.H., & Harvell C.D. (2004). Localized induction of generalized response against multiple biotic agents in Caribbean sea fans. *Coral Reefs*, 23, 397–405. doi 10.1007/s00338-004-0405-y
- Alvarado-Barrientos J.J. (2006). *Factores físico-químicos y biológicos que median en el desarrollo de los arrecifes y comunidades coralinas del Parque Nacional Marino Ballena, Pacífico Sur, Costa Rica*. Tesis de Maestría en Biología, Universidad de Costa Rica, San Pedro, Costa Rica.
- Alvarado J.J., Fernández C., & Nielsen V. (2006). Arrecifes y comunidades coralinas. En: V. Nielsen-Muñoz, M.A. Quesada-Alpizar (Eds). *Informe Técnico. Ambientes Marino Costeros de Costa Rica* (pp. 51-67). San José:

Comisión Interdisciplinaria Marino Costera de la zona económica exclusiva de Costa Rica.

Beakes G.W., Honda D., & Thines M. (2014). Systematics of the Straminipila: Labyrinthulomycota, Hypochytriomycota, and Oomycota. In: D.J. McLaughlin & J.W. Spatafora. (Eds). *Systematics and evolution. The Mycota VII, part A* (pp. 39-97). Berlín, Alemania: Springer-Verlag.

Bartley R., Bainbridge Z.T., Lewis S.E., Kroon F.J., Wilkinson S.N., Brodie J.E., & Silburne D.M. (2014). Relating sediment impacts on coral reefs to watershed sources, processes and management: a review. *Science of the Total Environment*, 468–469, 1138–1153.

Bayer F.M., & Macintyre I.G. (2001). The mineral component of the axis and holdfast of some gorgonacean octocorals (Coelenterata: Anthozoa), with special reference to the family Gorgoniidae. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 114(1), 309-345.

Bernecker A. (2009). Species List 2.1: Marine benthic algae and Cyanobacteria reported from the Caribbean coast of Costa Rica. In: I.S. Wehrtmann & J. Cortés (Eds). *Marine Biodiversity of Costa Rica, Central America* (pp. 17-52). Berlín, Alemania: Springer Science + Business Media B.V.

Bourne D.G., Garren M., Work T.M., Rosenberg E., Smith G.W. & Harvell C.D. (2009). Microbial disease and the coral holobiont. *Trends in Microbiology*, 17(12), 554-562. doi:10.1016/j.tim.2009.09.004

- Brazeau D.A., & Lasker H.R. (1989). The reproductive cycle and spawning in a Caribbean gorgonian. *The Biological Bulletin*, 176, 1-7.
- Breedy O. (2009). Octocorals. *In*: I.S. Wehrtmann & J. Cortés (Eds). *Marine Biodiversity of Costa Rica, Central America*. (pp. 161-167). Berlín, Alemania: Springer Science + Business Media B.V.
- Bruno J.F., Petes L.E., Harvell C.D., & Hettinger A. (2003). Nutrient enrichment can increase the severity of coral diseases. *Ecology Letters*, 6, 1056-1061. doi: 10.1046/j.1461-0248.2003.00544.x
- Brusca R.C., & Brusca G.J. (2005). Filo Cnidarios (Cnidaria). *In*: R.C. Brusca & G.J. Brusca. *Invertebrados* (pp. 237-291). Madrid, España: McGraw-Hill Interamericana.
- Bubnova E.N., Grum-Grzhimaylo A., Konovalova O.P., & Marfenina O.E. (2014). Fifty years of mycological studies at the White Sea Biological Station of Moscow State University: challenges, results and outlook. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*, 69(1), 23-39.
- Burge C.A., Douglas N., Conti-Jerpe I., Weil E., Roberts S., Friedman C.S., & Harvell C.D. (2012). Friend or foe: the association of Labyrinthulomycetes with the Caribbean sea fan *Gorgonia ventalina*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 101, 1–12. doi: 10.3354/dao02487

- Burge C.A., Kim C.J.S., Lyles J.M. & Harvell C.D. (2013). Special Issue Oceans and Humans Health: The Ecology of Marine Opportunists. *Microbiology Ecology*, 65, 869–879. doi: 10.1007/s00248-013-0190-7
- Burge C.A., Eakin C.M., Friedman C.S., Froelich B., Hershberger P.K., Hofmann E.E. (...) & Harvell C.D. (2014). Climate Change influences on marine infectious diseases: Implications for management and society. *Annual Review of Marine Science*, 6, 249–277. doi: 10.1146/annurev-marine-010213-135029
- Caballero-George C., Bolaños J., Ochoa E., Carballo J.L., Cruz J.A., & Arnold E. (2010). Protocol to isolate sponge-associated fungi from tropical waters and an examination of their cardioprotective potencial. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 4(4), 881-899.
- Cabañes F.J., Alonso J.M., Castellá G., Alegre F., Domingo M., & Pont S. (1997). Cutaneous hyalohyphomycosis caused by *Fusarium solani* in a loggerhead sea turtle (*Caretta caretta* L.). *Journal of Clinical Microbiology*, 35(12), 3343-3345.
- Cesar H., Burke L., & Pet-Soede L. (2003). *The economics of worldwide coral reefs degradation*. 3rd ed. Arnhem: Cesar Environmental Economics Consulting. 23 p.
- Coma R., Ribes M., Zabala M., & Gili J.M. (1995). The reproduction and cycle of gonadal development in the Mediterranean gorgonian *Paramuricea clavata*. *Marine Ecology Progress Series*, 117, 173-183.

- Cooper T.F., Gilmour J.P., & Fabricius K.E. (2009). Bioindicators of changes in water quality on coral reefs: review and recommendations for monitoring programmes. *Coral Reefs*, 28, 589-606. doi: 10.1007/s00338-009-0512-x
- Correa A.M.S., Ainsworth T.D., Rosales S.M., Thurber A.R., Butler C.R., Vega-Thurber R.L. (2016). Viral outbreak in corals associated with an in situ bleaching event: atypical herpes-like viruses and a new megavirus infecting *Symbiodinium*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 127. doi: 10.3389/fmicb.2016.00127
- Cortés J., & León A. (2002). *Arrecifes coralinos del Caribe de Costa Rica*. Heredia, Costa Rica: Editorial INBio. 136 p.
- Cortés J., Jiménez C.E., Fonseca A.C., & Alvarado J.J. (2010). Status and conservation of coral reefs in Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 58(Suplemento1), 33-50.
- Couch C.S., Weil E, & Harvell C.D. (2013). Temporal dynamics and plasticity in the cellular immune response of the sea fan coral, *Gorgonia ventalina*. *Marine Biology*, 260, 2449-2460. doi: 10.1007/s00227-013-2240-6
- Crow G.L., Brock J.A, & Kaiser S. (1995). *Fusarium solani* fungal infection of the lateral line canal system in captive scalloped hammerhead sharks (*Sphyrna lewini*) in Hawaii. *Journal of Wildlife Diseases*, 31(4), 562-5. doi: 10.7589/0090-3558-31.4.562

- De Hoog G.S., Guarro J., Gené J., & Figueras M.J. (2014). *Atlas of clinical fungi: The ultimate bench tool for diagnostics*. On line version 4.0. The Netherlands, Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Ebel, R. (2012). Natural Products from marine-derived fungi. *In*: E.B. Gareth Jones, & Ka-Lai Pang. *Marine Fungi and fungal-like organisms* (pp. 411-440). Berlín, Alemania: De Gruyter.
- Ein-Gil N., Ilan M., Carmeli S., Smith G.W., Pawlik J.R., & Yarden O. (2009). Presence of *Aspergillus sydowii*, a pathogen of gorgonian sea fans in the marine sponge *Spongia obscura*. *ISME Journal*, 3, 752-755. doi: 10.1038/ismej.2009.18
- Ellner S.P., Jones L.E., Mydlarz L.D., & Harvell C.D. (2007). Within-host disease ecology in the sea fan *Gorgonia ventalina*: modeling the spatial immune dynamics of a coral-pathogen interaction. *The American Naturalist*, 170(6), 143-161. doi: 10.1086/522841
- Fabry V.J., Seibel B.A., Feely R.A., & Orr J.C. (2008). Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. *ICES Journal of Marine Science*, 65, 414–432.
- Fell J.W. (2012). Yeast in marine environments. *In*: E.B. Gareth Jones, & Ka-Lai Pang. *Marine Fungi and fungal-like organisms* (pp. 91-102). Berlín, Alemania: De Gruyter.

- Fernández C., & Alvarado J.J. (2004). El arrecife coralino de Punta Cocles, costa Caribe de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 52(2), 121-129.
- Fonseca A.C. (2003). A rapid assessment at Cahuita National Park, Costa Rica, 1999. (Part I: stony corals and algae). *Atoll Research Bulletin*, 496, 248-257.
- Galloway S.B., Woodley C.M., McLaughlin S.M., Work T.M., Bochsler V.S., Meteyer C.U., (...), & Reynolds T.L. (2006). Coral disease and health workshop: Coral Histopathology II. United States, Silver Spring: NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 56 and NOAA Technical Memorandum CRCP 4. National Oceanic and Atmospheric Administration. 84 p.
- Geiser D.M., Ritchie K.B., & Smith G.W. (1998). Cause of sea fan death in the West Indies. *Nature*, 394, 137-138.
- Gil-Agudelo D.L., Myers C., Smith G.W., & Kim K. (2006). Changes in the microbial communities associated with *Gorgonia ventalina* during aspergillosis infection. *Diseases of Aquatic Organisms*, 69, 89-94.
- Gil-Agudelo D.L., Navas-Camacho R., Rodríguez-Ramírez A., Reyes-Nivia M.C., Bejarano S., Garzón-Ferreira J., & Smith G.W. (2009). Enfermedades coralinas y su investigación en los arrecifes colombianos. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, 38(2), 189-224.
- Glas N.L., & Donaldson G.C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied Environmental Microbiology*, 61, 1323-1330.

- Glasl B., Herndl G.J., & Frade P.R. (2016). The microbiome of coral surface mucus has a key role in mediating holobiont health and survival upon disturbance. *The ISME Journal*, 10, 2280-2292. doi:10.1038/ismej.2016.9
- Gomes P.B, Lira A.K.F., Naud J.P., Santos A.M., & Pérez C.D. 2012. Prey selectivity of the octocoral *Carijoa riisei* at Pernambuco, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 84(1), 157-164.
- Guzmán H.M., & Cortés J. (1984). Mortandad de *Gorgonia flabellum* Linnaeus (Octocorallia: Gorgoniidae) en la costa Caribe de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 32(2), 305-308.
- Guzmán H.M., & Cortés J. (2001). Changes in reef community structure after fifteen years of natural disturbances in the eastern Pacific (Costa Rica). *Bulletin of Marine Science*, 69(1), 133-149.
- Guzmán H.M., & Cortés J. (2007). Reef recovery 20 years after the 1982-83 El Niño massive mortality. *Marine Biology*, 151, 401-411.
- Harvell D.C., Kim K., Burkholder J.M., Colwell R.R., Epstein P.R., Grimes D.J., (...), & Vasta G.R. (1999). Emerging marine diseases –climate links and anthropogenic factors. *Science*, 285, 1505-1510. doi: 10.1126/science.285.5433.1505
- Harvell D.C., Aronson R., Baron N., Connell J., Dobson A., Ellner S., (...), & Ward J. (2004). The rising tide of ocean diseases: unsolved problems and research priorities. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2(7), 375-382.

- Harvell D.C., Jordán-Dahlgreen E., Merkel S., Rosenberg E., Raymundo L., Smith G., Weil E., & Willis B. (2007). Coral diseases, environmental drivers, and the balance between coral and microbial associates. *Oceanography*, 20(1), 172-195.
- Harvell D.C., Altizer S, Cattadori I.M., Harrington L., & Weil E. (2009). Climate change and wildlife diseases: When does the host matter the most? *Ecology* 90 (4), 912–920.
- Hatai K. (2012). Diseases of fish and shellfish caused by marine fungi. In: C. Raghukumar (Ed.). *Biology of marine fungi, Progress in Molecular and Subcellular Biology* 53 (pp. 15-52). Berlín, Alemania: Springer-Verlag. doi: 10.1007/978-3-642-23342-5_2
- Hernández-Muñoz D., Alcolado P.M., & Hernández-González M. (2008). Efectos de un emisario submarino de aguas "residuales" urbanas sobre comunidades de octocorales (Octocorallia: Alcyonacea) en Cuba. *Revista de Biología Tropical*, 56, 65-75.
- Hewson I., Brown J.M., Burge C.A., Couch C.S., LaBarre B.A., Mouchka M.E., Naito M., & Harvell C.D. (2012). Description of viral assemblages associated with the *Gorgonia ventalina* holobiont. *Coral Reefs*, 31, 487-491. doi: 10.1007/s00338-011-0864-x
- Jones E.B.G. (2000). Marine fungi: some factors influencing biodiversity. *Fungal Diversity*, 4, 53-73.

- Jurjevik Z., Peterson S.W., & Horn B.W. (2012). *Aspergillus* section *Versicolores*: nine new species and multilocus DNA sequence based phylogeny. *IMA Fungus*, 3(1), 59-79. doi:10.5598/imafungus.2012.03.01.07
- Kim K., Alker A.P., Shuster K., Quirolo C., & Harvell C.D. (2006). Longitudinal study of aspergillosis in sea fan corals. *Diseases of Aquatic Organisms*, 69, 95-99.
- Koh L.L., Tan T.K., Chou L.M., & Goh N.K.C. (2000). Fungi associated with gorgonians in Singapore. *In*: M.K. Moosa, S. Soemodihardjo, A. Soegiarto, K. Romimohtarto, A. Nontji, S. Soekarno & Suharsono (Eds.). *Proceedings of the ninth International Coral Reef Symposium* (pp. 521-526). Bali, Indonesia.
- Lafferty K.D., Porter J.W., & Ford S.E. (2004). Are diseases increasing in the ocean? *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 35, 31-54. doi: 10.2307/annurev.ecolsys.35.021103.105704
- Langdon, C., & Atkinson M.J. (2005). Effect of elevated pCO₂ on photosynthesis and calcification of corals and interactions with seasonal change in temperature/irradiance and nutrient enrichment. *Journal of Geophysical Research*, 110, C09S07, doi: 10.1029/2004JC002576
- Larone D.H. (2011). *Medically important fungi: a guide to identification*. 5th ed. Washington, D.C.: ASM Press. 508 p.
- Mok T., Koehler A.P., Yu M.Y., Ellis D.H., Johnson P.J., & Wickham N.W.R. 1997. Fatal *Penicillium citrinum* pneumonia with pericarditis in a patient with acute

leukemia. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(10), 2654-2656. doi: 0095-1137/97/\$04.0010

Morera-Beita C., & Sandoval-Murillo L.F. (2012). Estructura del paisaje y desarrollo turístico en Cahuita, Talamanca. *Revista Geográfica de América Central*, 2(48), 169-196.

Mullen K.M., Peters E.C., & Harvell C.D. (2004). Coral resistance to disease. *In*: E. Rosenberg, & Y. Loya (Eds). *Coral Health and Disease* (pp. 377-399). Berlín, Alemania: Springer-Verlag. doi: 10.1007/978-3-662-06414-6_22

Mumby P.J., Flower J., Chollett I., Box S.J., Bozec Y.M., Fitzsimmons C., (...), & Williams S.M. (2014). *Towards Reef Resilience and Sustainable Livelihoods: A Handbook for Caribbean Coral Reef Managers*. Exeter, Gran Bretaña: University of Exeter. 172 p.

Muñoz-Simón N. (2012). Cianobacterias bentónicas marinas en el Caribe central y sur de Costa Rica. *Revista de Ciencias del Mar y Costeras*, 4, 13-32.

Mydlarz L.D., Jones L.E., & Harvell C.D. (2006). Innate immunity, environmental drivers and disease ecology of marine and freshwater invertebrates. *The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37, 251–288. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110103

Mydlarz L.D., & Harvell C.D. (2007). Peroxidase activity and inducibility in the sea fan coral exposed to a fungal pathogen. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 146(1), 54-62. doi: 10.1016/j.cbpa.2006.09.005

- Nagelkerken I., Buchan K., Smith G.W., Bonair K., Bush P., Garzón-Ferreira J., (...), & Yoshioka P. (1997). Widespread disease in Caribbean sea fans: II. Patterns of infection and tissue loss. *Marine Ecology Progress Series*, 160, 255-263.
- Oh D.C., Jensen P.R., & Fenical W. (2006). Zygosporamide, a cytotoxic cyclic depsipeptide from the marine-derived fungus *Zygosporium masonii*. *Tetrahedron Letters*, 47, 8625-8628. doi: 10.1016/j.tetlet.2006.08.113
- Peters E.C. Coral histotechniques. Assistant Professor. Environmental Science & Policy. George Mason University. USA. Correo electrónico 30 julio 2014.
- Petes L.E., Harvell C.D., Peters E.C., Webb M.A.H, & Mullen K.M. (2003). Pathogens compromise reproduction and induce melanization in Caribbean sea fans. *Marine Ecology Progress Series*, 264,167-171.
- Phillot A.D., Parmenter C.J., & McKillup S.C. (2006). Calcium depletion of eggshell after fungal invasion of sea turtle eggs. *Chelonian Conservation Biology*, 5(1), 146-149.
- Pollock F.J., Morris P.J., Willis B.L., & Bourne D.G. (2011). The urgent need for robust coral disease diagnostics. *PLoS Pathology*, 7, e1002183. doi: 10.1371/journal.ppat.1002183
- Polson S.W., Higgins J.L., & Woodley C.M. (2008). PCR-based assay for detection of four coral pathogens. *Proceedings of the 11th International Coral Reef Symposium* (pp. 247-251). United States, Ft. Lauderdale.

- 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. *Marine Biology*, 136, 19-27.
- Ramos-Flores, T. (1983). Lower marine fungus associated with black line disease in star corals (*Montastrea annularis*, E. & S.). *Biology Bulletin*, 165, 429-435.
- Raghukumar C., & Ravindran J. (2012). Fungi and their role in corals and coral reef ecosystems. In: C. Raghukumar (Ed.). *Biology of marine fungi, Progress in Molecular and Subcellular Biology* 53 (pp. 89-113). Berlín, Alemania: Springer-Verlag. doi: 10.1007/978-3-642-23342-5_5
- Raymundo L., Work T., Bruckner A., & Willis B. (2008). A decision tree for describing coral lesions in the field. In: L.J. Raymundo, C.S. Couch & C.D. Harvell. (Eds). *Coral disease handbook guidelines for assessment, monitoring & management* (pp. 17-32). Melbourne, Australia: Currie Communications.
- Richardson L. (2004). Black Band Disease. In: E. Rosenberg, & Y. Loya (Eds). *Coral Health and Disease* (pp. 325-336). Berlín, Alemania: Springer-Verlag. doi: 10.1007/978-3-662-06414-6_18
- Rosenberg E., & Ben-Haim Y. (2002). Microbial diseases of corals and global warming. *Environmental Microbiology*, 4(6), 318-326.
- Rypien K.L., Andras J.P., & Harvell C.D. (2008). Global panmitic population structure in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus sydowii*. *Molecular Ecology*, 17, 4068-4078. doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03894.x

- Rypien K.L., & Barker, D.M. (2009). Isotopic labeling and antifungal resistance as tracers of gut passage of the sea fan pathogen *Aspergillus sydowii*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 86, 1-7. doi: 10.3354/dao02106
- Rivest E.B., Barker D.M., Rypien K.L., & Harvell C.D. (2010). Nitrogen source preference of *Aspergillus sydowii*, an infective agent associated with aspergillosis of sea fan corals. *Limnology and Oceanography*, 55(1), 386-392.
- Samson R.A., Houbraken J., Thrane U., Frisvad J.C., & Andersen B. (2010). *CBS Laboratory Manual Series: Food and Indoor Fungi*. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. 390 p.
- Samuel P., & Prabakaran P. (2011). Biodiversity of marine fungi recorded from Adirampattinam coastal environs, South East Coast of Tamilnadu. *World Journal of Science and Technology*, 1(5), 78-82.
- Sánchez J.A., & Wirshing H.H. (2005). A field key to the identification of tropical western Atlantic zooxanthellate octocorals (Octocorallia: Cnidaria). *Caribbean Journal of Science*, 41(3), 508-522.
- Sarma V.V. (2012). Diversity and distribution of marine fungi on *Rhizophora* spp. In mangroves. In: C. Raghukumar (Ed.). *Biology of marine fungi, Progress in Molecular and Subcellular Biology* 53 (pp. 243-275). Berlín, Alemania: Springer-Verlag. doi: 10.1007/978-3-642-23342-5_13
- Sarmiento-Ramírez J.M., Abella E., Martín M.P., Tellería M.T., López-Jurado L.F., Marco A., & Diéguez-Urbeondo J. (2010). *Fusarium solani* is responsible for

mass mortalities in nests of loggerhead sea turtle, *Caretta caretta*, in Boavista, Cape Verde. *FEMS Microbiology Letters*, 312, 192–200. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02116.x

Shinn E.A., Smith G.W., Prospero J.M., Betzer P., Hayes M.L., Garrison V., & Barber R.T. (2000). African dust and the demise of Caribbean coral reefs. *Geophysical Research Letters*, 27(19), 3029-3032.

Sistema Nacional de Áreas de Conservación de Costa Rica (s.f.). *Área de Conservación La Amistad Caribe (ACLAC)*. Recuperado el 16 de noviembre de 2016 de: <http://www.sinac.go.cr/ES/ac/aclac/Paginas/default.aspx>

Smith G.W., Ives L.D., Nagelkerken I.A., & Ritchie K.B. (1996). Caribbean sea-fan mortalities. *Nature*, 383, 487.

Smith G.W., & Weil E. (2004). Aspergillosis of gorgonians. *In*: E. Rosenberg, & Y. Loya (Eds). *Coral Health and Disease* (pp. 279-287). Berlín, Alemania: Springer-Verlag. doi: 10.1007/978-3-662-06414-6_15

Smith G.W. (2013). Aspergillosis of *Pseudopterogorgia americana*: increased host range of *Aspergillus sydowii* from the Wider Caribbean. *Journal of the South Carolina Academy of Science*, 11(1), 27-35.

Spalding M., Ravilious C., & Green E. (2001). *World Atlas of Coral Reefs*. United States, Berkeley: University of California Press.

- Sutherland K.P., Porter J.W., & Torres C. (2004). Disease and immunity in Caribbean and Indo-Pacific zooxanthellate corals. *Marine Ecology Progress Series*, 266, 273-302.
- Toledo-Hernández C., Bones-González A., Ortiz-Vázquez O.E., Sabat A.M., & Bayman P. (2007). Fungi in the sea fan *Gorgonia ventalina*: diversity and sampling strategies. *Coral Reefs*, 26, 725–730.
- Toledo-Hernández C., Zuluaga-Montero A., Bones-González A., Rodríguez J.A., Sabat A.M., & Bayman P. (2008). Fungi in healthy and diseases sea fans (*Gorgonia ventalina*): is *Aspergillus sydowii* always the pathogen? *Coral Reefs* 27, 707-714.
- Toledo-Hernández C., & Ruiz-Diaz C.P. (2014). The immune responses of the coral. *Invertebrate Survival Journal*, 11, 319-328.
- Trowbridge C.D. (1998). Ecology of the green macroalga *Codium fragile* (Suringar) Harriot 1889: invasive and non-invasive subspecies. In: A. Ansel, M. Barnes, & R.N. Gibson (Eds.). *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*. Vol. 36 (pp. 1-64). London, United Kingdom: UCL Press.
- Ulken A., Viquez R., Valiente C., & Campos M. (1990). Marine fungi (Chytridiomycetes and Thraustochytriales) from a mangrove area at Punta Morales, Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 38(2), 243-250.

- Vanreusel A., Fonseca G., Danovaro R., Da Silva M.C., Esteves A.M., Ferrero T., Gad G., (...), & Galleron J. (2010). The contribution of deep-sea macrohabitat heterogeneity to global nematode diversity. *Marine Ecology*, 31, 6–20. doi:10.1111/j.1439-0485.2009.00352.x
- Vasuki S., Ganesan M., & Subba-Rao P.V. (2001). Effect of light intensity, photoperiod, ESP medium and nitrogen sources on growth of marine brown alga *Padina boergesenii* (Dictyotales, Phaeophyta). *Indian Journal of Marine Sciences*, 30(4), 228-231.
- Ward J.R., & Lafferty K.D. (2004). The elusive baseline of marine disease: are diseases in ocean ecosystems increasing? *PLoS Biology*, 2(4), 542-547.
- Weir-Brush J.R., Garrison V.H., Smith G.W., & Shinn E.A. (2004). The relationship between gorgonian coral (Cnidaria: Gorgonacea) diseases and African dust storms. *Aerobiologia*, 20, 119-126.
- Wernberg T., Russell B.D., Moore P.J., Ling S.D., Smale D.A., Campbell A., Coleman M.A., Steinberg P.D., Kendrick G.A., & Connell S.D. (2011). Impacts of climate change in a global hotspot for temperate marine biodiversity and ocean warming. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 400, 7-16. doi:10.1016/j.jembe.2011.02.021
- Whitton S.R., McKenzie E.H.C., & Hyde K.D. (2003). Microfungi on the Pandanaceae: *Zygosporium*, a review of the genus and two new species. *Fungal Diversity*, 12, 207-222.

Work T.M., & Aeby G.S. (2006). Systematically describing gross lesions in corals. *Diseases of Aquatic Organisms*, 70, 155-160.

Work T.M., Richardson L.L., Reynolds T.L., & Willis B.L. (2008). Biomedical and veterinary science can increase our understanding of coral disease. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 362, 63-70.

Work T., & Meteyer C. (2014). To understand coral disease, look at coral cells. *EcoHealth*, 11(4), 610-618. doi: 10.1007/s10393-014-0931-1

Yarden O., Ainsworth T.D., Roff G., Leggat W., Fine M., & Hoegh-Guldberg O. (2007). Increased prevalence of ubiquitous ascomycetes in a acropoid coral (*Acropora formosa*) exhibiting symptoms of brown band syndrome and skeletal eroding band disease. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(8), 2755-2557. doi: 10.1128/AEM.02738-06

Zhang X.Y., Zhang Y., Xu X.Y., & Qi S.H. (2013). Diverse deep-sea fungi from the South China Sea and their antimicrobial activity. *Currents in Microbiology*, 67, 525–530.

Anexos

Anexo 1. Promedios mensuales de datos climáticos periodo 2005-2015, estación Puerto Vargas. Fuente Instituto Meteorológico Nacional.

INSTITUTO METEOROLOGICO NACIONAL
DEPARTAMENTO DE INFORMACION
PROMEDIOS MENSUALES DE DATOS CLIMATICOS
(estaciones mecánicas)

ESTACION : 85 6 PUERTO VARGAS, LIMON		Latitud: 09 ° 43 ' N Longitud: 82 ° 48 ' O Altitud. 3 m.s.n.m													
Elementos	Periodos	Ene.	Feb.	Mar.	Abr.	May.	Jun.	Jul.	Ago.	Set.	Oct.	Nov.	Dic.	Prom.	Total
LLUVIA	1994 2015	283.7	256.2	204.4	237.7	369.9	284.8	411.5	296.9	161.8	181.4	341.3	392.6	285.2	3422.2
TEM.MAX.	1997 1997										29.1			29.1	
TEM.MIN.	1997 1997										23.3			23.3	
TEM.MED.	1997 1997										26.2			26.2	
VIENTO DIR. PREDOMINANTE															
Promedio dias con lluvia >= 0.1 mm.		19	16	18	16	19	20	23	19	15	17	21	20	223.4	Total.

Lluvia en milímetros: 1mm = 1 litro de agua por m². Radiación Solar global en Megajulios(MJ/m²)
 Temperatura en Grados Celsius (°C). Evaporación en mm. Viento en km/h. Humedad Relativa en Porcentaje (%).
 VIENTO DIR PREDOM : 1 Norte, 2 Noreste, 3 Este, 4 Sureste, 5 Sur, 6 Suroeste, 7 Oeste, 8 Noreste, 9 Variable
 Brillo Solar en horas y décimas de horas.

Anexo 2. Promedios mensuales de datos climáticos periodo 2005-2015, estación Manzanillo. Fuente Instituto Meteorológico Nacional.

**INSTITUTO METEOROLOGICO NACIONAL
DEPARTAMENTO DE INFORMACION
PROMEDIOS MENSUALES DE DATOS CLIMATICOS
(estaciones automáticas)**

ESTACION: 85 23 MANZANILLO			Latitud: 09 ° 37 ' N Longitud: 82 ° 39 ' O Altitud. 80 m.s.n.m													
Elementos	Períodos		Ene.	Feb.	Mar.	Abr.	May.	Jun.	Jul.	Ago.	Set.	Oct.	Nov.	Dic.	Prom.	Total
LLUVIA	2005	2015	227.4	217.9	212.9	177.6	268.9	198.5	343.4	205.6	135.9	129.9	273.1	321.1	226.0	2712.2
TEM.MAX.	2005	2015	29.2	29.9	30.3	31.3	31.7	31.7	30.6	31.0	31.4	31.4	29.3	28.9	30.6	
TEM.MIN.	2005	2015	21.2	21.3	21.7	22.7	23.3	23.5	23.2	23.1	23.1	23.1	22.5	21.7	22.5	
TEM.MED.	2005	2015	25.2	25.6	26.0	27.0	27.5	27.6	26.9	27.1	27.2	27.2	25.9	25.3	26.5	
HUMEDAD	2005	2015	86.9	85.2	84.1	84.9	85.7	85.6	87.2	85.9	85.1	85.5	87.3	87.2	85.9	
VIENTO VEL.	2005	2015	2.0	2.0	1.9	1.8	1.7	1.7	1.9	1.8	1.8	1.9	2.5	2.3	1.9	
RADIACION	2005	2015	8.7	10.8	12.8	12.0	14.2	13.3	12.1	13.1	15.1	11.5	9.9	8.9	11.9	
VIENTO DIR. PREDOMINANTE			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
Promedio días con lluvia >= 0.1 mm.			19	19	17	15	19	18	24	20	17	18	21	21	226	Total

Lluvia en milímetros: 1mm = 1 litro de agua por m². Radiación Solar global en Megajulios(MJ/m²)
 Temperatura en Grados Celsius (°C). Evaporación en mm. Viento en km/h. Humedad Relativa en Porcentaje (%).
 VIENTO DIR PREDOM : 1 Norte, 2 Noreste , 3 Este, 4 Sureste, 5 Sur, 6 Suroeste, 7 Oeste, 8 Noreste, 9 Variable
 Brillo Solar en horas y décimas de horas. Presión hPa.