



## **Recomposição da comunidade de zooxantelas simbiotes do hidrocoral *Millepora alcicornis* após um evento de anomalia térmica**

Inscrição para o processo seletivo de bolsa modalidade **doutorado**

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva - PPGBBE  
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

### **Candidata:**

Amana Guedes Garrido

Mestre em Zoologia (UFRJ)

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5444553544671809>

Laboratório de Biodiversidade de Cnidaria - NUPEM / UFRJ

Núcleo em Ecologia e Desenvolvimento Ambiental de Macaé - UFRJ

### **Orientadora:**

Carla Zilberberg

Doutora em Genética (UFRJ)

Professora Associada I, Dedicção Exclusiva

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/4852986852697885>

Laboratório de Biodiversidade de Cnidaria - NUPEM / UFRJ

Núcleo em Ecologia e Desenvolvimento Ambiental de Macaé - UFRJ

## 1. Introdução e Justificativa

O aquecimento dos oceanos tem levado a um aumento das pesquisas sobre a suscetibilidade dos organismos a variações de temperatura. Nesse contexto, corais recifais e seus simbiontes (conjunto chamado de holobionte) têm recebido especial atenção devido à sua importância ecológica e sensibilidade a anomalias térmicas (Hoegh-Guldberg et al. 2007, Oliver & Palumbi 2011). Corais construtores de recifes de águas rasas possuem dinoflagelados fotossintetizantes simbiontes (zooxantelas) responsáveis por fornecer até 90% da energia necessária para suas funções biológicas. Esta simbiose acelera as taxas de crescimento do coral e favorece a formação de recifes, entretanto, ela pode ser facilmente rompida durante eventos de estresse (Stanley 2006), com a expulsão das zooxantelas pelo hospedeiro (Hoegh-Guldberg et al. 2007). Quando estressados, os corais perdem as zooxantelas e seu tecido fica transparente, tornando visível a cor branca do esqueleto de carbonato de cálcio. Esse processo é conhecido como branqueamento e pode levar os corais à morte dependendo da intensidade e duração do estresse (Stanley 2006). Devido à grande importância das zooxantelas na manutenção de saúde dos corais e conseqüentemente dos recifes coralíneos, diversos estudos têm explorado a ecologia e a diversidade molecular desses simbiontes (Oliver & Palumbi 2011).

Eventos de branqueamento podem ocorrer em resposta a uma série de variáveis químicas e biológicas, entretanto, o aumento da temperatura da água do mar é a principal causa de branqueamentos pontuais ou em massa (Brown 1997). A exposição a anomalias térmicas de apenas 1-2 °C acima da média de temperaturas máximas de verão pode levar ao rompimento da simbiose entre corais e zooxantelas, e longos períodos de exposição ao estresse podem resultar na mortalidade dos corais, levando grandes extensões recifais ao declínio simultaneamente (revisado por Brown 1997, Hoegh-Guldberg et al. 2007, Hoegh-Guldberg & Bruno 2010, Hughes et al. 2017).

As previsões realizadas pelo IPCC (sigla em inglês para Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas) sugerem, nos cenários mais extremos, que a temperatura global aumentará entre 2,4 e 6,4 °C até 2050 (IPCC 2007, 2013). De acordo com estas projeções, comunidades recifais dominadas por corais, como as atuais, se tornarão raras até a metade do século XXI (Hoegh-Guldberg & Bruno 2010). Atualmente, a ocorrência de eventos de branqueamento global em massa cada vez mais frequentes, extensos e severos já tem sido relatada (Hughes et al. 2017), assim como foi projetado no início da

década (Hoegh-Guldberg & Bruno 2010). No Brasil, o mesmo fenômeno têm sido observado, com registros de branqueamento ocorrendo desde a década de 1990 e se tornando também mais frequentes e abrangentes (revisado por Lisboa et al. 2018).

No primeiro semestre de 2018, a NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration) publicou um alerta de El Niño para o verão de 2018-2019, e esta previsão foi novamente confirmada em 4 de agosto, com probabilidade de ~70% de que o fenômeno climático ocorra no próximo verão (El Niño Watch: [http://www.cpc.ncep.noaa.gov/products/analysis\\_monitoring/enso\\_advisory/](http://www.cpc.ncep.noaa.gov/products/analysis_monitoring/enso_advisory/)). Segundo Lisboa e colaboradores (2018), os eventos de El Niño estão fortemente relacionados com anomalias térmicas positivas no Atlântico Sul, sugerindo um novo alerta de branqueamento para os corais brasileiros. Este alerta corrobora as previsões do IPCC para o meio do século (IPCC 2007, 2013), acentua as projeções de declínio dos recifes de coral (Hoegh-Guldberg & Bruno 2010) e confirma a observação de Hughes e colaboradores (2017) de eventos de branqueamento cada vez mais frequentes.

Frente às previsões alarmantes, têm-se buscado entender a dinâmica e diversidade das associações simbióticas entre corais e zooxantelas. Atualmente são reconhecidas nove linhagens principais de zooxantelas, anteriormente denominadas “clados” e recentemente alocadas em gêneros distintos, pertencentes à família Symbiodiniaceae (LaJeunesse et al. 2018). Dentro de cada gênero existe ainda uma alta diversidade de linhagens, algumas já descritas como espécies e outras ainda reconhecidas por denominação alfa-numérica (subtipos ou subclados). Quando em simbiose, as zooxantelas perdem seus caracteres taxonômicos típicos, e as linhagens são diferenciadas por análises moleculares (Baker 2003). É conhecido que essas linhagens apresentam diferenças fisiológicas marcantes, sendo umas mais tolerantes a estresses ambientais do que outras, e podem assegurar a sobrevivência dos hospedeiros em situações adversas (Baker 2003). Algumas espécies de corais podem se associar a zooxantelas distintas, dependendo das condições ambientais, e, nesses casos, a dinâmica da comunidade simbiote pode desempenhar um importante papel na adaptação térmica do holobionte (Oliver & Palumbi 2011).

Acredita-se que a reorganização da comunidade simbiote, pela alteração dos tipos de zooxantelas dominantes, pode ser um mecanismo pelo qual os corais seriam capazes de adaptar às mudanças climáticas (Rowan 2004). De acordo com a Hipótese do Branqueamento Adaptativo (Buddemeier & Fautin 1993, Ware et al. 1996), após a perda de simbiotes decorrente do branqueamento o coral hospedeiro é capaz de

adquirir tipos de zooxantelas mais resistentes à nova condição térmica do ambiente (Kinzie et al. 2001). Neste processo, a comunidade simbiote sofreria uma alteração de dominância, em relação à comunidade pré-branqueamento, e reestabeleceria o equilíbrio em uma nova comunidade pós-branqueamento (Kinzie et al. 2001).

*Millepora alcicornis* Linnaeus, 1758 é um hidrocoral zooxantelado, conhecido como coral-de-fogo, de ampla distribuição geográfica, comumente encontrado da Flórida (EUA) ao Rio de Janeiro (revisado por Pires et al. 2007). Os hidrocorais são cnidários pertencentes à Classe Hydrozoa que depositam um exoesqueleto calcário ramificado, similar ao construído pelos corais verdadeiros (da Classe Anthozoa, Ordem Scleractinia). O gênero *Millepora* Linnaeus, 1758 compreende as únicas espécies de corais ramificados encontrados no Brasil e desempenham um importante papel na manutenção da complexidade dos recifes brasileiros, sendo bastante comum nas bordas rasas dos recifes e em comunidades coralíneas (Laborel 1970, Castro & Pires 2001). A complexidade estrutural gerada pela forma ramificada desses organismos é responsável pela disponibilização de hábitat para diversos peixes e invertebrados marinhos, aumentando a biodiversidade do ambiente (Laborel 1970, Glynn 1993).

Diversos estudos mostraram que *M. alcicornis* é extremamente suscetível a eventos de branqueamento relacionados a elevação da temperatura do mar ou ao aumento da incidência luminosa (Cook et al. 1990, Banaszak et al. 2003). Frequentemente, os milleporídeos são os primeiros corais a apresentarem sintomas de branqueamento e de recuperação durante e após anomalias térmicas (Cook et al. 1990, Glynn 1993), indicando uma resposta rápida às mudanças ambientais. Entretanto, o fator responsável pela adaptabilidade de *Millepora* spp. não é conhecido, podendo partir do hospedeiro, resiliente ao aquecimento, ou a resiliência pode ser adquirida através da composição ou flexibilidade de sua comunidade de zooxantelas, ou ainda uma junção desses fatores.

O Brasil possui os únicos recifes de coral verdadeiros do Atlântico Sul, porém, poucos estudos buscaram compreender os padrões de associações entre corais e zooxantelas ao longo do seu litoral. Apenas na última década tiveram início os esforços em caracterizar as linhagens de zooxantelas presentes nos corais brasileiros (Costa et al. 2008, 2013; Monteiro et al. 2013; Silva-Lima et al. 2015; Picciani et al. 2017). Apesar de sua importância, abundância e suscetibilidade ao branqueamento, a dinâmica das associações hospedeiro-simbiontes para hidrocorais ainda é desconhecida, e pouco se sabe sobre suas respostas a anomalias térmicas. Acompanhar a evolução e os efeitos da

anomalia prevista para o verão de 2019 será de extrema importância para aprimorar previsões e subsidiar esforços de conservação para os ambientes coralíneos brasileiros.

Este projeto compreende um capítulo do projeto de tese da proponente, intitulado “Dinâmica das comunidades de dinoflagelados da família Symbiodiniaceae associados a corais recifais no Brasil e sua resposta aos efeitos de impactos locais e globais”. A tese tem o objetivo geral de acompanhar as variações temporais das comunidades de zooxantelas associadas a quatro espécies de coral, e avaliar os efeitos de fatores abióticos e impactos ambientais locais e globais na dinâmica das comunidades simbiotes e na saúde dos holobiontes, sendo estruturada em quatro capítulos:

**1 – Dinâmica das comunidades de zooxantelas associadas aos corais na Armação dos Búzios (RJ):** No qual estão sendo avaliados os efeitos de impactos locais e fatores ambientais (temperatura e sedimentação) na dinâmica sazonal (por 19 meses) das associações hospedeiro-simbiotes de quatro espécies de corais, inclusive *Millepora alcicornis*, em cinco locais na Armação dos Búzios, com diferentes níveis de pressão antrópica. (Financiado pelo Projeto Ecorais, apoiado pelo Funbio a partir do Projeto de Apoio à Pesquisa Marinha e Pesqueira no Rio de Janeiro)

**2 – Corais e zooxantelas em cenários de anomalia térmica e acidificação dos oceanos: avaliação das respostas fisiológicas e seu potencial de recuperação:** Neste capítulo serão avaliados os efeitos do aumento da temperatura e da acidificação (induzidos no Mesocosmo Marinho do Projeto Coral Vivo, em Arraial d’Ajuda, Porto Seguro, BA) sobre corais e zooxantelas, por meio do monitoramento da composição da comunidade simbiote, taxas de calcificação, atividade fotossintética, branqueamento e pós-recuperação de duas espécies de coral ao longo das anomalias. (Desenvolvido com o apoio do Projeto Coral Vivo, pelo Programa Petrobrás Ambiental)

**3 – Efeitos do aumento da temperatura da água do mar sobre corais e zooxantelas durante o El Niño de 2015-2016:** Durante este evento de El Niño duas espécies de coral foram monitorados em Porto Seguro, BA, buscando investigar os efeitos de anomalias térmicas naturais sobre estes holobiontes através do monitoramento da comunidade simbiote e de suas taxas de branqueamento e sobrevivência decorrentes do evento de branqueamento causado pelo fenômeno climático. (Desenvolvido com o apoio da Rede de Pesquisas Coral Vivo)

**4 – Recomposição da comunidade de zooxantelas simbiotes do hidrocoral *Millepora alcicornis* após um evento de anomalia térmica:** Descrito em detalhes na presente proposta.

Ao longo dessa abordagem será possível obter um panorama bastante completo dos efeitos de impactos em escala local e global sobre corais recifais, além de nos permitir compreender como progredem as diferentes etapas do processo de branqueamento, desde o surgimento dos primeiros sintomas até a recuperação do holobionte, e como a dinâmica da comunidade de zooxantelas está envolvida nesse processo. Nos três primeiros capítulos serão investigadas as variações sazonais naturais da comunidade simbiote e sua associação com impactos locais; e os efeitos das mudanças climáticas globais sobre o holobionte, por meio de anomalias induzidas e naturais. Entretanto, apesar de a recuperação do holobionte pós-estresse ter sido observada nos demais capítulos, o processo rápido de reestabelecimento da comunidade de zooxantelas permanece obscuro. O desenvolvimento do trabalho aqui proposto pretende preencher esta lacuna, concluindo a análise do processo completo de branqueamento dos corais.

## **2. Objetivos**

### Objetivo Geral:

Identificar e monitorar a dinâmica das linhagens de zooxantelas associadas ao hidrocoral *Millepora alcicornis* durante o processo de branqueamento e recuperação do holobionte ao longo de um período de anomalia térmica.

### Objetivos Específicos:

- Avaliar o efeito do El Niño previsto para o final do verão de 2018 sobre as colônias de *M. alcicornis* de duas localidades na Região dos Lagos (RJ): Armação dos Búzios e Arraial do Cabo.
- Monitorar as mudanças na composição e dominância da comunidade simbiote ao longo do processo de recolonização do tecido do hidrocoral pelas zooxantelas (em nível de subclado) até sua completa recuperação.
- Acompanhar as variações de coloração, densidade de zooxantelas e conteúdo de clorofila no tecido do hidrocoral desde o mês anterior à anomalia térmica até a total recuperação dos indivíduos.

### 3. Metodologia

#### *Área de Estudo:*

O presente projeto será desenvolvido em dois pontos da Região dos Lagos (RJ): o canto direito da Praia da Tartaruga, na Armação dos Búzios, e o costão da Praia dos Anjos, em Arraial do Cabo.

A Praia da Tartaruga foi um dos pontos monitorados pelo Projeto Ecorais – Saúde e Conservação dos Habitats Coralíneos da Armação dos Búzios, de dezembro de 2016 a junho de 2018, e neste, em relação aos demais, foi observada uma maior ocorrência de colônias branqueadas ao longo do período. Além disso, este ponto apresenta a maior cobertura de corais da região, está localizado em uma praia bastante frequentada por turistas e embarcações, e pertence a um do núcleos do Parque Natural dos Corais da Armação dos Búzios, uma unidade de conservação de proteção integral criada em 2009.

Arraial do Cabo também é contemplada por uma unidade de conservação, a Reserva Extrativista Marinha de Arraial do Cabo, criada em 1997. O costão da Praia dos Anjos está dentro dos limites da ResEx, e é uma região de intenso tráfego de embarcações e turistas. No final do verão de 2018, a equipe do Projeto Costão Rochoso de Arraial do Cabo (também apoiado pelo Funbio a partir do Projeto de Apoio à Pesquisa Marinha e Pesqueira no Rio de Janeiro) verificou um alto índice de branqueamento de *Millepora alcicornis* neste ponto, em maior intensidade do que no entorno.

As enseadas de Arraial do Cabo e da Armação dos Búzios foram descritas por Laborel (1970) como “Oásis Coralíneos”, devido à alta diversidade de corais confinados em enseadas circundadas por costões em mar aberto com fauna característica de águas frias. Esta região também é marcada por uma forte ressurgência sazonal, o que aumenta as amplitudes de variação de temperatura devido ao afloramento das águas mais profundas e frias (Palma & Matano 2009). Durante a ressurgência, que é comum no verão, a temperatura da água pode atingir os 12 °C (Valentin 2001), contrastando com os picos de 26-28 °C esperados durante o período de anomalia térmica.

#### *Monitoramento da saúde e da comunidade de zooxantelas de M. alcicornis:*

O estado de saúde e as zooxantelas associadas a *M. alcicornis* serão monitorados nos dois locais descritos acima a partir de fevereiro de 2019. A princípio serão realizadas campanhas mensais de monitoramento (preferencialmente na primeira semana do mês), com a coleta aleatória de amostras de 10 indivíduos em cada ponto para as análises

moleculares, de densidade de zooxantelas e quantificação do conteúdo de clorofila, além da obtenção de fotografias com escalas de cor para o acompanhamento imediato da saúde do coral. Sensores de luminosidade e temperatura serão instalados nos dois pontos monitorados, para acompanhar sua variação ao longo dos meses de amostragem.

Assim que forem observados sintomas de branqueamento (tecido pálido ou manchas descoradas), 10 colônias, sendo quatro saudáveis e seis branqueadas, serão marcadas para monitoramento, com vergalhões de aço fincados no substrato adjacente. A partir daí as campanhas passarão a ocorrer a cada 15 dias, possibilitando um acompanhamento próximo da evolução do evento. Ao surgirem os primeiros sinais de recuperação após o evento de branqueamento, serão feitas amostragens semanais até a recuperação completa da coloração original do hidrocoral, indicativo da recomposição da comunidade de zooxantelas simbiotes.

De acordo com as previsões da NOAA e com monitoramentos de branqueamento realizados pelas redes de pesquisa associadas e parceiras (Rede Coral Vivo, Projeto Ecorais e Projeto Costão Rochoso de Arraial do Cabo), é esperado que o evento de branqueamento ocorra entre março e abril de 2019. Sendo assim, os primeiros sinais de recuperação devem surgir por volta de maio e progredir até a recuperação completa das colônias em torno de junho de 2019. Isto resultará em cerca de 2 campanhas mensais (fevereiro e março), 3 campanhas quinzenais (março-2, abril-1, abril-2), 8 campanhas semanais (4 em maio e 4 em junho), totalizando 13 campanhas de coleta. Este desenho amostral resultará na coleta de 130 amostras, porém as datas previstas e o número final de campanhas e amostras dependem de como e quando ocorrerá o branqueamento.

Se o evento de El Niño previsto pela NOAA não ocorrer, e não for observado branqueamento até maio de 2019, as colônias serão branqueadas em laboratório e devolvidas ao ambiente para a recuperação. Para isso, 10 colônias serão coletadas, transportadas em caixas plásticas e mantidas em aquários com aeração e fluxo de água apropriados; quatro destas serão mantidas a 25 °C como controle e seis serão submetidas a 30 °C (quando geralmente ocorre branqueamento, Winter et al. 2016). As colônias serão devolvidas ao local em que foram coletadas, afixadas ao substrato com resina epoxi não-tóxica, e monitoradas como descrito acima, adequando-se as datas. Nesse caso, apenas um dos locais será utilizado (Armação dos Búzios ou Arraial do Cabo), devido a maior complexidade logística envolvida na manipulação de colônias.



*Coletas de dados e análises laboratoriais:*

As amostras serão coletadas por meio de mergulho livre em dupla. Para a fixação dos sensores e marcação das colônias será necessário o uso de equipamento de mergulho autônomo. Pequenos fragmentos de cerca de 2 cm<sup>2</sup> serão coletados e armazenados em nitrogênio líquido (a -196 °C) até a realização das análises moleculares e de densidade de zooxantelas e conteúdo de clorofila.

Para acessar a densidade de zooxantelas e o conteúdo relativo de clorofila no tecido dos corais, as amostras congeladas serão fixadas em formol 10% e descalcificadas em solução de ácido fórmico 5% e formol 10%. O tecido resultante será fotografado, para a mensuração da área amostrada, e homogeneizado em 6 mL de formol 2%. As zooxantelas presentes nessa solução serão contabilizadas por citometria de fluxo.

A extração do DNA genômico total será feita com um kit comercial (DNeasy Plant Mini Kit - Qiagen). Para a identificação das linhagens de zooxantelas, a região do espaçador interno transcrito 2 do DNA ribossomal (ITS2 rDNA) será amplificada via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). As amplificações serão quantificadas e purificadas para o sequenciamento de última geração (NGS) na plataforma Illumina MiSeq. As amostras e reagentes para o sequenciamento serão transportados em gelo seco (-78 °C) até o sequenciador. O NGS fornecerá um banco de sequências representativo das linhagens de zooxantelas associadas às amostras e possibilitará a análise e identificação e quantificação relativa de tipos dominantes e raros.

*Análises de dados:*

A densidade de zooxantelas e o conteúdo de clorofila obtidos pela citometria de fluxo serão padronizados por área de tecido, através da mensuração do fragmento no programa gratuito ImageJ (Schindelin et al. 2015). Análises de variância serão aplicadas para testar diferenças desses parâmetros entre colônias saudáveis e branqueadas ao longo do tempo. Possíveis relações com as variações de luminosidade e temperatura e a diversidade de zooxantelas serão buscadas por meio de análises de redundância (RDA). As análises serão feitas com os pacotes gratuitos “nlme” (Pinheiro et al. 2018) e “vegan” (Oksanen et al. 2018) no R (R 3.3.2 e RStudio 1.0.136; Rstudio Team 2015).

As sequências obtidas pelo NGS serão editadas, para a retirada de grampos e trechos de baixa qualidade, no programa Geneious. A qualidade dos dados será avaliada no programa gratuito FastQC, e as sequências serão mapeadas contra uma base de dados, composta por sequências de ITS2 de zooxantelas obtidas pelo Laboratório de

Biodiversidade de Cnidaria da UFRJ e sequências disponibilizadas pelo NCBI, no programa Geneious. Com as sequências mantidas para análise, serão calculadas as frequências relativas de cada linhagem de zooxantela presente nas amostras, que serão comparadas quanto à diversidade e composição da comunidade ao longo do tempo.

Reconstruções filogenéticas serão realizadas para verificar o grau de similaridade e as relações evolutivas entre os linhagens de zooxantelas encontradas. Para isso, as sequências obtidas serão alinhadas no programa gratuito MEGA 7 (Kumar et al. 2015) com sequências de ITS2 de zooxantelas do mesmo gênero indicado pelo mapeamento contra o banco de dados citato acima. Para a filogenia serão utilizados o método da Máxima Verossimilhança, na plataforma online PhyML (Guindon & Gascuel 2003) e análises Bayesianas, no programa gratuito MrBayes 3 (Ronquist & Huelsenbeck 2003).

#### **4. Atividades Previstas**

##### *Campanhas de coleta de dados:*

O projeto contará com cerca de 13 campanhas de monitoramento na Praia da Tartaruga, Armação dos Búzios, e no costão da Praia dos Anjos, Arraial do Cabo (RJ). Os dois locais serão sempre visitados em uma mesma campanha. A primeira campanha contará com dois dias de trabalho em cada ponto, totalizando 4 dias, e as demais campanhas contarão com dois dias de trabalho no total, um dia em cada ponto. Durante as campanhas duas pessoas realizarão as seguintes atividades:

- Instalação dos sensores de luminosidade e temperatura (primeira campanha);
- Refixação ou reposição dos sensores (quando necessário);
- Limpeza, manutenção e download dos dados dos sensores (todas as campanhas);
- Fotografias das colônias de *Millepora alcicornis* com um padrão de escala de cores, para caracterizar o estado de saúde dos hidrocorais (todas as campanhas);
- Coleta de amostras para análises moleculares, mensuração da densidade de zooxantelas e do conteúdo de clorofila (todas as campanhas);
- Marcação das colônias monitoradas (assim que observado branqueamento);
- Manutenção das marcações das colônias (sempre que necessário);
- Recolhimento dos sensores e marcações (última campanha).

Durante a primeira campanha, em fevereiro de 2019, serão instalados os sensores de luminosidade e temperatura e demarcadas as áreas de amostragem. Assim que os

primeiros sintomas de branqueamento forem observados, as colônias serão marcadas para o monitoramento, conforme descrito na metodologia. Três campanhas: a de instalação dos sensores, a de marcação das colônias e a de recolhimento dos sensores e marcações exigem o uso de equipamento de mergulho autônomo. As demais campanhas seguirão apenas com o monitoramento, amostragem e manutenção das marcações e sensores, atividades feitas por meio de mergulho livre.

*Atividades de laboratório:*

Conforme descrito anteriormente, as atividades de laboratório envolvem a preparação e mensuração das amostras no citômetro de fluxo, e a preparação e sequenciamento das amostras para a identificação da diversidade de zooxantelas por sequenciamento, e incluem as seguintes etapas:

- Análise da densidade de zooxantelas e conteúdo relativo de clorofila:

- Fixação das amostras em formol;
- Descalcificação e fotografias das amostras para mensuração da área de tecido;
- Homogeneização do tecido do coral em formol 2%;
- Aplicação e leitura das amostras no citômetro de fluxo;
- Cálculo da densidade de zooxantelas e do conteúdo de clorofila por área de tecido.

- Análise da composição da comunidade de zooxantelas simbiotes:

- Extração do DNA total das amostras destinadas à análise molecular;
- Purificação dos produtos da extração e amplificação do marcador ITS2 rDNA para a identificação das linhagens de zooxantelas presentes em cada amostra;
- Purificação dos produtos da amplificação, marcação e diluição das amostras para o sequenciamento de última geração (NGS);
- Envio por correio das amostras para o NGS e obtenção dos dados moleculares;
- Análises bioinformáticas dos bancos de sequências gerados pelo NGS.

Por fim, serão feitas as análises estatísticas dos dados moleculares, buscando diferenças entre composição, diversidade e riqueza da comunidade simbiote ao longo do monitoramento; da densidade de zooxantelas, do conteúdo de clorofila e dos índices de branqueamento, buscando caracterizar o estresse observado quanto a sua intensidade, duração e efeito em termos de perda de zooxantelas ou degradação de pigmentos fotossintéticos; e das variáveis ambientais, a fim de relacionar as possíveis variações biológicas observadas com as medidas de temperatura e luminosidade no período.

## 5. Infraestrutura física e tecnológica utilizada

Para as campanhas de coleta de dados será utilizado o carro particular da proponente. Cada campanha demandará dois dias de campo (exceto a primeira, que exigirá quatro dias) e a estadia será em Arraial do Cabo, na base do Laboratório de Ecologia de Ambientes Recifais (LECAR), da Universidade Federal Fluminense, coordenado pelo Prof. Carlos Eduardo Leite Ferreira, parceiro da presente proposta e também coordenador do Projeto Costão Rochoso de Arraial do Cabo. O equipamento de mergulho autônomo utilizado pertence ao Projeto Ecorais, coordenado pela Dr.<sup>a</sup> Simone Oigman Pszczol, do Instituto Brasileiro de Biodiversidade (BrBio), também parceira da presente proposta. O ponto de monitoramento na Armação dos Búzios é um costão próximo à praia, de modo que não será necessário alugar embarcação, esta será necessária apenas em Arraial do Cabo. Também serão alugados quatro cilindros de mergulho para cada uma das três campanhas com mergulho autônomo, em operadoras de mergulho da região. Assim que coletadas, as amostras serão armazenadas em um botijão de nitrogênio líquido, também cedido pelo “Projeto Ecorais”, o seu abastecimento será feito na UFRJ, disponibilizado pelo Centro de Ciências da Saúde.

As análises laboratoriais serão desenvolvidas no Laboratório de Biodiversidade de Cnidaria (LaBiCni) da UFRJ, coordenado pela Prof.<sup>a</sup> Carla Zilberberg. O laboratório, localizado no Núcleo em Ecologia e Desenvolvimento Ambiental de Macaé (NUPEM / UFRJ), conta com todos os equipamentos necessários às análises moleculares: micropipetas automáticas, centrífuga, banho térmico, termocicladores, refrigerador, geladeira, cubas de eletroforese, transiluminador ultravioleta, microondas e balança de precisão. O LaBiCni também possui a câmera fotográfica digital subaquática utilizada para a documentação das colônias. Após o retorno da campanha de coleta, as amostras serão transferidas do nitrogênio líquido para o ultra freezer (-80 °C) de uso comum do NUPEM, onde ficarão armazenadas até a realização das análises moleculares. O LaBiCni também conta com os recursos computacionais necessários às análises de dados, incluindo a licença do programa usado para as análises das sequências obtidas.

A análise de densidade de zooxantelas e conteúdo de clorofila serão realizadas em colaboração com o Laboratório de Fitoplâncton Marinho (FitoMar) da UFRJ, coordenado pelo Prof. Paulo Salomon, que possui um citômetro de fluxo. O sequenciamento será realizado em colaboração com o Laboratório de Genoma, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, coordenado pelo Prof. Rodolpho Albano.

## 6. Cronograma

	2019												2020		2021		2022
	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	1° Sem.	2° Sem.	1° Sem.	2° Sem.	Fev
<b>Atividades gerais PPG</b>																	
Revisão bibliográfica	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Disciplinas restantes PPGBBE		x						x									
Doutorado sanduíche													x	x			
Qualificação														x			
Redação da tese															x	x	
Defesa																	x
<b>Atividades de campo</b>																	
Coletas pré-branqueamento		x	x														
Marcação das colônias branqueadas			x														
Coletas branqueamento			x	x													
Coletas recuperação					x	x											
<b>Atividades de laboratório</b>																	
Análises das fotografias							x										
Citometria de fluxo							x										
Extração do DNA total							x	x									
Amplificação do ITS2 rDNA								x	x								
Sequenciamento										x	x						
Análise dos dados										x	x	x					
<b>Redação</b>																	
Relatoria campo e prestação de contas								x									
Relatoria final e prestação de contas													x				

## 7. Orçamento e estimativa de gastos

Orçamento da Pesquisa e Estimativa de Gastos							
Categoria de despesa	Descrição dos itens	Cedido p/ Instituição (Sim / Não)	Quantidade	Unidade	Valor Unitário (R\$)	Valor Total (R\$)	Previsão de gasto
Uso e consumo	Material para marcação das colônias (vergalhões, resina epoxi, braçadeiras, marreta, espátulas)	Não	1	unidade	400,00	<b>400,00</b>	Jan/2019
	Gelo seco (para transporte de reagentes e amostras)	Não	24	kg	16,00	<b>384,00</b>	Out-Nov/2019
	HotStar HiFidelity DNA Polymerase (1000U) (reagente para amplificação do ITS2)	Não	1	unidade	4.781,00	<b>4.781,00</b>	Ago/2019
	PhiX control v3 (reagente para o sequenciamento)	Não	1	unidade	805,00	<b>805,00</b>	Ago/2019
	MiSeq Reagent Nano kit, V2 (500 cycles) (reagente para o sequenciamento)	Não	2	kit	1.800,00	<b>3.600,00</b>	Set/2019
	Nextera XT Index Kit (96 ind., 384 samp.) (reagente para o sequenciamento)	Não	1	kit	5.050,00	<b>5.050,00</b>	Set/2019
	Manutenção de pipetas automáticas	Não	5	unidade	300,00	<b>1.500,00</b>	Jul/2019
	Plásticos para rotina de laboratório (tubos eppendorf, placas de 96 poços, criotubos, luvas, ponteiras para pipetas)	Não	1	unidade	2.038,00	<b>2.038,00</b>	Ago/2019
	DNeasy Plant Mini Kit (50) (kit para extração de DNA)	Não	3	kit	1.404,00	<b>4.212,00</b>	Jul/2019
	ProNex® Size-Selective Purification System (10ml) (kit para purificação de DNA)	Não	1	kit	1.190,00	<b>1.190,00</b>	Jul/2019
	Correios (envio de reagentes e amostras)	Não	2	pacote	80,00	<b>160,00</b>	Out-Nov2019
Serviço de Terceiros P. Física	Aluguel de embarcação (campanhas de Arraial do Cabo)	Não	13	dia	150,00	<b>1.950,00</b>	Fev-Jun/2019
Serviço de terceiros P. Jurídica	Aluguel de cilindros para mergulho autônomo	Não	12	unidade	45,00	<b>540,00</b>	Fev-Jun/2019
	Seguro de mergulho (DAN) (2 pessoas + 1 extra)	Não	3	ass. anual	290,00	<b>870,00</b>	Jan/2019
Viagens	Combustível	Não	400	litro	5,30	<b>2.120,00</b>	Fev-Jun/2019
	Pedágio	Não	13	campanha	50,00	<b>650,00</b>	Fev-Jun/2019
	Diária	Não	28	dia	250,00	<b>7.000,00</b>	Fev-Jun/2019
Equipamentos	Sensor de luminosidade e temperatura (+extras p/ reposição)	Não	5	unidade	550,00	<b>2.750,00</b>	Jan/2019
<b>TOTAL</b>						<b>40.000,00</b>	

## 8. Resultados Esperados e Impacto Previsto do Projeto

De acordo com as previsões de anomalias térmicas da NOAA para o verão de 2019 e com outros eventos de branqueamento observados no Brasil (dados do Projeto Coral Vivo no Recife de Fora, Bahia, durante o El Niño de 2016; dados do Projeto Ecorais durante o La Niña de 2018; e observações da equipe do Projeto Costão Rochoso de Arraial do Cabo durante o La Niña de 2018), esperamos que o branqueamento seja observado em março de 2019, quando a temperatura da água pode chegar a 28 °C. É esperado que as colônias branqueadas já estejam completamente recuperadas até julho do mesmo ano com as temperaturas máximas retornando aos 25 °C. Em nenhum desses eventos já monitorados foi registrada a mortalidade de colônias, portanto, se a anomalia térmica não ultrapassar os 30 °C é possível que este cenário se repita.

A amostragem inicial, de colônias saudáveis pré-branqueamento, devem indicar colônias de *Millepora alcicornis* com coloração normal (marrom alaranjadas, de índice 4 ou 5 do cartão de escala de cores) com densidade de zooxantelas entre  $6 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  céls/cm<sup>2</sup> (de acordo com Calvet 2018, e dados ainda não publicados de M. Pacheco, da equipe do Projeto Costão Rochoso de Arraial do Cabo). As comunidades simbiotes devem então ser dominadas principalmente por zooxantelas do gênero *Breviolum* LaJeunesse e colaboradores, 2018 (Clado B), seguidas pelo gênero *Symbiodinium* (Freudenthal, 1962) (Clado A), podendo conter representantes do gênero *Cladocopium* LaJeunesse e colaboradores, 2018 (Clado C) em menor densidade (de acordo com dados do Projeto Ecorais, ainda não publicados). Sabemos que zooxantelas de gêneros diferentes apresentam características fisiológicas distintas, e algumas diferenças também são observadas entre espécies e linhagens dentro de cada gênero (Baker 2003). Levantamentos da diversidade de zooxantelas para esta mesma região, realizados pela proponente durante o seu mestrado e durante o Projeto Ecorais, indicaram a presença das linhagens C3 (gênero *Cladocopium*), A4 (gênero *Symbiodinium*) e uma nova linhagem do gênero *Breviolum* ainda não descrita, aparentemente associada a regiões de grande amplitude de variação de temperatura causada pela ressurgência. Sendo assim, esperamos encontrar uma alta diversidade de linhagens ao longo das amostragens e identificar novas linhagens, ainda desconhecidas da ciência, quando as comunidades foram afetadas pelo branqueamento e ao longo do seu processo de recuperação. Algumas destas podem ter um importante papel na recolonização do tecido do hospedeiro e em sua adaptação térmica e/ou luminosa.

Mudanças na intensidade luminosa do ambiente podem explicar eventuais padrões divergentes ao longo do monitoramento. O aumento da luminosidade pode ser um fator agravante no processo de branqueamento, de modo que ambientes com maior incidência luminosa estão mais sujeitos ao branqueamento do que os demais. Além disso, mesmo que a temperatura da água não atinja valores tão elevados, é possível que vários dias de alta incidência luminosa, característicos do verão, levem ao evento de branqueamento.

Inicialmente, durante o pico do branqueamento, as colônias de *M. alvicornis* devem perder drasticamente suas zooxantelas associadas, reduzindo o conteúdo de clorofila e a densidade de zooxantelas para cerca de  $1 \times 10^5$  céls/cm<sup>2</sup> (de acordo com Calvet 2018, e dados não publicados de M. Pacheco), em relação às mensurações iniciais pré-branqueamento. Neste processo, a coloração do tecido se tornará branca ou bastante pálida (índice 1 ou 2 da escala de cores) e a comunidade de zooxantelas perderá principalmente suas linhagens dominantes. Com a comunidade simbiote reduzida a 1/6 do normal, o tecido do hidrocoral pode servir como substrato livre para colonização por outras linhagens de zooxantelas oportunistas e/ou mais adaptadas ao estresse térmico.

O aparecimento de novas linhagens de zooxantelas (como representantes do gênero *Durusdinium* LaJeunesse e colaboradores, 2018 (Clado D) e de outras linhagens dos gêneros citados acima) ou aumento da representatividade de linhagens já existentes (como *Breviolum* sp., por exemplo) deverá ser observado durante as primeiras semanas de recuperação. Isso deve ocorrer após o pico do branqueamento, quando a temperatura da água se mantiver abaixo dos 25 °C durante a maior parte do tempo e a densidade de zooxantelas no tecido do hidrocoral começar a aumentar. Essa comunidade transitória e dinâmica pode desempenhar um importante papel na recuperação do holobionte após o estresse térmico. Sem pigmentação, o tecido do coral se torna um ambiente estressante para as linhagens de zooxantelas que compunham sua comunidade simbiote. As novas linhagens adquiridas do ambiente, ou a dominância de linhagens anteriormente em baixa densidade, podem favorecer a recolonização do tecido, tornando-o menos estressante para a comunidade que se reestabelecerá.

Com o acompanhamento do processo de recuperação esperamos identificar quais linhagens de zooxantelas são inicialmente responsáveis pela recolonização do tecido do hidrocoral e caracterizar a sucessão de linhagens, que podem se alternar e/ou variar em proporção relativa, até o reestabelecimento de uma comunidade simbiote saudável e estável pós-branqueamento. Este reestabelecimento deve ser caracterizado pela normalização da coloração do tecido e pela presença de zooxantelas em densidade igual



ou superior à da comunidade pré-branqueamento. Essa nova comunidade simbiote (1) pode apresentar a mesma composição e riqueza observadas nas comunidades pré-branqueamento, indicando que as linhagens encontradas no processo de recuperação foram apenas transitórias, ou (2) pode ser dominada por tipos diferentes de zooxantelas ou mesmo manter em baixa densidade as linhagens adquiridas na recuperação. No primeiro caso, as linhagens transitórias, embora participem do processo de recuperação, não resultam em nenhuma vantagem para o coral em termos adaptativos, uma vez que o holobionte estará igualmente suscetível ao próximo evento de anomalia térmica. No segundo caso, o holobionte pode ter adquirido zooxantelas mais aptas a lidar com as anomalias, corroborando a Hipótese do Branqueamento Adaptativo (Ware et al. 1996).

Estes resultados nos permitirão compreender como os únicos corais ramificados brasileiros respondem a impactos globais e estimar seu potencial adaptativo, além de fornecer informações sobre a diversidade genética e a dinâmica das zooxantelas associadas, identificando que linhagens estão presentes em cada etapa do processo de branqueamento e recuperação. A presença dos hidrocorais nos ambientes coralíneos está intimamente relacionada à manutenção de sua biodiversidade, que pode entrar em declínio caso esses organismos sejam afetados com severidade por eventos de branqueamento. Apesar de sua relevância para estratégias de conservação de ambientes marinhos, existem poucos dados sobre o tema no Brasil. Além disso, será possível testar a Hipótese do Branqueamento Adaptativo (Ware et al. 1996), para a elaboração de previsões a respeito do futuro estado dessa espécie, e dos recifes e ambientes coralíneos, frente a cenários de mudanças climáticas. Em uma escala local, os resultados da presente propostas contribuem com dados básicos para os programas de gestão e manejo de ambas as unidades de conservação marinhas envolvidas: a Reserva Extrativista Marinha de Arraial do Cabo e o Parque Natural dos Corais, na Armação dos Búzios, que atraem um grande número de turistas ao longo do ano e são essenciais economia da região.

## 9. Referências Bibliográficas

- Baker AC (2003) Flexibility and specificity in coral-algal symbiosis: diversity, ecology, and biogeography of *Symbiodinium*. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 34:661-89
- Banaszak AT, Ayala-Schiaffino N, Rodríguez-Román A, Enríquez S, Iglesias-Prieto R (2003) Response of *Millepora alcicornis* (Milleporina: Milleporidae) to two

- bleaching events at Puerto Morelos reef, Mexican Caribbean. *Rev Biol Trop* 51(4):57-66
- Brown BE (1997) Coral bleaching: causes and consequences. *Coral Reefs* 16S:129-138
- Buddemeier RW, Fautin DG (1993) Coral bleaching as an adaptive mechanism. *BioScience* 43(5):320-326
- Calvet JMQ (2018) Mortalidade e recuperação do hidrocoral *Millepora alcicornis* em estresse térmico. Monografia apresentada ao Instituto de Biologia da UFF, 44pp
- Castro CB, Pires DO (2001) Brazilian coral reefs: what we already know and what is still missing. *B Mar Sci* 69(2):357-371
- Cook CB, Logan A, Ward J, Luckhurst B, Berg BJJ (1990) Elevated temperatures and bleaching on a high latitude coral reef: The 1988 Bermuda event. *Coral Reefs* 9:45-49
- Costa CF, Sassi R, Gorch-Lira K (2008) Zooxanthellae genotypes in the coral *Siderastrea stellata* from coastal reefs in northeastern Brazil. *J Exp Mar Biol Ecol* 367:149-152
- Costa CF, Sassi R, Gorch-Lira K, LaJeunesse TC, Fitt W (2013) Seasonal changes in zooxanthellae harbored by zoanthids (Cnidaria, Zoanthidea) from coastal reefs in northeastern Brazil. *Panam J Aquat Sci* 8(4):253-264
- Freudenthal HD (1962) *Symbiodinium* gen. nov. and *Symbiodinium microadriaticum* sp. nov., a zooxanthella: taxonomy, life cycle, and morphology. *J Protozool* 9(1):45-52
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by Maximum Likelihood. *Syst Biol* 52(5):696-704
- Hoegh-Guldberg O, Mumby PJ, Hooten AJ, Steneck RS, Greenfield P, Gomez E, Harvell CD, Sale PF, Edwards AJ, Caldera K, Knowlton N, Eakin CM, Iglesias-Prieto R, Muthiga N, Bradbury RH, Dubi A, Hatziolos ME (2007) Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Science* 318:1737-4
- Hoegh-Guldberg O, Bruno JF (2010) The impact of climate change on the world's marine ecosystems. *Science* 328:1523-1528
- Hughes TP, Kerry JT, Álvarez-Noriega M, Álvarez-Romero JG, Anderson KD, Baird AH, Babcock RC, Beger M, Bellwood DR, Berkelmans R, Bridge TC, Butler IR, Byrne M, Cantin NE, Comeau S, Connolly SR, Cumming GS, Dalton SJ, Diaz-Pulido G, Eakin CM, Figueira WF, Gilmour JP, Harrison HB, Heron SF, Hoey AS, Hobbs J-PA, Hoogenboom MO, Kennedy EV, Kuo C-Y, Lough JM, Lowe RJ, Liu G, McCulloch MT, Malcolm HA, McWilliam MJ, Pandolfi JM, Pears RJ, Pratchett

- MS, Schoepf V, Simpson T, Skirving WJ, Sommer B, Torda G, Wachenfeld DR, Willis BL, Wilson SK (2017) Global warming and recurrent mass bleaching of corals. *Nature* 543:373-377
- IPCC (2007) Climate change 2007: synthesis report. Contribution of Working Groups I, II and III to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Core Writing Team, Pauchari RK, Reisinger A (eds.). IPCC, Geneva, Switzerland, 104 pp
- IPCC (2013) Summary for Policymakers. In: TF Stocker, D Qin, G-K Plattner, M Tignor, SK Allen, J Boschung, A Nauels, Y Xia, V Bex, PM Midgley (eds.) Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, UK and New York, USA, pp 1-30
- Kinzie RA, Takayama M, Santos SR, Coffroth MA (2001) The adaptive bleaching hypothesis: Experimental tests of critical assumptions. *Biol Bull* 200:51-58
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2015) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Mol Biol Evol* 33(7):1870-1874
- Laborel J (1970) Madreporaires et hydrocorallaires récifaux des côtes brésiennes. Systématique, écologie, répartition verticale et géographique. *Rés Sci Camp Calypso* 9(25):171-229
- LaJeunesse TC, Parkinson JE, Gabrielson PW, Jeong HJ, Reimer JD, Voolstra CR, Santos SR (2018) Systematic revision of Symbiodiniaceae highlights the antiquity and diversity of coral endosymbionts. *Curr Biol* 28:1-11
- Linnaeus C (1758) Tomus I. *Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus differentiis, synonymis, locis*. Ed. 10, Holmiae, Laurentii Salvii (1-4):1-824
- Lisboa DS, Kikuchi RKP, Leão ZMAN (2018) El Niño, sea surface temperature anomaly and coral bleaching in the South Atlantic: A chain of events modeled with a Bayesian approach. *J Geophys Res-Oceans* 123:2554-2569
- Monteiro JG, Costa CF, Gorch-Lira K, Fitt WK, Stefanni SS, Sassi R, Santos RS, LaJeunesse TC (2013) Ecological and biogeographic implications of *Siderastrea* symbiotic relationship with *Symbiodinium* sp. C46 in Sal Island (Cape Verde, East Atlantic Ocean). *Mar Biodiv* 43:261-272
- Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlenn D, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Szoecs E, Wagner H (2018).

- vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-2. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Oliver TA, Palumbi SR (2011) Many corals host thermally resistant symbionts in high-temperature habitat. *Coral Reefs* 30:241-250
- Palma ED, Matano RP (2009) Disentangling the upwelling mechanisms of the South Brazil Bight. *Cont Shelf Res* 29(11):1525-1534
- Picciani N, Seiblitiz IGL, Paiva PC, Castro CB, Zilberberg C (2016) Geographic patterns of *Symbiodinium* diversity associated with the coral *Mussismilia hispida* (Cnidaria, Scleractinia) correlate with major reef regions in the Southwestern Atlantic Ocean. *Mar Biol* 163:236
- Pinheiro J, Bates D, Debroy S, Sarkar D, R Core Team (2018) nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models, R package version 3.1-137. <https://cran.r-project.org/package=nlme>
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Rowan R (2004) Thermal adaptation in reef coral symbionts. *Nature* 430:742
- RStudio Team (2015) RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc. Boston, MA. <http://www.rstudio.com>
- Silva-Lima AW, Walter JM, Garcia GD, Ramires N, Ank G, Meireles PM, Nobrega AF, Siva-Neto ID, Moura RL, Salomon PS, Thompson CC, Thompson FL (2015) Multiple *Symbiodinium* strains are hosted by the Brazilian endemic corals *Mussismilia* spp. *Microb Ecol* DOI 10.1007/s00248-015-0573-z
- Schindelin J, Rueden, CT, Hiner MC, Eliceiri KW (2015) The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Mol Reprod Dev* 82(7-8):518-529
- Stanley GDJ (2006) Photosymbiosis and the evolution of modern coral reefs. *Science* 312:857-8
- Valentin JV (2001) The Cabo Frio Upwelling System, Brazil. p 97-105. In: Seeliger U, Kjerfve B (eds.) *Coastal Marine Ecosystems of Latin America*. Ecological Studies 144. 376 pp
- Ware JR, Fautin DG, Buddemeier RW (1996) Patterns of coral bleaching: modeling the adaptive bleaching hypothesis. *Ecol Model* 84:199-214
- Winter APM, Chaloub RM, Duarte GAS, Castro CB (2016) Photosynthetic responses of corals *Mussismilia harttii* (Verrill, 1867) from turbid waters to changes in temperature and presence/absence of light. *Braz J Oceanogr* 64(3):203-216