

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALINE APARECIDA ZANOTTI

SUCCESSÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA ASSOCIADA À DOENÇA DO CORAL  
INVASOR, *Tubastraea tagusensis*

PONTAL DO PARANÁ

2019

ALINE APARECIDA ZANOTTI

SUCESSÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA ASSOCIADA À DOENÇA DO CORAL  
INVASOR, *Tubastraea tagusensis*

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Sistemas  
Costeiros e Oceânicos, Setor de Centro de Estudos do Mar,  
Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do  
título de Mestre em Sistemas Costeiros Oceânicos.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Visentini Kitahara

PONTAL DO PARANÁ

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE:  
UFPR / SiBi - Biblioteca do Centro de Estudos do Mar  
Fernanda Pigozzi – CRB 9/1151

Z33s Zanotti, Aline Aparecida  
Sucessão da comunidade microbiana associada à doença do coral invasor, *Tubastraea tagusensis*. / Aline Aparecida Zanotti. – Pontal do Paraná, 2019.  
61 f.: il.; 29 cm.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Visentini Kitahara.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Sistemas Costeiros e Oceânicos, Centro de Estudos do Mar, Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná.

1. Coral – doença. 2. Coral-sol - micro-organismo. 3. Coral - simbiose. 4. Coral – *Tubastraea tagusensis*. I. Título. II. Kitahara, Marcelo Vicentini. III. Universidade Federal Do Paraná.

CDD 590



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR REITORIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO SISTEMAS COSTEIROS  
E OCEÂNICOS - 40001016054P6

### TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em SISTEMAS COSTEIROS E OCEÂNICOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **ALINE APARECIDA ZANOTTI**, intitulada: **SUCESSÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA ASSOCIADA À DOENÇA DO CORAL-INVASOR, TUBASTRAEA TAGUENSIS**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de Mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 27 de Março de 2019.

MARCELO VISENTINI KITAHARA  
Presidente da Banca Examinadora

LUCIENE CORREA LIMA  
Avaliador Externo (UFPR)

ON-LINE

CAMILA CARLOS-SHANLEY  
Avaliador Externo (TSU)

FLÁVIA TALARICO SAIA  
Avaliador Externo (UNIFESP)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador, de longa data, Marcelo Kitahara, pela oportunidade de trabalharmos juntos, pela confiança, dicas e conversas extremamente produtivas.

Ao Gustavo Gregoracci, por toda a colaboração, paciência e explicações.

À minha família, por sempre me apoiarem, mesmo que, por vezes, não entendam meus planos.

Ao Thiago, por toda a compreensão e apoio.

Às CEBIMarianas, mulheres/amigas incríveis que deixaram meus dias mais divertidos ao longo do mestrado.

Aos amigos queridíssimos que Pontal me deu.

Ao CEBIMar, pela concessão do espaço, pelo apoio nas coletas e auxílio de todo os funcionários.

A CAPES, pela bolsa concedida,

Ao PGSISCO, à UFPR e a USP pelo apoio institucional.

Agradeço por todos os ensinamentos, acadêmicos e pessoais, adquiridos ao longo desse processo.

## RESUMO

Os ecossistemas recifais do Atlântico Sul Ocidental vêm sofrendo significativas alterações em decorrência da invasão dos corais-sol, sendo *Tubastraea tagusensis* uma das duas espécies conhecidas popularmente por esse nome. Na Ilha dos Búzios, litoral norte do Estado de São Paulo, onde há abundância desta espécie invasora, diversas colônias foram visualizadas apresentando necrose tecidual, sendo este o primeiro relato de doença acometendo essa espécie de coral. Nesse contexto, o presente estudo buscou compreender a relação de *T. tagusensis* com micro-organismos simbióticos, através de sequenciamento parcial do gene bacteriano 16S rDNA de corais saudáveis e doentes, e em um vetor em potencial, o peixe *Abudefduf saxatilis*. Foram identificadas grande diversidade de bactérias e arqueias, sendo possível a determinação do core microbiano, micro-organismos persistentes associados às colônias saudáveis, que se mantiveram parcialmente presentes nas colônias doentes. Comparando a diversidade de micro-organismos, a comunidade de simbiotes associados aos corais doentes é mais diversa do que a associada aos corais saudáveis. Apesar disso, os micro-organismos com maior frequência relativa, cerca de 75% do total de simbiotes associados aos corais doentes, é composto pelos mesmos gêneros presentes nas colônias saudáveis. A comunidade microbiana associada às colônias saudáveis não sofre alterações significativas em relação aos espécimes examinados, sendo possível verificar a sucessão da comunidade microbiana associada ao coral *T. tagusensis* em seu estado saudável e durante diferentes estágios de infecção (i.e. inicial, intermediário e avançado). A comparação da microbiota associada a corais saudáveis com a de espécimes em estágio inicial de necrose tecidual, permitiu a identificação de 17 micro-organismos potencialmente patogênicos, que podem ser os promotores dessa doença. Além disso, sugerimos um vetor em potencial para essa doença, o peixe *Abudefduf saxatilis*, e indicamos que a contaminação da área por hidrocarbonetos ou subprodutos deste, podem também ser um facilitador desta doença.

**Palavras-chave:** coral sol, micro-organismos, simbiose, core microbiano, potenciais patógenos.

## ABSTRACT

Southwestern Atlantic reef ecosystems are undergoing significant changes due to sun corals invasion - *Tubastraea tagusensis* is one of the two species popularly known as sun coral. Along Búzios Island, northern São Paulo State coast, a locality where the abundance of *T. tagusensis* is particularly high, some colonies were displaying tissue necrosis, a phenomenon never reported for this coral species. Herein, using next generation sequencing, we sought to understand the relationship between *T. tagusensis* and its microbiota. Thus, using universal bacterial primers, partial 16S rDNA gene was sequenced from healthy and diseased corals, and in a potential vector, the fish *Abudefduf saxatilis*. Results indicate a wide variety of bacteria and archaea associated with healthy and an even higher diversity associated to those corals with tissue necrosis. Further analyses enabled the identification of the microbiome core - microorganisms that were identified in all samples examined. The microbiota associated to unhealthy corals was more diverse than that associated to healthy colonies. Despite of that, nearly 75% of the microorganisms identified in healthy corals are the same as those from colonies with tissue necrosis. In addition, as the microbial community associated to the six healthy colonies sequenced did not alter composition significantly, it was possible to verify the microbiome succession during different necrosis stages (i.e., initial, intermediate and advanced). The comparison between the microbiome from healthy corals to those in early tissue necrosis suggests 17 potential pathogens, which might act as the promoters of this disease. In addition, we suggest a potential vector for the studied tissue necrosis, the fish *Abudefduf saxatilis*, and indicate that hydrocarbon contamination might also act as a factor increasing the propensity for this coral disease.

**Key words:** Sun coral, microorganisms, symbiosis, core microbiome, pathogens

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>14</b>
MICROBIOMA ASSOCIADO AO CORAL SOL, <i>Tubastraea tagusensis</i> .....	14
INTRODUÇÃO .....	14
MATERIAL E MÉTODOS .....	15
RESULTADOS .....	17
DISCUSSÃO.....	24
REFERÊNCIAS .....	28
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>33</b>
SUCESSÃO DA COMUNIDADE DE MICRO-ORGANISMOS ASSOCIADOS A DIFERENTES ESTÁGIOS DA DOENÇA DO CORAL, <i>Tubastraea tagusensis</i> .....	33
INTRODUÇÃO .....	33
MATERIAIS E MÉTODOS .....	36
RESULTADOS .....	38
DISCUSSÃO.....	45
REFERÊNCIAS .....	51
<b>CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>58</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>59</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>60</b>

## INTRODUÇÃO

Os corais escleractíneos são os principais arquitetos dos recifes de corais de águas rasas e profundas, sendo ambos considerados ecossistemas extremamente complexos e figurando entre os mais biodiversos do planeta (DOWER; IAN PERRY, 2001; REED, 2002; ROGERS, 1999). Parte desta complexidade está atrelada a capacidade destes organismos em estabelecer relações de simbiose, sendo considerados como metazoários com maior diversidade de micro-organismos associados (BLACKALL; WILSON; VAN OPPEN, 2015). Entretanto, atualmente, estes ecossistemas vêm atraindo grande atenção pública, especialmente devido ao destino incerto dos recifes de corais em face aos crescentes desafios de origem antrópica. Em 2004 e 2008, no *Status of Coral Reefs of the World*, foram relacionadas as 10 principais ameaças/estressores dos recifes de corais, das quais destacam-se o fenômeno do branqueamento (ANTHONY et al., 2008; BEN-HAIM; ZICHERMAN-KEREN; ROSENBERG, 2003; ROSENBERG; FALKOVITZ, 2004), a acidificação dos oceanos (ANTHONY et al., 2008; CRAWLEY et al., 2010), as atividades extrativistas (p.ex., pesca), aumento de sedimentação, de nutrientes e de poluentes químicos, o desenvolvimento não planejado de áreas costeiras (WILKINSON, 2004), bioinvasões (MIRANDA; CRUZ; BARROS, 2016) e doenças decorrentes destes estressores (GARCIA et al., 2013; LUNA et al., 2010; SAKOWSKI, 2015; SÉRÉ et al., 2013; WELSH et al., 2015).

Apesar de pouco diversos ao longo do Atlântico Sul Ocidental (ASC), os corais escleractíneos exercem diversas funções ecossistêmicas ímpares ao largo da costa do Brasil, onde é encontrada a única formação de atol do ASC, vastas extensões recifais de águas rasas (p.ex., Arquipélago dos Abrolhos - Bahia, Parcel do Manuel Luís - Maranhão) e profundas (p.ex., Bacia de Campos, Santos e Pelotas), além de formações únicas como os chapeirões (CASTRO; PIRES, 2001). Entretanto, nas últimas décadas, os recifes brasileiros vêm sofrendo com as diversas ameaças/estressores supracitados. Como exemplos, temos o branqueamento das colônias de *Madracis decactis* (MOREIRA et al., 2013), *Siderastrea stellata* (LINS-DE-BARROS et al., 2013) a doença do coral endêmico *Mussismilia braziliensis* (GARCIA et al., 2013), a pesca predatória e a invasão dos corais-sol, *Tubastraea coccinea* e *Tubastraea tagusensis* (Castro & Pires, 2001).

Nativos do Indo-Pacífico, *T. coccinea* e *T. tagusensis* foram primeiramente registrados em águas brasileiras na década de 1980, incrustando plataformas de petróleo ao largo do Estado do Rio de Janeiro (CASTRO; PIRES, 2001), e desde então veem se espalhando pela costa do Brasil (CREED, 2006). De forma geral, os corais invasores têm sido

os protagonistas de mudanças significativas nas comunidades bentônicas de águas rasas (Lages *et al.*, 2011; Miranda *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2019), principalmente devido às suas características reprodutivas/oportunistas (DE PAULA, 2007). Mais especificamente, *T. tagusensis* possui grande repertório de estratégias reprodutivas e colônias adultas liberam grande quantidade de larvas sem a necessidade de fertilização cruzada (AYRE; RESING, 1986; CAPEL *et al.*, 2016), sendo assim, consideradas hermafroditas simultâneas, com habilidade de autofecundação. Além disso, possuem grande sucesso no recrutamento (DE PAULA; CREED, 2005; MIZRAHI, 2008), rápido crescimento (VERMEIJ, 2006), estratégias alternativas de crescimento quando em contato com predadores (VERMEIJ, 2005) e elevada plasticidade fisiológica para “ajustamento” a diferentes condições ambientais como turbidez, salinidade, entre outras. Em adição, outras características facilitadoras da colonização, estabelecimento e expansão destas espécies são a produção de metabólitos secundários com propriedades anti-depuração e anti-predação (KONTIZA *et al.*, 2006; LAGES *et al.*, 2010), o que provavelmente está associado à ausência de predadores e/ou competidores nas áreas invadidas.

Não obstante, mesmo não estabelecendo relação de simbiose com dinoflagelados fotossintetizantes (i.e., são azooxantelados), é observada tanto em locais com grande intensidade luminosa, quanto em sombreados, possuindo ampla distribuição na costa brasileira, incluindo áreas de relevante interesse ecológico (SILVA *et al.*, 2011). Atualmente, *T. tagusensis* é registrada em substratos naturais e artificiais dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia e Ceará (COSTA *et al.*, 2014; CREED *et al.*, 2008; DE PAULA; CREED, 2004; FERREIRA; GONÇALVES; COUTINHO, 2004; SAMPAIO *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2014), sendo que nos dois primeiros, alguns pontos de ocorrência desta espécie indicam que a mesma pode chegar a cobrir 100% do substrato consolidado (DE PAULA; CREED, 2004; MANTELATTO *et al.*, 2011), mudando as comunidades bentônicas e, conseqüentemente a ictiofauna.

Em 2014, cerca de 40 anos após o primeiro relato da presença de *T. tagusensis* em águas brasileiras, foram observadas colônias deste coral aparentemente doente na Ilha dos Búzios, litoral norte do Estado de São Paulo. Mesmo que em diversos graus de desenvolvimento (i.e., desde pequenas lesões/necrose tecidual a pólipos aparentemente sem tecido (Fig. 1), inicialmente, as colônias necrosadas eram encontradas em uma única localidade desta ilha. Entretanto, a necrose se espalhou ao longo dos recifes rochosos desta

ilha, sendo que atualmente é possível encontrar colônias doentes em quase todas as suas localidades. Atualmente, este fenômeno é o primeiro relato de um coral azooxantelado doente.

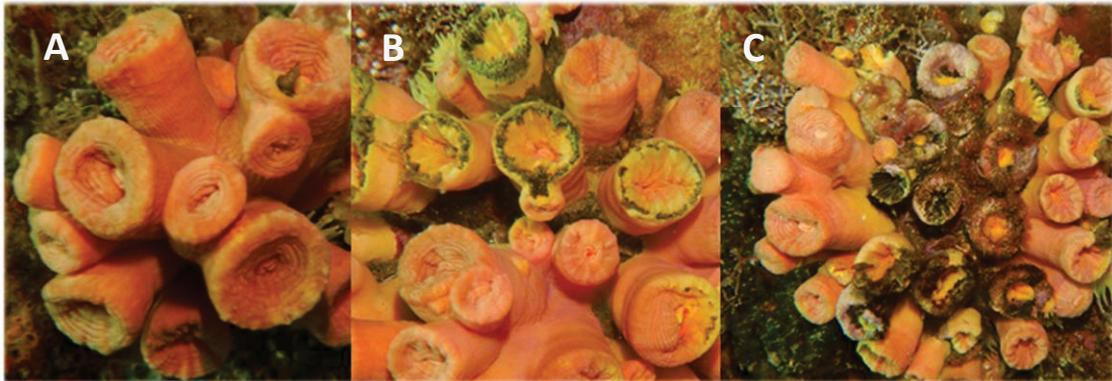


Figura 1. Colônias de *Tubastraea tagusensis* apresentando necrose em diversos estágios de evolução. A - estágio inicial de necrose. B - colônia em estágio intermediário de necrose. C - colônia em estágio avançado de necrose com diversos pólipos aparentemente sem tecido.

Apesar de diversas questões biológicas e ecológicas terem ou estarem sendo estudadas acerca desse coral, seu microbioma (i.e., sua relação com micro-organismos) ainda não havia sido explorada, como já ocorreu para *T. coccinea* (CARLOS; TORRES; OTTOBONI, 2013). Neste contexto e especialmente focados em corais zooxantelados, inúmeros trabalhos vêm relatando a existência de bactérias e arqueias associadas de forma específica a cada espécie de coral, conceito conhecido como *core* microbiano (HERNANDEZ-AGREDA; GATES; AINSWORTH, 2017). Entende-se que o *core* microbiano é estabelecido por processos co-evolutivos (FRAUNE; BOSCH, 2010), sendo esta associação crucial ao hospedeiro, uma vez que exerce papel fundamental para sua adaptação/adequação ao meio.

O avanço destes e outros estudos acerca da microbiota dos corais foi ponto importante para a proposição da Teoria Hologenômica (TH) (ROSENBERG et al., 2007), a qual estabelece dois termos: holobionte – hospedeiro e os micro-organismos que vivem em simbiose; e hologenoma – somatória das informações genéticas do hospedeiro e dos micro-organismos simbiotes. Atualmente, a TH possui grande apelo evolutivo e ecológico, e se baseia nas premissas de que: (1) todas as espécies de animais e plantas possuem relações simbióticas com diversos e abundantes micro-organismos; (2) a agregação entre micro-organismos simbiotes e o seu hospedeiro, reflete diretamente na aptidão e adequação do hospedeiro; (3) a variância genética do hologenoma pode ser aprimorada através das mudanças no genoma do hospedeiro ou no genoma dos simbiotes; e que (4) essas variações

podem influenciar na evolução do holobionte, visto que as variações genéticas do microbioma e do hospedeiro podem ser transmitidas verticalmente com fidelidade, de uma geração para a outra (ROSENBERG; ZILBER-ROSENBERG, 2011).

Dessa forma, o desbalanço do microbioma pode ser deflagrador de inúmeros impactos em seu respectivo hospedeiro, incluindo mudanças fisiológicas, branqueamento ou, em casos extremos, a morte. Por exemplo, efeitos sinérgicos do aumento de temperatura e contaminação pela bactéria *Vibrio shiloi* foram reportadas como causadora do branqueamento em *Oculina patagonica* em águas mediterrâneas (ROSENBERG; FALKOVITZ, 2004). Aparte do branqueamento de *O. patagonica*, mais de 20 doenças de corais são atualmente conhecidas, sendo que para a vasta maioria não são conhecidos os o(s) patógeno(s) deflagradores, ou mesmo o(s) vetor(es). Este hiato se deve principalmente a complexidade encontrada no ambiente marinho, sendo que grande parte dos estudos foca em descrever como a comunidade microbiana é afetada e na proposição de patógenos em potencial (GIGNOUX-WOLFSOHN; VOLLMER, 2015; SWEET; BYTHELL, 2012; SWEET; CROQUER; BYTHELL, 2014).

Assim, com o objetivo de verificar não apenas se as necroses teciduais observadas em *T. tagusensis* são decorrentes de infecções por bactérias patogênicas, mas também se existe alguma sucessão da comunidade de micro-organismos com o desenvolvimento das mesmas, o presente trabalho disserta sobre análises das microbiotas associadas às colônias saudáveis e em três estágios de necrose (i.e., inicial, intermediária e avançada) associados à *T. tagusensis*. Em resumo, porções da borda do cálice (região inicialmente afetada pela doença) de colônias saudáveis e doentes contendo tecido e esqueleto, tiveram DNA genômico total extraído e uma porção do gene 16S foi amplificado utilizando iniciadores universais de bactérias (LANE, 1991; TURNER et al., 1999). Posteriormente, os amplicons foram determinados através de sequenciamento paralelo massivo (plataforma MiSeq – Illumina), sendo as sequências resultantes classificadas até o menor nível taxonômico possível (normalmente gênero). Seguindo o mesmo procedimento, uma amostra de larvas de *T. tagusensis*, assim como o microbioma presente na boca de *Abudefduf saxatilis* (popularmente conhecido como “sargentinho” e vetor em potencial da doença estudada) também foram sequenciadas. Destaca-se que, com o intuito de verificar adequações da microbiota de *T. tagusensis* frente a diferentes profundidades, o sequenciamento das colônias saudáveis contou com espécimes amostrados em três profundidades (3, 5 e 8 m).

Com essas amostras, os objetivos do presente trabalho foram: i) descrever a comunidade de bactérias e arqueias associados ao coral *T. tagusensis*; ii) verificar adequações da microbiota de corais coletados em diferentes profundidades; iii) identificar o *core* microbiano de *T. tagusensis*; iv) verificar se existe transmissão vertical da microbiota (colônia mãe para larvas recém liberadas) e, caso positivo, se o *core* microbiano é transmitido; v) comparar o *core* microbiano da *T. tagusensis* com demais corais, zooxantelados e azooxantelados, que já tiveram seu *core* microbiano identificado; vi) identificar a comunidade de micro-organismos associados a três estágios de desenvolvimento de necrose tecidual; vii) comparar a microbiota das colônias saudáveis com as doentes; viii) analisar possível sucessão da comunidade de micro-organismos conforme avanço dos estágios de necrose; ix) identificar se o *core* microbiano é persistente em colônias doentes; x) identificar micro-organismos com potencial patogênico; e xi) verificar se o peixe *Abudefduf saxatilis* pode ser considerado um vetor em potencial desta doença.

## CAPÍTULO I

### MICROBIOMA ASSOCIADO AO CORAL SOL, *Tubastraea tagusensis*

#### INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, ao longo da costa do Brasil, as comunidades marinhas costeiras vêm sofrendo rápidas mudanças em decorrência da invasão dos corais-sol, *Tubastraea coccinea* e *T. tagusensis* (DE PAULA; CREED, 2004; LAGES et al., 2011). Primeiramente registrados em águas brasileiras no início da década de 1980 (CASTRO; PIRES, 2001), estas espécies de corais escleractíneos são nativas do Oceano Pacífico, e tem como localidade tipo os arquipélagos de Fiji e de Galápagos, respectivamente. Atualmente, ambas são consideradas como as primeiras espécies de corais escleractíneos que invadiram a costa ocidental do Atlântico Sul (SILVA et al., 2014) e, destas, *T. tagusensis* já é reportada para as costas dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia e Ceará (COSTA et al., 2014; CREED et al., 2008; DE PAULA; CREED, 2004; FERREIRA; GONÇALVES; COUTINHO, 2004; SAMPAIO et al., 2012; SILVA et al., 2014). Entretanto, ao largo dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo, é possível encontrar áreas onde estas espécies saturam os substratos naturais (i.e., costões rochosos) e artificiais (e.g. marinas), chegando a 100% de cobertura (MANTELATTO et al., 2011). Consequentemente, existem diversas evidências da capacidade destas espécies de competirem e até mesmo eliminarem do ambiente, corais nativos como a *Mussismilia hispida*, gerando mudanças significativas nos serviços ecossistêmicos locais.

Os corais têm sido amplamente estudados, em função de sua ampla relação simbiótica com bactérias, arqueias, fungos, algas e vírus (BLACKALL; WILSON; VAN OPPEN, 2015). De forma geral, este microbioma é um dos mais complexos já estudados (BAYER et al., 2013), e existem hipóteses de que a relação de simbiose microbiana com corais pode ser um processo co-evolutivo. Neste sentido o microbioma auxilia em diversos mecanismos relacionados à aptidão e “funcionamento” do coral hospedeiro. Entretanto, as vias metabólicas e os respectivos benefícios oriundos desta simbiose são pouco compreendidos ou ainda não foram investigados. Com o intuito de identificar na comunidade de simbiontes os micro-organismos cruciais para suas espécies hospedeiras, o conceito “core microbiano” foi adotado, tratando-se dos grupos de simbiontes persistentes nas associações

com seu hospedeiro independente das condições ambientais. (HERNANDEZ-AGREDA; GATES; AINSWORTH, 2017).

Em vista de limitações tecnológicas os micro-organismos estiveram por muito tempo desvinculados da teoria da evolução (BORDENSTEIN; THEIS, 2015). Atualmente, a relação simbiótica entre eucariontes e bactérias tem se mostrado uma constante para as espécies estudadas (BURGER, 2009; MCFALL-NGAI, 2002; ROSENBERG et al., 2007; SAFFO, 2006), sendo diretamente relacionada à evolução (GILBERT et al., 2010), e se tornado um princípio central da biologia (GILBERT; SAPP; TAUBER, 2012). Os membros do domínio *Eukarya*, não figuram como entidades autônomas, mas como holobiontes - hospedeiro e micro-organismos que vivem em simbiose (ROHWER; EDWARDS, 2002). Esta relação vem sendo considerada um dos pontos da teoria hologenômica (ROSENBERG et al., 2007), a qual sugere o hologenoma - somatória das informações genéticas do hospedeiro e dos micro-organismos simbiotes - como um dos pontos centrais da evolução. De forma resumida, esta teoria baseia-se nas premissas de que a simbiose entre micro-organismos e seu hospedeiro reflete diretamente na aptidão e adequação do hospedeiro ao ambiente. Neste sentido, o hologenoma pode se adequar a diferentes variantes ambientais através de mudanças no genoma do hospedeiro e/ou no genoma dos simbiotes (ROSENBERG; ZILBER-ROSENBERG, 2011). Essas variações podem influenciar na evolução do holobionte, sendo transmitidas verticalmente de uma geração para a seguinte (ROSENBERG; ZILBER-ROSENBERG, 2011). Assim, visando adicionar ao conhecimento acerca do hologenoma dos corais invasores, análises metagenômicas em *T. tagusensis* foram realizadas com o intuito de: i) ampliar o conhecimento acerca de sua relação com micro-organismos; ii) identificar possíveis respostas ambientais na comunidade microbiana simbiote, em espécimes de *T. tagusensis* coletadas em diferentes profundidades; e iii) verificar se existe transferência da comunidade bacteriana das colônias adultas para suas respectivas larvas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Trinta e duas colônias de *T. tagusensis* de quatro faixas batimétricas (3, 6, 8 e 11m) foram coletadas em um costão vertical da Ilha dos Búzios, litoral norte de SP, nos dias 09 de outubro de 2017 (20 colônias) e 30 de novembro de 2017 (12 colônias). Após a coleta, as colônias foram congeladas em sacos plásticos individuais (sem água), com exceção de seis colônias da segunda coleta (30/11/2017), as quais foram mantidas em aquário de fluxo aberto

para obtenção de larvas. Para cada colônia, uma porção de aproximadamente 25mg da região da borda do cálice, contendo tecido e esqueleto, foram amostrados, e um pool de 10 larvas compôs a amostra utilizada para verificação de transmissão vertical da microbiota. DNA genômico total de cada amostra foi extraído utilizando o *DNeasy Blood & Tissue kit* (Qiagen) seguindo as orientações do fabricante. A qualidade e quantidade do DNA de cada amostra foram verificadas através de eletroforese em gel de agarose (1,5%) e espectrofotômetro de microvolumes (NanoDrop 2000). Posteriormente, utilizando os *primers* universais, 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) e 519R (GWATTACCGCGGCKGCTG) (LANE, 1991; TURNER et al., 1999), para amplificação do gene 16S, foram realizadas reações de polimerase em cadeia utilizando o kit *Advantage®-HF 2 PCR*. Cada reação continha: 16ng de DNA; 2,5µl de *Buffer*; 2,5µl de *dNTP Mix*; 0,5µl de cada *primer* (10µM); 0,5µl de enzima e água ultrapura até completar o volume de 25µl. Cada reação foi realizada de acordo com a ciclagem a seguir: desnaturação inicial 94°C por 60s, seguida por 30 ciclos a 94°C por 30s, 56°C por 40s e 68°C por 33s, sendo finalizado por extensão final a 68°C por 33s.

Uma vez confirmada a amplificação do gene de interesse foi realizada sua purificação utilizando esferas magnéticas (*Agencourt AMPure XP*), seguindo o protocolo do fabricante e eluição final em 50µl de 1X TE (10mM de Tris-HCl, pH 8, 1mM de EDTA). A concentração das purificações foi mensurada através do *Qubit® dsDNA BR Assay Kit* e todos seus respectivos volumes foram reajustados para 50µl, volume necessário para dar início à montagem das bibliotecas, adicionando 1X TE. As bibliotecas foram montadas utilizando o kit *NEBNext Ultra II FS DNA Library Prep.* e mantidas congeladas. A fim de mensurar a quantidade e qualidade das bibliotecas, estas foram submetidas a análises de concentração no *Qubit® dsDNA HS Assay Kit* e, posteriormente, a distribuição de tamanho da biblioteca foi mensurada utilizando eletroforese capilar (*Bioanalyzer High Sensitivity DNA chip*). O sequenciamento foi realizado na plataforma MiSeq (Illumina), utilizando os reagentes MiSeq Nano kit v2 (500 ciclos), no Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa – Universidade de São Paulo (CEFAP-USP).

### Bioinformática

As sequências de cada amostra passaram por um conjunto de tratamentos até as análises estatísticas. As pontas de baixa qualidade de cada sequência, assim como as sequências curtas (<50pb) foram removidas com o programa SolexaQA++ (COX; PETERSON; BIGGS, 2010). Sequências idênticas foram agrupadas utilizando o programa

Swarm (MAHÉ et al., 2014) e posteriormente classificadas na plataforma Mothur (SCHLOSS et al., 2009) utilizando o banco de dados 16S Silva- 132 (BDS) (MITROVIĆ et al., 2011).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software STAMP – *Statistical Analysis of Metagenomic Profiles* (PARKS et al., 2014), removendo as sequências provenientes de eucariotos. Os testes estatísticos foram realizados para múltiplos grupos através de análises de variância (ANOVA), com os testes post-hoc Turkey-Kramer e de correção de testes múltiplos Benjamini-Hochberg FDR, sendo 0,01 o filtro de p-valor corrigido utilizado. Whites's non-parametric t-test, tipo two-side, CI method (DP bootstrap, correção de testes múltiplos Benjamini-Hochberg FDR e filtro de p-valor de 0,01) foram aplicados para comparações de grupos.

## RESULTADOS

Independente do protocolo utilizado, parte das 32 colônias amostradas e que tiveram seus respectivos DNAs genômicos totais extraídos não resultaram na amplificação do ribossomo 16S. Assim, os resultados abaixo representam esforço de sequenciamento de seis amostras de colônias adultas, das quais duas para cada uma das profundidades (3, 6 e 8 m), e uma referente à amostra de larvas.

A média de leituras geradas por amostra de coral foi de 25.223, variando de 15.917 a 30.147 sequencias oriundas de *Bacteria*, *Archaea*, *Eukarya*, cloroplastos e mitocôndrias. A comparação das sequências obtidas junto ao BDS resultou na identificação de 386 gêneros e 54 filos como sendo de eucariotos, sendo que estas, assim como as identificadas como procedentes de cloroplastos ou mitocôndrias, foram excluídas das análises posteriores. Das sequências restantes, foi identificada uma média de 600 OTUs (*Bacteria* e *Archaea*) por amostra de coral (Fig. 1.1), sendo que os mesmos foram classificados até o nível de gênero, com raras exceções em que a classificação ficou limitada a níveis taxonômicos superiores (Material Suplementar 1).

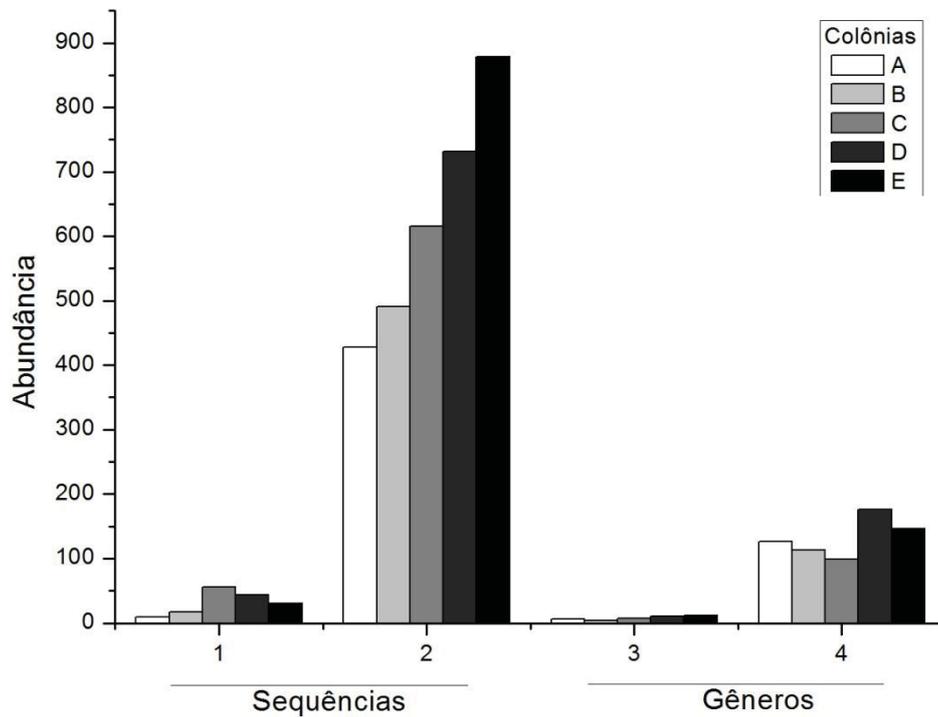


Figura 1.1. Comparação entre o número de sequências e gêneros de Bactérias e Archaeas para cada colônia de coral *Tubastraea tagusensis*. Colônias A-8m, B-6m, C-3m, D-6m, E-3m e F-8m.

Após a identificação das sequências, os dados foram agrupados de acordo com a profundidade de coleta dos espécimes (i.e.: 3; 6; e 8m), e assim aplicados os testes estatísticos. De forma geral, foram identificados 25 filos de *Bacteria* ou *Archaea*, dos quais nove (*Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Nanoarchaeaeota*, *Euryarchaeota*, *Planctomycetes* e *Halanaerobiaeota* – Tab. 1.1) estão presentes em todas as amostras analisadas. Apesar dos 435 gêneros de bactérias e arqueias associados aos corais (Fig. 1.2), um grupo de 30 gêneros são mais abundantes e responsáveis por cerca de 60% da microbiota identificada (Fig. 1.3). Destes, 20 gêneros estão presentes em todas as colônias analisadas, sendo consideradas como "core microbiano" (Fig. 1.4).



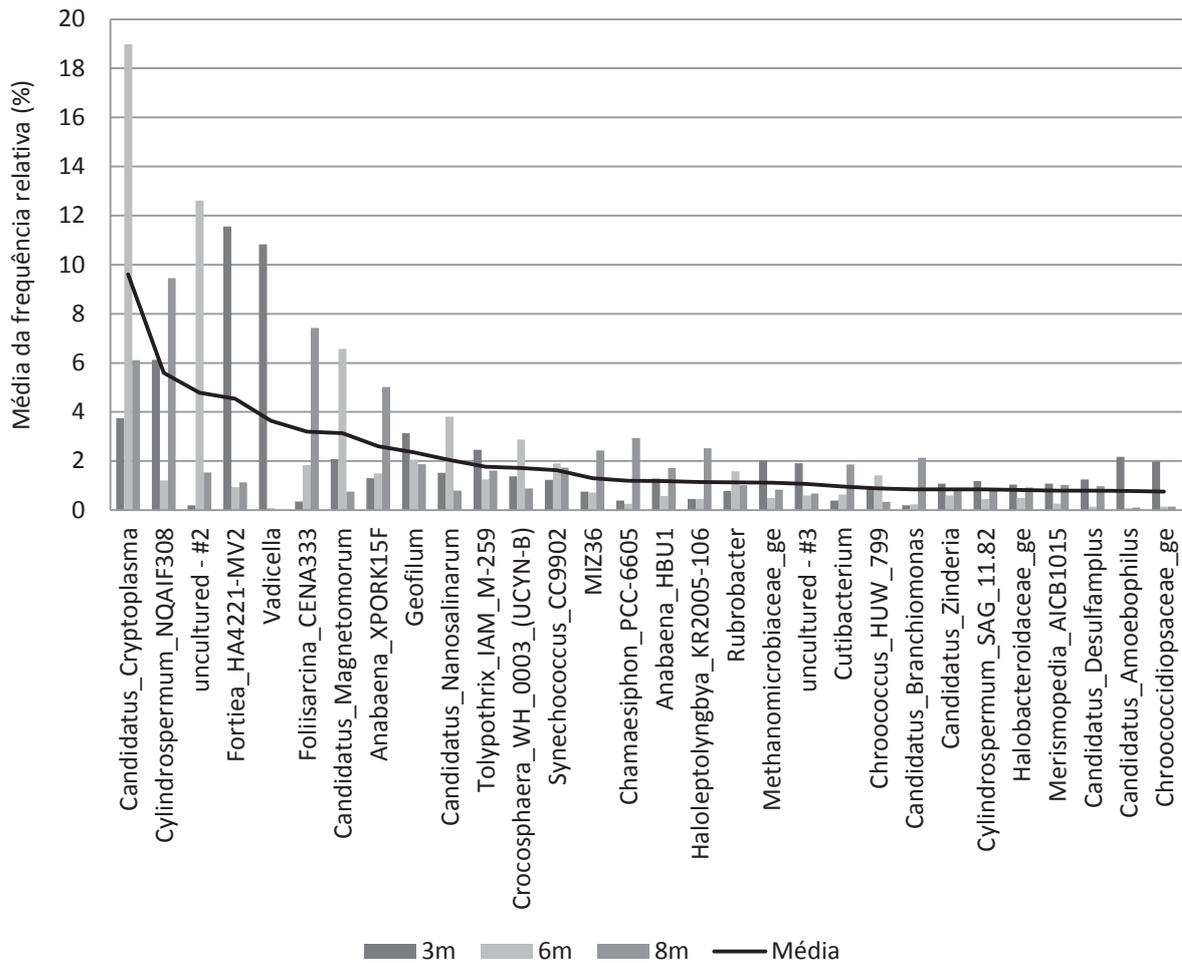


Figura 1.3. Média da frequência relativa dos 30 gêneros mais abundantes associados às colônias de coral *T. tagusensis*, coletadas nas profundidades de 3, 6 e 8m.

Apesar de haver diferença da abundância dos filos de *Bacteria* e *Archaea* com relação às profundidades de ocorrência das colônias de corais, a comparação da comunidade resultou na verificação de que não existem adequações significativas da comunidade microbiana entre as profundidades (3, 6 e 8m - ANOVA) ou mesmo entre grupos referentes a profundidades (3 e 6m, 3 e 8m, 6 e 8m - Whites's non-parametric t-test).

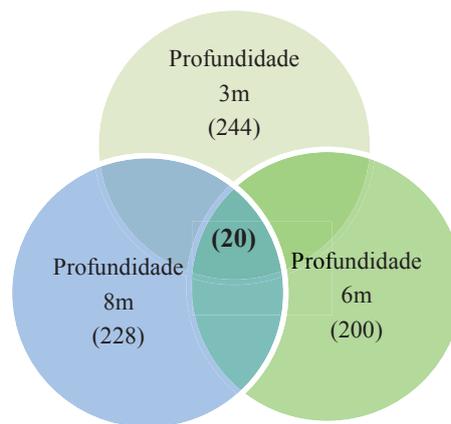


Figura 1.4. Número de gêneros de Bactérias e Archaeas, descritos associados a cada conjunto de colônias, 3m, 6m e 8m, e o número de gêneros que estão presentes em comum em todas as amostras analisadas de corais *T. tagusensis*.

Dos 20 gêneros de *Bacteria* e *Archaea* identificados nas colônias das três profundidades coletadas, dois representam arqueias (*Candidatus nanosalinarum* e *Methanomicrobiaceae* ge), e correspondem a 3,5, 4,3 e 1,63% de toda a comunidade microbiana das colônias amostradas aos 3, 6 e 8m de profundidade respectivamente. Os demais gêneros (18) representam bactérias e compõem cerca de 40% de toda a comunidade de micro-organismos identificados no core microbiano (Tabela 1.2).

Desta forma, o "core microbiano" de *T. tagusensis*, além de representar quase metade de toda a microbiota associada a este coral, compõem parcela similar do total de micro-organismos presentes nas amostras: 43,18% nas colônias coletadas aos 3m; 43,58% na profundidade de 6m; e 44,4% nos corais dos 8m de profundidade. Entretanto, apesar da abundância relativa dos gêneros serem similares, foram identificadas alterações nas frequências dos micro-organismos de acordo com a profundidade amostrada (Fig. 1.5). Os casos mais discrepantes em relação à frequência relativa são dos gêneros: *Candidatus cryptoplasma*; *Cylindrospermum* (NQAIF308); *Fortiea* (HA4221-MV2); *Foliisarcina* (CENA33); e *Candidatus magnetorum*. Após a identificação do core microbiano e a detecção de sua persistência (inclusive na frequência dos gêneros) nas colônias coletadas em profundidades distintas, o microbioma associado às colônias de diferentes profundidades foi novamente comparada, excluindo da análise os 20 gêneros formadores do core. Apesar da ausência do core microbiano, não houve diferença significativa entre as três profundidades quando submetidas à ANOVA de múltiplos grupos (3, 6 e 8 m) ou no teste Whites's non-parametric t-test de dois grupos (3x6 m, 3x8 m e 6x8 m).

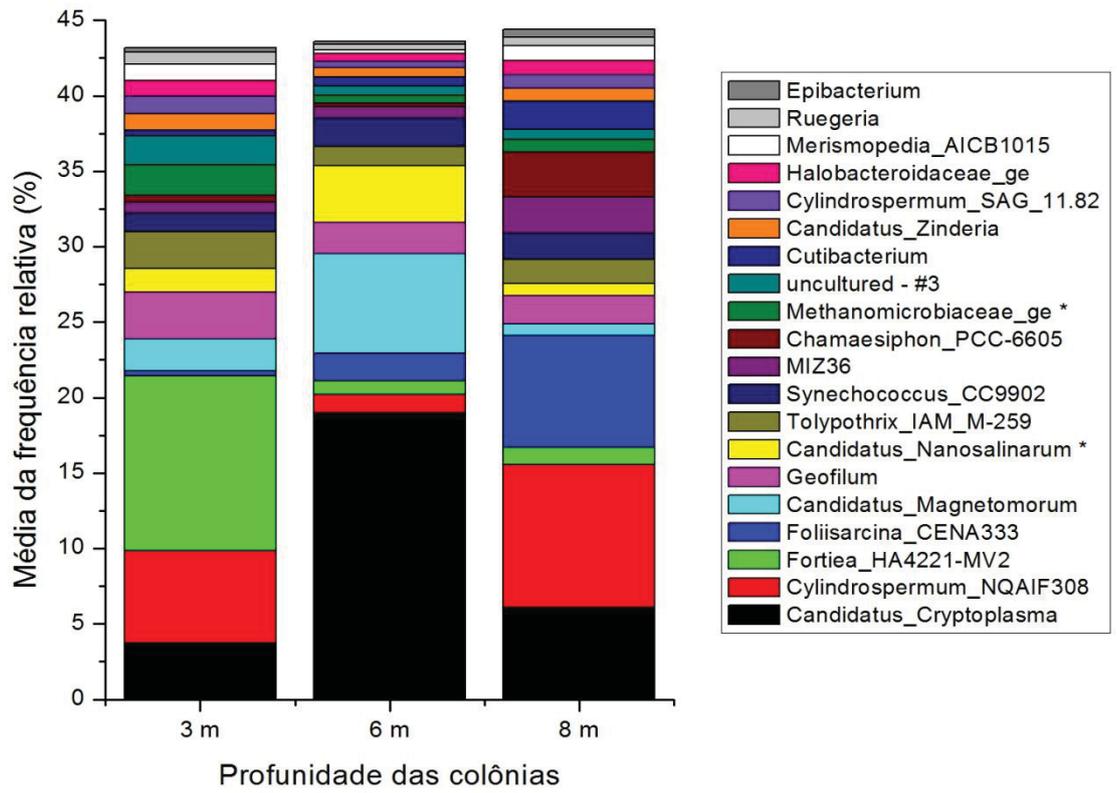


Figura 1.5. Frequência relativa dos gêneros que formam o core microbiano em cada uma das três profundidades. Asterisco (\*) representa Archaea.

Tabela 1.2. Classificação do core-microbiano e suas respectivas frequências em cada profundidade. Asterisco (\*) representa Archaea.

<b>Filo</b>	<b>Classe</b>	<b>Ordem</b>	<b>Família</b>	<b>Gênero</b>	<b>3m (%)</b>	<b>6m (%)</b>	<b>8m (%)</b>	
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rickettsiales</i>	<i>Anaplasmataceae</i>	<i>Candidatus_Cryptoplasma</i>	3,75	18,97	6,12	
			<i>Rickettsiaceae</i>	<i>uncultured - #3</i>	1,91	0,6	0,68	
	<i>Rhodobacteriales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Ruegeria</i>		0,78	0,34	0,56	
			<i>Epibacterium</i>		0,29	0,19	0,53	
			<i>Candidatus_Magnetomorum</i>		2,08	6,56	0,76	
	<i>Deltaproteobacteria</i>		<i>Desulfobacterales</i>					
	<i>Gammaproteobacteria</i>		<i>Betaproteobacteriales</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Candidatus_Zinderia</i>	1,08	0,6	0,87
	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	<i>Nostocales</i>	<i>Cylindrospermum_NQAIF308</i>		6,13	1,22	9,45
				<i>Fortia_HA4221-MV2</i>		11,56	0,94	1,14
				<i>Tohyothrix_IAM_M-259</i>	<i>Nostocaceae</i>		2,45	1,25
<i>Cylindrospermum_SAG_II.82</i>					1,18	0,45	0,89	
<i>Chamaesiphon_PCC-6605</i>				<i>Chamaesiphonaceae</i>		0,39	0,26	2,94
<i>Merismopedia_AICB1015</i>				<i>Cyanobacteriaceae</i>		1,08	0,26	1,03
<i>Foliisarcina_CENA333</i>				<i>Xenococcaceae</i>		0,36	1,83	7,42
<i>MIZ36</i>				<i>Leptolyngbyaceae</i>		0,76	0,72	2,43
<i>Synechococcus_CC9902</i>				<i>Cyanobiaceae</i>		1,24	1,9	1,73
<i>Cutibacterium</i>				<i>Propionibacteriaceae</i>		0,39	0,64	1,85
<i>Geofilum</i>	<i>Bacteroidales</i>	<i>Marinilabiliaceae</i>		3,14	2,05	1,88		
<i>Methanomicrobia</i>	<i>Methanomicrobiales</i>	<i>Methanomicrobiaceae</i>	<i>Methanomicrobiaceae_ge *</i>	2,03	0,49	0,84		
<i>Halanaerobiia</i>	<i>Halanaerobiales</i>	<i>Halobacteroidaceae</i>	<i>Halobacteroidaceae_ge</i>	1,05	0,49	0,92		
<i>Nanoarchaeota</i>	<i>Nanoarchaeales</i>	<i>Nanoarchaeaceae</i>	<i>Candidatus_Nanosalinarum *</i>	1,53	3,81	0,79		
<i>Total</i>								

## Metagenômica de larvas de *T. tagusensis*

Os micro-organismos associados a 10 larvas foram analisados como se fosse uma única amostra. O número de sequências geradas e identificadas utilizando o BDS contendo bactérias, arqueias, cloroplastos e mitocôndrias foi de 49.120. Destas, cerca de 14.300 representam eucariotos, cloroplastos ou mitocôndrias e foram excluídas das análises. Assim, cerca de 31.000 sequências obtidas das 10 larvas foram utilizadas nas comparações com as amostras das colônias de corais adultos.

No geral, as larvas possuem microbioma diverso, sendo encontrados 19 filos, dos quais dois representam *Archaea* (2) e *Bacteria* (17). A maior parte do microbioma é formada por bactérias do filo *Bacteroidetes* (97%), seguido por *Proteobacterias* (1,5%) e *Cyanobacterias* (0,7%). As arqueias compõem apenas 0,022% do microbioma associado às larvas, sendo representadas por apenas dois gêneros, *Thermoproteaceae* e *Methanomicrobiaceae*. Dentre os 19 filos, foram identificados 198 gêneros, sendo que 95% de toda a comunidade de simbiontes são formados por representantes da família *Flavobacteriaceae*, mais especificamente pelos gêneros *Spongiiferula* (58%), *Polaribacter* (32%) e *Spongiivirga* (4%).

Em comparação com as colônias adultas, as larvas de *T. tagusensis* compartilham 16 gêneros de micro-organismos, sendo os únicos ausentes as bactérias *Candidatus Cryptoplasma*, *Uncultured #3* e *Ruegeria*, e a arqueia *Candidatus nanosalinarum*. Apesar da presença do *core* microbiano nas larvas, a frequência relativa de seus gêneros é menor se comparada às colônias adultas. Em adição, além do *core* microbiano, larvas e colônias adultas compartilham 130 gêneros de bactérias/arqueias, que no total representam 66,65% e 56,32% da microbiota das larvas e adultos respectivamente.

## DISCUSSÃO

Os corais são ricos em inibidores de PCR, encontrados no tecido e no esqueleto desses animais, como ácidos húmicos e os íons de  $\text{Ca}^{2+}$  (MATHESON et al., 2014; SCHRADER et al., 2012; WEBER; DEFORCE; APPRILL, 2017). Dessa forma, compreende-se a dificuldade da amplificação de 100% das colônias coletadas, mesmo com as insistentes alterações do protocolo de PCR realizadas em busca do sucesso de todas as amplificações.

Entendendo que variáveis ambientais (e.g.: luz; temperatura; nutrientes; etc.) regem a distribuição da fauna e flora incrustante de costões rochosos, e que as mesmas diferem

conforme o gradiente batimétrico (NYBAKKEN, 1982), a microbiota associada ao coral invasor *Tubastraea tagusensis* foi analisada em busca de potenciais mudanças na sua composição que pudesse indicar “adaptações” co-evolutivas (coral/microbiota) em tempo ecológico. Contudo, as colônias de corais das profundidades amostradas (3, 6 e 8m) não apresentaram diferenças significativas nas comunidades microbianas (*Bacteria* e *Archaea*) associadas. De acordo com CAIRNS (1991), a abundância e distribuição de *T. tagusensis* em sua localidade tipo são restritas, e ao longo da costa do Brasil, onde esta espécie é invasora, sua diversidade genética é baixa, sendo a maioria das “populações” composta por clones (CAPEL et al., 2017). Dessa forma, a ausência de diferença significativa entre o microbioma das colônias de diferentes profundidades pode ser resultado da elevada taxa clonal de *T. tagusensis* em águas brasileiras. Esse quadro corrobora com a teoria hologenômica, mais especificamente com a premissa: a microbiota simbiote é transmitida por gerações consecutivas (ZILBER-ROSENBERG; ROSENBERG, 2008). Entretanto, essa semelhança também pode indicar que o gradiente batimétrico amostrado pode não ser uma condicionante fundamental capaz de alterar significativamente a microbiota associada aos corais.

Apesar da alteração pouco significativa com relação à profundidade, a comunidade microbiana associada com *T. tagusensis* é diversa, sendo composta por 26 filos, dentre os quais *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Firmicutes* são os mais abundantes (Tab. 1.1). Esse perfil de filos abundantes foi observado para o coral cérebro, *Mussismilia braziliensis* (GARCIA et al., 2013). Em adição, análises metagenômicas realizadas nas águas dos costões ao largo da Ilha dos Búzios, sugerem que os principais filos presentes na região são os mesmos citados acima (CARLOS; TORRES; OTTOBONI, 2013). A presença desses filos também foi verificada em outras espécies de corais (*Mussismilia hispida*; *Madracis decactis*; e *Tubastraea coccinea*) e zoantários (*Palythoa caribaeorum*) da Ilha dos Búzios (Carlos et al., 2013), no coral *Acropora millepora* (LITTMAN; WILLIS; BOURNE, 2011), e em *Porites astreoides*, exceto pela ausência do filo *Bacteroidetes*, nesse caso (WEGLEY et al., 2007). Blackall e colaboradores (2015) corroboram a frequência e abundância dos mesmos filos nos estudos metagenômicos de corais.

O filo de *Bacteria* mais abundante associado aos corais *T. tagusensis* (i.e. *Proteobacteria*), também é o mais abundante no meio marinho (AMARAL-ZETTLER et al., 2010), e além de ser reportada para as espécies citadas acima, também já foi registrada em diversos outros antozoários, como *Siderastrea stellata* (LINS-DE-BARROS et al., 2013), *Mussismilia hispida* (CARLOS; TORRES; OTTOBONI, 2013; LINS-DE-BARROS et al.,

2010) de recifes brasileiros, e *Porites astreoides* (WEGLEY et al., 2007), *Porites lutea* (SÉRÉ et al., 2013), *Pocillopora damicornis* (YOKOUCHI et al., 2006) e *Platygyra carnosa* (NG et al., 2015) para outras regiões.

A similaridade entre os principais filos que compõe a microbiota ocorrente na água e associada aos corais sugere duas hipóteses a serem estudadas: 1) parte dos micro-organismos simbioses não é específica dos corais, mas eles a obtêm do meio e essa associação os auxiliam na adequação as condições físicas do ambiente, uma vez que esses micro-organismos (diversidade e frequência relativa) se adaptam mais rapidamente às condições locais; e/ou 2) que a associação com os micro-organismos mais abundantes do local é “antiga” e evolui junto com o hospedeiro, sendo então necessárias classificações taxonômicas da microbiota em níveis de gêneros ou espécies para se verificar a real similaridade. Este último poderia indicar a evolução do holobionte ao longo de dezenas de milhares de anos.

A diversidade de gêneros associada ao tecido e esqueleto de *T. tagusensis* é elevada e, além de ser amplamente conhecido que os corais possuem diversos micro-organismos associados (BAYER et al., 2013), existe uma distinção na abundância e diversidade entre muco, tecido e esqueleto e foi observado que os ambientes mais diversos são tecidos e esqueleto (APPRILL; WEBER; SANTORO, 2016). Entretanto, esta distinção não foi estudada no presente trabalho.

Dentre a diversidade de gêneros recuperada no presente estudo (c.a. 400), 20 foram identificados em todos os espécimes (sugerindo um *core* microbiano), e totalizam 43% dos simbioses desta espécie de coral para a localidade de estudo. A verificação do *core* microbiano sugere que existem bactérias e arqueias cruciais para o hospedeiro. Em adição, essa relação sugere também que a simbiose entre corais e bactérias/arqueias é uma relação minimamente comensalista, pois pelo menos um dos envolvidos (micro-organismos ou corais) é beneficiado. Entretanto, apesar de inúmeros estudos dissertarem acerca da microbiota dos corais, nem todos buscaram identificar o *core* microbiano. Segundo Hernandez-Agreda *et al.* (2017), apenas 16 espécies de corais foram exploradas nessa perspectiva, todos zooxantelados (i.e., corais que também possuem relação simbiótica com dinoflagelados fotossintetizantes). Dentre os *cores* microbianos estudados até 2015, dois gêneros de bactérias foram reportados para todos os corais hospedeiros: *Ralstonia* (*Burkholderiaceae*) e *Propionibacterium* (*Propionibacteriaceae*) (vide Ainsworth *et al.*, 2015). No *core* microbiano de *T. tagusensis*, foram encontrados representantes das duas famílias, *Burkholderiaceae* e *Propionibacteriaceae*, mas pertencentes a gêneros diferentes

daqueles observados por Ainsworth *et al.* (2015) (*Candidatus\_Zinderia* e *Cutibacterium* - Tab. 1.2).

Entretanto, diferente dos corais analisados por Ainsworth e colaboradores (2015), *T. tagusensis* não possui zooxantelas, sendo a presença de representantes das famílias *Burkholderiaceae* e *Propionibacteriaceae*, ou então de suas respectivas ordens, detectada apenas no core microbiano de outras espécies de corais azooxantelados, como os Scleractinia *Dendrophyllia* sp. e *Eguchipsammia fistula* (RÖTHIG *et al.*, 2017), ou no Octocorallia *Paramuricea placomus* (KELLOGG; ROSS; BROOKE, 2016). Assim, a presença das mesmas famílias de bactérias, mas gêneros diferentes, em relação aos demais corais zooxantelados analisados, pode ser uma adequação dos corais azooxantelados, incluindo *T. tagusensis*, em resposta à ausência de microalgas comumente utilizadas para obtenção de energia, ou ainda serem gêneros/espécies de Bactérias que estão associadas diretamente as zooxantelas. Em adição, destacamos que o gênero *Propinibacterium* teve recentemente sua filogenia reconstruída, sendo que três novos gêneros (*Acidipropionibacterium*, *Cutibacterium* e *Pseudopropionibacterium*) foram propostos (SCHOLZ; KILIAN, 2016). Nesse contexto, há a possibilidade de ao nos referirmos a *Propinibacterium* e *Cutibacterium*, estejamos falando do mesmo gênero.

A presença do core microbiano, mesmo que incompleto, nas larvas recém-liberadas na coluna d'água e a semelhança da comunidade microbiana das larvas em relação à comunidade de micro-organismos presentes nas colônias adultas, corrobora a existência de transferência vertical destas em *T. tagusensis*, como proposto na teoria hologenômica (ROSENBERG *et al.*, 2007) e como visto no coral caribenho *Porites astreoides* (SHARP; DISTEL; PAUL, 2012).

## REFERÊNCIAS

- AINSWORTH, T. D. et al. The coral core microbiome identifies rare bacterial taxa as ubiquitous endosymbionts. **The ISME journal**, v. 9, n. 10, p. 1–14, 2015.
- AMARAL-ZETTLER, L. et al. A Global Census of Marine Microbes. In: MCINTYRE, A. D. (Ed.). **Life in the World's Oceans: Diversity, Distribution, and Abundance**. [s.l.] Blackwell Publishing Ltd, 2010. p. 221–245.
- APPRILL, A.; WEBER, L. G.; SANTORO, A. E. Distinguishing between Microbial Habitats Unravels Ecological Complexity in Coral Microbiomes. **mSystems**, v. 1, n. 5, p. e00143-16, 25 out. 2016.
- BAYER, T. et al. The microbiome of the red sea coral *Stylophora Pistillata* is dominated by tissue-associated *Endozoicomonas* bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 15, p. 4759–4762, 2013.
- BLACKALL, L. L.; WILSON, B.; VAN OPPEN, M. J. H. H. Coral-the world's most diverse symbiotic ecosystem. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 21, p. 5330–5347, 1 nov. 2015.
- BORDENSTEIN, S. R.; THEIS, K. R. Host biology in light of the microbiome: Ten principles of holobionts and hologenomes. **PLoS Biology**, v. 13, n. 8, p. e1002226, 18 ago. 2015.
- BURGER, J. Defining Culture in Animals The Question of Animal Culture. **BioScience**, v. 59, n. 11, p. 1001–1002, 2009.
- CAIRNS, S. D. A revision of the *Ahermatypic Scleractinia* of the Galapagos and Cocos Islands. **Smithsonian Contributions to Zoology**, n. 504, p. 1–32, 1991.
- CAPEL, K. C. C. et al. Clone wars: asexual reproduction dominates in the invasive range of *Tubastraea* spp. (*Anthozoa: Scleractinia*) in the South-Atlantic Ocean. **PeerJ**, v. 5, p. e3873, 5 out. 2017.
- CARLOS, C.; TORRES, T. T.; OTTOBONI, L. M. M. Bacterial communities and species-specific associations with the mucus of Brazilian coral species. **Scientific Reports**, v. 3, n. 1, p. 1624, 2013.
- CASTRO, C. B.; PIRES, D. O. DE O. BRAZILIAN CORAL REEFS: WHAT WE

- ALREADY KNOW AND WHAT IS STILL MISSING. **Bulletin of Marine Science**, v. 69, n. 2, p. 357–371, 2001.
- COSTA, T. J. F. et al. Expansion of an invasive coral species over Abrolhos Bank, Southwestern Atlantic. **Marine Pollution Bulletin**, v. 85, n. 1, p. 252–253, 2014.
- COX, M. P.; PETERSON, D. A.; BIGGS, P. J. SolexaQA: At-a-glance quality assessment of Illumina second-generation sequencing data. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 485, 2010.
- CREED, J. C. et al. Cnidaria, Scleractinia, *Tubastraea coccinea* Lesson, 1829 and *Tubastraea tagusensis* Wells , 1982 : Distribution extension . **Check List**, v. 4, n. 3, p. 297–300, 2008.
- DE PAULA, A. F.; CREED, J. C. Two species of the coral *Tubastraea* (Cnidaria, Scleractinia) in Brazil: A case of accidental introduction. **Bulletin of Marine Science**, v. 74, n. 1, p. 175–183, 2004.
- GARCIA, G. D. et al. Metagenomic Analysis of Healthy and White Plague-Affected *Mussismilia braziliensis* Corals. **Microbial Ecology**, v. 65, n. 4, p. 1076–1086, 2013.
- GILBERT, S. F. et al. Symbiosis as a source of selectable epigenetic variation: taking the heat for the big guy. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1540, p. 671–678, 2010.
- GILBERT, S. F.; SAPP, J.; TAUBER, A. I. A Symbiotic View of Life: We Have Never Been Individuals. **The Quarterly Review of Biology**, v. 87, n. 4, p. 325–341, 19 dez. 2012.
- HERNANDEZ-AGREDA, A.; GATES, R. D.; AINSWORTH, T. D. Defining the Core Microbiome in Corals' Microbial Soup. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 125–140, 2017.
- KELLOGG, C. A.; ROSS, S. W.; BROOKE, S. D. Bacterial community diversity of the deep-sea octocoral *Paramuricea placomus*. **PeerJ**, v. 4, p. e2529, 29 set. 2016.
- LAGES, B. G. et al. Change in tropical rocky shore communities due to an alien coral invasion. **Marine Ecology Progress Series**, v. 438, p. 85–96, 2011.
- LINS-DE-BARROS, M. M. et al. Archaea, bacteria, and algal plastids associated with the reef-building corals *Siderastrea stellata* and *Mussismilia hispida* from Búzios, South Atlantic Ocean, Brazil. **Microbial Ecology**, v. 59, n. 3, p. 523–532, 16 abr. 2010.

- LINS-DE-BARROS, M. M. et al. Microbial Community Compositional Shifts in Bleached Colonies of the Brazilian Reef-Building Coral *Siderastrea stellata*. **Microbial Ecology**, v. 65, n. 1, p. 205–213, 5 jan. 2013.
- LITTMAN, R.; WILLIS, B. L.; BOURNE, D. G. Metagenomic analysis of the coral holobiont during a natural bleaching event on the Great Barrier Reef. **Environmental Microbiology Reports**, v. 3, n. 6, p. 651–660, 2011.
- MAHÉ, F. et al. Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. **PeerJ**, v. 2, p. e593, 25 set. 2014.
- MANTELATTO, M. C. et al. Range expansion of the invasive corals *Tubastraea coccinea* and *Tubastraea tagusensis* in the Southwest Atlantic. **Coral Reefs**, v. 30, n. 2, p. 397–397, 30 jun. 2011.
- MATHESON, C. D. et al. Assessing PCR Inhibition from Humic Substances. *The Open Enzyme Inhibition Journal*, v. 3, n. 1, p. 38–45, 2014.
- MCFALL-NGAI, M. J. Unseen Forces: The Influence of Bacteria on Animal Development. **Developmental Biology**, v. 242, n. 1, p. 1–14, fev. 2002.
- MITROVIĆ, S. M. et al. The effect of heroin on verbal memory. **Psychiatria Danubina**, v. 23, n. 1, p. 53–59, 27 nov. 2011.
- NG, J. C. Y. et al. Pyrosequencing of the bacteria associated with *Platygyra carnosus* corals with skeletal growth anomalies reveals differences in bacterial community composition in apparently healthy and diseased tissues. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. OCT, p. 1142, 20 out. 2015.
- NYBAKKEN, J. W. **Marine biology: An ecological approach**. [s.l: s.n.]. v. 29
- PARKS, D. H. et al. STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics**, v. 30, n. 21, p. 3123–3124, 1 nov. 2014.
- ROHWER, F.; EDWARDS, R. The Phage Proteomic Tree : a Genome-Based Taxonomy for Phage. **Journal of bacteriology**, v. 184, n. 16, p. 4529–4535, 2002.
- ROSENBERG, E. et al. The role of microorganisms in coral health , disease and evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. May, p. 355–362, 2007.

ROSENBERG, E.; ZILBER-ROSENBERG, I. Symbiosis and development: The hologenome concept. **Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews**, v. 93, n. 1, p. 56–66, 2011.

RÖTHIG, T. et al. Microbial community composition of deep-sea corals from the Red Sea provides insight into functional adaption to a unique environment. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 44714, 17 dez. 2017.

SAFFO, M. Symbiosis: the way of all life. **Life as we know it**, 2006.

SAMPAIO, C. L. S. et al. New occurrences of the nonindigenous orange cup corals *Tubastraea coccinea* and *T. tagusensis* (Scleractinia: Dendrophylliidae) in southwestern Atlantic. **Check List**, v. 8, n. 3, p. 528–530, 2012.

SCHLOSS, P. D. et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537–7541, 1 dez. 2009.

SCHOLZ, C. F. P.; KILIAN, M. The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus propionibacterium to the proposed novel genera *Acidipropionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. nov. and *Pseudopropionibacterium* gen. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 11, p. 4422–4432, 1 nov. 2016.

SCHRADER, C. et al. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, v. 113, n. 5, p. 1014–1026, 1 nov. 2012.

SÉRÉ, M. G. et al. Bacterial communities associated with *Porites* white patch syndrome (PWPS) on three western Indian Ocean (WIO) coral reefs. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e83746, 2013.

SHARP, K. H.; DISTEL, D.; PAUL, V. J. Diversity and dynamics of bacterial communities in early life stages of the Caribbean coral *Porites astreoides*. **The ISME Journal**, v. 6, n. 4, p. 790–801, 24 abr. 2012.

SILVA, A. G. et al. Eleven years of range expansion of two invasive corals (*Tubastraea coccinea* and *Tubastraea tagusensis*) through the southwest Atlantic (Brazil). **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 141, p. 9–16, 2014.

WEBER, L.; DEFORCE, E.; APPRILL, A. Optimization of DNA extraction for advancing coral microbiota investigations. *Microbiome*, v. 5, n. 1, p. 18, 8 fev. 2017.

WEGLEY, L. et al. Metagenomic analysis of the microbial community associated with the coral *Porites astreoides*. ***Environmental Microbiology***, v. 9, n. 11, p. 2707–2719, 2007.

YOKOUCHI, H. et al. Whole-metagenome amplification of a microbial community associated with scleractinian coral by multiple displacement amplification using 29 polymerase. ***Environmental Microbiology***, v. 8, n. 7, p. 1155–1163, 2006.

ZILBER-ROSENBERG, I.; ROSENBERG, E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. ***FEMS microbiology reviews***, v. 32, n. 5, p. 723–735, 2008.

## CAPÍTULO II

### SUCESSÃO DA COMUNIDADE DE MICRO-ORGANISMOS ASSOCIADOS A DIFERENTES ESTÁGIOS DA DOENÇA DO CORAL, *Tubastraea tagusensis*

#### INTRODUÇÃO

Os corais escleractíneos são os principais formadores dos recifes de corais de águas rasas e profundas, sendo ambos considerados ecossistemas extremamente complexos e figurando entre os mais biodiversos do planeta (DOWER; IAN PERRY, 2001; REED, 2002; ROGERS, 1999). Entretanto, devido aos crescentes desafios de origem antrópica, nas últimas décadas, os ambientes coralíneos vêm sendo impactados por poluição, sobrepesca (WILKINSON, 2004), branqueamento (ANTHONY et al., 2008; BEN-HAIM; ZICHERMAN-KEREN; ROSENBERG, 2003; ROSENBERG; FALKOVITZ, 2004) e doenças associadas a mudanças na comunidade simbiote dos corais (BEN-HAIM; ROSENBERG, 2002; DENNER et al., 2003; GARCIA et al., 2013; LUNA et al., 2010; PANTOS et al., 2003; SEKAR; KACZMARSKY; RICHARDSON, 2008; SÉRÉ et al., 2013). Desta última, de acordo com BLACKALL e colaboradores (2015), existe intrínseca relação espécie-específica entre corais e micro-organismos, como Bactérias, Archaeas, Eucariotos e vírus.

Assim, com o intuito de aprimorar o conhecimento acerca dos fatores que podem influenciar na saúde dos corais e, conseqüentemente, no desbalanço ou mudança da comunidade simbiote, diversos estudos buscaram determinar a microbiota associada a corais saudáveis (AINSWORTH et al., 2015; HERNANDEZ-AGREDA; GATES; AINSWORTH, 2017; RÖTHIG et al., 2017) e doentes (APPRILL; HUGHEN; MINCER, 2013; GARCIA et al., 2013; MEYER et al., 2017; SÉRÉ et al., 2013). Estes e outros trabalhos (p.ex. HERNANDEZ-AGREDA; GATES; AINSWORTH, 2017), sugerem que existem micro-organismos fundamentais para o hospedeiro, e que o balanço da comunidade microbiana é resultado co-evolutivo e também ecológico. Conseqüentemente, condições bióticas ou abióticas que resultem em estresse para os corais, podem ocasionar o desbalanço dessa relação, o que por sua vez, pode desencadear inúmeras doenças no hospedeiro (ROSENBERG et al., 2007). Atualmente, apesar de mais de 20 doenças associadas a corais serem conhecidas (RAYMUNDO et al., 2008), apenas uma minoria teve os patógenos identificados (ROSENBERG et al., 2007). Os demais estudos descrevem as mudanças na microbiota, indicando que o aumento da abundância do gênero *Ruegeria* é compartilhado por diversas

espécies de corais doentes (APPRILL; HUGHEN; MINCER, 2013; CASEY; CONNOLLY; AINSWORTH, 2015; NG et al., 2015; SATO et al., 2017; SEKAR; KACZMARSKY; RICHARDSON, 2008; SÉRÉ et al., 2013).

Em águas brasileiras, análises metagenômicas já foram realizadas aos corais endêmicos *Mussismilia braziliensis* (GARCIA et al., 2013; REIS et al., 2009), *Mussismilia hispida* (CARLOS; TORRES; OTTOBONI, 2013; LINS-DE-BARROS et al., 2010), além de outras espécies com distribuição mais ampla, como *Madracis decactis* (CARLOS; TORRES; OTTOBONI, 2013; MOREIRA et al., 2013), *Siderastrea stellata* (LINS-DE-BARROS et al., 2013) e ao coral invasor *Tubastraea coccinea* (CARLOS; TORRES; OTTOBONI, 2013). Nestes trabalhos, além da microbiota associada a espécimes saudáveis, a comunidade microbiana associada a corais branqueados e doentes também foi descrita. Assim, devido ao elevado endemismo de corais zooxantelados na costa brasileira, associada à baixa diversidade geral deste grupo para o Atlântico Sul Ocidental (CASTRO; PIRES, 2001; WILKINSON, 2008), de forma geral, esses trabalhos abrangeram uma grande porção dos corais brasileiros, enfatizando a importância da conservação dos recifes brasileiros. No entanto, além de doenças, os ambientes recifais brasileiros vêm sendo impactados com a invasão dos corais sol, *T. tagusensis* e *T. coccinea* oriundos de Galápagos (Pacífico Oriental) e Fiji (sul do Oceano Pacífico), respectivamente. Atualmente, *T. tagusensis* possui ampla distribuição no Brasil, sendo registrado nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia e Ceará (COSTA et al., 2014; CREED et al., 2008; DE PAULA; CREED, 2004; FERREIRA; GONÇALVES; COUTINHO, 2006; SAMPAIO et al., 2012; SILVA et al., 2014). Destes, algumas localidades no Estado de São Paulo os costões rochosos estão saturados (100%) por corais invasores, como a Ilha dos Búzios, que antes da bioinvasão era uma região composta por *Madracis decactis*, *Mussismilia hispida*, *Palythoa caribaeorum*, turf e esponjas (MANTELATTO et al., 2011). Ao que tudo indica, o sucesso da invasão de *T. tagusensis* pode estar relacionado com as características reprodutivas – alta produção de oócitos, idade precoce para reprodução (FENNER; BANKS, 2004) e rápida incubação – condição de espécies oportunistas (DE PAULA, 2007).

Em 2014, durante mergulhos autônomos ao largo da Ilha dos Búzios, colônias de *T. tagusensis* com necrose tecidual foram observadas. Inicialmente as colônias afetadas eram vistas em um único ponto, sendo que atualmente é possível encontrar colônias doentes sempre que se mergulha nesta localidade. De forma geral, a necrose tecidual se inicia pela borda do cálice, como um pequeno ponto marrom (Fig. 2.1A e 2.1B) e se expande pelo pólipos (Fig.

2.1C e 2.1D), podendo atingir diversos indivíduos, levando-os à morte (Fig. 2.1D e 2.1E). Ao manejar essas colônias, observou-se que o esqueleto da região doente ficou fragilizado e mais quebradiço. Em adição, pólipos apresentando necrose tecidual foram observados em maior abundância na margem dos locais de deposição de ovos do peixe *Abudefduf saxatilis*, conhecido como sargentinho, sugerindo a possibilidade de haver uma relação entre a doença desse coral e esses peixes.

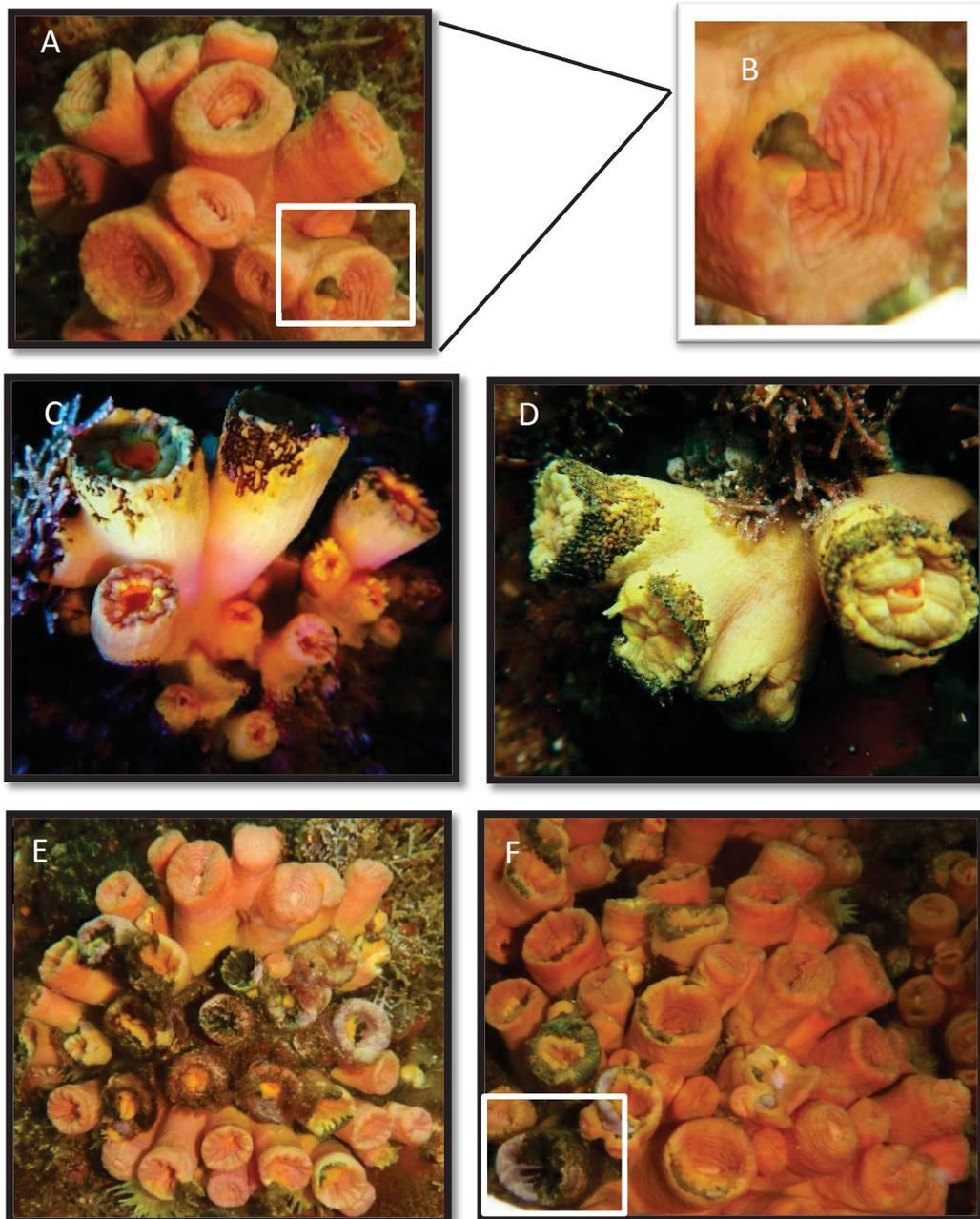


Figura 2.1. Registros de colônias de *Tubastraea tagusensis*, na Ilha de Búzios, SP apresentando sinais de doença, (A) em estágio inicial, (B) com um único pólipo apresentando pequeno ponto de necrose tecidual, (C, D), em estágio intermediário, quando a necrose avança pelo pólipos e (E, F) em estágio avançado, com pólipos tomados pela doença e sem vida.

Com o intuito de verificar se a necrose tecidual possui relação com outras doenças observadas em corais escleractíneos, o presente trabalho buscou, com base em análises metagenômicas, descrever e investigar possíveis sucessões na comunidade de bactérias e arqueias das porções doentes. Buscando aprofundar o conhecimento acerca da evolução da doença, classificamos as colônias doentes por estágios, a saber: inicial, intermediário e avançado. Os resultados obtidos foram comparados com o perfil da microbiota de colônias saudáveis coletadas na mesma localidade e com a mesma região do pólipos amostrada. Em adição, o mesmo procedimento foi realizado para verificar o perfil da comunidade de microorganismos associados à boca do peixe *Abudefduf saxatilis*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Dezoito espécimes do coral invasor *Tubastraea tagusensis*, e um espécime do peixe *Abudefduf saxatilis*, foram coletados na Ilha dos Búzios, litoral norte do Estado de São Paulo, entre 5 e 7 m de profundidade e prontamente congeladas. Parte das amostras de corais representam colônias saudáveis (n=7) e o restante são colônias apresentando diferentes estágios de necrose tecidual, sendo dividida entre necrose tecidual inicial (n=6), intermediária (n=2) e avançada (n=3). A amostra de peixe representa um potencial vetor. A classificação dos estágios de necrose tecidual foi realizada usando a porção do pólipos afetada: colônias com pequenos pontos de necrose na borda calicular foram consideradas como estágio inicial; colônias com mais de 50% da borda do cálice afetada foram consideradas como estágio intermediário; e colônias que continham pólipos completamente necrosados, estágio avançado (Fig. 1). Em todas as colônias examinadas (saudáveis e doentes), um fragmento de aproximadamente 25mg (~5mm<sup>2</sup>) da borda do cálice contendo tecido e esqueleto foi utilizado para a extração de DNA genômico total. No peixe, foi realizada uma raspagem suave do interior da boca para a extração de sua comunidade microbiana. O DNA dos corais foi extraído utilizando o *DNeasy Blood & Tissue kit* (Qiagen), seguindo as orientações do fabricante, enquanto que durante a extração de DNA do esfregaço da boca do sargentinho foram realizadas duas lavagens de 500µl do *buffer* AW2. A qualidade e pureza do DNA extraído foram verificadas através de eletroforese em gel de agarose (1,5%) e espectrofotometria (NanoDrop), respectivamente.

Usando os iniciadores bacterianos universais 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) e 519R (GWATTACCGCGGCKGCTG) (região V1-V3)

do gene 16S rDNA desenvolvidos por LANE (1991) e TURNER e colaboradores (1999), respectivamente. Um fragmento de aproximadamente 600pb foi amplificado utilizando o kit *Advantage®-HF 2 PCR*, seguindo concentrações proposta pelo fabricante e ciclagem de dois passos para as colônias doentes, nas seguintes condições: 94°C por 1 minuto seguido por 38 ciclos à 94°C por 30 segundos e 68°C por 1 minuto. Para colônias saudáveis e esfregaço da mucosa bucal do peixe, a PCR seguiu as seguintes condições: desnaturação inicial 94°C por 60 segundos, seguida por 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 56°C por 40 segundos e 68°C por 33 segundos, sendo finalizado por extensão final a 68°C por 33 segundos.

Amplicons resultantes foram purificados com esferas magnéticas (*Agencourt AMPure XP*) seguindo o protocolo do fabricante, e eluídos em 50µl de 1X TE (10mM de Tris-HCl, pH 8, 1mM de EDTA). A concentração final das amostras foi mensurada utilizando o *Qubit® dsDNA BR Assay Kit*. Bibliotecas foram preparadas com o *NEBNext Ultra II FS DNA Library Prep. kit* e suas respectivas concentrações e distribuição de tamanho verificadas usando o *Qubit® dsDNA HS (High Sensitivity) Assay Kit* e o *Bioanalyzer High Sensitivity DNA chip* respectivamente. O sequenciamento foi realizado na plataforma MiSeq (Illumina), utilizando o MiSeq Nano kit v2 (500 cycles), no Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa – Universidade de São Paulo (CEFAP-USP).

### Bioinformática

As sequências de cada amostra passaram por um conjunto de tratamentos até as análises estatísticas. As pontas de baixa qualidade de cada sequência, assim como as sequências curtas (<50pb) foram removidas com o programa *SolexaQA++* (COX; PETERSON; BIGGS, 2010). Sequências idênticas foram agrupadas utilizando o programa *Swarm* (MAHÉ et al., 2014) e posteriormente classificadas na plataforma *mothur* (SCHLOSS et al., 2009) utilizando o banco de dados 16S Silva - 132 (BDS) (MITROVIĆ et al., 2011).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *STAMP – Statical Analysis of Metagenomic Profiles* (PARKS et al., 2014), removendo as sequências provenientes de eucariotos. Os testes estatísticos foram realizados para múltiplos grupos através de análises de variância (ANOVA), com os testes post-hoc Turkey-Kramer e de correção de múltiplos testes Benjamini-Hochberg FDR, sendo 0,01 o filtro de p-valor corrigido utilizado. Whites's non-parametric t-test, tipo two-side, CI method (DP bootstrap, correção de testes múltiplos Benjamini-Hochberg FDR e filtro de p-valor de 0,01) foram aplicados para comparações de grupos.

## RESULTADOS

A partir do tecido e esqueleto de corais saudáveis e doentes, foram obtidas 1.190.239 sequências (em média 220pb) representando bactérias, arqueias, cloroplastos, mitocôndrias e eucariotos. De forma geral, o número de sequências obtidas a partir dos corais doentes (média de 90.065) foi cerca de três vezes maior do que a dos corais saudáveis (média de 30.160). Procedente de *A. saxatilis*, 11.764 sequências foram geradas. A classificação das sequências junto ao BDS indicou que parte das sequências dos corais saudáveis (25%), doentes (13%) e do peixe (94,7%) era oriunda de eucariotos e, outra parcela de cloroplastos e mitocôndrias. Assim, essas sequências foram excluídas das análises estatísticas. O número de sequências classificadas como sendo de *Bacteria* ou *Archaea* associadas aos corais doentes foi em média de 41.000 por colônia, ~700 por colônia saudável e 570 associada a *A. saxatilis* (Material Suplementar 3)

Dentre bactérias e arqueias, foram identificados 1.450 gêneros (Material Suplementar 2 e 4) dos quais 398 ocorrem em colônias saudáveis e doentes, a frequência desses gêneros representam 96,04% da microbiota associada aos corais saudáveis e 71,7% da comunidade de micro-organismos associados aos doentes. De forma geral, dos 1.450 gêneros, 302 são mais abundantes nas colônias saudáveis e todos os demais mais abundantes nas colônias doentes. Em total, 29,3% da frequência dos gêneros ( $n = 1.002$ ) estavam associados exclusivamente aos corais doentes e 3,96% (50 gêneros) estavam associados apenas com as colônias saudáveis (Figs. 2.2 e 2.3). Dentre os 398 gêneros compartilhados entre colônias saudáveis e doentes, 211 são significativamente diferentes e destes, 61 foram mais frequentes nas saudáveis e os demais mais frequentes nas colônias doentes. Associados a *A. saxatilis*, foram identificados 84 gêneros de micro-organismos, dos quais 13 são de *Archaea* e 71 de *Bacteria*. Dentre esses gêneros, 57 são comuns às colônias saudáveis e 77 às colônias doentes, sendo que os gêneros compartilhados entre o esfregaço bucal de *A. saxatilis* e as colônias representam frequência relativa de 15% nas colônias saudáveis e 84% na boca do peixe. Para as colônias apresentando necrose, os gêneros de bactérias e arqueias compartilhados com o esfregaço bucal de *A. saxatilis* totalizam 23%, sendo que esses mesmos gêneros perfazem 96% da comunidade de micro-organismos associados à boca do peixe (Material Suplementar 3).

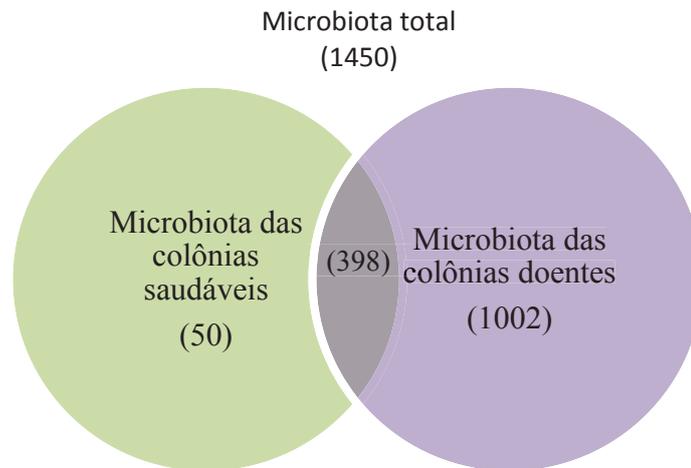


Figura 2.2. Diagrama de Veen indicando o número de gêneros de Bactérias e Archaeas associadas à *Tubastraea tagusensis*. Em cinza a microbiota exclusiva das colônias saudáveis e em vermelho a microbiota das colônias doentes. A interseção indica o número de gêneros compartilhados por ambos os grupos.

Em nível taxonômico de domínio, existem diferenças significativas entre as colônias saudáveis e doentes, sendo que as primeiras possuem frequência relativa de 4% de *Archaea* e 96% de *Bacteria*, enquanto nas colônias doentes apenas 0,5% representam *Archaea*. Dentre as bactérias, *Alphaproteobacteria*, *Bacteroidia* e *Oxyphotobacteria* são as classes que possuem maior discrepância nesta comparação, sendo que as duas primeiras representam cerca de 36% de todas as sequências oriundas das colônias saudáveis e 72% nas colônias de corais doentes. Entretanto, o número de leituras de *Oxyphotobacteria* decresce nas colônias doentes, totalizando 18,8% enquanto nas colônias saudáveis representam 42%. Duas classes, *Acidobacteria* (Subgroup\_19) e *Rubrobacteria* foram detectadas exclusivamente nos corais saudáveis, enquanto que dezenas de classes fazem parte apenas da microbiota das colônias doentes. Neste mesmo contexto, 334 ordens foram observadas, das quais *Rhodobacterales*, *Flavobacteriales*, *Rhizobiales*, *Cytophagales* e *Nostocales* representam mais da metade da microbiota das colônias doentes (~60%), tendo todas, menos *Nostocales*, aumento da frequência relativa nesta condição. Por sua vez, *Nostocales*, a ordem de bactéria mais frequente nas colônias saudáveis, teve acentuado decréscimo de abundância nas colônias doentes (de 33,85% para 7,5%). As ordens *Rickettsiales* e *Rhodospirillales*, que juntas somam cerca de 18% da microbiota das colônias saudáveis, também apresentaram diminuição nos corais doentes, chegando a 1,5%.

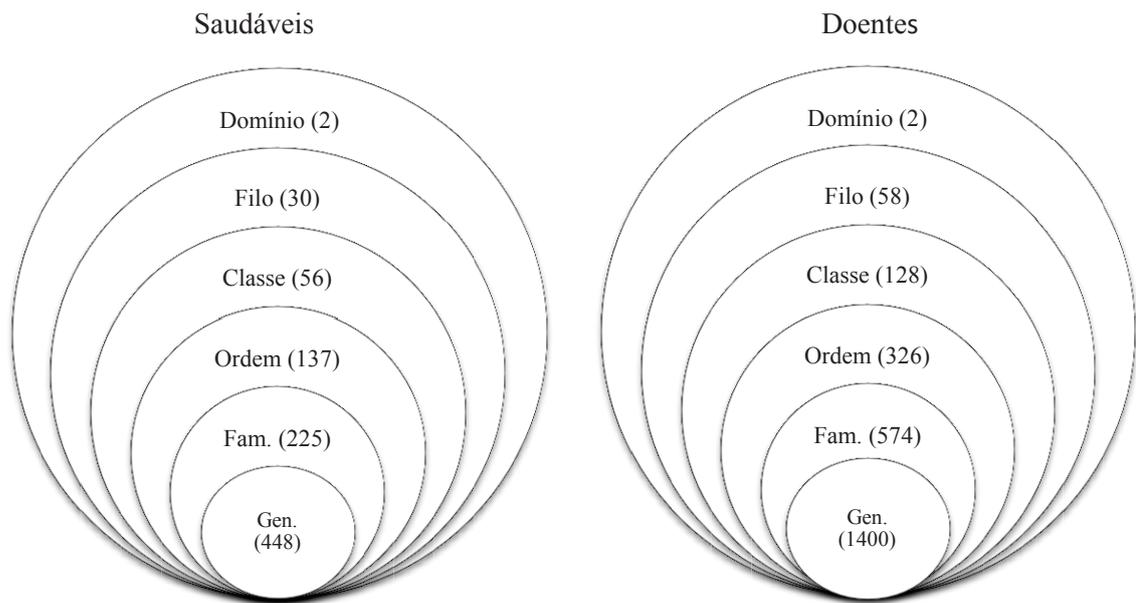


Figura 2.3. Diversidade de micro-organismos associados às colônias de corais *T. tagusensis* saudáveis e doentes.

Em nível de gêneros, a diversidade de micro-organismos associados aos corais em ambos os estados analisados é alta. Entretanto, apesar de que a maioria apresenta baixa frequência, é possível observar que existem alguns que são formadores da maior parte do microbioma e que o mesmo difere entre os estados dos corais. Nas colônias saudáveis, 22 gêneros (Fig. 2.4A) representam 58,1% da microbiota, estando apenas um desses gêneros, *Rubrobacter*, ausente nas colônias doentes e os demais 21 gêneros dessa lista não são significativamente abundantes nos corais doentes, representando 4,8% da comunidade associada. Em contrapartida, dos 22 gêneros mais abundantes nas colônias doentes (Fig. 2.4B) (41,3% da microbiota observada), cinco também foram recuperados nas colônias saudáveis, sendo que os demais representam 5,06% do microbioma associado às colônias saudáveis.

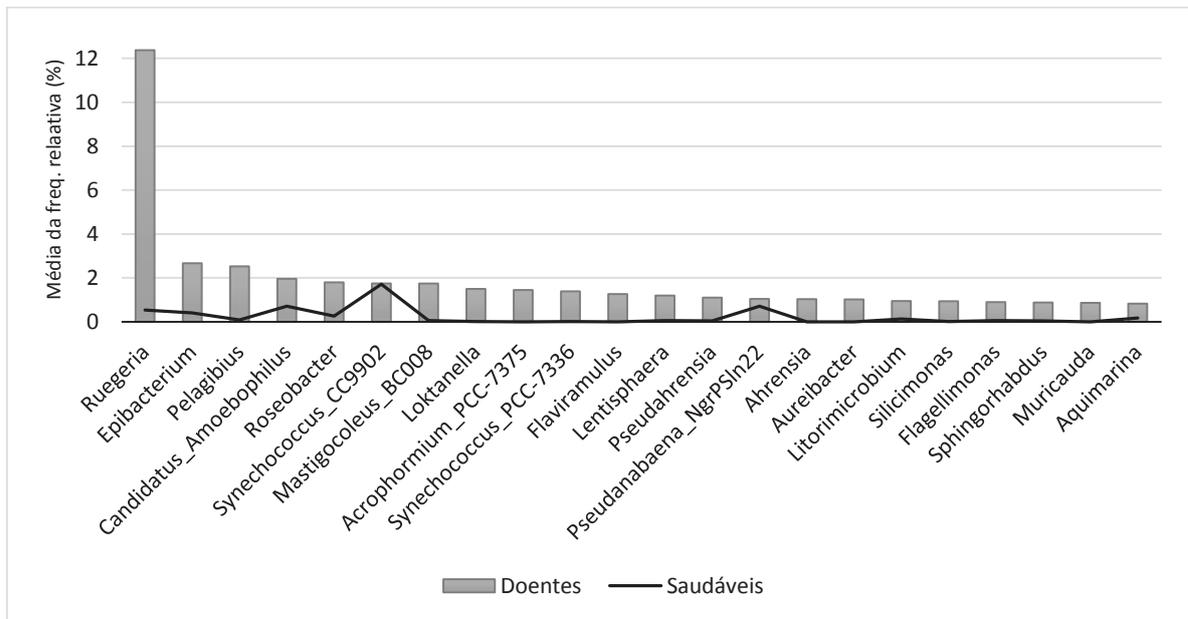
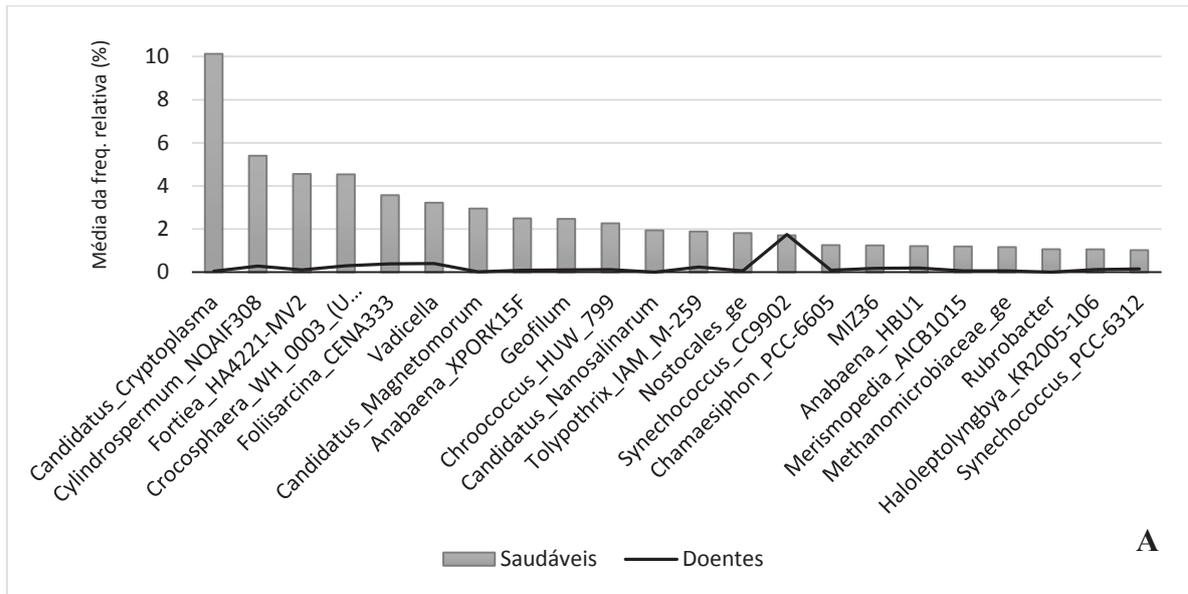


Figura 2.4 – Os 22 gêneros com maior frequência relativa em: (A) associados aos corais saudáveis e suas frequências nos corais doentes; e (B) associados aos corais doentes e suas frequência nos corais saudáveis.

Comparações visando verificar se existem diferenças do microbioma com relação às colônias saudáveis e aos três estágios observados da doença (inicial, intermediário e avançando – vide Fig. 2.1), sugerem que 15 filos compõem quase toda a microbiota associada aos corais, independente do estado. Os mais abundantes, *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* e *Firmicutes*, tiveram abundâncias alteradas quando comparadas entre colônias saudáveis e doentes (i.e., aumento das *Proteobacterias* e *Bacteroidetes* e diminuição das *Cyanobacterias* - Tab. 2.1).

Tabela 2.1. Frequência relativa dos principais filos associados aos corais saudáveis (S), e nas fases inicial (DI), intermediária (DM) e avançada (DA) de infecção. Asterisco (\*) indicam filos pertencentes ao domínio Archaea, sendo os demais Bacteria.

<b>Filo</b>	<b>S (%)</b>	<b>DI (%)</b>	<b>DM (%)</b>	<b>DA (%)</b>
<b>Proteobacteria</b>	39,97	59,60	40,45	51,93
<b>Cyanobacteria</b>	38,76	16,51	18,99	16,27
<b>Bacteroidetes</b>	8,23	18,50	33,69	24,92
<b>Actinobacteria</b>	3,03	0,81	0,27	1,53
<b>Firmicutes</b>	2,50	0,15	0,08	0,20
<b>Nanoarchaeaeota*</b>	2,03	0,02	0,01	0,02
<b>Euryarchaeota*</b>	1,43	0,12	1,50	0,17
<b>Planctomycetes</b>	1,00	1,67	1,44	1,64
<b>Halanaerobiaeota</b>	0,83	0,03	0,05	0,06
<b>Crenarchaeota*</b>	0,53	0,14	0,07	0,05
<b>Verrucomicrobia</b>	0,42	0,15	0,17	0,46
<b>Chloroflexi</b>	0,32	0,27	0,74	0,41
<b>Fusobacteria</b>	0,26	0,02	0,13	0,09
<b>Lentisphaerae</b>	0,16	0,89	1,87	1,31
<b>Acidobacteria</b>	0,15	0,31	0,14	0,32
<b>Total</b>	99,61	99,20	99,59	99,40

Conseqüentemente, o acompanhamento da sucessão dos micro-organismos nos estágios analisados indica que a vasta maioria dos grupos que compõem o microbioma das colônias saudáveis também está presente nas colônias doentes. Entretanto, apesar de serem observadas variações de frequência do microbioma em relação à condição do coral, uma parcela correspondente a aproximadamente metade do total de micro-organismos associados permanece constante mesmo com o avanço da doença. Ao serem observados os primeiros estágios de necrose tecidual (estágio inicial), o número de gêneros de *Bacteria* e *Archaea* quase triplica (2,88 vezes), mas 73,6% (409 gêneros) dos micro-organismos identificados nas colônias saudáveis também foram identificados neste estágio da doença. No estágio de infecção intermediária o número de gêneros duplica em relação às saudáveis (Fig. 5), mas diminui em relação ao estágio inicial, correspondendo a 40%. Em estágios de *necrose tecidual* avançada é observado aumento da diversidade de micro-organismos se comparado com o estágio intermediário, mas 73,3% da microbiota (347 gêneros) também são encontradas nas

colônias saudáveis. Em comparação entre estágios de infecção, observa-se 492 gêneros em comum entre os estágios intermediário e avançado, os quais representam 24,6% da microbiota associada às últimas (Fig. 2.5). Em contrapartida, 658 gêneros de *Bacteria* e *Archaea* são compartilhados entre os estágios iniciais e avançados, mas ausentes nos indivíduos saudáveis, e 476 gêneros estão presentes em todos os estágios de infecção.

Apesar da parcela de micro-organismos compartilhados, para cada estágio, incluindo colônias saudáveis, é observado um grupo de bactérias e arqueias exclusivos: 56 para colônias saudáveis; 229 em colônias em estágio inicial de necrose; 35 para o estágio intermediário; e 38 exclusivos das colônias em estágio avançado. A comparação da microbiota de colônias saudáveis e aquela de diferentes estágios de infecção são significativamente diferentes ( $p$ -valor  $<0,01$ ), apesar de que a diferença não foi significativa entre diferentes estágios da doença.



Figura 2.5. Diagrama de Venn mostrando a microbiota (gêneros) de cada estágio analisado, sendo azul para colônias saudáveis, verde estágio inicial de necrose, amarelo para colônias em estágio intermediário e laranja das colônias em estágio avançado. Nas intersecções está presentes o número de gêneros compartilhados entre estágios.

O *core* microbiano (micro-organismos persistentes em todos os espécimes de uma determinada espécie de holobionte) de *Tubastraea tagusensis* é composto por 18 gêneros de bactérias e dois gêneros de arqueias (vide Capítulo 1), dos quais apenas Candidatus

*Nanosalinarum* e *Candidatus Magnetomorum* não foram encontrados nas colônias necrosadas. De forma geral, o core microbiano é responsável por uma grande parcela da comunidade simbiote das colônias saudáveis (42%), mas significativamente menor em relação às colônias doentes, representando 19,6%, 12,7% e 13,3% nas colônias em estágio inicial, intermediário e avançado respectivamente. Pertencente ao core, apenas *Synechococcus* CC9902 não diminuiu significativamente sua frequência e, apesar da baixa representatividade geral, *Epibacterium* e *Ruegeria* aumentaram sua frequência relativa em mais de seis e 23 vezes, respectivamente (Fig. 2.6).

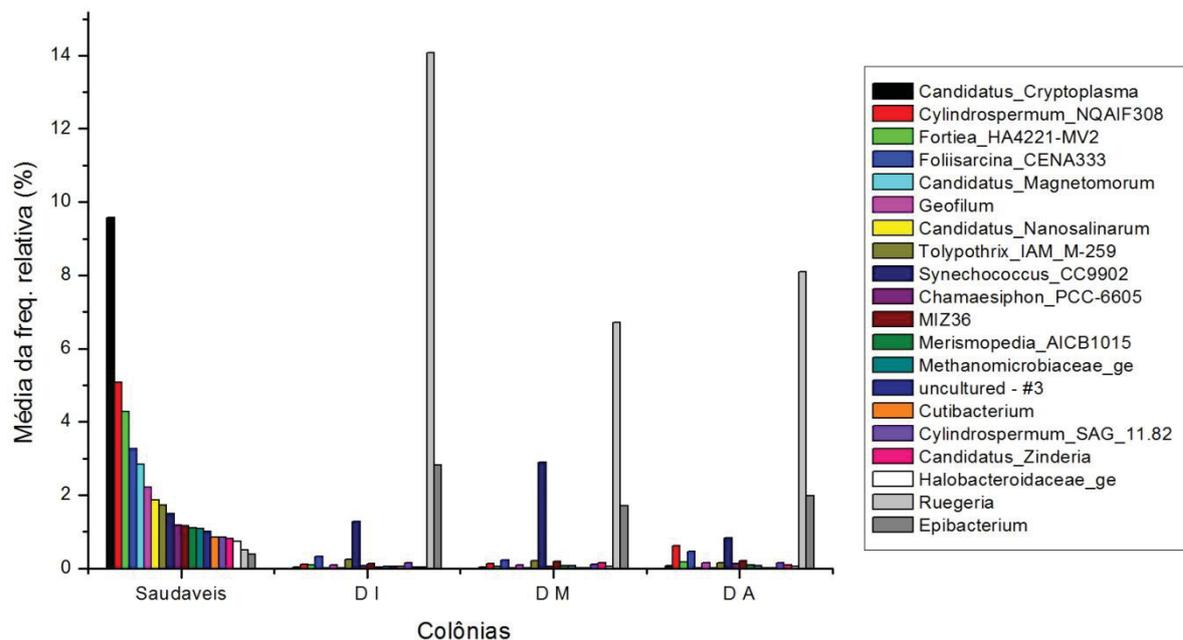


Figura 2.6. Média da frequência relativa dos gêneros que compõe o core microbiano nas colônias saudáveis, em estágio inicial (DI), intermediário (DM) e avançado (DA) da doença.

Buscando identificar patógenos potenciais da necrose tecidual de *T. tagusensis*, especial atenção foi direcionada a comunidade de micro-organismos associados exclusivamente ao estágio inicial do fenômeno. Dentre esses, foram observadas 102 diferenças significativas, dos quais foram excluídos gêneros que não apresentam características de patógenos, tais como aqueles frequentes nas colônias saudáveis (48) e os que não estavam presentes em todas as colônias doentes (9). Assim, a lista de potenciais patógenos foi reduzida para 45 gêneros, sendo todos pertencentes ao domínio *Bacteria*. Em adição, todos os gêneros com menos de 10 leituras por colônia foram excluídos da caracterização dos potenciais patógenos, restando 17 gêneros de Bactérias (Tab. 2.2).

Conseqüentemente, além de identificadas em todas as colônias em estágio inicial de necrose, estes 17 gêneros foram encontrados nos demais estágios analisados e com tendência de aumento da frequência relativa por estágio.

Tabela 2.2. Classificação dos 17 gêneros de Bactérias encontradas em todas as colônias em todos os estágios de necrose analisados e com tendência de aumento da frequência relativa durante o “desenvolvimento” da doença no coral *Tubastraea tagusensis*.

<b>Família</b>	<b>Gênero</b>	<b>Saudáveis</b>	<b>DI</b>	<b>p-valor</b>
<b>Arenicellaceae</b>	<i>Arenicella</i>	0,01915	0,311451	0,003819
<b>Cyclobacteriaceae</b>	<i>Aureibacter</i>	0	0,117278	0,003383
	<i>Fulvivirga</i>	0	0,196171	0,007614
<b>Flavobacteriaceae</b>	<i>Spongiibacterium</i>	0	0,312766	0,003638
	<i>Muricauda</i>	0	1,035522	0,00453
	<i>Aureitalea</i>	0	0,136383	0,009921
<b>Rhodobacteraceae</b>	<i>Litorisediminivivens</i>	0,063933	0,505203	0,001041
	<i>Aestuariahabitans</i>	0,012801	0,189821	0,00115
	<i>Litorisediminicola</i>	0,047247	0,362939	0,002931
	<i>Poseidonocella</i>	0	0,10241	0,003026
	<i>Xuhuaishuia</i>	0	0,127789	0,004255
	<i>Marinovum</i>	0,0383	0,286314	0,005042
	<i>Litorimicrobium</i>	0,138488	0,859186	0,005407
	<i>Marinibacterium</i>	0,012801	0,133853	0,005797
	<i>Oceanobacterium</i>	0,063933	0,332632	0,006388
	<i>Rhodobacteraceae_ge</i>	0,044783	0,334763	0,008323
<b>Sphingomonadaceae</b>	<i>Sphingorhabdus</i>	0,044783	0,860783	0,001011

## DISCUSSÃO

Mudanças na comunidade de micro-organismos associados às colônias do coral invasor *Tubastraea tagusensis* são significativas desde os primeiros sinais de necrose tecidual, havendo aumento da diversidade microbiana (i.e., bactérias e arqueias), o que se mostra consistente com estudos sobre doenças em corais (CLOSEK et al., 2014; GIGNOUX-WOLFSOHN; VOLLMER, 2015; SUNAGAWA et al., 2009). No entanto, parte da microbiota associada aos corais doentes (>50%) é formada por gêneros (~300) também

identificados nas colônias saudáveis. Assim, apesar da detecção de centenas (~1000) de gêneros de micro-organismos nas colônias doentes (ausentes nas colônias saudáveis), esses não substituíram a microbiota associada ao hospedeiro saudável. Em adição, apesar da diversidade, a frequência relativa dos gêneros de *Bacteria* e *Archaea* que foram detectadas exclusivamente em colônias doentes não é alta, sendo a maior específica para um gênero de cerca de 1,45% da microbiota total (*Acrophormium\_PCC-7375*), e média dentre gêneros é ~0,028%. Conseqüentemente, essa baixa frequência pode indicar que a vasta maioria é composta por espécies oportunistas/colonizadores secundários, que foram capazes de se desenvolver no coral após o desbalanço da microbiota causada pela infecção primária. Entretanto, o oposto também foi detectado, i.e., gêneros presentes apenas em colônias saudáveis (50, dos quais 26 possuem  $p\text{-valor} \leq 0,01$  e todos possuem baixa frequência relativa [média de ~0,079]).

Dentre as arqueias, desde os estágios iniciais de necrose tecidual, a frequência relativa desse domínio, que é normalmente baixa em *T. tagusensis* (veja Capítulo 1), assim como em outros corais (CÁRDENAS et al., 2012; WEGLEY et al., 2007), decresceu significativamente, podendo indicar que representantes deste grupo são mais susceptíveis a mudanças no balanço da microbiota em geral. Apesar de também sofrerem mudanças nas suas respectivas frequências relativas, os quinze principais filos (12 de *Bacteria* e três de *Archaea*) não mudaram entre colônias saudáveis a aquelas apresentando necrose tecidual (inicial à avançada). Dessa forma, nota-se que há persistência desses filos como os principais formadores da microbiota dos corais *T. tagusensis*, independente da condição da colônia (doente ou saudável). Além da persistência dos filos, muitos gêneros, presentes nas colônias saudáveis também se mantiveram conservados independente do estágio da doença, indicando que existe uma relação balanceada entre microbiota e hospedeiro (HERNANDEZ-AGREDA; GATES; AINSWORTH, 2017) Entretanto, derivações na diversidade e abundância da microbiota entre estágios de necrose tecidual sugere um processo de colonização secundária das regiões afetadas do hospedeiro (GIGNOUX-WOLFSOHN; VOLLMER, 2015; SUNAGAWA et al., 2009), além da relativa “resistência” da microbiota primária (microbiota das colônias saudáveis) (CLOSEK et al., 2014; GARCIA et al., 2013; GIGNOUX-WOLFSOHN; VOLLMER, 2015). Outro fator observado é que a porcentagem da área das colônias de *T. tagusensis* necrosadas não está diretamente relacionada com a diversidade de micro-organismos associados. No estágio inicial, onde é observada necrose de menos de 0,25 cm<sup>2</sup> da borda calicular de um pólipos, foi identificada a maior diversidade de gêneros de micro-

organismos, assim como quase todos aqueles detectados nas colônias saudáveis. Ressalta-se ainda que o estágio inicial de necrose tecidual foi o com maior diversidade exclusiva. No estágio intermediário, onde se observa aumento da área afetada pela necrose (Fig. 2.1C e 2.1D), o número de gêneros identificados, além de diminuir, não indica a ocorrência de micro-organismos “colonizadores” exclusivos desse estágio. Em adição, neste estágio foi detectado um significativo decréscimo em número e porcentagem de gêneros se comparados com colônias em estágio inicial, indicando uma possível resposta do coral à doença. Em colônias apresentando avançado estágio de necrose o número de gêneros identificados aumenta em relação ao estágio anterior, mas não significativamente perante o estágio inicial. Nesse estágio a maioria dos micro-organismos sucede a dos outros estágios, sendo apenas 38 gêneros pioneiros.

Estas variações no microbioma indicam rápida desestabilização da comunidade de simbiontes durante o processo de infecção inicial do hospedeiro, e subsequente colonização por micro-organismos oportunistas, conforme observado em outras doenças de corais (GIGNOUX-WOLFSOHN; ARONSON; VOLLMER, 2017; GIGNOUX-WOLFSOHN; VOLLMER, 2015). Entretanto, após este estágio de máxima colonização por espécies oportunistas, no estágio de necrose intermediário a comunidade de micro-organismos tende a se estabilizar, sendo este possivelmente o estágio mais crítico para o coral uma vez que a frequência dos micro-organismos simbiontes (i.e., aqueles presentes nas colônias saudáveis) diminui significativamente, indicando importante *turn-over* do microbioma. No ápice da necrose, quando praticamente não existe mais tecido saudável no pólipos afetado, a microbiota simbiote aumenta novamente sua frequência relativa (~70%), sendo o restante composto por micro-organismos do estágio médio, além de outros que não foram detectados no último, mas identificados no estágio inicial.

Paralelamente as análises referentes ao microbioma da necrose, atenção foi direcionada para verificação da presença do core microbiano. Dentre os 20 gêneros descritos como core microbiano, apenas dois, representado um de *Bacteria* e outro de *Archaea*, não foram identificados em todas as colônias doentes amostradas. De modo geral a frequência relativa desses gêneros diminuiu significativamente (>50%) nas colônias apresentando necrose, seguindo o mesmo padrão dos colonizadores primários em cada estágio, como descrito acima. Entretanto, três gêneros de *Bacteria* apresentaram padrões diferentes: *Synechococcus*\_CC9902 aumenta sua frequência no estágio intermediário e nos demais sofre um decréscimo como a maioria dos gêneros; e *Ruegeria* e *Epibacterium* foram mais

frequentes nas colônias doentes do que nas saudáveis - *Ruegeria* se destaca por ser responsável por 14%, 6,7% e 8% da microbiota associada aos estágios inicial, intermediário e avançado respectivamente. De forma geral, *Ruegeria* e *Epibacterium* foram identificados como gêneros mais abundantes dentre os 22 com maior frequência relativa nas colônias doentes. O gênero *Ruegeria* foi descrito associado a diversos corais saudáveis (APPRILL; HUGHEN; MINCER, 2013; BAYER et al., 2013; HARDER et al., 2003; MULLER et al., 2017) e doentes (APPRILL; HUGHEN; MINCER, 2013; CASEY; CONNOLLY; AINSWORTH, 2015; NG et al., 2015; SATO et al., 2017; SEKAR; KACZMARSKY; RICHARDSON, 2008; SÉRÉ et al., 2013), sendo que Apprill e colaboradores (2013) indicam que *Ruegeria* aumenta sua frequência em tecidos de corais doentes, assim como observado em *T. tagusensis*.

A ocorrência de *Ruegeria* no core microbiano de *T. tagusensis*, apesar de “função” ainda desconhecida, deve auxiliar o coral na manutenção de sua saúde/fisiologia, assim como postulado como “funções” do core microbiano (HERNANDEZ-AGREDA; GATES; AINSWORTH, 2017). Além disso, estudos apontam que o gênero *Ruegeria* apresenta potencial de inibidor de outros gêneros e produção do ácido tropodietético, que têm ação antimicrobiana (PORSBY; NIELSEN; GRAM, 2008). Neste contexto, a observação que este gênero é o mais abundante durante o desenvolvimento da necrose tecidual aqui observada, pode ser i) uma tentativa do hospedeiro, ou mesmo desta comunidade microbiana em estabilizar o microbioma, ou ainda ii) uma resposta do mesmo as novas condições. Neste primeiro caso, condições para a multiplicação de células de *Ruegeria* ocorreriam por parte do hospedeiro, ou como resposta fisiológica microbiana do desbalanço de sua comunidade. Com o avanço da doença pelo pólip (estágio intermediário e avançado), o gênero diminui sua frequência, indicando que as condições do hospedeiro, devido à proliferação de inúmeras espécies de bactérias até então ausentes ou raras (i.e., desbalanço microbiano e presença de espécies “colonizadoras” e/ou “oportunistas”), já não sustentam sua manutenção como anteriormente. No segundo caso, uma vez que o balanço do core microbiano (adaptação) e demais simbiontes primários (aptidão) é desestabilizado, são detectadas inúmeras espécies oportunistas, sendo que *Ruegeria* se torna oportunista da condição, aumentando sua abundância como previamente observado em outras doenças de corais e no experimento com inserção de um agente patogênico conhecido na espécie *Pocillopora damicornis* (ROSADO et al., 2019). Apesar de ambas as alternativas serem viáveis, entendemos que *Ruegeria* não possui perfil de organismo patogênico. No caso de *Epibacterium*, apesar de não haver relação

conhecida com corais escleractíneos (grupo descrito associado a superfícies de algas marinhas [vide Penesyan *et al.*, 2013]), sua detecção e aumento de abundância durante a evolução da necrose tecidual pode ser relacionada à exposição do esqueleto coralíneo ao ambiente que, uma vez sem tecido, se transforma em substrato para diversos organismos, como por exemplo, algas filamentosas. Em adição, trabalhos recentes reclassificaram algumas espécies do gênero *Ruegeria* como *Epibacterium* (WIRTH; WHITMAN, 2018), dessa forma podemos estar falando apenas do gênero *Epibacterium* nesse trabalho, para confirmação dessas informações é necessária novas análises. A análise metagenômica também auxiliou na identificação de 17 gêneros de bactérias (Tab. 2.2) como sendo micro-organismos potencialmente patógenos. Destes, apenas *Arenicella* já foi descrita associada à doença de corais (“skeletal growth anomalies” em *Platygyra carnosa*, Ng *et al.*, 2015). Entretanto, apesar dos gêneros restantes não terem sido mencionados como patógenos de corais, as famílias *Flavobacteriaceae* e *Rhodobacteraceae*, que englobam 13 dos 16 gêneros restantes, foram previamente associadas às seguintes doenças coralíneas: *Flavobacterias* – Banda Branca (GIGNOUX-WOLFSOHN; VOLLMER, 2015); Praga Branca (GARCIA *et al.*, 2013; RODER *et al.*, 2014); e Banda Amarela (APPRILL; HUGHEN; MINCER, 2013); e as *Rhodobacterias* – Síndrome Branca (POLLOCK *et al.*, 2017); Síndrome da Mancha Branca em *Porites* (SÉRÉ *et al.*, 2013); Praga Branca (RODER *et al.*, 2014); e Banda Preta (SEKAR; KACZMARSKY; RICHARDSON, 2008).

Apesar das características supracitadas a respeito desse grupo de bactérias com potencial patogênico, não é possível afirmar causalidade na necrose tecidual em *T. tagusensis*. Com raras exceções, a identificação do(s) agente(s) patogênico(s), assim como os vetores de doenças coralíneas não é possível. Entretanto, esse trabalho propõe o peixe *A. saxatilis* como um potencial vetor para essa doença. Mais especificamente, o contato da mucosa bucal de *A. saxatilis* durante mordidas em *T. tagusensis* insere micro-organismos exógenos no coral *T. tagusensis*. Consequentemente, esses micro-organismos podem ser capazes de desbalancear a microbiota associada à parte do tecido que foi lesionada mecanicamente e, por consequência, desencadear a necrose tecidual. Em adição, dentre os gêneros com potencial patogênico, três foram identificados associados à mucosa bucal de *A. saxatilis*: *Litorisediminivivens*; *Aestuariaihabitans*; e *Litorimicrobium*. No entanto, destaca-se que apenas uma sequência de cada um desses gêneros foi encontrada no sequenciamento da referida mucosa.

Além disso, a análise do perfil das bactérias identificadas como potenciais patógenos (Tab. 2) indica que dois gêneros possuem relação com derivados de petróleo: *Muricauda*

(HWANG et al., 2009) e *Sphingorhabdus* (JEONG; JIN; JEON, 2016). Consequentemente, existe ainda a possibilidade de relação entre a doença de *T. tagusensis* e contaminação por petróleo, uma vez que entre 1974 e 2012, 55 acidentes envolvendo derramamento de petróleo no Estado de São Paulo foram registrados, sendo São Sebastião (município próximo a Ilha dos Búzios), a localidade mais afetada (TREVIZANI et al., 2014). Em adição, em 2013 esta localidade foi vítima de outro grave derramamento de petróleo (PROCURADORIA DA REPÚBLICA NO ESTADO DE S. PAULO, 2016), o que pode ter funcionado como um facilitador da doença de duas formas distintas: i) o ambiente em que colônias de *T. tagusensis* vêm apresentando necrose tecidual vem sendo cronicamente afetado por derrames de petróleo e/ou outros subprodutos do mesmo, facilitando a presença e “disponibilidade” de representantes de *Muricauda* e *Sphingorhabdus*; ou ii) corais que vivem em localidades com aporte constante de petróleo e/ou outros subprodutos do mesmo, estão bioacumulando esses contaminantes e, por consequência, sua metabolização por Bactérias que normalmente estão associadas ao petróleo.

## REFERÊNCIAS

- AINSWORTH, T. D. et al. The coral core microbiome identifies rare bacterial taxa as ubiquitous endosymbionts. **The ISME journal**, v. 9, n. 10, p. 1–14, 2015.
- ANTHONY, K. R. N. et al. Ocean acidification causes bleaching and productivity loss in coral reef builders. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 45, p. 17442–17446, 2008.
- APPRILL, A.; HUGHEN, K.; MINCER, T. Major similarities in the bacterial communities associated with lesioned and healthy *Fungiidae* corals. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 7, p. 2063–2072, jul. 2013.
- BAYER, T. et al. The microbiome of the red sea coral *Stylophora pistillata* is dominated by tissue-associated *Endozoicomonas* bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 15, p. 4759–4762, 2013.
- BEN-HAIM, Y.; ROSENBERG, E. A novel *Vibrio* sp. pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. **Marine Biology**, v. 141, n. 1, p. 47–55, 2002.
- BEN-HAIM, Y.; ZICHERMAN-KEREN, M.; ROSENBERG, E. Temperature-Regulated Bleaching and Lysis of the Coral *Pocillopora damicornis* by the Novel Pathogen *Vibrio coralliilyticus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 4236–4241, 2003.
- BLACKALL, L. L.; WILSON, B.; VAN OPPEN, M. J. H. H. Coral-the world's most diverse symbiotic ecosystem. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 21, p. 5330–5347, 1 nov. 2015.
- CÁRDENAS, A. et al. Shifts in bacterial communities of two caribbean reef-building coral species affected by white plague disease. **ISME Journal**, v. 6, n. 3, p. 502–512, 29 mar. 2012.
- CARLOS, C.; TORRES, T. T.; OTTOBONI, L. M. M. Bacterial communities and species-specific associations with the mucus of Brazilian coral species. **Scientific Reports**, v. 3, n. 1, p. 1624, 2013.
- CASEY, J. M.; CONNOLLY, S. R.; AINSWORTH, T. D. Coral transplantation triggers shift in microbiome and promotion of coral disease associated potential pathogens. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 11903, 6 dez. 2015.

- CASTRO, C. B.; PIRES, D. O. DE O. Brazilian coral reefs: What we already know and what is still missing. **Bulletin of Marine Science**, v. 69, n. 2, p. 357–371, 2001.
- CLOSEK, C. J. et al. Coral transcriptome and bacterial community profiles reveal distinct Yellow Band Disease states in *Orbicella faveolata*. **ISME Journal**, v. 8, n. 12, p. 2411–2422, 20 dez. 2014.
- COSTA, T. J. F. et al. Expansion of an invasive coral species over Abrolhos Bank, Southwestern Atlantic. **Marine Pollution Bulletin**, v. 85, n. 1, p. 252–253, 2014.
- COX, M. P.; PETERSON, D. A.; BIGGS, P. J. SolexaQA: At-a-glance quality assessment of Illumina second-generation sequencing data. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 1, p. 485, 2010.
- CREED, J. C. et al. Cnidaria, Scleractinia, *Tubastraea coccinea* Lesson, 1829 and *Tubastraea tagusensis* Wells, 1982: Distribution extension . **Check List**, v. 4, n. 3, p. 297–300, 2008.
- DE PAULA, A. F. **Biologia reprodutiva, crescimento e competição dos corais invasores *Tubastraea coccinea* e *Tubastraea tagusensis* (Scleractinia: Dendrophylliidae) com espécies nativas.** [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.
- DE PAULA, A. F.; CREED, J. C. Two species of the coral *Tubastraea* (Cnidaria, Scleractinia) in Brazil: A case of accidental introduction. **Bulletin of Marine Science**, v. 74, n. 1, p. 175–183, 2004.
- DENNER, E. B. M. et al. *Aurantimonas corallicida* gen. nov., sp. nov., the causative agent of white plague type II on Caribbean *Scleractinian* corals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 1115–1122, 1 jul. 2003.
- DOWER, J. F.; IAN PERRY, R. High abundance of larval rockfish over Cobb Seamount, an isolated seamount in the Northeast Pacific. **Fisheries Oceanography**, v. 10, n. 3, p. 268–274, 2001.
- FENNER, D.; BANKS, K. Orange Cup Coral *Tubastraea coccinea* invades Florida and the Flower Garden Banks, Northwestern Gulf of Mexico. **Coral Reefs**, v. 23, n. 4, p. 505–507, 2004.
- FERREIRA, C. E. L.; GONÇALVES, J. E. A.; COUTINHO, R. Ship hulls and oil platforms as potential vectors to marine species introduction. **Journal of Coastal Research**, v. 3, n. 39, p. 1340–1345, 2006.

- GARCIA, G. D. et al. Metagenomic Analysis of Healthy and White Plague-Affected *Mussismilia braziliensis* Corals. **Microbial Ecology**, v. 65, n. 4, p. 1076–1086, 2013.
- GIGNOUX-WOLFSOHN, S. A.; ARONSON, F. M.; VOLLMER, S. V. Complex interactions between potentially pathogenic, opportunistic, and resident bacteria emerge during infection on a reef-building coral. **FEMS microbiology ecology**, v. 93, n. 7, 1 jul. 2017.
- GIGNOUX-WOLFSOHN, S. A.; VOLLMER, S. V. Identification of candidate coral pathogens on white band disease-infected *Staghorn* coral. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–16, 2015.
- HARDER, T. et al. A distinctive epibiotic bacterial community on the soft coral *Dendronephthya* sp. and antibacterial activity of coral tissue extracts suggest a chemical mechanism against bacterial epibiosis. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 43, n. 3, p. 337–347, 2003.
- HERNANDEZ-AGREDA, A.; GATES, R. D.; AINSWORTH, T. D. Defining the Core Microbiome in Corals' Microbial Soup. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 125–140, 2017.
- HWANG, C. Y. et al. *Muricauda olearia* sp. nov., isolated from crude-oil-contaminated seawater, and emended description of the genus *Muricauda*. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 8, p. 1856–1861, 1 ago. 2009.
- JEONG, H. I.; JIN, H. M.; JEON, C. O. Complete genome sequence of *Sphingorhabdus* sp. M41, a versatile hydrocarbon degrader, isolated from crude oil-contaminated coastal sediment. **Journal of Biotechnology**, v. 227, p. 41–42, 10 jun. 2016.
- LANE, D. 16S/23S rRNA sequencing. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics.**, p. 115–175, 1991.
- LINS-DE-BARROS, M. M. et al. Archaea, bacteria, and algal plastids associated with the reef-building corals *Siderastrea stellata* and *Mussismilia hispida* from Búzios, South Atlantic Ocean, Brazil. **Microbial Ecology**, v. 59, n. 3, p. 523–532, 16 abr. 2010.
- LINS-DE-BARROS, M. M. et al. Microbial Community Compositional Shifts in Bleached Colonies of the Brazilian Reef-Building Coral *Siderastrea stellata*. **Microbial Ecology**, v. 65,

n. 1, p. 205–213, 5 jan. 2013.

LUNA, G. M. et al. *Vibrio harveyi* as a causative agent of the White Syndrome in tropical stony corals. **Environmental Microbiology Reports**, v. 2, n. 1, p. 120–127, 2010.

MAHÉ, F. et al. Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. **PeerJ**, v. 2, p. e593, 25 set. 2014.

MANTELATTO, M. C. et al. Range expansion of the invasive corals *Tubastraea coccinea* and *Tubastraea tagusensis* in the Southwest Atlantic. **Coral Reefs**, v. 30, n. 2, p. 397–397, 30 jun. 2011.

MEYER, J. L. et al. Comparative metagenomics of the polymicrobial black band disease of corals. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. APR, p. 618, 18 abr. 2017.

MITROVIĆ, S. M. et al. The effect of heroin on verbal memory. **Psychiatria Danubina**, v. 23, n. 1, p. 53–59, 27 nov. 2011.

MOREIRA, A. P. B. et al. Culturable heterotrophic bacteria associated with healthy and bleached scleractinian *Madracis decactis* and the fireworm *Hermodice carunculata* from the remote St. Peter and St. Paul Archipelago, Brazil. **Current Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 38–46, 2013.

MULLER, E. M. et al. Low pH reduces the virulence of black band disease on *Orbicella faveolata*. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, p. e0178869, 1 jun. 2017.

NG, J. C. Y. et al. Pyrosequencing of the bacteria associated with *Platygyra carnosus* corals with skeletal growth anomalies reveals differences in bacterial community composition in apparently healthy and diseased tissues. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. OCT, p. 1142, 20 out. 2015.

PANTOS, O. et al. The bacterial ecology of a plague-like disease affecting the Caribbean coral *Montastrea annularis*. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 5, p. 370–382, 1 maio 2003.

PARKS, D. H. et al. STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics**, v. 30, n. 21, p. 3123–3124, 1 nov. 2014.

PENESYAN, A. et al. *Epibacterium ulvae* gen. nov., sp. nov., epibiotic bacteria isolated from

the surface of a marine alga. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. PART 5, p. 1589–1596, 1 maio 2013.

POLLOCK, F. J. et al. White syndrome-affected corals have a distinct microbiome at disease lesion fronts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 2, p. e02799-16, 15 jan. 2017.

PORSBY, C. H.; NIELSEN, K. F.; GRAM, L. Phaeobacter and Ruegeria species of the Roseobacter clade colonize separate niches in a Danish Turbot (*Scophthalmus maximus*)-rearing farm and antagonize *Vibrio anguillarum* under different growth conditions. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 23, p. 7356–64, dez. 2008.

PROCURADORIA DA REPÚBLICA NO ESTADO DE S. PAULO. **MPF e MP/SP processam Petrobras e Transpetro por vazamento de mais de 3,5 mil litros de óleo em São Sebastião**. Disponível em: <<http://www.mpf.mp.br/sp/sala-de-imprensa/noticias-sp/mpf-e-mp-sp-processam-petrobras-e-transpetro-por-vazamento-de-mais-de-3-5-mil-litros-de-oleo-em-sao-sebastiao-sp>>. Acesso em: 20 fev. 2019.

RAYMUNDO, L. J. et al. **Coral Disease Handbook, Guidelines for Assessment, Monitoring & Management**. Currie Com ed. [s.l: s.n.].

REED, J. K. Comparison of deep-water coral reefs and lithoherms off southeastern USA. **Hydrobiologia**, v. 471, p. 57–69, 2002.

REIS, A. M. M. et al. Bacterial diversity associated with the Brazilian endemic reef coral *Mussismilia braziliensis*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 4, p. 1378–1387, 2 fev. 2009.

RODER, C. et al. Bacterial profiling of White Plague Disease in a comparative coral species framework. **ISME Journal**, v. 8, n. 1, p. 31–39, 8 jan. 2014.

ROGERS, C. Sampling may be hazardous to your reef monitoring program. **Proceedings of the Hawai'i Coral Reef Monitoring Workshop. East-West Center, Honolu**, p. 57–64, 1999.

ROSADO, P. M. et al. Marine probiotics: increasing coral resistance to bleaching through microbiome manipulation. *The ISME Journal*, v. 13, n. 4, p. 921–936, 5 abr. 2019.

ROSENBERG, E. et al. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution.

**Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. May, p. 355–362, 2007.

ROSENBERG, E.; FALKOVITZ, L. The *Vibrio shiloi/Oculina patagonica* Model System of Coral Bleaching. **Annual Review of Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 143–159, out. 2004.

RÖTHIG, T. et al. Microbial community composition of deep-sea corals from the Red Sea provides insight into functional adaptation to a unique environment. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 44714, 17 dez. 2017.

SAMPAIO, C. L. S. et al. New occurrences of the nonindigenous orange cup corals *Tubastraea coccinea* and *T. tagusensis* (Scleractinia: Dendrophylliidae) in southwestern Atlantic. **Check List**, v. 8, n. 3, p. 528–530, 2012.

SATO, Y. et al. Unraveling the microbial processes of black band disease in corals through integrated genomics. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 40455, 17 dez. 2017.

SCHLOSS, P. D. et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537–7541, 1 dez. 2009.

SEKAR, R.; KACZMARSKY, L. T.; RICHARDSON, L. L. Microbial community composition of black band disease on the coral host *Siderastrea siderea* from three regions of the wider Caribbean. **Marine Ecology Progress Series**, v. 362, p. 85–98, 30 jun. 2008.

SÉRÉ, M. G. et al. Bacterial communities associated with *Porites* white patch syndrome (PWPS) on three western Indian Ocean (WIO) coral reefs. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e83746, 2013.

SILVA, A. G. et al. Eleven years of range expansion of two invasive corals (*Tubastraea coccinea* and *Tubastraea tagusensis*) through the southwest Atlantic (Brazil). **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 141, p. 9–16, 2014.

SUNAGAWA, S. et al. Bacterial diversity and white Plague disease-associated community changes in the Caribbean coral *Montastraea faveolata*. **ISME Journal**, v. 3, n. 5, p. 512–521, 8 maio 2009.

TREVIZANI, J. L. B. et al. Instrumento Para Minimização De Acidentes Com Derramamento De Petróleo. **Revista Meio Ambiente e Sustentabilidade**, v. 5, n. 3, p. 199–218, 2014.

TURNER, S. et al. Investigating deep phylogenetic relationships among *Cyanobacteria* and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 327–338, 1999.

WEGLEY, L. et al. Metagenomic analysis of the microbial community associated with the coral *Porites astreoides*. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 11, p. 2707–2719, 2007.

WILKINSON, C. R. **Status of Coral Reefs of the World: 2004**. [s.l.] Australian Institute of Marine Science (AIMS), 2004.

WILKINSON, C. R. **Status of coral reefs of the world: 2008**. Townsville, Australia. Global Coral Reef Monitoring Network and Reef and Rainforest Research Centre, , 2008. Disponível em: <[www.gcrmn.org](http://www.gcrmn.org)>. Acesso em: 9 jan. 2018

WIRTH, J. S.; WHITMAN, W. B. Phylogenomic analyses of a clade within the roseobacter group suggest taxonomic reassignments of species of the genera *Aestuariivita*, *Citricella*, *Loktanella*, *Nautella*, *Pelagibaca*, *Ruegeria*, *Thalassobius*, *Thiobacimonas* and *Tropicibacter*, and the proposal of six novel genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 68, n. 7, p. 2393–2411, 1 jul. 2018.

## CONCLUSÃO GERAL

Análises metagenômicas de colônias de *T. tagusensis*, uma espécie de coral escleractíneo azooxantelado invasor na costa brasileira, saudáveis (coletadas em diferentes faixas batimétricas), de suas larvas e de espécimes apresentando três estágios de necrose tecidual, revela microbioma diverso e estável. Dentre a microbiota foi identificada a presença de gêneros de bactérias e arqueias correspondentes ao core microbiano, e a persistência desses micro-organismos com mudanças de frequência nas colônias doentes, sugerindo a existência de interação simbiótica entre os micro-organismos e seu hospedeiro. Em adição, foi detectada a transferência vertical de mais de 50% da comunidade de micro-organismos para as larvas, corroborando com uma das premissas da teoria hologenômica (ROSENBERG et al., 2007) que postula que a origem de parte da microbiota encontrada nos corais é proveniente das colônias mães. Nas colônias doentes, foi observado que apesar do aumento significativo da diversidade de micro-organismos associados nos primeiros estágios de necrose tecidual, os colonizadores primários, persistentes desde a fase larval, continuam sendo os responsáveis pela maior porção do microbioma, sugerindo estabilidade e resistência dessa comunidade. Durante o avanço dos estágios de necrose, foram detectadas as ocorrências de micro-organismos até então ausentes nas colônias saudáveis, e aqui chamados de colonizadores secundários. Essa transição ocorre rapidamente, enquanto há apenas uma pequena porção do pólipos com sinais da doença. Conforme a doença se espalha pelo pólipos, aumentando a região necrosada, exceto por alguns poucos gêneros de bactérias, não foram detectados novos colonizadores, sendo os micro-organismos encontrados no estágio inicial recorrentes nos demais estágios. Assim, foi possível observar que, apesar de haver um decréscimo nas frequências relativas dos colonizadores primários, conforme a doença avança eles continuam resistentes nas colônias analisadas, sugerindo a possibilidade de restauração da microbiota saudável, visto que não requer reintrodução desses micro-organismos. Dentre os colonizadores secundários, acreditamos que há um grupo com potencial patogênico que deve ser mais estudado. Além disso, propomos que o peixe *Abudefduf saxatilis* é um vetor em potencial para essa doença e que a contaminação da área por hidrocarbonetos ou subprodutos deste, pode também ser um facilitador desta doença que acomete o coral *T. tagusensis* na região da Ilha de Búzios.

## APÊNDICES

Material Suplementar 01 – Material\_Suplementar\_01\_AlineZ

Material Suplementar 02 – Material\_Suplementar\_02\_AlineZ

Material Suplementar 03 – Material\_Suplementar\_03\_AlineZ

Material Suplementar 03 – Material\_Suplementar\_03\_AlineZ

## REFERÊNCIAS

(Introdução e Conclusão geral)

AYRE, D. J.; RESING, J. M. Sexual and asexual production of planulae in reef corals. **Marine Biology**, v. 90, n. 2, p. 187–190, 1986.

BLACKALL, L. L.; WILSON, B.; VAN OPPEN, M. J. H. H. Coral-the world's most diverse symbiotic ecosystem. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 21, p. 5330–5347, 1 nov. 2015.

CARLOS, C.; TORRES, T. T.; OTTOBONI, L. M. M. Bacterial communities and species-specific associations with the mucus of Brazilian coral species. **Scientific Reports**, v. 3, n. 1, p. 1624, 2013.

CASTRO, C. B.; PIRES, D. O. Brazilian coral reefs: What we already know and what is still missing **Bulletin of Marine Science**, v. 69, n. 2, p. 357–371, 2001.

COSTA, T. J. F. et al. Expansion of an invasive coral species over Abrolhos Bank, Southwestern Atlantic. **Marine Pollution Bulletin**, v. 85, n. 1, p. 252–253, 2014.

CREED, J. C. et al. Cnidaria, Scleractinia, *Tubastraea coccinea* Lesson , 1829 and *Tubastraea tagusensis* Wells , 1982 : Distribution extension . **Check List**, v. 4, n. 3, p. 297–300, 2008.

DE PAULA, A. F. **Biologia reprodutiva, crescimento e competição dos corais invasores *Tubastraea coccinea* e *Tubastraea tagusensis* (Scleractinia: Dendrophylliidae) com espécies nativas.** [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.

DE PAULA, A. F.; CREED, J. C. Two species of the coral *Tubastraea* (Cnidaria, Scleractinia) in Brazil: A case of accidental introduction. **Bulletin of Marine Science**, v. 74, n. 1, p. 175–183, 2004.

DE PAULA, A. F.; CREED, J. C. Spatial distribution and abundance of nonindigenous coral genus *Tubastraea* (Cnidaria, Scleractinia) around Ilha Grande, Brazil. **Brazilian journal of biology**, v. 65, n. 4, p. 661–673, 2005.

DOWER, J. F.; IAN PERRY, R. High abundance of larval rockfish over Cobb Seamount, an isolated seamount in the Northeast Pacific. **Fisheries Oceanography**, v. 10, n. 3, p. 268–274, 2001.

- FRAUNE, S.; BOSCH, T. C. G. Why bacteria matter in animal development and evolution. **BioEssays**, v. 32, n. 7, p. 571–580, 2010.
- HERNANDEZ-AGREDA, A.; GATES, R. D.; AINSWORTH, T. D. Defining the Core Microbiome in Corals' Microbial Soup. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 125–140, 2017.
- KONTIZA, I. et al. 3-Keto steroids from the marine organisms *Dendrophyllia cornigera* and *Cymodocea nodosa*. **Steroids**, v. 71, n. 2, p. 177–181, 2006.
- LAGES, B. G. et al. Chemical composition and release in situ due to injury of the invasive coral *Tubastraea* (*Cnidaria*, *Scleractinia*). **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 58, n. IICBBM, p. 47–56, 2010.
- LAGES, B. G. et al. Change in tropical rocky shore communities due to an alien coral invasion. **Marine Ecology Progress Series**, v. 438, p. 85–96, 2011.
- LANE, D. 16S/23S rRNA sequencing. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics.**, p. 115–175, 1991.
- MANTELATTO, M. C. et al. Range expansion of the invasive corals *Tubastraea coccinea* and *Tubastraea tagusensis* in the Southwest Atlantic. **Coral Reefs**, v. 30, n. 2, p. 397–397, 30 jun. 2011.
- MIZRAHI, D. **Influência da temperatura e luminosidade na distribuição da espécie invasora *Tubastraea coccinea* na região de ressurgência de Arraial do Cabo- RJ.** [s.l.] University federal of Rio de Janeiro, 2008.
- REED, J. K. Comparison of deep-water coral reefs and lithoherms off southeastern USA. **Hydrobiologia**, v. 471, p. 57–69, 2002.
- ROGERS, C. Sampling may be hazardous to your reef monitoring program. **Proceedings of the Hawai'i Coral Reef Monitoring Workshop. East-West Center, Honolu**, p. 57–64, 1999.
- ROSENBERG, E. et al. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. May, p. 355–362, 2007.
- ROSENBERG, E.; FALKOVITZ, L. The *Vibrio shiloi/Oculina patagonica* Model System of

Coral Bleaching. **Annual Review of Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 143–159, out. 2004.

ROSENBERG, E.; ZILBER-ROSENBERG, I. Symbiosis and development: The hologenome concept. **Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews**, v. 93, n. 1, p. 56–66, 2011.

SAMPAIO, C. L. S. et al. New occurrences of the nonindigenous orange cup corals *Tubastraea coccinea* and *T. tagusensis* (Scleractinia: Dendrophylliidae) in southwestern Atlantic. **Check List**, v. 8, n. 3, p. 528–530, 2012.

SILVA, A. G. et al. Expansion of the invasive corals *Tubastraea coccinea* and *Tubastraea tagusensis* into the Tamoios Ecological Station Marine Protected Area, Brazil. **Aquatic Invasions**, v. 6, n. SUPPL.1, p. 105–110, 2011.

SILVA, A. G. et al. Eleven years of range expansion of two invasive corals (*Tubastraea coccinea* and *Tubastraea tagusensis*) through the southwest Atlantic (Brazil). **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 141, p. 9–16, 2014.

TURNER, S. et al. Investigating deep phylogenetic relationships among Cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 327–338, 1999.

VERMEIJ, M. J. A. A novel growth strategy allows *Tubastrea coccinea* to escape small-scale adverse conditions and start over again. **Coral Reefs**, v. 24, n. 3, p. 442, 2005.

VERMEIJ, M. J. A. Early life-history dynamics of Caribbean coral species on artificial substratum: The importance of competition, growth and variation in life-history strategy. **Coral Reefs**, v. 25, n. 1, p. 59–71, 2006.

ZILBER-ROSENBERG, I.; ROSENBERG, E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. **FEMS microbiology reviews**, v. 32, n. 5, p. 723–735, 2008.