



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Biologia
Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva

Vitor Hugo de Souza Coutinho

Efeitos do aumento da temperatura e da acidificação da água
do mar no coral endêmico da costa brasileira *Mussismilia*
harttii (Cnidaria:Anthozoa:Scleractinia)



Rio de Janeiro

2017

Vitor Hugo de Souza Coutinho

**Efeitos do aumento de temperatura
e acidificação da água do mar no
coral endêmico da costa brasileira
Mussismilia harttii (Cnidaria:
Anthozoa: Scleractinia)**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-graduação em
Biodiversidade e Biologia Evolutiva,
Universidade Federal do Rio de
Janeiro, para obtenção do título de
Mestre em Biodiversidade e Biologia
Evolutiva.

Orientadora: Carla Zilberberg

Rio de Janeiro

2017

Ficha Catalográfica

Coutinho, Vitor Hugo de Souza

Efeitos do aumento da temperatura e da acidificação da água do mar no coral endêmico da costa brasileira *Mussismilia hartii* (Cnidaria: Anthozoa: Scleractinia) / Vitor Hugo de Souza Coutinho. – Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Biologia, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva, 2017.

74 f. il. ; 31 cm.

Orientadora: Carla Zilberberg.

Dissertação (mestrado) -- UFRJ, Instituto de Biologia, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva, 2017.

Referências: p. 61-74.

1. Mudança Climática. 2. Recifes de Corais. 3. Água do Mar. 4. Temperatura Alta. 5. Acidificação. - Dissertação. I. Zilberberg, Carla. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. III. Instituto de Biologia. IV. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva. V. Título.

Vitor Hugo de Souza Coutinho

Efeitos do aumento de temperatura e acidificação da água do mar no coral endêmico da costa brasileira *Mussismilia harttii* (Cnidaria: Anthozoa: Scleractinia)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva, Universidade Federal do Rio de Janeiro, para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Biologia Evolutiva.

Aprovado em

Dr. Paulo César de Paiva, UFRJ (Presidente)

Dr. Maria Teresa Menezes de Széchy, UFRJ

Dra. Deborah Catharine de Assis Leite, UFRJ

Dra. Michelle Regina Lemos Klautau, UFRJ

Dr. Emiliano Nicolas Calderon, UFRJ

DEDICATÓRIA

Para todos que já tiveram um momento de fraqueza.
Não vai doer para sempre, então não deixe isso afetar
o que há de melhor em você.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a pessoa que fez tudo isso possível. Carla Zilberberg, em momento orientadora, em momento mãe. Sempre foi muito atenciosa, carinhosa com todos os seus “filhos” e também rigorosa quando preciso. Estes quatro anos no laboratório eu aprendi muito sobre pesquisa e sobre mim mesmo. Quero agradecer muito por todo apoio e suporte nos momentos mais delicados que tive nestes dois anos de mestrado.

Também devo meus agradecimentos a Amana Garrido que agiu como co-orientadora, mesmo que não oficialmente. Você nunca deixou de me dar suporte e fazer o possível para me ajudar. Muito obrigado mesmo!!

Agradeço a todos do Coral Vivo em especial aos professores Clóvis Castro e Débora Pires pela realização do Mesocosmo marinho. Aquele período de 1 mês que passei em Arraial d’Ajuda foi uma das melhores experiências que tive na vida. Agradeço também a Emiliano Calderon, Cristiano Pereira e Tércio Mangelli pelo suporte durante todo o período de experimento.

Agradeço também a CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e ao PPGBBE e pelas disciplinas oferecidas.

Agradeço aos professores Antonio Solé-Cava, Michelle Klautau e Paulo Paiva pela disponibilidade de espaço de trabalho nos seus laboratórios e a todos os integrantes dos laboratórios LBDM, LABIPOR e LABPOLY que sempre foram muito prestativos.

Agradeço a todos do LABICNI que sempre estiveram dispostos a ajudar. Gostaria de agradecer especialmente a Isabela Seiblitiz pelos bons momentos de conversa e também pelas discussões enriquecedoras.

Agradeço a todos os meus amigos, os que já faziam parte da minha vida e os que eu fiz nesse período de mestrado. Meus agradecimentos especiais vão para Wérley Assis, Gilberto Oliveira, Isabelly Trancoso, Dário Barroso, Wellington Felipe e Antonio Cavalcante que estiveram sempre me apoiando e me reanimando nos momentos mais difíceis.

Agradeço também a todos da Roda Psicoterapêutica que neste último ano por todas as conversas e suporte.

E por fim a minha mãe, Daise, meu pai, Luciano e meu irmão Paulo Vitor pelo apoio.

RESUMO

Os corais construtores de recifes possuem simbiose com dinoflagelados fotossintetizantes pertencentes ao gênero *Symbiodinium*. Com o aumento da temperatura dos oceanos, devido ao excesso de CO₂ na atmosfera, esta simbiose é quebrada, acarretando na expulsão dos seus simbiontes. O excesso de CO₂ também tem reduzido o pH da água que afeta na formação de carbonato de cálcio (CaCO₃), enfraquecendo o esqueleto dos corais, o que propicia a um maior risco de erosão dos recifes e vulnerabilidade a fortes tempestades. Para avaliar os efeitos do aumento da temperatura e da acidificação da água do mar na fisiologia do coral endêmico *Mussismilia harttii* em conjunto com seus simbiontes, foi realizado um experimento de aumento de temperatura (2°C) e redução do pH (0,3), além da interação temperatura/pH no Mesocosmo Marinho do Projeto Coral Vivo, Porto Seguro, BA. Fragmentos de *M. harttii* foram distribuídos em tanques, permanecendo inicialmente por 10 dias para aclimação. Fragmentos foram coletados após a aclimação (T0), sete (T1), 15 (T2) dias após o experimento ligado e após três meses de recuperação no recife. Foi amplificado o gene 18S rDNA e realizada a análise de polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição. O estado fisiológico das zooxantelas foi acompanhado por meio de mensurações do rendimento fotoquímico máximo. A taxa de calcificação de *M. harttii* ao longo dos 15 dias de experimento foi quantificada por meio de análises de anomalias de alcalinidade. Os fragmentos foram fotografados para observação de mudança de cor utilizando um padrão de coloração (*Coral Health Chart*). Foi observada a presença do clado C de zooxantelas como clado dominante *in situ* e nos tanques controle e pH. Nos tanques de temperatura e pH+temperatura, foi encontrada a ocorrência do clado A, em dominância e em mistura com o clado C. Após recuperação, os ramos tenderam a retornar ao estado inicial contendo o clado C. Nas análises de estresse fotossintético e de calcificação, foram encontrados valores reduzidos para os tanques de temperatura e pH+temperatura, indicando que o aumento da temperatura teve um efeito negativo no coral e nos simbiontes. Além disso, os pólipos expostos ao estresse térmico (Temperatura e pH+Temperatura) apresentavam sinais avançados de branqueamento no T1 que se intensificaram no T2. Após a três meses no recife, os corais tenderam a recuperar a sua coloração original, exceto alguns indivíduos que se mantiveram branqueados. Estes resultados mostram que os efeitos causados pelo aumento na temperatura podem ter uma resposta mais imediata na fisiologia do coral que a redução no pH marinho e a curto prazo uma diminuição do pH não parece afetar negativamente a fisiologia de *Mussismilia harttii* e suas zooxantelas.

ABSTRACT

Reef-building corals have symbiosis with photosynthetic dinoflagellates from the genus *Symbiodinium*. With the increase in ocean temperature due to the excess in atmosphere, this symbiosis is broken, leading to the expulsion of their symbionts. The excess of CO₂ has also reduced the pH of water that affects the formation of calcium carbonate (CaCO₃), weakening the coral skeleton, which propitiates a greater risk of erosion of the reefs and vulnerability to strong storms. To assess the effects of temperature increase and acidification of sea water in the physiology of the endemic coral *Mussismilia harttii* in conjunction with its symbionts, an experiment of temperature increasing (2° C) and pH reduction (0.3) was conducted, in addition to the interaction temperature/pH on the marine mesocosm of Coral Vivo Project, Porto Seguro, BA. Fragments of *M. harttii* were distributed in tanks, initially for 10 days, to acclimatization. Fragments were collected after acclimatization (T0), 7 (T1), 15 (T2) days after the experiment start and after three months of recovering at the reef. The 18S rDNA gene was amplified and an analysis of Restriction Fragment Length Polymorphism was made. The physiological state of zooxanthellae was accompanied by means of measurements of maximum photochemical yield. The calcification rate of *M. harttii* along 15 days of experiment was quantified via analysis of alkalinity anomalies. The fragments were photographed for color change observation using a coloring pattern (Coral Health Chart). It was observed the presence of clade C zooxanthellae as dominant in situ and in control tanks and with reduced pH. In temperature and pH+temperature tanks, occurrence of clade A was found, in dominance and in combination with the clade C. After recovery, the branches tended to return to the initial state, containing the clade C. On the analysis of photosynthetic stress and calcification, reduced values were found for temperature and pH+temperature tanks, indicating that the rise of temperature had a negative effect on coral and symbionts. In addition, the polyps exposed to thermal stress (temperature and pH+temperature) showed advanced signs of bleaching in T1, that were intensified in T2. After three months on the reef, corals have tended to recover their original coloration, except some individuals which remained bleached. These results show that the effects caused by the increase of temperature can have a more immediate response in physiology of coral that the reduction in marine and, in short-term pH, decrease does not seem to negatively affect the physiology of *Mussismilia harttii* and their zooxanthellae.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquematização da degradação da proteína D1 e formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). **Pág.20**
- Figura 2:** Imagem do coral *Mussismilia harttii* (Verrill, 1868). Foto: Fábio Negrão **Pág.23**
- Figura 3:** Localização dos pontos de coleta no Recife de Fora, Porto Seguro (BA). **A)** Brasil; **B)** Porto Seguro, BA; **C)** Parque Municipal Marinho do Recife de Fora; **D)** Mapa do Recife de Fora, indicando os locais de amostragem: Labirinto, Funil, Enseada do Mourão e Enseada do Taquaruçú. **Pág.27**
- Figura 4:** Esquematização do sistema aberto de circulação de água do Mesocosmo Marinho. (A) Poço de entrada de água com bombas de captação, (B) cisternas subterrâneas para o tratamento de água, (C) sala de controle com os quatro tanques de água tratada de 310 litros no sótão, (D) mangueiras de distribuição da água para os tanques, (E) tanques onde ocorrem os experimentos, (F) tela para filtragem da luz, (G) poço de retorno de água com calcário. (Modificado de Duarte *et al.*, 2016) **Pág. 28**
- Figura 5:** Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando os padrões de bandas obtidos pela análise de PCR/RFLP da região do 18S rDNA de *Symbiodinium* das culturas puras dos clados A, B, C e D, digerida pela enzima de restrição *Taq I*. Os valores indicam os tamanhos de cada banda e o total de cada clado. Os valores sublinhados são dos fragmentos terminais da sequência. **Pág. 32**
- Figura 6:** Esquema com a disposição das quatro colônias e suas réplicas nos tanques. C- Controle; T-Temperatura; pH+T – Concomitante de pH+Temperatura. MhaC- Colônia de *Mussismilia harttii*. **Pág. 35**
- Figura 7:** Sistema de incubação com os fragmentos do coral *M. harttii* para as análises de calcificação. **Pág. 35**
- Figura 8:** Exemplo de *Coral Health Chart* para comparação e avaliação do **Pág. 37**

branqueamento. Foto: <http://www.coralwatch.org>.

Figura 9: Gráfico com os valores de temperatura durante o período de aclimação e durante todos os tempos de experimento. Eixo Y – Temperaturas em graus Celsius; Eixo X – Dias de experimento; A linha vermelha separa a aclimação (a esquerda) do experimento (a direita). **Pág. 39**

Figura 10: Gráfico com os valores de pH durante o período de aclimação e durante todos os tempos de experimento. Eixo Y – Valores de pH da água; Eixo X – Dias de experimento; A linha vermelha separa a aclimação (a esquerda) do experimento (a direita). **Pág. 39**

Figura 11: Acompanhamento dos estágios de branqueamento dos fragmentos de *M. harttii* durante os tempos de experimento. C – Controle; pH – Tratamento com redução do pH da água; T – Tratamento com aumento da temperatura da água; pH+T – Tratamento misto de pH e temperatura. **Pág. 40**

Figura 12: Porcentagem de saúde dos pólipos pós-recuperação. C – Colônias. **Pág. 41**

Figura 13: Fragmentos após três meses de recuperação no Recife de Fora, Porto Seguro, BA. **Pág. 41**

Figura 14: Gráfico em barras com as médias dos valores de eficiência fotossintética máxima (F_v/F_m) nos quatro tratamentos nos diferentes tempos de experimento. As diferentes letras simbolizam as diferenças significativas ($p > 0,05$). T0 – após 10 dias de aclimação; T1 – após 7 dias de experimento; T2 – após 15 dias de experimento; Rec – após a recuperação. **Pág. 46**

Figura 15: Gráfico em barras com as médias das taxas de calcificação nos quatro tratamentos nos diferentes tempos de experimento. As diferentes letras simbolizam as diferenças significativas ($p > 0,05$). T0 – após 10 dias de aclimação; T1 – após 7 dias de experimento; T2 – após 15 dias de experimento; **Pág. 48**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados obtidos a partir da identificação dos clados de zooxantelas associadas à *Mussismilia harttii* pela análise de PCR/RFLP do gene 18S rDNA digerido pela enzima de restrição *Taq* I. A e C indicam os clados encontrados; + indica a presença de mistura de clados em uma mesma amostra; / indica a análise de duas amostras de uma mesma colônia sendo um saudável e outro branqueado, respectivamente; X indica amostras que não puderam ser identificadas. C – Colônia; R – Rameto ou réplica da colônia; Verdade de campo – Coletado antes da aclimatação; T0 – após 10 dias de aclimatação; T1 – após 7 dias de experimento; T2 – após 15 dias de experimento; Recuperação – devolvidos ao recife e re-coletados após 3 meses.

Pág. 44

Tabela 2: Médias e desvio padrão dos valores de eficiência fotossintética por tratamento e em cada tempo de experimento. Os valores em negrito foram significativamente diferentes dos demais ($p > 0,05$). T0 – após 10 dias de aclimatação; T1 – após 7 dias de experimento; T2 – após 15 dias de experimento; Rec – Após a recuperação.

Pág. 46

Tabela 3: Tabela comparativa dos valores do pós-hoc Newman-Keuls da eficiência fotossintética. Os valores em negrito foram significativamente diferentes dos demais ($p > 0,05$). T0 – após 10 dias de aclimatação; T1 – após 7 dias de experimento; T2 – após 15 dias de experimento; Rec – Após a recuperação. C- Controle; pH – Tratamento de pH; T – Tratamento de temperatura; pH+T – Tratamento concomitante de pH e temperatura.

Pág. 47

Tabela 4: Médias e desvio padrão das taxas de calcificação dos tratamentos em cada tempo de experimento. Os valores em negrito significam os valores que foram significativamente diferentes ($p > 0,05$). T0 – após 10 dias de aclimatação; T1 – após 7 dias de experimento; T2 – após 15 dias de experimento;

Pág. 49

Tabela 5: Tabela comparativa dos valores do pós-hoc Newman-Keuls das taxas de calcificação. Os valores em negrito foram significativamente

Pág. 49

diferentes dos demais ($p > 0,05$). T0 – após 10 dias de aclimação; T1 – após 7 dias de experimento; T2 – após 15 dias de experimento. C- Controle; pH – Tratamento de pH; T – Tratamento de temperatura; pH+T – Tratamento concomitante de pH e temperatura.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. CO₂ e as mudanças climáticas.....	15
1.2. Simbiose coral-zooxantela.....	17
1.3. Efeitos das mudanças climáticas no coral e em seus simbiontes.....	19
1.4. Simbiose coral-zooxantela no Brasil.....	21
2. OBJETIVOS.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1. Área de estudo e coleta.....	26
3.2. Mesocosmo Marinho.....	27
3.3. Coleta das amostras no experimento.....	29
3.4. Análises Moleculares de <i>Symbiodinium</i>.....	30
3.5. Análise de Estresse Fotossintético.....	32
3.6. Análise de Calcificação.....	33
3.7. Avaliação da coloração das colônias.....	36
4. RESULTADOS.....	38
4.1. Dados abióticos do Mesocosmo Marinho.....	38
4.2. Avaliação da coloração das colônias.....	40
4.3. Análises Moleculares de <i>Symbiodinium</i>.....	41
4.4. Análises do Estresse Fotossintético.....	45
4.5. Análise de Calcificação.....	47
5. DISCUSSÃO.....	50
5.1. Avaliação da coloração das colônias.....	50
5.2. Análises Moleculares de <i>Symbiodinium</i>.....	51
5.3. Análises do Estresse Fotossintético.....	54
5.4. Análise de Calcificação.....	57
6. CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS.....	62

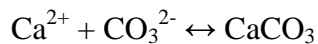
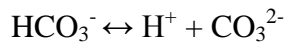
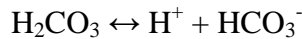
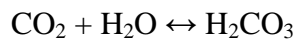
1. Introdução

1.1. CO₂ e as mudanças climáticas

O gás carbônico (CO₂) está presente em diversos processos vitais (Efeito estufa, ciclo do carbono, respiração, fotossíntese, entre outros) para a existência de vida. Este gás é um dos principais gases formadores do efeito estufa (cerca de 55% de toda a camada é formada por CO₂), um fenômeno natural e vital para a vida na Terra, servindo como um “cobertor” retendo parte da radiação emitida pelo sol, aquecendo o planeta em cerca de 33°C em comparação ao que seria a Terra sem esta camada (Boyes & Stanisstreet, 1993). O sol emite uma radiação eletromagnética que passa por uma camada contendo estes gases e parte desta radiação é repelida enquanto outra parte penetra a atmosfera terrestre e atinge a crosta. A crosta, quando aquecida, emite uma radiação eletromagnética em direção ao espaço que é retida pela camada de gases, aquecendo assim o planeta (Boyes & Stanisstreet, 1993).

O CO₂ atmosférico também tem grande importância para o ciclo do carbono que é guiado por dois processos independentes. No primeiro, o CO₂ atmosférico é solubilizado a águas profundas em altas latitudes, onde são encontradas as menores temperaturas e esta água, rica em CO₂, é transportada para baixas latitudes pelas águas profundas (Gruber & Sarmiento, 2002). Outra forma de integração do carbono ao ambiente marinho é através de vias biológicas que agem de diferentes formas (Gruber & Sarmiento, 2002). Uma delas é pela fixação de CO₂ por organismos fotossintetizantes que reduzem o CO₂ da zona eufótica acarretando na solubilização do CO₂ atmosférico pela diferença de pressões (Riebsell & Tortell, 2011). A outra via biológica para o bombeamento de carbono em ambientes marinhos é pela formação de carbonato de

cálcio (CaCO_3) (Riebsell & Tortell, 2011). Para a formação de CaCO_3 , ocorrem as seguintes reações:



O CO_2 quando solubiliza na água do mar forma o ácido carbônico (H_2CO_3) que por ser instável acaba por se dissociar em íons bicarbonato (HCO_3^-), liberando prótons de hidrogênio (H^+). Dois íons bicarbonato reagem com o cálcio formando o carbonato de cálcio (CaCO_3), CO_2 e água. Este processo diminui a quantidade de carbono inorgânico dissolvido e aumenta a acidez da água (Orr *et al.*, 2005; Zeebe & Ridgwell, 2011). O CaCO_3 é um composto utilizado para construção de estruturas de sustentação e proteção para diversos organismos (corais, moluscos, foraminíferos, equinodermos, algas calcárias, entre outros) (Vilhaça, 2009), e pode ser encontrado em três formas minerais (Calcita, Aragonita e Vaterita). A vaterita é a forma menos instável e pouco encontrada de maneira natural (Bessler & Rodrigues, 2008). A calcita é a forma mais abundante, menos densa e menos resistente que a aragonita, sendo encontrada em foraminíferos, cirripédios, rodofíceas e equinodermas (Bessler & Rodrigues, 2008; Villaça, 2009). A última forma mineral, a aragonita, é comumente encontrada em corais escleractíneos e moluscos (Vilhaça, 2009). Esta forma é propensa a formação de conjuntos entrelaçados o que lhe confere maior durabilidade e resistência em relação a calcita (Bessler & Rodrigues, 2008).

Estes sistemas (efeito estufa e ciclo do carbono) ocorrem de maneira natural e em equilíbrio, contudo, desde o século XVIII, com a ocorrência da Revolução Industrial, a queima de combustíveis fósseis tem aumentado a concentração de CO_2 na atmosfera

(Stocker e Schmittner 1997; Freitas *et al.*, 2012). A grande emissão deste gás tem aumentado a camada de gases do efeito estufa, acarretando no aumento da temperatura no planeta e, conseqüentemente, o aumento da temperatura no mar que é um dos fatores que tem causado o branqueamento de corais (Kikuchi *et al.*, 2003).

1.2. Simbiose coral-zooxantela

Os corais são responsáveis pela formação de grandes estruturas recifais, devido a alta taxa de calcificação que estes organismos podem apresentar. Esta capacidade de formar recifes é geralmente associada a simbiose dos corais com dinoflagelados fotossintetizantes pertencentes ao gênero *Symbiodinium* (Alveolata, Dinophyceae - Freudenthal, 1962), conhecidos como zooxantelas (Allemand *et al.*, 2004). Estes dinoflagelados são endossimbiontes presentes em diversos grupos taxonômicos (cnidários, Hoegh-Guldberg *et al.*, 1987; Rowan & Knowlton, 1995; moluscos, Trench *et al.*, 1981; platelmintos, Nakamura *et al.*, 1993; foraminíferos, Pawlowski, *et al.*, 2001) e esta relação é altamente vantajosa tanto para o hospedeiro quanto para os simbiossiontes, uma vez que o hospedeiro disponibiliza CO₂ e metabólitos nitrogenados para as zooxantelas e estas disponibilizam O₂ e nutrientes essenciais para o hospedeiro (açúcares, proteínas, carboidratos, entre outros) (Muscatine, 1980; Antonelli *et al.*, 2016). No coral, estes organismos vivem dentro de células da gastroderme e são responsáveis por até 90% dos nutrientes que são utilizados pelo coral, grande parte destinada para a deposição de carbonato de cálcio (Stanley, 2006).

Estes dinoflagelados apresentam duas fases de vida. Na fase móvel, eles apresentam cloroplastos em baixa densidade e dois flagelos, sendo utilizado para locomoção na coluna d'água. Em contrapartida, em sua fase cócoides, os dinoflagelados perdem os flagelos, junto com outros caracteres secundários, e aumentam a densidade de cloroplastos dentro da célula. Esta segunda fase é dominante no ciclo de vida destes

organismos e é nela que eles permanecem quando vivem em endossimbiose (Freudenthal, 1962). Quando em sua fase cocóide estes organismos perdem grande parte dos seus caracteres descritivos e, por isso, se torna de difícil identificação (LaJeunesse, 2001).

No estudo de Freudenthal (1962) estes organismos foram inicialmente descritos como sendo *Symbiodinium microadriaticum*, contudo, na década de 80 foram realizados os primeiros estudos genéticos com aloenzimas e hibridização de DNA que observaram divergências genéticas entre indivíduos desta espécie (Schoenberg & Trench, 1980; Blank & Huss, 1989). Posteriormente uma grande diversidade de linhagens foram encontradas através da análise de DNA nuclear ribossomal (18S e 28S rDNA) e de cloroplasto (23S) (Lenaers *et al.*, 1991; Rowan & Powers, 1991a, 1991b, 1992; McNally *et al.*, 1994; Baker & Rowan, 1997; Wilcox, 1998). Até o momento são reconhecidas nove linhagens moleculares do gênero *Symbiodinium* denominadas por nomenclatura alfanumérica como clados A a I (Pochon & Gates, 2010). A partir da utilização de marcadores moleculares mais variáveis, como a região do espaçador interno transcrito (ITS) e a região não codificante do minicírculo do cloroplasto (*psbA*) (LaJeunesse, 2001; Thornhill *et al.*, 2014), foi possível acessar uma imensa diversidade de linhagens dentro destes clados, denominados subclados (Baldwin *et al.*, 1995; LaJeunesse, 2001).

Dos nove clados citados acima, quatro são comumente encontradas em associação com corais escleractínios (clados A, B, C e D). Estes clados apresentam características fisiológicas distintas que podem conferir ao hospedeiro certa resistência a estresses ambientais (Baker 2003). O clado A é comumente encontrado em ambientes rasos, onde tem alta incidência luminosa (Banaszak *et al.*, 2000). Esta resistência a luminosidade estaria relacionada com o aminoácido micosporina que é produzido pelo simbionte e o protege contra radiação UV (Banaszak *et al.*, 2000). Os clados B e C

podem ser encontrados em ampla distribuição de profundidade (desde 1 metro até mais de 10 metros de profundidade). Por fim, o clado D, geralmente está associado a ambientes que sofreram impactos térmicos recentes, podendo apresentar certa tolerância ao aumento de temperatura (Glynn *et al.*, 2001). Esta capacidade de sobreviver em diferentes ambientes está relacionado com as diferentes características fisiológicas que os subclados apresentam (Finney *et al.*, 2010). Um mesmo coral pode apresentar clados distintos, dependendo das condições ambientais, assim, a variabilidade da comunidade simbiote pode auxiliar na sobrevivência do coral frente a mudanças climáticas (Baker 2003). Contudo, os efeitos da redução de pH na relação simbiótica entre o coral e as zooxantelas não são bem conhecidos.

1.3. Efeitos das mudanças climáticas no coral e em seus simbioses

Como mencionado anteriormente (Tópico 1.1 - CO₂ e as mudanças climáticas), o aumento nas concentrações de CO₂ tem acarretado no aumento da temperatura que provoca sérios danos ao coral e a sua comunidade simbiote.

O aumento da temperatura no ambiente pode provocar a destruição da proteína D1, principal proteína do fotossistema II (Ohad *et al.*, 1994). Localizada dentro do cloroplasto das zooxantelas, esta proteína é a primeira afetada pelas altas temperaturas e luminosidade (Warner *et al.*, 1999). Quando a D1 é danificada, e seu reparo não for maior que a destruição, acarreta em fotodano ao fotossistema II (Warner *et al.*, 1999; Weis, 2008), e, conseqüentemente, afeta a ação da carboxilação primária da enzima ribulose bifosfato carboxilase oxigenase (RuBisCO), que fornece a energia inicial na ausência de ATP (Lesser, 1996; Weis, 2008). Com a interrupção da RuBisCO, a formação de ATP é parada, porém os aparatos fotossintéticos continuam o transporte de elétrons que se ligariam ao ATP formado (Weis, 2008). Sem ATP os elétrons se ligam ao O₂, reduzindo o O₂ disponibilizado para o fotossistema I, formando superóxidos (O₂⁻

) (Tchernov *et al.*, 2004; Weis, 2008). O O_2^- é reduzido pela enzima superóxido dismutase em um composto menos reativo, mais estável porém ainda danoso peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que pode reagir com ferro (Fe^{2+}) formando o radical hidroxila ($-OH$) (Jones *et al.*, 1998; Lesser, 2006; Weis, 2008). Os elétrons em excesso também podem se ligar a pigmentos e formar oxigênio singlete (1O_2). Estas espécies reativas de oxigênio (ROS) podem passar por difusão ao tecido do hospedeiro causando danos tanto no simbiote quanto no hospedeiro (Venn *et al.*, 2008; Weis, 2008). Outra situação que pode ocorrer é do aumento de temperatura acarretar no aumento no metabolismo dos simbioses que, conseqüentemente, aumenta a densidade de zooxantelas e a demanda de metabólitos secundários excretados pelo coral, principalmente CO_2 (Cunning & Baker, 2012; Wooldridge, 2013). Quando esta demanda não é suprida também tem grande potencial para prejudicar a cadeia transportadora de elétrons, criando as ROS. Como forma de proteção, o coral expulsa seus simbioses expondo a coloração branca do seu esqueleto (Lesser, 1997)(Figura 1).

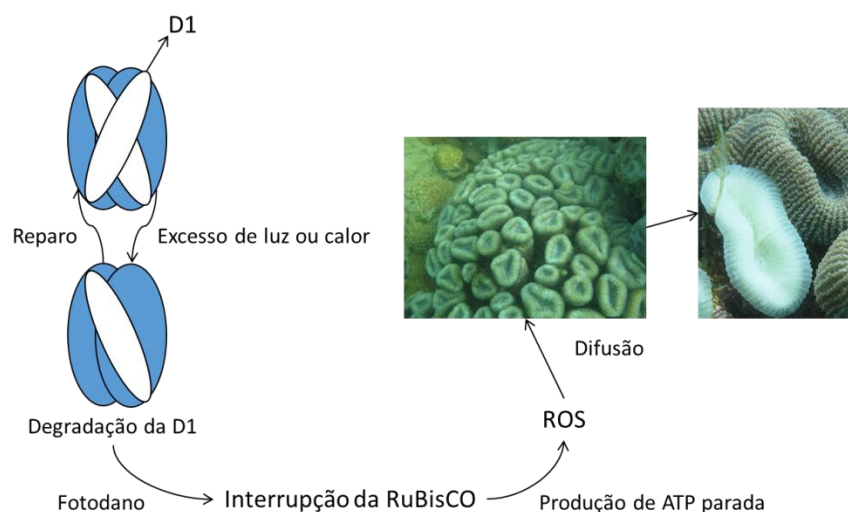


Figura 1: Esquemática da degradação da proteína D1 e formação de espécies reativas de oxigênio (ROS).

O excesso de CO₂ também tem reduzido o pH da água, aumentando a formação de bicarbonato, que acaba reduzindo os íons carbonato e, conseqüentemente a formação de carbonato de cálcio (Orr *et al.*, 2005). Organismos formadores de aragonita (em especial corais pétreos) tendem a ser os primeiros a sofrer com a acidificação pois, por ser um cristal mais denso que a calcita tem um estado de saturação maior e por isso depende de uma maior quantidade de íons carbonato para sua formação (Feely *et al.*, 2009). Para a formação da aragonita a concentração de íons carbonato devem ser de 66 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ enquanto que a calcita necessita de uma concentração de 42 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ de íons carbonato para saturação (Feely *et al.*, 2009). Projeções futuras indicam que em 2050 ocorrerá uma subsaturação completa de aragonita nos oceanos árticos, enquanto que para calcita a subsaturação ocorrerá em 2095 (Feely *et al.*, 2009). Nos corais, a falta de CaCO₃ da água acarreta no enfraquecimento do esqueleto, propiciando maior risco de erosão dos recifes e vulnerabilidade a fortes tempestades (Guinotte e Fabry 2008).

1.4. Simbiose coral-zooxantela no Brasil

Os corais zooxantelados apresentam uma ampla distribuição pela costa brasileira, estendendo-se do Parcel do Manoel Luís (Maranhão) até Santa Catarina, incluindo também as ilhas oceânicas de Atol das Rocas, Fernando de Noronha, São Pedro e São Paulo e Trindade, sendo um total de 3000km de extensão pela costa (Castro e Pires, 2001; Capel *et al.*, 2012). Apesar de ampla distribuição, o Brasil apresenta baixa diversidade de espécies (apenas 26 espécies, sendo dois invasores) que pode ser explicada pela alta sedimentação e turbidez das águas que seria um limitante para a permanência e sobrevivência de outras espécies. Embora tenha baixa diversidade, a costa brasileira tem um alto grau de endemismo (das 26 espécies, seis destas são endêmicas da costa brasileira) (Leão *et al.*, 2003). No Brasil também são encontrados os únicos recifes coralíneos do Atlântico Sul, localizado no Sul do Estado da Bahia (Castro

& Pires, 2001) que, em conjunto com o alto grau de endemismo, reforçam a necessidade de conservação destes ambientes.

Devido a suas características únicas, os recifes brasileiros estão tendo grande visibilidade e a quantidade de estudos sobre os corais e sua relação simbiótica com as zooxantelas têm aumentado consideravelmente, e ainda está crescendo o número de publicações (Costa *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2008; Suggett *et al.*, 2012; Miranda *et al.*, 2013; Duarte, 2015; Garrido, 2015; Picciani-de-Souza *et al.*, 2016; Fonseca *et al.*, 2017). Contudo, estudos manipulativos que verifiquem os efeitos do aumento da temperatura nos corais brasileiros ainda são escassos (Duarte, 2015; Garrido, 2015) e não existe estudos sobre os efeitos da acidificação nos corais brasileiros. A utilização de estudos manipulativos, como por exemplo através da utilização de mesocosmos marinhos, tem sido bastante comum e vem se mostrando bastante eficaz para a investigação das respostas dos corais frente às mudanças climáticas globais (Lockett *et al.*, 1996; Leclercq *et al.*, 2002; Jokiel *et al.*, 2008; Pandolfi *et al.*, 2011; Bahr *et al.*, 2016).

O coral utilizado neste estudo é a *Mussismilia harttii* (Verrill, 1868), espécie endêmica do Brasil, encontrada desde o Rio Grande do Norte até o Espírito Santo. Esta espécie forma grandes colônias ramificadas, com pólipos isolados no topo dos ramos e cálices irregulares com coloração variando entre cinza, amarelo e verde. É uma das principais construtoras dos recifes brasileiros (Hetzl e Castro, 1994), entretanto, foi classificada recentemente como em perigo de extinção (EN) (Portarias MMA n° 444/2014 e n°445/2014) (Figura 2).



Figura 2: Imagem do coral *Mussismilia harttii* (Verrill, 1868). Foto: Fábio Negrão.

Apesar do número de estudos sobre a relação coral-zooxantela estar aumentando no Brasil, só existe um único estudo que avalia a composição de *Symbiodinium* em *M. harttii* (Picciani-de-Souza 2013), sendo este estudo bastante restrito, analisando somente um recife na Bahia. Picciani-de-Souza (2013) observou que *M. harttii* se associa somente a *Symbiodinium* do clado C no Recife de Fora, Porto Seguro (BA). Neste mesmo estudo foi relatada a diversidade de *M. hispida* e *M. braziliensis* para a mesma localidade. Assim como *M. harttii*, *M. hispida* também só apresentou associação com o clado C de *Symbiodinium* no Recife de Fora, enquanto que *M. braziliensis* teve associação com clados A e C nas mesmas proporções.

Este trabalho, que posteriormente foi publicado como artigo, analisou a diversidade de *Symbiodinium* associado a *M. hispida* por toda a sua distribuição pela costa e nas ilhas oceânicas brasileiras. Além do que já foi exposto acima, *M. hispida* também apresentou associação exclusiva com clado C no Parque Nacional Marinho dos Abrolhos (BA) e na Baía de Todos os Santos, Salvador (BA) enquanto que em outras localidades amostradas ao norte e ao sul das já citadas, *M. hispida* apresentou

associação somente com os clados A e B (Picciani-de-Souza, 2013; Picciani-de-Souza *et al.*, 2016).

Apesar de já existir conhecimento sobre a relação exclusiva de *M. harttii* com clado C no Recife de Fora, não se sabe se esta relação simbiótica é estável (apenas com clado C) ou flexível dependendo das condições ambientais, como foi observado nas outras duas espécies (Picciani-de-Souza 2013; Picciani-de-Souza *et al.*, 2016). Além disso, as respostas fisiológicas do coral *M. hartti* e de seus simbiossomas frente a mudanças climáticas globais ainda não são conhecidas.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do aumento da temperatura e da acidificação da água do mar na fisiologia do coral endêmico *Mussismilia harttii* e de seus simbiossiontes, e na comunidade de *Symbiodinium* associada ao coral.

2.2. Objetivos específicos

- Acompanhar as possíveis variações na comunidade de *Symbiodinium* associada a *M. harttii* ao longo de um experimento de acréscimo de temperatura e acidificação da água do mar e após a sua recuperação do estresse imposto.
- Avaliar os efeitos do aumento da temperatura e da acidificação da água do mar nas taxas de calcificação do coral *M. harttii*.
- Avaliar os efeitos do aumento da temperatura e da acidificação da água do mar na atividade fotossintética da comunidade de *Symbiodinium* associada a *M. harttii*.

3. Material e Métodos

3.1. Área de estudo e coleta:

O Recife de Fora é um ambiente recifal localizado à 7,2 km de distância de Porto Seguro (BA) entre as coordenadas 16° 23' 30" - 16° 25' 06" S e 38° 58' 30" - 38° 59' 18" W, com cerca de 3,2 km de distância da costa. O recife tem aproximadamente 17,5 km² de área e a profundidade no entorno pode chegar a 20 m (Bruno *et al.*, 2009) (Figura 3C). Da área total do recife, cerca de 97% é destinada a preservação e os outros 3% é destinada para visitação (PMPS, 2017).

Neste ambiente foram coletados fragmentos de quatro colônias de *Mussismilia harttii* em quatro pontos distintos do Recife de Fora, Porto Seguro, BA com uma distância mínima aproximada de 1 km entre elas para reduzir as chances de coletar clones. Estas coletas foram realizadas em abril de 2015, através mergulho autônomo a quatro metros de profundidade. Os quatro pontos de coletam foram: Labirinto, localizado a sudoeste do recife (16°25'9.40"S 38°59'43.40"O); Funil, na parte sul do recife (16°25'2.90"S 38°58'57.30"O); Enseada do Mourão, na costa oeste do recife (16°24'45.40" S38°59'10.90"O); e Enseada do Taquaruçú, na costa leste do recife (16°24'29.40" S38°58'36.10"O) (Figura 3D). No campo, um fragmento/colônia foi fixado para as análises de composição taxonômica de *Symbiodinium* (Verdade de Campo - VC). Os demais fragmentos foram transportados para a Base de Pesquisa do Coral Vivo, em Arraial D'Ajuda (Porto Seguro, BA) em quatro caixas, separados pelas localidades, e foram distribuídos em 16 tanques (seis fragmentos/colônia/tanque) no Mesocosmo Marinho do Projeto Coral Vivo (Duarte *et al.*, 2015), permanecendo por 10 dias para aclimação.

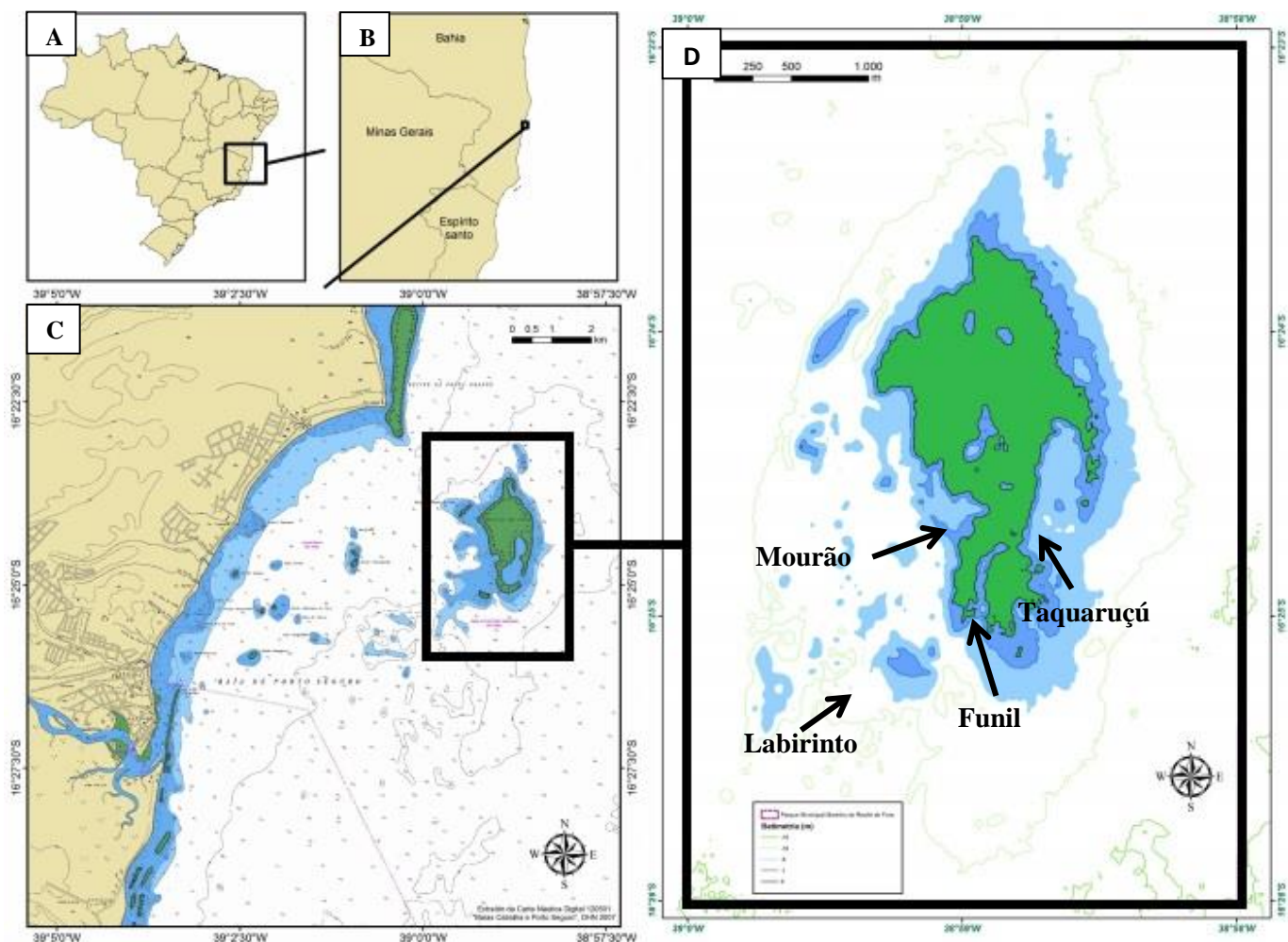


Figura 3: Localização dos pontos de coleta no Recife de Fora, Porto Seguro (BA). **A)** Brasil; **B)** Porto Seguro, BA; **C)** Parque Municipal Marinho do Recife de Fora; **D)** Mapa do Recife de Fora, indicando os locais de amostragem: Labirinto, Funil, Enseada do Mourão e Enseada do Taquaruçú.

3.2. Mesocosmo Marinho:

O Mesocosmo Marinho é um sistema experimental aberto (alimentação intermitente da água do mar) onde a água utilizada é captada diretamente do recife. Este experimento tem por finalidade simular os impactos futuros causados pelas mudanças climáticas, usando como base as previsões descritas pelo relatório do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC) da ONU (Duarte *et al.*, 2015).

Neste sistema, a água do mar é bombeada para quatro cisternas subterrâneas onde foram adicionados os tratamentos: 1) A água foi aquecida até aumentar em 2°C (temperatura), 2) Adição de CO₂ na água para redução em 0,3 do pH (acidificação), 3) Interação temperatura e pH (+2°C e -0,3, respectivamente) e 4) controle (sem tratamento). Desta forma, a temperatura e o pH do sistema flutuaram de acordo com a temperatura e o pH no recife, ou seja, se no recife a água estivesse a 26°C e o pH em 8,2, nos tanques de temperatura a água estaria a 28°C, nos tanques de pH a água estaria com 7,9 de pH, enquanto que nos tanques-controle os valores seriam o mesmo encontrado no recife. Das cisternas, as águas foram bombeadas para os tanques onde estavam os corais para o experimento. Posteriormente, a água tratada foi enviada a um poço com calcário para recuperação da temperatura e pH pré-experimental e retornada para o mar (Figura 4).

Os valores dos tratamentos seguem as previsões feitas pelo IPCC para daqui a 50 anos. Em Duarte (2015), haviam sido testados diferentes acréscimos de temperatura (+1°, +2° e +4,5°C) e o acréscimo de 2°C se mostrou ótimo para observação do branqueamento sem que ocorra a morte dos corais.

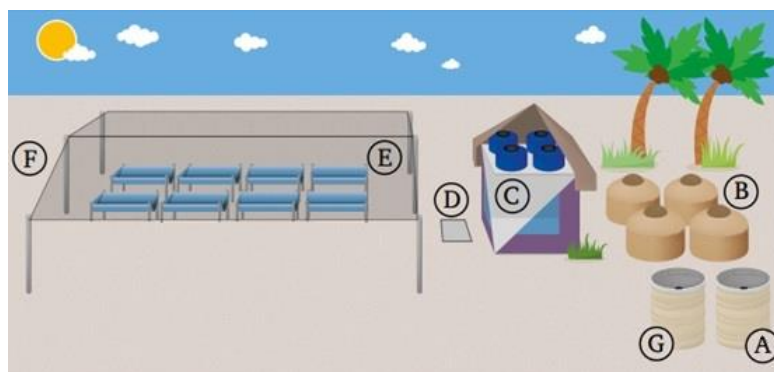


Figura 4: Esquematização do sistema aberto de circulação de água do Mesocosmo Marinho. (A) Poço de entrada de água com bombas de captação, (B) cisternas subterrâneas para o tratamento de água, (C) sala de controle com os quatro tanques de água tratada de 310 litros no sótão, (D) mangueiras de distribuição da água para os

tanques, (E) tanques onde ocorrem os experimentos, (F) tela para filtragem da luz, (G) poço de retorno de água com calcário. (Modificado de Duarte *et al.*, 2016)

3.3. Coleta das amostras no experimento:

Os fragmentos foram aclimatados por 10 dias em um mesmo tanque com ligação direta com o mar e após a aclimatação foi coletado e fixado um fragmento de cada tanque de cada colônia (T0) e iniciados os tratamentos (quatro tanques/tratamento e cada tanque com pelo menos quatro fragmentos de cada colônia). Após 7 (T1) e 15 (T2) dias um fragmento/colônia/tanque foi retirado do experimento e fixado para as análises de composição taxonômica de *Symbiodinium*. Após 15 dias, pelo menos dois fragmentos de cada tratamento foram colados em placas de cerâmica com resina epóxi e devolvidos ao Recife de Fora para a recuperação após o estresse imposto pelos tratamentos. Os fragmentos recuperados foram retirados do recife após três meses, a eficiência fotossintética máxima foi medida e os fragmentos fixados para as análises de composição taxonômica de *Symbiodinium*. Alguns fragmentos ainda estavam branqueados após os três meses e, com isso, eles foram coletados e incluídos nas análises. Amostras de mais quatro colônias de *M. harttii* do local da recuperação foram coletadas para comparação com os resultados do experimento. O número total de amostras analisado foi de 270 fragmentos.

Cada fragmento foi fixado na solução salina de lise CHAOS (solução de lise: tiocianato de guanidina 4M, N-laurilsarcosil 0,5%, Tris pH 8,0 25µM, 2-mercaptoetanol 0,1M; Fukami *et al* 2004), que iniciou a lise celular da extração do DNA total para a realização das análises moleculares, buscando identificar as linhagens de *Symbiodinium* presentes nas amostras. Ao longo do experimento, o fluxo de água foi mantido constante e foram registradas diariamente as variações de temperatura, pH, salinidade, O₂ dissolvido, luminosidade e turbidez. Também foram feitas fotografias dos

fragmentos utilizando uma escala de variação de cor para a comparação visual dos estados de branqueamento das amostras ao longo dos tratamentos.

3.4. Análises Moleculares de *Symbiodinium*:

Após a lise inicial das células utilizando a solução CHAOS (como descrito no parágrafo anterior), o restante da extração do DNA total foi realizada pelo método de fenol-clorofórmio de acordo com Fukami *et al.* (2004). Este método de extração se inicia com a adição de 250µl da solução de CHAOS que contém a amostra em um novo microtubo com 250µl de PEB (Phenol Extraction Buffer: 100 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA, 1% dodecil sulfato de sódio) e 500µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (24:24:1) e vortexado por cerca de 5 minutos. O produto vortexado foi centrifugado a 14.000 rpm por 5 minutos para a separar o DNA das proteínas e polissacarídeos. A fase superior foi retirada e colocada em um novo microtubo com 500µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e repetida a etapa anterior para a limpeza maior do DNA. O produto restante é adicionado em um microtubo com 500µl de isopropanol gelado para precipitação do DNA e deixado a -20°C durante pelo menos 12 horas. Após a precipitação, o microtubo foi centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Foi adicionado 500µl de etanol gelado a 70%, para a lavagem do DNA, depois foi novamente centrifugado a 14.000 rpm por 5 min, o sobrenadante foi descartado e depois seco a temperatura ambiente por aproximadamente duas horas. O processo de extração é finalizado com adição de 100µl de H₂O MilliQ™ (H₂OMQ) com RNase (10mg/ml) a 1% e conservado a -20°C até a realização das análises moleculares. Após a extração, a qualidade e quantidade de DNA extraído foi comparado com o λ bacteriófago molecular (212 ng/µl) e visualizado sob iluminação UV em uma eletroforese em gel de agarose a 0,8% coradas com Gel Red™ e corrido em tampão TBE 1X (4,45 mM Tris base pH 8,0; 4,45 mM ácido bórico; 0,1 mM EDTA). As

amostras foram diluídas oito vezes (oito partes de H₂OMQ e 1 parte de DNA) para a realização das ampliações.

Do DNA total foi amplificado o gene 18S rDNA (de aproximadamente 1,600 pb) de *Symbiodinium* via reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os iniciadores ss3Z (5'-AGCACTGCGTCACTCCGAATAATTCACCGG-3') e ss5Z (mistura de 5'-GCAGTTATAATTTATTTGATGGTCACTGCTAC-3' e 5'-GCAGTTATAGTTTATTTGATGGTTGCTGCTAC-3') (Rowan e Powers, 1991a). Cada reação foi realizada através da mistura de 1µl do DNA total extraído com Tampão de PCR 1X ("Green GoTaq Flexi Buffer", Promega), 200 µM de uma mistura de dideoxynucleotídeos (dNTP mix), 1 mg ml⁻¹ de albumina do soro bovino (BSA), 2,5 mM de MgCl₂, 0,5 µM de cada iniciador, 1 U de polimerase GoTaq (Promega) e H₂OMQ™ até completar 15µl de volume final. Para as reações foi utilizado um termociclador Mastercycler® nexus gradient (Eppendorf) com as seguintes condições: 1 ciclo de 5 minutos a 94°C; 1 ciclo de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C e 2 minutos a 72°C; 29 ciclos de 1 minuto a 92°C, 1 minuto a 55°C e 2:30 minutos a 72°C; e por fim 1 ciclo de 10 minutos a 72°C. Para visualização do produto amplificado foi feita uma eletroforese em gel de agarose a 1% com tampão TBE 1x e corado em GelRed™, o tamanho dos fragmentos foi quantificado em comparação com um marcador de peso molecular de DNA (GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus, Fermentas) e visualizado sob iluminação UV.

Posteriormente o fragmento amplificado foi digerido pela enzima de restrição *Taq* I (Promega) para a análise de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP). Cada reação foi feita com 4µl de produto de PCR, 1X tampão da enzima, 5 U de *Taq* I e H₂OMQ™ até completar 20µl e deixado durante 12 horas em banho-maria a 65°C. Os produtos da digestão foram visualizados por eletroforese em gel de agarose

2% com tampão TBE 1x, corado em GelRed™ sob iluminação UV e comparados com os padrões de bandas obtidos de culturas puras dos clados A, B, C e D (doado pelo Prof. Mark Warner da Universidade de Delaware, Estados Unidos) (Figura 5). A técnica de PCR/ RFLP não tem poder para mostrar uma diversidade de clados presentes no coral, mas sim expõe o clado que tem em maior abundância (90%), sendo considerado o clado dominante.

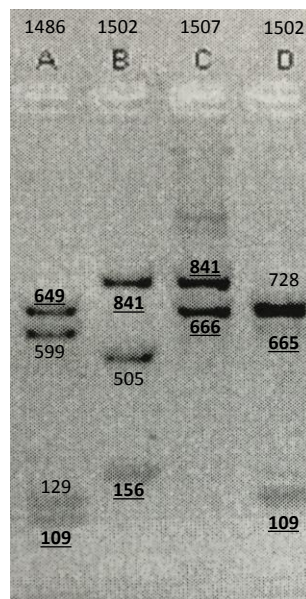


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando os padrões de bandas obtidos pela análise de PCR/RFLP da região do 18S rDNA de *Symbiodinium* das culturas puras dos clados A, B, C e D, digerida pela enzima de restrição *Taq* I. Os valores indicam os tamanhos de cada banda e o total de cada clado. Os valores sublinhados são dos fragmentos terminais da sequência.

3.5. Análise de Estresse Fotossintético:

O estado fisiológico das zooxantelas ao longo do experimento e após recuperação foi acompanhado por meio de mensurações do rendimento fotoquímico máximo (F_V/F_M) utilizando um fluorômetro portátil DIVING-PAM Underwater Fluorometer (Heinz Walz GmbH, Alemanha) com as seguintes configurações: Intensidade de luz de

medida = 6, Intensidade de luz actínica= 3, Ganho = 2, Fator de transferência de elétrons = 1 e Intensidade de pulso de saturação = 8. Um fragmento de cada colônia foi distribuído pelos tratamentos de forma aleatória (4 fragmentos de cada colônia - 16 fragmentos no total) (Figura 6). As medidas de F_v/F_m foram realizadas em todos os tempos de coleta (T0, T1, T2 e após recuperação), sempre uma hora após o pôr do sol.

O rendimento fotoquímico máximo analisa o máximo de luz que é absorvida pelas antenas dos fotoreceptores do fotossistema II em um pulso de luz quando incubados no escuro. Com esta análise é possível avaliar o estado fisiológico e a eficiência dos fotossistemas e foram utilizadas para acompanhar a saúde dos corais e seus simbiontes ao longo dos tratamentos. Estas medidas são feitas através do seguinte cálculo: $(F_M - F_0)/F_M$, onde F_0 é a fluorescência inicial (medida assim que abrem os estômatos para captação da luz), F_M é a fluorescência máxima (quantidade máxima de luz absorvida antes da inibição dos fotossistemas) e a função ' $F_M - F_0$ ' equivale à fluorescência variável (F_v) que é a diferença entre a fluorescência máxima e a fluorescência inicial (Ralph & Gandemann, 2005).

O tratamento dos dados obtidos e a elaboração de gráficos foram feitos pelo programa Microsoft Excel 2010. Foram feitos testes de normalidade e homoscedasticidade para avaliar se os dados estavam de acordo com as premissas da análise de variância (ANOVA) nos programas Past 3 (Hammer *et al.*, 2001) e Statistica 12 (STAT SOFT, 2004), respectivamente. Uma ANOVA com medidas repetitivas foi realizada seguido do teste de pos hoc de Newman-Keuls pelo programa Statistica 12.

3.6. Análise de Calcificação:

Para avaliar se os tratamentos afetaram a capacidade de calcificação de *M. harttii*, a taxa de calcificação ao longo dos 15 dias de experimento foi calculada por meio de análises de anomalias de alcalinidade. Esta técnica estima as taxas de

calcificação por meio da incubação, em curto período de tempo, com volumes de água pré-definidos (Smith & Key, 1978; Gazeau et al., 2014). Como já explicado (Tópico 1.1), o ciclo do carbono na água forma carbonato de cálcio e neste processo libera íons de hidrogênio que acidificam a água e através desta diferença de pH que é estimado o quanto de carbonato de cálcio é formado e incorporado pelo coral.

Um fragmento de cada colônia foi distribuído pelos tratamentos de forma aleatória (Figura 6) e em cada tempo de coleta (T0, T1 e T2) foram incubados por três horas (Figura 7). A alcalinidade da água foi mensurada pelo método de titulação antes e depois da incubação pelo técnico da Rede de Pesquisa do Coral Vivo, Tarcio Mangelli. Neste método, os fragmentos foram colocados dentro de recipientes estéreis com 200g de água do mar filtrada à temperatura constante de 24-26°C. Foram tomadas medidas antes e após serem incubados por 3 horas em agitação constante e a partir desta diferença de alcalinidade foi estimada a taxa de calcificação de cada fragmento. A diferença de alcalinidade obtida foi padronizada pela área total de tecido vivo dos fragmentos incubados que foi calculada a partir das medidas feitas das fotografias de vistas superior e laterais de cada fragmento através do programa ImageJ.

Disposição das colônias nos tanques

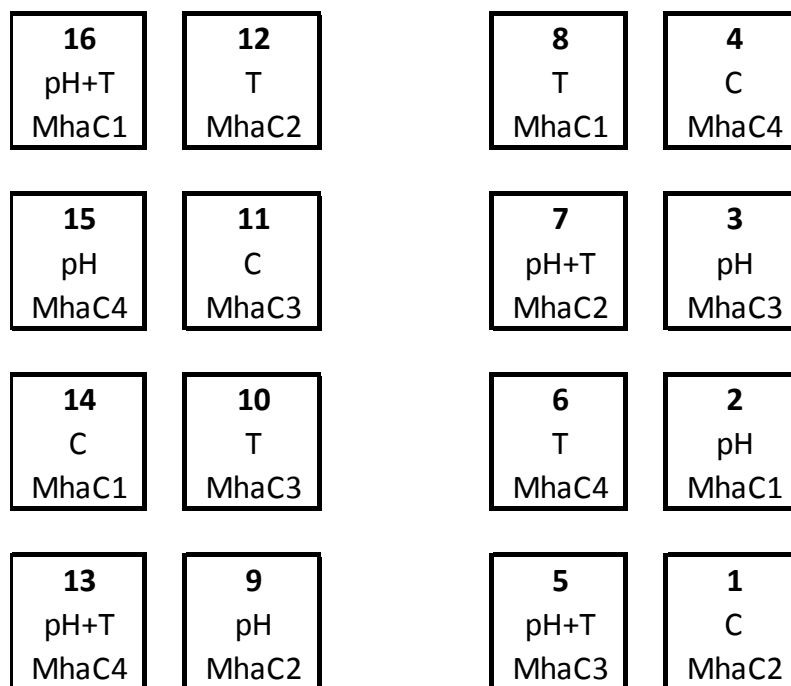


Figura 6: Esquema com a disposição das quatro colônias e suas réplicas nos tanques.

C- Controle; pH – redução no pH; T- aumento na temperatura; pH+T – Concomitante de pH+Temperatura. MhaC- Colônia de *Mussismilia harttii*.



Figura 7: Sistema de incubação com os fragmentos do coral *M. harttii* para as análises de calcificação.

O tratamento dos dados obtidos e a elaboração de gráficos foram feitos pelo programa Microsoft Excel 2010. Foram feitos testes de normalidade e homoscedasticidade para avaliar se os dados estavam de acordo com as premissas da análise de variância (ANOVA) nos programas Past 3 (Hammer *et al.*, 2001) e Statistica 12 (STAT SOFT, 2004), respectivamente. Assim como nas análises do estresse fotossintético, uma ANOVA com medidas repetitivas foi realizada seguido do teste de pos hoc de Newman-Keuls pelo programa Statistica 12.

3.7. Avaliação da coloração das colônias

Durante o experimento, os fragmentos foram fotografados para observação da aparência ao decorrer dos tratamentos a qual foram expostos. Para esta etapa foram utilizados os mesmos fragmentos das análises de fotossíntese e calcificação que foram fotografados antes do início do experimento e após 7 e 15 dias do experimento iniciado (T0, T1 e T2), antes de levados para a incubação (3.4. Análise de Calcificação). Também foram fotografados os fragmentos que foram recuperados após três meses no recife. Todas essas fotografias foram comparadas com o padrão de coloração proposto pelo *Coral Watch*, o *Coral Health Chart* (Figura 8). Este cartão dispõe de gradientes de coloração que auxilia na identificação de corais saudáveis e branqueados. Por isso, através do *Coral Health Chart* foi possível avaliar os estágios de branqueamento causado pelos tratamentos.

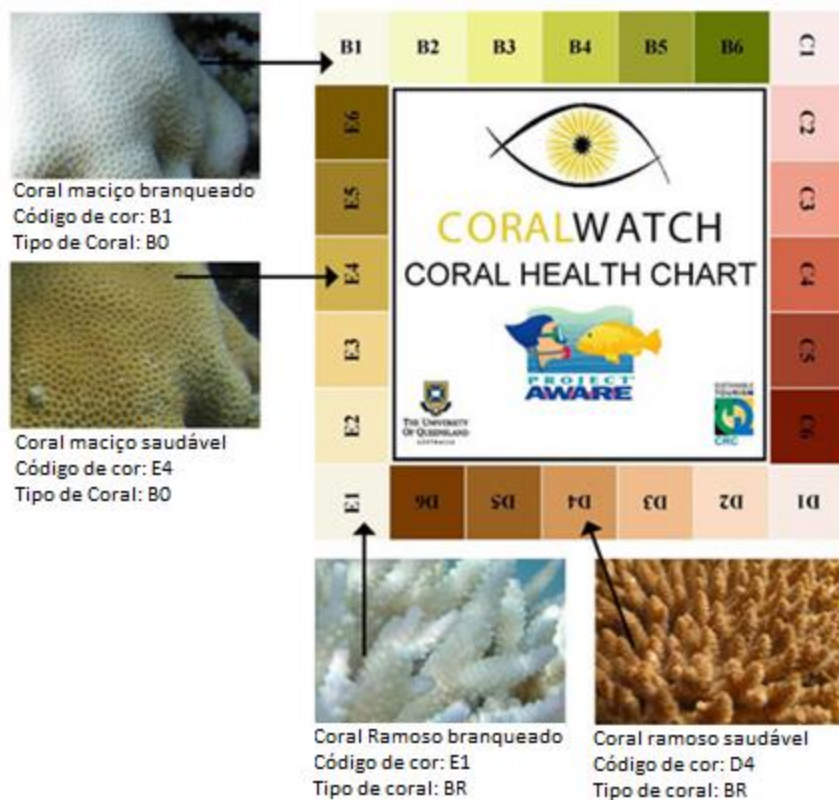


Figura 8: Exemplo de *Coral Health Chart* para comparação e avaliação do branqueamento. Foto: <http://www.coralwatch.org>.

4. Resultados

4.1. Dados abióticos do Mesocosmo Marinho

No decorrer do experimento, foram medidas a temperatura e o pH de cada tanque de 15 em 15 minutos para observar cada oscilação nos valores, desde a aclimação até o encerramento do experimento 15 dias depois e realizadas contraprovas sempre no mesmo horário para confirmação dos valores registrados. Durante o período de aclimação, a temperatura ambiente foi tão alta quanto a observada nos tanques com tratamento de temperatura durante o experimento (Figura 9). Como todo o sistema funciona de acordo com as flutuações na temperatura ambiental, as temperaturas elevadas no recife em frente a base de pesquisa do Coral Vivo, no local de captação da água para o experimento e a ausência de chuvas na região durante este período, foi refletida nos tanques.

Dando início ao experimento, os valores de temperatura nos tanques com tratamento de temperatura e pH+temperatura aumentaram e se mantiveram similares durante todo o experimento (Figura 9). As temperaturas variaram entre 25°C e 29,4°C na aclimação; entre 25,6°C e 28°C nos tanques controle e com tratamento de pH; e entre 27,3°C e 31,4°C nos tanques com tratamento de temperatura e pH+Temperatura (Figura 9). Em determinados momentos do experimento, houve quedas nas temperaturas dos tanques expostos a tal estresse, devido a falhas na resistência que é responsável pelo aquecimento da água. As quedas ocorreram durante o período da noite, quando não havia supervisão, porém ao amanhecer o equipamento era religado e as temperaturas voltavam ao estado anterior. O problema foi sanado com a substituição do sistema de aquecimento.

Durante todo o período experimental, as variações de pH eram constantes ao longo do dia, tendo atingido o valor máximo de 8,7 e mínimo de 8,0 na aclimação e nos tanques controle e de temperatura. Enquanto isso, nos tratamentos de pH e pH+Temperatura os valores foram sempre inferiores que os outros tanques (Controle e Temperatura), variando

entre 8,3 e 7,4. Em uma medida tomada durante o 3º dia de experimento (05/05) mostrou valores de pH muito inferior ao esperado, incluindo os tanques que não tinham tratamento de pH (Controle e Temperatura). Na medida tomada 15 minutos depois, os valores se reestabeleceram o que pode levar a crer que houve uma falha na medição e, por isso, esta medição não foi levada em conta (Figura 10).

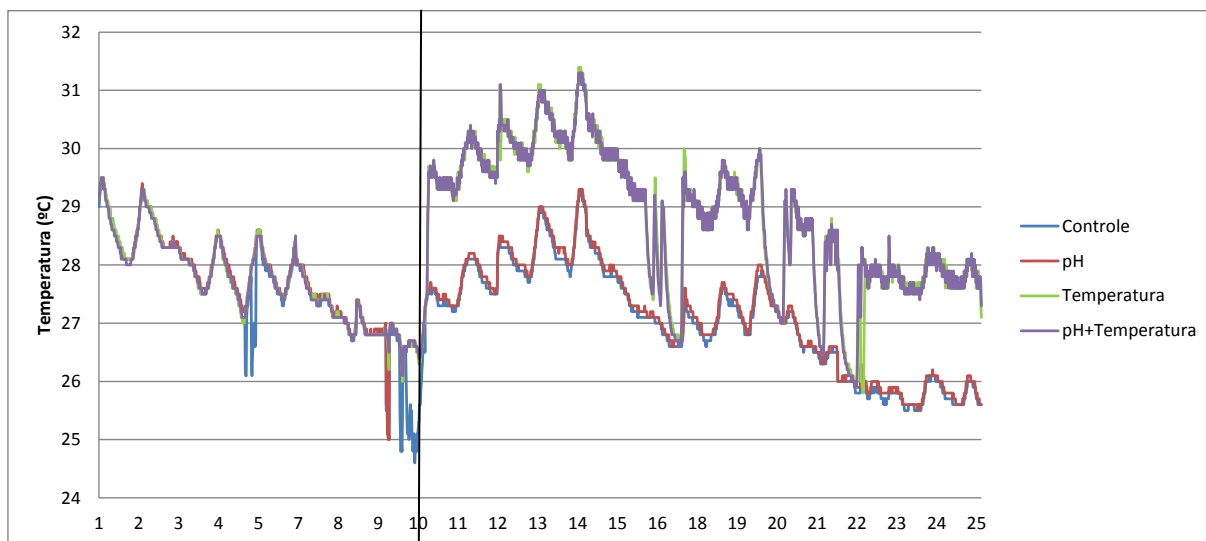


Figura 9: Gráfico com os valores de temperatura durante o período de aclimação e durante todos os tempos de experimento. Eixo Y – Temperaturas em graus Celsius; Eixo X – Dias de experimento; A linha vermelha separa a aclimação (a esquerda) do experimento (a direita).

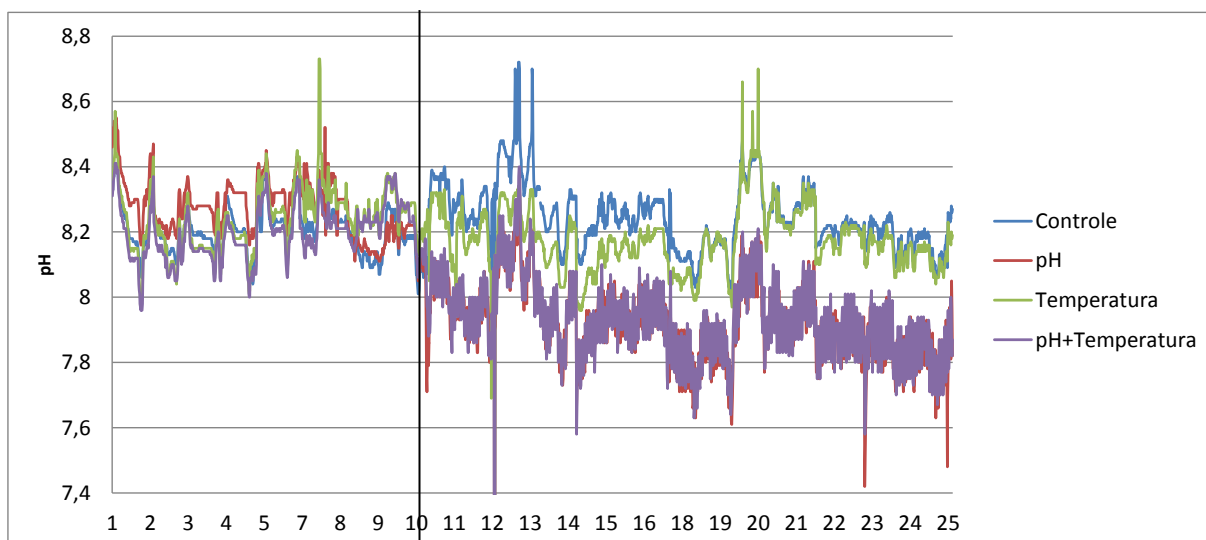


Figura 10: Gráfico com os valores de pH durante o período de aclimação e durante todos os tempos de experimento. Eixo Y – Valores de pH da água; Eixo X – Dias de experimento; A linha vermelha separa a aclimação (a esquerda) do experimento (a direita).

4.2. Avaliação da coloração das colônias

Durante todo o experimento (T0, T1 e T2 e após a recuperação) foi avaliada a saúde aparente dos pólipos através de acompanhamento visual e fotográfico dos estágios de branqueamento decorrente da exposição ao estresse térmico. Ao observar as fotografias é possível notar que os fragmentos que estiveram nos tanques-controle e expostos aos tratamentos de pH aparentavam leve descoloração (Figura 11), enquanto que os fragmentos expostos ao estresse térmico (Temperatura e pH+Temperatura) apresentavam sinais avançados de branqueamento no T1 que se intensificaram no T2 (Figura 11).

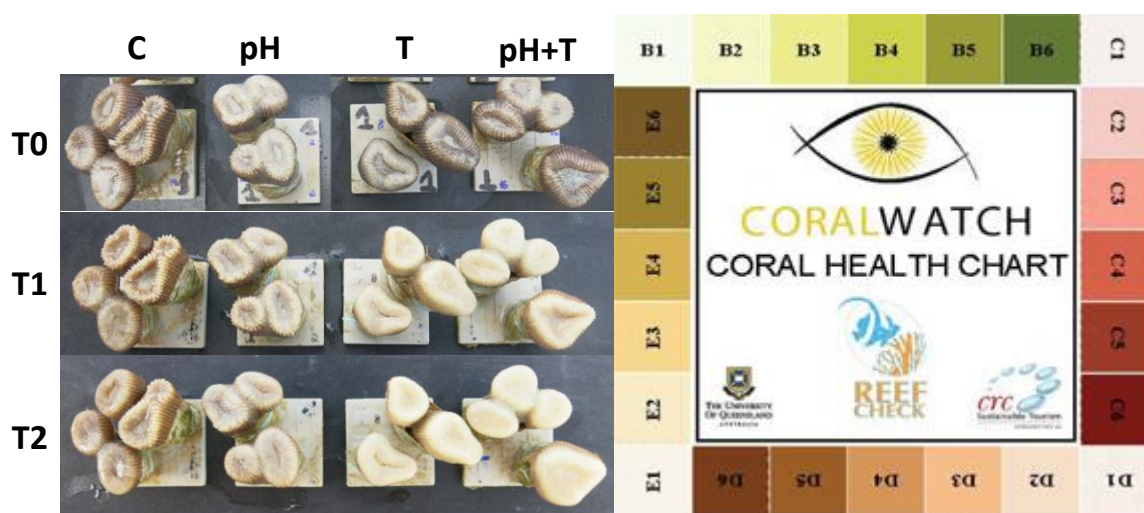


Figura 11: Acompanhamento dos estágios de branqueamento dos fragmentos de *M. harttii* durante os tempos de experimento. C – Controle; pH – Tratamento com redução do pH da água; T – Tratamento com aumento da temperatura da água; pH+T – Tratamento misto de pH e temperatura.

Após o período de três meses de recuperação, 98% dos fragmentos sobreviveram e destes, 96% dos fragmentos aparentaram ter recuperado sua coloração original (Figura 12). Diferente destes, alguns indivíduos ainda se mantinham branqueados em diferentes níveis (e.g., os que estão circulados em vermelho na Figura 13).

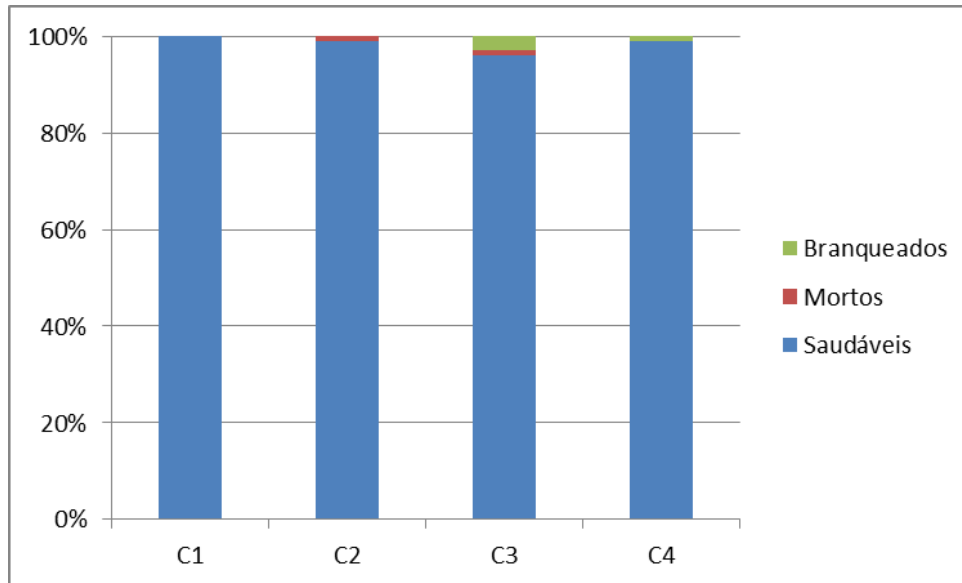


Figura 12: Porcentagem de saúde dos pólipos pós-recuperação. C – Colônias.



Figura 13: Fragmentos após três meses de recuperação no Recife de Fora, Porto Seguro, BA.

4.3. Análises Moleculares de *Symbiodinium*

Conforme os resultados obtidos através das análises de PCR/RFLP da região do gene 18S rDNA, foi observado que no ambiente (verdades de campo), todas as quatro colônias apresentaram em sua composição *Symbiodinium* pertencente ao clado C, como sendo o clado dominante (Tabela 1). Os tanques controle e o tratamento de pH também apresentaram somente o clado C em todas as amostras ao longo de todo o experimento. Já no tratamento de temperatura foi observada a ocorrência de mistura dos cladoss A e C em uma amostra na

colônia 2, cinco amostras na colônia 3 e duas amostras da colônia 4 em todos os tempos amostrados, inclusive na coleta após a aclimatação antes do experimento começar (T0) (Tabela 1). Em particular, as amostras do T0 que apresentaram mistura de clados estavam arranjadas no mesmo tanque (Tanque 6 – Figura 6). Este tanque, juntamente com os tanques 1, 2 e 5 estavam dispostos em uma posição onde os filtros de luz (sombrites) não os cobriam durante algumas horas da manhã. Quanto ao T1, apenas um rameto da colônia 3 e um rameto da colônia 4 tiveram mistura de clados, enquanto que no T2, duas amostras da colônia 3 e uma amostra da colônia 4 tiveram a presença dos clados A+C (Tabela 1). A colônia 1, diferente das demais, apresentou somente clado C em sua composição em todos os tempos do experimento de temperatura e após recuperação.

No tanque com tratamento concomitante de pH e temperatura foi observada a prevalência do clado C (79,7%), porém algumas amostras de todas as colônias apresentaram um padrão de bandas similar ao clado A em dominância (7,8% - cinco amostras) e em mistura com clado C (12,5% - oito amostras) (Tabela 1). De forma detalhada, as colônias 2, 3 e 4 apresentaram mistura de clados no tempo inicial e no mesmo tanque, assim como no tanque 6 (Tanque 7– Tabela 1). O tanque 7, diferente do tanque 6, permaneceu coberto pelo filtro de luz durante todo o período de sol. No T1, a colônia 3 apresentou uma amostra com clado A em dominância e uma amostra com misturas entre os clados A e C, enquanto que a colônia 4 tinha uma amostra em mistura de clados (Tabela 1). Por último, no T2, todas as colônias tiveram mudança de clado em pelo menos uma amostra. A colônia 1 apresentou uma amostra com clado A em dominância e uma amostra com mistura de clados. A colônia 2 teve uma amostra com clado A em dominância e duas amostras em mistura de clados, enquanto que as colônias 3 e 4 tiveram uma amostra cada com a presença do clado A dominante (Tabela 1).

Depois de recuperados os ramos tenderam a retornar ao estado inicial contendo o clado C como dominante, sendo somente observada mistura de clados em apenas uma

amostra que ainda se mostrava totalmente branqueada da colônia 3 (Tabela 1; Circulado em vermelho - Figura 13).

Tabela 1: Resultados obtidos a partir da identificação dos clados de zooxantelas associadas à *Mussismilia hartii* pela análise de PCR/RFLP do gene 18S rDNA digerido pela enzima de restrição *Taq* I. A e C indicam os clados encontrados; + indica a presença de mistura de clados em uma mesma amostra; / indica a análise de duas amostras de uma mesma colônia sendo um saudável e outro branqueado, respectivamente; X indica amostras que não puderam ser identificadas. C – Colônia; R – Rameto ou réplica da colônia; Verdade de campo – Coletado antes da aclimação; T0 – após 10 dias de aclimação; T1 – após 7 dias de experimento; T2 – após 15 dias de experimento; Recuperação – devolvidos ao recife e re-coletados após 3 meses.

Tratamentos	Tempo	Colônias															
		C1				C2				C3				C4			
		R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
	Verdade de campo	C				C				C				C			
Controle	T0	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	X	C	C	C
	T1	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
	T2	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	X	C	C	C
	Recuperação	C	C	C	C	X	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
pH	T0	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	X	C	C	C
	T1	X	C	C	X	C	X	C	C	C	C	X	C	C	C	C	C
	T2	C	C	C	C	C	C	C	X	C	C	C	C	C	C	C	C
	Recuperação	C	C/X	C	C	C	C	C	C	X	C	X	X	C	C	C	C
Temperatura	T0	C	C	C	C	A+C	C	C	C	A+C	C	C	C	C	C	C	C
	T1	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	A+C	X	C	C	A+C	C
	T2	X	X	C	C	C	X	X	C	A+C	A+C	X	C	X	A+C	C	C
	Recuperação	C	C	C	C	C	C	C	C	C/C	C/A+C	C/C	X	C/C	C/C	C	C/C
pH + Temperatura	T0	C	C	C	C	C	A+C	C	C	C	A+C	C	C	X	A+C	C	C
	T1	C	C	C	C	X	C	C	C	X	A	A+C	C	C	C	A+C	C
	T2	X	A	C	A+C	A	A+C	A+C	X	C	A	C	C	A	C	C	X
	Recuperação	C	C	C	C	X	C	C	C	X/C	C	C/C	C/C	C	C	C	C

4.4. Análises do Estresse Fotossintético

Durante os tempos de coleta foi medido o rendimento fotossintético máximo (Fv/Fm) de cada pólipos. Os resultados da RMANOVA mostram que a diferença entre os tratamentos foi significativamente dependente dos tempos (Tratamento – $F= 29,087$; $GL=3$; $p< 0,005$. Tempo – $F= 5,063$; $GL= 2$; $p> 0,005$. Tratamento/Tempo - $F = 7,563$; $GL= 6$; $p< 0,005$). Após o período de aclimação (T0), todos os corais apresentaram valores similares de Fv/Fm. Após 7 dias de experimento (T1), os valores de Fv/Fm para os corais nos tanques-controle e sob tratamento de pH foram similares ao T0, enquanto que para corais expostos ao aumento de temperatura ou temperatura e pH, houve uma redução significativa na eficiência dos fotossistemas (Figura 12; Tabela 2; Tabela 3). No T2 (15 dias de experimento), apesar de não ter sido significativamente diferente do T0 ou T1, houve uma tendência de aumento nos valores de Fv/Fm nos corais que não estavam expostos ao tratamento térmico (Controle e pH), enquanto que nos corais expostos ao estresse térmico (Temperatura e pH+Temperatura), os valores de Fv/Fm continuaram baixos como em T1 e significativamente diferente de T0 (Figura 12; Tabela 2; Tabela 3). Após os três meses no recife para recuperação, os fragmentos apresentaram valores de Fv/Fm similares entre si e superiores aos valores obtidos tanto em T0 quanto durante o experimento, sendo estes resultados estatisticamente diferentes dos demais (Figura 14).

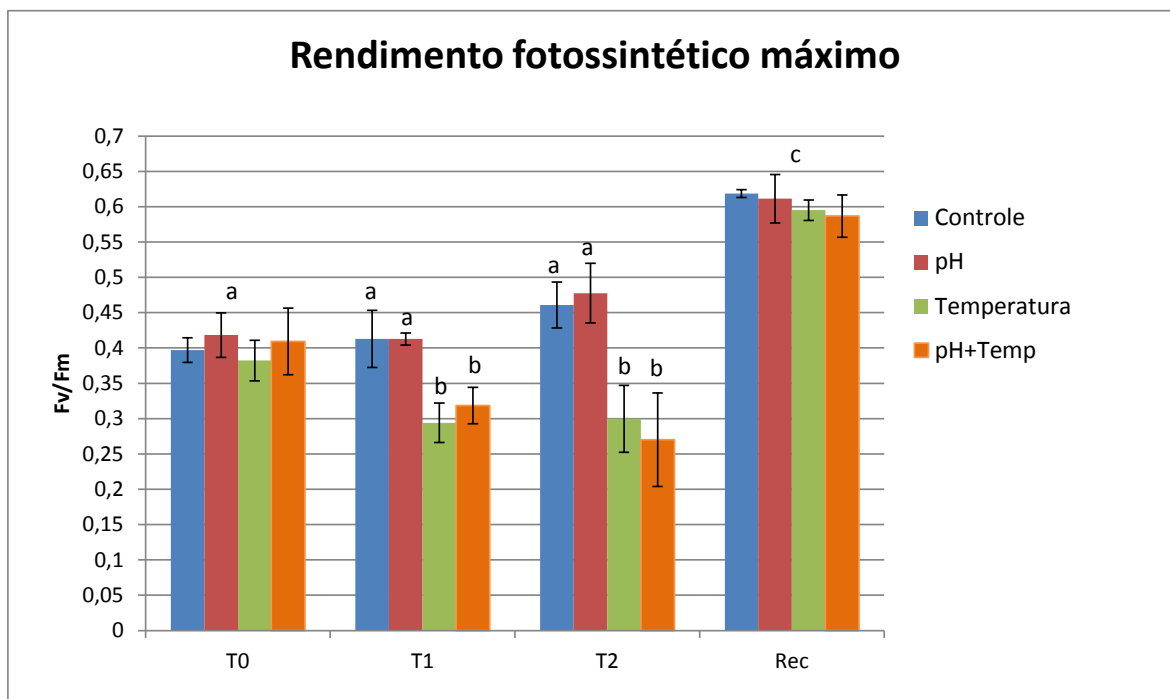


Figura 14: Gráfico em barras com as médias dos valores de eficiência fotossintética máxima (Fv/Fm) nos quatro tratamentos nos diferentes tempos de experimento. As diferentes letras simbolizam as diferenças significativas ($p > 0,05$). T0 – após 10 dias de aclimação; T1 – após 7 dias de experimento; T2 – após 15 dias de experimento; Rec – após a recuperação.

Tabela 2: Médias e desvio padrão dos valores de eficiência fotossintética por tratamento e em cada tempo de experimento. Os valores em negrito foram significativamente diferentes dos demais ($p > 0,05$). T0 – após 10 dias de aclimação; T1 – após 7 dias de experimento; T2 – após 15 dias de experimento; Rec – Após a recuperação.

		Fv/Fm			
		T0	T1	T2	Rec
Controle	Média	0,397	0,413	0,461	0,619
	dp	0,017	0,040	0,033	0,006
pH	Média	0,418	0,413	0,478	0,611
	dp	0,032	0,009	0,042	0,034
Temperatura	Média	0,409	0,319	0,270	0,595
	dp	0,047	0,026	0,066	0,015
pH+Temperatura	Média	0,382	0,294	0,300	0,587
	dp	0,029	0,028	0,047	0,030

Tabela 3: Tabela comparativa dos valores do pós-hoc Newman-Keuls da eficiência fotossintética. Os valores em negrito foram significativamente diferentes dos demais ($p > 0,05$). T0 – após 10 dias de aclimação; T1 – após 7 dias de experimento; T2 – após 15 dias de experimento; Rec – Após a recuperação. C- Controle; pH – Tratamento de pH; T – Tratamento de temperatura; pH+T – Tratamento concomitante de pH e temperatura.

Tratamento		C	C	C	C	pH	pH	pH	pH	T	T	T	T	pH + T	pH + T	pH + T	pH + T
	Tempo	T0	T1	T2	Rec	T0	T1	T2	Rec	T0	T1	T2	Rec	T0	T1	T2	Rec
C	T0		0,91	0,12	0,00	0,91	0,80	0,03	0,00	0,55	0,00	0,00	0,00	0,62	0,01	0,00	0,00
C	T1	0,91		0,13	0,00	0,83	0,99	0,05	0,00	0,72	0,00	0,00	0,00	0,99	0,00	0,00	0,00
C	T2	0,12	0,13		0,00	0,09	0,22	0,50	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,23	0,00	0,00	0,00
C	Rec	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00	0,60	0,00	0,00	0,00	0,57
pH	T0	0,91	0,83	0,09	0,00		0,97	0,05	0,00	0,69	0,00	0,00	0,00	0,98	0,00	0,00	0,00
pH	T1	0,80	0,99	0,22	0,00	0,97		0,08	0,00	0,60	0,00	0,00	0,00	0,89	0,00	0,00	0,00
pH	T2	0,03	0,05	0,50	0,00	0,05	0,08		0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00
pH	Rec	0,00	0,00	0,00	0,76	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,51	0,00	0,00	0,00	0,58
T	T0	0,55	0,72	0,04	0,00	0,69	0,60	0,01	0,00		0,00	0,00	0,00	0,52	0,01	0,00	0,00
T	T1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,82	0,00	0,00	0,58	0,34	0,00
T	T2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,82		0,00	0,00	0,45	0,46	0,00
T	Rec	0,00	0,00	0,00	0,60	0,00	0,00	0,00	0,51	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,74
pH + T	T0	0,62	0,99	0,23	0,00	0,98	0,89	0,08	0,00	0,52	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00
pH + T	T1	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,58	0,45	0,00	0,00		0,22	0,00
pH + T	T2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,34	0,46	0,00	0,00	0,22		0,00
pH + T	Rec	0,00	0,00	0,00	0,57	0,00	0,00	0,00	0,58	0,00	0,00	0,00	0,74	0,00	0,00	0,00	

4.5. Análise de Calcificação

Com as análises das taxas de calcificação, a RMANOVA mostrou que a diferença entre os tratamentos foi significativamente dependente dos tempos (Tratamento – $F=6,682$; $GL= 3$; $p=0,001$. Tempo – $F= 0,006$; $GL= 2$; $p=0,935$. Tratamento/Tempo - $F= 3,038$; $GL= 6$; $p=0,016$), assim como para fotossíntese. É possível observar valores similares em todos os tanques após a aclimação (T0). Após 7 dias, houve a tendência de redução nas taxas de calcificação para os tratamentos envolvendo o aumento na temperatura (Temperatura e pH+Temperatura), enquanto que ocorreu um possível aumento na calcificação dos corais que se encontravam nos tanques-controle e com tratamento de pH. Porém, diferenças de resposta entre colônias acarretou em uma grande variância dos dados não sendo possível detectar diferenças estatisticamente. Esses resultados se acentuaram após 15 dias de experimento (T2),

evidenciando uma redução significativa das taxas de calcificação somente nos tratamentos de temperatura no T2 (Figura 13; Tabela 4; Tabela 5).

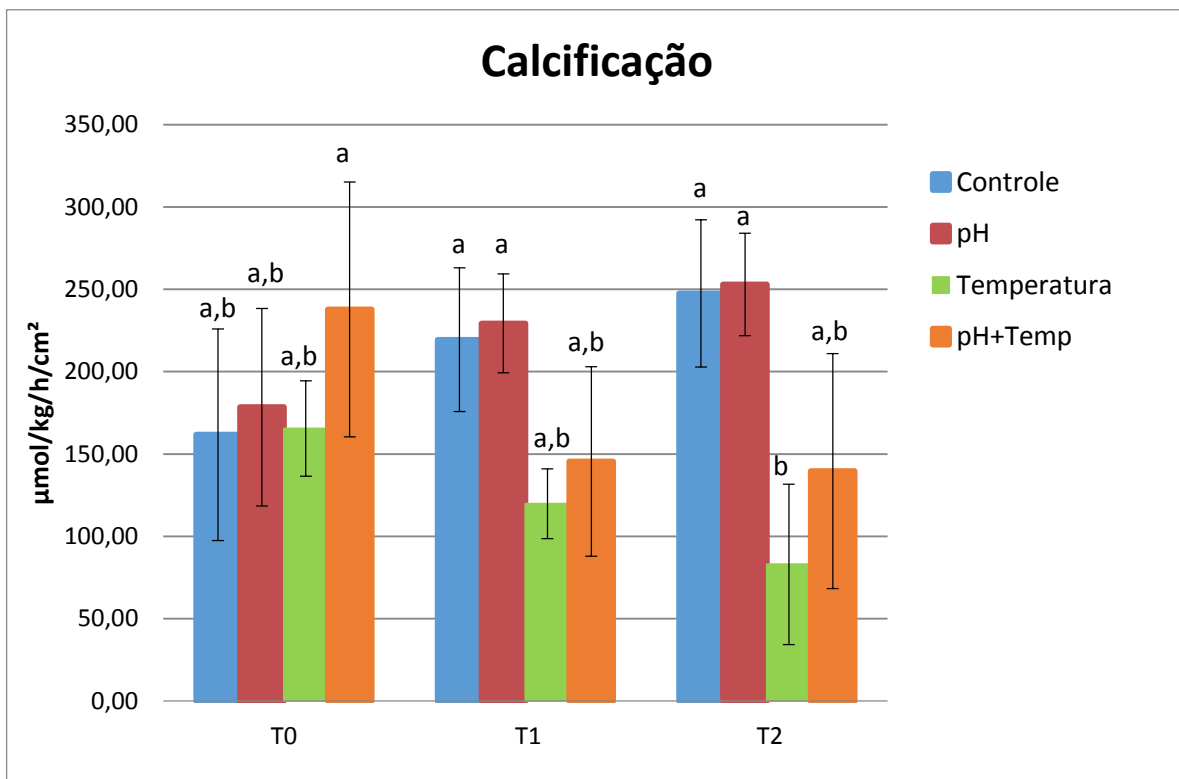


Figura 15: Gráfico em barras com as médias das taxas de calcificação nos quatro tratamentos nos diferentes tempos de experimento. As diferentes letras simbolizam as diferenças significativas ($p > 0,05$). T0 – após 10 dias de aclimação; T1 – após 7 dias de experimento; T2 – após 15 dias de experimento;

Tabela 4: Médias e desvio padrão das taxas de calcificação dos tratamentos em cada tempo de experimento. Os valores em negrito significam os valores que foram significativamente diferentes ($p>0,05$). T0 – após 10 dias de aclimação; T1 – após 7 dias de experimento; T2 – após 15 dias de experimento;

		Taxa de Calcificação		
		T0	T1	T2
Controle	Média	161,7	219,3	247,5
	dp	64,3	43,6	44,7
pH	Média	178,4	229,3	252,9
	dp	60,0	30,1	31,1
Temperatura	Média	165,5	119,7	83,0
	dp	29,0	21,2	48,7
pH+Temperatura	Média	237,8	145,4	139,6
	dp	77,4	57,5	71,3

Tabela 5: Tabela comparativa dos valores do pós-hoc Newman-Keuls das taxas de calcificação. Os valores em negrito foram significativamente diferentes dos demais ($p>0,05$). T0 – após 10 dias de aclimação; T1 – após 7 dias de experimento; T2 – após 15 dias de experimento. C- Controle; pH – Tratamento de pH; T – Tratamento de temperatura; pH+T – Tratamento concomitante de pH e temperatura.

Tratamento	Tempo	C			pH			pH+T			T			
		T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	
C	T0			0,53	0,41	0,92	0,51	0,40	0,48	0,70	0,86	0,93	0,75	0,35
C	T1	0,53			0,91	0,34	0,82	0,93	0,90	0,42	0,43	0,42	0,25	0,05
C	T2	0,41	0,91			0,48	0,90	0,90	0,82	0,26	0,24	0,39	0,11	0,02
pH	T0	0,92	0,34	0,48			0,46	0,50	0,50	0,86	0,89	0,76	0,73	0,29
pH	T1	0,51	0,82	0,90	0,46			0,94	0,84	0,37	0,36	0,44	0,19	0,03
pH	T2	0,40	0,93	0,90	0,50	0,94			0,93	0,24	0,22	0,39	0,10	0,01
pH+T	T0	0,48	0,90	0,82	0,50	0,84	0,93			0,33	0,31	0,44	0,15	0,02
pH+T	T1	0,70	0,42	0,26	0,86	0,37	0,24	0,33			0,89	0,88	0,82	0,46
pH+T	T2	0,86	0,43	0,24	0,89	0,36	0,22	0,31	0,89			0,93	0,64	0,38
T	T0	0,93	0,42	0,39	0,76	0,44	0,39	0,44	0,88	0,93			0,81	0,39
T	T1	0,75	0,25	0,11	0,73	0,19	0,10	0,15	0,82	0,64	0,81			0,39
T	T2	0,35	0,05	0,02	0,29	0,03	0,01	0,02	0,46	0,38	0,39	0,39		

5. Discussão

O presente estudo mostrou que o aumento da temperatura tem um grande efeito na fisiologia de *Musissmilia hartti* e de suas zooxantelas simbiotes, ao contrário da acidificação, que mostrou não alterar, a curto prazo, a fisiologia do hospedeiro-simbionte.

5.1. Avaliação da coloração das colônias

Com a avaliação das fotografias dos fragmentos expostos aos tratamentos foi observado a evolução dos níveis de branqueamento nos corais expostos ao estresse térmico (tanques com tratamento de temperatura e pH+temperatura). Estresses térmicos tendem a demonstrar uma resposta mais imediata ao branqueamento (12 dias de exposição - Brown, 1997) do que estresses provocados pela alteração do pH (60 dias de exposição - Anthony, *et al.*, 2008). Wall e colaboradores (2013) também já haviam verificado que altas concentrações de CO₂, em 21 dias de experimento, não provocaram o branqueamento no coral *Seriatopora caliendrum* enquanto que a temperatura de 30,5°C branquearam os corais. No presente estudo o coral *M. harttii* apresentou branqueamento severo após exposição a temperaturas de até 31,4° C, nos tanques com estresse térmico, e leve descoloração nos tanques controle e de pH que atingiu máximas de 28° C, contudo, a descoloração parece estar relacionada com as altas temperaturas a que os corais foram expostos do que as altas concentrações de CO₂ na água.

Esta leve descoloração nos fragmentos já havia sido observada após o período de aclimação, o que sugere que os corais estavam passando por algum estresse antes dos experimento. A explicação mais provável são as altas temperaturas no recife (de onde a água era coletada para o experimento) registradas durante o período de aclimação, chegando a 29,4°C (Média: 27,6°) nos dois primeiros dias de aclimação

sendo esta temperatura maior que as registradas para os tratamentos térmicos no T2 (28,3°; Média: 27,6°C). Após os corais serem levados para recuperação de três meses no recife de origem, os corais foram recoletados e grande parte aparentava ter recuperado a coloração original. Este resultado pode significar que o tempo de três meses é o tempo necessário para a recuperação do estado de saúde do coral e possível reestabelecimento de sua comunidade simbiote. Isto também foi observado no coral *Acropora aspera* que branqueou quando exposto a temperatura de 34°C e após 2 meses nas mesmas condições ambientais (recuperação) retornou a coloração original (Bonesso *et al.*, 2017).

5.2. Análises Moleculares de *Symbiodinium*

Mussismilia harttii apresentou associação com os clados A e C, sendo a associação com clado A somente quando o coral foi exposto a temperaturas elevadas. Estes resultados foram diferentes dos que foram encontrados por Picciani-de-Souza (2013) que observou, em um estudo *in situ*, associação exclusiva deste coral com o clado C para a mesma região (i.e., Recife de Fora, Porto Seguro, BA). Neste mesmo estudo foi observado, também uma associação específica do clado C em *Mussismilia hispida* enquanto que em *Mussismilia braziliensis* foi observada uma mistura dos clados C e A (Picciani-de-Souza, 2013). A presença do clado C nas três espécies mostra que esta associação parece ser bastante estável para este gênero nesta localidade. Porém, diferente do que foi observado no Recife de Fora, as colônias de *M. hispida* apresentaram associação específica com clado A na costa norte do país enquanto que na região sudeste foi encontrada a associação com clado A e em algumas colônias uma mistura entre os clados A e B (Picciani-de-Souza *et al.*, 2016). Como observado para *M. hispida*, a relação simbiótica entre o coral *M. harttii* e o *Symbiodinium* pode também depender das condições ambientais que o coral está exposto.

Quando expostos aos tratamentos de pH e aos tanques controles, o clado C também se mostrou dominante em todos os tempos de tratamento, sem mudança para outros clados. Este resultado era esperado, visto que a mudança na dominância de clados em um hospedeiro está geralmente relacionada com estresses térmicos (Baker 2003), apesar de que luminosidade também é um fator abiótico que está correlacionado com mudanças de clados (Rowan *et al.*, 1997; Baker, 2003; LaJeunesse *et al.* 2004). Não existem estudos que reportem a mudança de clado em ambientes acidificados, contudo, já foi observado branqueamento com queda na concentração de clorofila α , em experimentos prolongados (oito semanas em pH <7,8; Anthony *et al.* 2008). Também já foi reportado que diferentes subclados de *Symbiodinium* respondem de diferentes formas a mudança no pH (Branding *et al.*, 2011; Towanda & Thuesen, 2012; Baghdasarian *et al.*, 2017). Com isso, é possível levantar a hipótese de que haja expulsão de tipos de simbiontes e recolonização de outros mais resistentes dependendo do tempo de exposição, porém, devido ao curto período experimental, isso não foi observado em *M. harttii*.

Quando as colônias de *M. harttii* foram expostas ao estresse térmico (tratamento de temperatura e ao tratamento concomitante de pH e temperatura) foi observada a presença do clado A em dominância ou em mistura com clado C. Em um estudo com o coral *Acropora millepora* foi observada também mudança de clados após um evento de branqueamento em ilhas na margem sul da Grande Barreira de corais da Austrália. Neste estudo foram analisados os clados presentes antes e três meses após o branqueamento e foi observada prevalência do subclado C2 antes do branqueamento e mudança para os clados D e C1 após o branqueamento (Jones *et al.*, 2008)

O clado A é encontrado em colônias de águas rasas, que estão sob estresse luminoso, podendo ter maior resistência a luminosidade intensa (LaJeunesse, 2002; Loh

et al. 2006; Finney, *et al.* 2010). Esta resistência pode ser atribuída pela presença do aminoácido micosporina que confere a zooxantela proteção contra a radiação UV (Banaszak *et al.*, 2000). No coral *Orbicella* (= *Montastraea*) *faveolata* já foi observada uma maior resistência ao branqueamento, e valores maiores de F_V/F_M , quando associado a *Symbiodinium* dos clados A e D, do que quando associado aos clados B e C (Kemp *et al.*, 2014).

Além do aparecimento do clado A durante o período experimental, este clado também foi observado no início do experimento, logo após o período de 10 dias que ficaram aclimatando (T0). Isso pode estar associado às altas temperaturas durante o período de aclimação, que foi aproximadamente 1°C acima dos valores reportados no final do experimento nos tanques com tratamento térmico. Entretanto, esta variabilidade intra-colonial pode estar associada a diferenças de micro-habitats *in situ*. Este tipo de variação já foi reportado em espécies do gênero *Orbicella* (*Montastraea*) que apresentaram diferentes clados em uma mesma colônia, sendo correlacionado com incidência luminosa (Rowan *et al.*, 1997).

Por hipótese, o aparecimento deste clado pode ter ocorrido das seguintes formas: 1) Os clados A e C são os únicos clados presentes nas colônias estudadas e, portanto, com a redução do clado C, o clado A pôde aparecer; 2) outros clados estariam presentes, além dos clados A e C, porém em baixíssima densidade e, com o aumento da temperatura e da forte incidência luminosa, devido a pouca profundidade nos tanques do experimento somente o clado A resistiu; 3) O clado A não compunha a comunidade de *M. harttii* e, com o estresse térmico, foi adquirido da coluna d'água. Infelizmente a técnica da PCR/RFLP não possui resolução suficiente para acessar sequências de clados em baixa densidade (Powell *et al.*, 1996). Uma técnica que tem sido usada recentemente

para acessar esta diversidade de clados e até subclados é através do Sequenciamento de Última Geração (NGS; Thomas *et al.*, 2014).

Comparando os indivíduos dos tratamentos com os recuperados de uma mesma colônia, é possível observar que houve a recuperação da maioria dos indivíduos ao clado dominante inicial (Clado C). Contudo, dentre todos os fragmentos que retornaram ao recife, um fragmento não tinha se recuperado e ainda apresentava branqueamento severo e, quando analisado a composição taxonômica foi encontrada uma mistura dos clados A e C. Estes resultados mostram que com três meses de retorno ao seu ambiente normal após a exposição a estresse térmico, há a retomada do estado original de simbiontes, na maioria dos pólipos de *M. harttii*.

5.3. Análises do Estresse fotossintético

Os valores obtidos de F_V/F_M indicam que o aumento de temperatura pode ter efeito negativo sobre as zooxantelas, afetando suas taxas fotossintéticas. Os resultados encontrados neste estudo corroboram com os encontrados por Duarte (2015) que, em um estudo realizado também no mesocosmo marinho, verificou valores baixos de F_V/F_M para esta mesma espécie quando associados ao aumento de temperatura de 2°C e 4°C acima das flutuações da temperatura ambiente. Outro estudo, utilizando desta vez um sistema fechado com temperaturas fixas, observou que temperaturas acima de 31°C foram prejudiciais para *M. harttii* tendo quedas nos valores de F_V/F_M , que se acentuou quando em exposição a luz, sendo a temperatura de 31°C limítrofe para recuperação dos pólipos expostos (Winter *et al.*, 2016). Em outro estudo, quatro corais (*Stylophora pistillata*, *Montipora aequituberculata*, *Acropora* sp. e *Pavona cactus*) foram expostos a temperaturas entre 27° a 34°C e a irradiância de $300 \pm 20 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, em conjunto e isoladamente. Após a exposição foi observado que os valores de F_V/F_M das espécies *M. aequituberculata* e *S. pistillata* reduziram quando expostos somente ao

estresse térmico e quando expostos à ação conjunta da temperatura elevada e radiação UV, todos os corais tiveram redução significativa nos valores de F_V/F_M (Ferrier-Pagès *et al.*, 2007). Também foi observada uma redução nos valores de F_V/F_M do coral *Seriatopora caliendrum* quando expostos a temperatura de 30,5°C. Juntamente com a redução no F_V/F_M os corais sofreram branqueamento e reduções nas concentrações de clorofila α e na densidade de zooxantelas (Wall *et al.*, 2013). Segundo Cunning e Baker (2012), o aumento da temperatura pode provocar um aumento exacerbado na densidade de zooxantelas e, conseqüentemente, aumentando a concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) após sofrerem o fotodano no fotossistema II. Apesar de não ter sido medida a clorofila α e a densidade de zooxantelas no presente estudo, observou-se o branqueamento dos corais e a redução nos valores de F_V/F_M , sugerindo que *M. harttii* também teria sofrido redução nas concentrações de clorofila α e de zooxantelas. Para comprovar esta hipótese seria necessário outro estudo com *M. harttii* que medissem tanto os valores de F_V/F_M , assim como quantificar clorofila α e densidade de zooxantelas.

Assim como já explicado, com a expulsão das zooxantelas o coral branqueia e perde o grande aporte nutricional fornecido pelos simbioses. Contudo, já foi relatado que alguns corais tem capacidade de, durante um evento de branqueamento, compensar a aquisição de carbono fornecida pela autotrofia dos simbioses através da heterotrofia. O coral *Montipora capitata*, por exemplo, é capaz de chegar, através da heterotrofia, a quantidade de carbono contribuído pelas zooxantelas, enquanto que os corais *Porites compressa* e *Porites lobata* são menos resilientes e não são capazes de equilibrar a aquisição de carbono pela heterotrofia quando branqueados, ou seja, *P. compressa* e *P. lobata* seriam mais suscetíveis a mortalidade que *M. capitata* em eventos de branqueamento prolongado (Grottoli *et al.*, 2006). No entanto, ainda não foram

desenvolvidos estudos que observem a ação da heterotrofia em *M. harttii* em períodos de branqueamento.

Como já mencionado, a exposição intensa à luz parece ser um intensificador da ação danosa do aumento na temperatura. Em um estudo, o coral *Stilophora pistillata* foi exposto à luminosidade consideradas altas ($100\text{-}120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por tempo prolongado (27 dias de exposição) e apresentou redução significativa nos valores de F_V/F_M (Nakamura *et al.*, 2017). Em contrapartida, no estudo de Schrameyer e colaboradores (2016) o estresse luminoso, de forma isolada, não afetou os valores de F_V/F_M nos corais *Pocillopora damicornis* e *Pavona decussata*. Os corais teriam sido expostos a um experimento de 96 horas com densidade de luz de, aproximadamente, $1464 \pm 22 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e só mostraram redução significativa da F_V/F_M quando expostos a enzima inibidora da proteína PsbA do cloroplasto – Lincomicina (Schrameyer *et al.*, 2016). No presente estudo, os corais foram expostos apenas a luminosidade solar incidente nos tanques do mesocosmos, sendo atenuada por uma tela de sombreamento que filtrou 70% da luz (Duarte *et al.*, 2015). Ao longo de todo o experimento a luminosidade na qual os corais estavam expostos variou de $\sim 320 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a $\sim 4 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (com média de $\sim 76 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Com os valores altos de luminosidade, aliados ao tempo de exposição (15 dias de experimento) é possível que a luminosidade tenha sido um fator importante na redução do F_V/F_M .

Outro ponto a ser mencionado é sobre os valores iniciais (T_0) se mostrarem baixos quando comparados com os valores obtidos durante a recuperação, além disso resultados obtidos para a mesma espécie no início de cada experimento em dois outros estudos (Duarte, 2015; Winter *et al.*, 2016). Assim como o presente estudo, os corais foram mantidos durante 10 dias aclimatando e após isso foi medido o F_V/F_M . Duarte

(2015) e Winter e colaboradores (2016) apresentavam F_V/F_M após a aclimação de aproximadamente 0,6 enquanto que no presente estudo os valores iniciais não passaram de 0,4. Uma possível razão para esta diferença talvez esteja nas altas temperaturas presentes durante o período de aclimação do presente estudo. A temperatura no atual experimento atingiu a máxima de 29,4°C, enquanto que nos experimentos de Duarte (2015) e de Winter (2016) se manteve em torno de 26,5°C. Após o período de recuperação, foi medido o F_V/F_M dos corais recuperados e estes apresentaram valores maiores que os encontrados após aclimação e similares aos valores iniciais encontrados nos dois estudos acima citados, sugerindo que o aumento de temperatura no início da aclimação pode ter afetado a eficiência fotossintética antes do experimento começar.

Não foi possível correlacionar a ocorrência do clado A com a eficiência fotossintética. Como já explicado, clado A geralmente está associado com corais que estão sob forte estresse e tem certa resistência ao branqueamento e maiores valores de F_V/F_M quando sob estresse térmico (Banaszak et al., 2000; Kemp et al., 2014). Apesar disso, os valores de F_V/F_M se mostraram reduzidos para os tratamentos térmicos e os pólipos branqueados no presente estudo. Contudo, o fragmento utilizado para as mensurações da eficiência fotossintética não foi utilizado para a análise molecular, portanto é possível que este fragmento em específico não tenha mudado de clado. Também é possível que o coral, por ter branqueado, tenha reduzido a densidade de zooxantelas e as concentrações de clorofila α e, como já mencionado, tenha reduzido os valores de F_V/F_M .

5.4. Análise de Calcificação

Os resultados obtidos para calcificação mostraram que houve redução nas taxas de calcificação apenas para os corais que passaram pelos tratamentos térmicos. Estudos já

havia apontado que a redução no pH provocaria a redução nas taxas de calcificação em diversos organismos (Guinotte e Fabry, 2008). Um exemplo é o coral *Porites compressa* que em 40 dias de experimento a pH 7.2 teve metade da taxa de calcificação que a pH 8.0 (Marubini & Atkinson, 1999). Enquanto que em outro estudo o coral *Stylophora pistillata* não sofreu redução em sua calcificação durante um experimento de 40 dias sob pH mínimo de 7.7 (Nakamura *et al.*, 2017). Nestes dois estudos citados a queda na calcificação pode ter sido influenciado por dois fatores: *P. compressa* ser um coral mais sensível a quedas de pH que *S. pistillata*; o pH mais próximo de 7.0 afetar mais as taxas de calcificação que próximo de 8.0 ou até mesmo estes dois fatores conjuntos. Para *M. harttii*, ainda não se sabe o quão suscetível este coral é a redução de pH e, no presente estudo, o tempo de 15 dias de experimento pode não ter sido suficiente para observar mudanças significativas.

Quanto a influência da temperatura nas taxas de calcificação, este resultado se mostra correlacionado com as análises de fotossíntese. Como já mencionado o coral, sob forte estresse térmico, pode ter expulsado grande parte das zooxantelas e como consequência reduziu as taxas fotossintéticas. As zooxantelas, através da fotossíntese, fornecem metabólitos essenciais para a deposição de CaCO_3 (Muscatine, 1980; Stanley, 2006; Antonelli *et al.*, 2016). Com a possível redução da densidade de zooxantelas reduziu também as taxas de fotossíntese e com isso os nutrientes utilizados pelo coral para deposição de CaCO_3 são restringidos. Este tipo de resultado já havia sido observado para o coral *Siderastrea siderea* que apresentou redução nas taxas de calcificação quando expostos a temperaturas entre 28° e 32°C (Horvarth *et al.*, 2013).

Apesar da redução nas taxas de calcificação terem sido associadas as alterações térmicas, os corais expostos pela ação dos dois estressores (temperatura e pH) tiveram uma redução na calcificação menor que somente de temperatura. Uma possível

explicação é que o CO₂, injetado no sistema do mesocosmo para acidificação da água, pode ter suprido a demanda nutricional exigida pelas zooxantelas. Como já mencionado, o aumento da temperatura pode induzir ao aumento no metabolismo dos simbiossitos e, conseqüentemente, aumento na densidade de zooxantelas que provoca um aumento na demanda de nutrientes (Cunning & Baker, 2012; Wooldridge, 2013). Esta demanda, quando não atingida, pode provocar a formação de ROS. É possível que, com a injeção de CO₂ para acidificar a água, a demanda necessitada para a fotossíntese tenha sido atingida e não afetado de maneira tão drástica no aporte nutricional fornecido ao coral e, por conseqüência, na calcificação. Outra possível explicação está relacionada com a enzima anidrase carbônica que tem como função catalisar a conversão reversível de HCO₃⁻ em CO₂ (Furla *et al.*, 2000). Em um experimento de acidificação com a anêmona *Anemonia viridis* observou-se redução da ação da anidrase carbônica em altas concentrações de CO₂. Segundo os autores um ambiente com concentrações normais de CO₂, o HCO₃⁻ é preferencialmente removido da água do mar pra aquisição de carbono inorgânico (Ventura *et al.*, 2016). Entretanto, um ambiente com alta concentração de CO₂, o HCO₃⁻ é substituído pelo CO₂ como fonte principal de carbono fazendo com que tenha um consumo menor de energia para a ação da anidrase carbônica e esta energia possa ser utilizada com outros fins (Ventura *et al.*, 2016). É possível que esta situação tenha ocorrido com coral *M. harttii* nos tratamentos com alta concentração de CO₂ (tratamentos de pH) e tenha concentrado sua demanda energética para a calcificação.

Em resumo, estes resultados obtidos mostram que os efeitos causados pelo aumento na temperatura, previstos pelo IPCC para daqui a 50 anos, podem ter uma resposta mais imediata na fisiologia do coral que a redução no pH marinho e a curto prazo uma diminuição do pH não parece afetar negativamente as taxas de calcificação de *Mussismilia harttii*. Devido essa suscetibilidade de *M. harttii* ao aumento de

temperatura, em conjunto com o seu endemismo, importância na formação dos recifes brasileiros e seu *status* recente de “em perigo de extinção” reforçam a necessidade de medidas para sua conservação.

6. Conclusão

- O coral *Mussismilia harttii* mostrou ser suscetível ao aumento de 2°C na temperatura da água provocando branqueamento, acompanhado pela mudança do clado C inicial para o clado A em alguns fragmentos, diminuição do rendimento fotossintético máximo (F_V/F_M) e redução nas taxas de calcificação.
- Não foi possível observar correlação entre a presença do clado A com a redução do rendimento fotossintético pois este clado geralmente é mais resistente a ambientes sob estresse térmico e mostram maiores valores de F_V/F_M que corais associados ao clado C.
- A redução nas taxas de calcificação de *M. harttii* nos tratamentos térmicos pode ter sido influenciado pela redução nas taxas fotossintéticas de seus simbiontes.
- *M. harttii* tendeu a recuperação da coloração, do clado C inicial e valores de F_V/F_M acima dos observados após o T0.

REFERÊNCIAS

- ALLEMAND, D.; FERRIER-PAGÈS, C.; FURLA, P.; HOULBRÈQUE, F.; PUVREL, S.; REYNAUD, S.; TAMBUTTÉ, E.; TAMBUTTÉ, S. ZOCCOLA, D. Biomineralisation in reef-building corals: from molecular mechanisms to environmental control. *General Palaeontology (Palaeobiochemistry)*, C. R. Palevol, 3: 453–467p, 2004.
- ANTHONY, K.R.N.; KLINE, D.I.; DIAZ-PULIDO, G.; DOVE, S.; HOEGH-GULDBERG, O. Ocean acidification causes bleaching and productivity loss in coral reef builders. *PNAS*. 105(45): 17442-17446, 2008.
- ANTONELLI, P. L.; RUTZ, S. F.; SAMMARCO, P. W.; STRYCHAR, K. B. Evolution of symbiosis in hermatypic corals: A model of the past, present, and future. *Nonlinear Analysis: Real World Applications*. 32: 389-402, 2016.
- BAGHDASARIAN, G.; OSBERG, A.; MIHORA, D.; PUTNAM, H.; GATES, R.D.; EDMUNDS, P.J. Effects of temperature and pCO₂ on population regulation of *Symbiodinium* spp. in a Tropical reef coral. *The Biological Bulletin*. 232(2): 123-139, 2017.
- BAHR, K.D.; JOKIEL, P.L.; RODGERS, K.S. Seasonal and annual calcification rates of the Hawaiian reef coral, *Montipora capitata*, under present and future climate change scenarios. *Journal of Marine Science*. 74(4): 1083-1091, 2016.
- BAKER, A. C. Flexibility and specificity in coral-algal symbiosis: diversity, ecology, and biogeography of *Symbiodinium*. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 34:661-689, 2003.
- BAKER, A.C.; ROWAN, R. Diversity of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae) in scleractinian corals of the Caribbean and eastern Pacific. *Proceedings of the 8th International Coral Reef Symposium*. 2: 1301–1306, 1997.

- BALDWIN, B.G.; SANDERSON, M.J.; PORTER, J.M.; WOJCIECHOWSKI, M.F.; CAMPBELL, C.S.; DONOGHUE, M.J. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 82: 247–277, 1995.
- BANASZAK, A. T.; LAJEUNESSE, T. C.; TRENCH, R. K. The synthesis of mycosporine-like amino acids (MAAs) by cultured, symbiotic dinoflagellates. *J Experimental Marine Biological Ecology*. 249: 219 –233, 2000.
- BESSLER, K.R.; RODRIGUES, L.C. Os polimorfos de carbonato de cálcio – uma síntese fácil da aragonita. *Química Nova*. 31(1): 178-180, 2008.
- BLANK, R.J.; HUSS, V.A.R. DNA divergency and speciation in *Symbiodinium* (Dinophyceae). *Plant Systematics and Evolution*. 163: 153–163, 1989.
- BONESSO, J.L.; LEGGAT, W.; AINSWORTH, T.D. Exposure to elevated sea-surface temperatures belong bleaching threshold impairs coral recovery and regeneration following injury. *PeerJ Preprints* 5:e2949v1, 2017.
- BOYES, E.; STANISSTREET, M. The ‘Greenhouse Effect’: children’s perceptions of causes, consequences and cures. *Internacional Journal of Science Education*. 15 (5): 531-552, 1993.
- BRANDING, P.; WARNER, M.E.; DAVEY, P.; SMITH, D.J.; ACHTERBERG, E.P.; SUGGETT, D.J. Differential effects of ocean acidification on growth and photosynthesis among phylotypes of *Symbiodinium* (Dinophyceae). *Limnology and Oceanography*. 56(3): 927-938, 2011.
- BROWN, B.E. Coral bleaching: causes and consequences. *Coral Reefs* 16: 129-138, 1997.

- BRUNO, R. L. M.; DE ARAÚJO, H. A. B.; MACHADO, A. J. Análise das assembleias de foraminíferos no sedimento superficial do Recife de Fora, região sul da Bahia. *Revista Brasileira de Geociências*, 39(4): 599-607, 2009.
- CAPEL, K. C. C.; SEGAL, B.; LINDNER, A. Corallith beds at the edge of the tropical South Atlantic. *Coral Reefs*. 31: Note, 2012.
- CASTRO, C. B.; PIRES, D. O. Brazilian coral reefs: what we already know and what is still missing. *Bulletin of Marine Science*. 69(2): 357-371p, 2001.
- COSTA, C.F.; SASSI, R.; AMARAL, F.D. Annual cycle of simbiotic dinoflagellates from three species of scleractiniam corals from coastal reefs of northeastern Brazil. *Coral Reefs*. 24:191-193, 2005.
- COSTA, C.F.; SASSI, R.; GORLACH-LIRA, K. Zooxanthellae genotypes in the coral *Siderastrea stellata* from coastal reefs in northeastern Brazil. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 367: 149-152, 2008.
- CUNNING, R.; BAKER, A.C. Excess algal symbionts increase the susceptibility of reef corals to bleaching. *Nature Climate Change*. 3:259–262, 2013.
- DUARTE, G.; CALDERON, E. N.; PEREIRA, C. M.; MARANGONI, L. F. B.; SANTOS, H. F.; PEIXOTO, R. S.; BIANCHINI, A.; CASTRO, C. B. A novel marine mesocosm facility to study global warming, water quality, and ocean acidification. *Ecology and Evolution*, 5: 4555-4566, 2015.
- DUARTE, G. Estudo da variação da taxa de calcificação e da produtividade de *Mussismilia harttii* (Verrill, 1868) (Cnidaria: Scleractinia) sob efeito da alteração da pressão parcial de CO₂, da temperatura e da disponibilidade de zooplâncton em um mesocosmo recifal. Tese apresentada ao PPG em Zoologia do MNRJ/UFRJ. 2015.
- DUARTE, G.; CALDERON, E. N.; PEREIRA, C. M.; MARANGONI, L. F. B.; SANTOS, H. F.; PEIXOTO, R. S.; BIANCHINI, A.; CASTRO, C. B. Avaliando

- impactos de estresses ambientais em recifes de coral – o uso de mesocosmos. Em: ZILBERBERG, C.; ABRANTES, D. P.; MARQUES, J. A.; MACHADO, L. F.; MARANGONI, L. F. B. *Conhecendo os Recifes Brasileiros: Rede de Pesquisas Coral Vivo*. Rio de Janeiro: Série de Livros Museu Nacional, 1: 233-244, 2016.
- FEELY, R.A.; DONEY, S.C.; COOLEY, S.R. Ocean Acidification – Present conditions and future changes. *Oceanography*. 22(4):36-47, 2009.
- FERRIER-PAGÈS, C.; RICHARD, C.; FORCIOLI, D.; ALLEMAND, D.; PICHON, M.; SHICK, M. Effects of temperature and UV radiation increases on the photosynthetic efficiency in four scleractinian coral species. 213(1): 76-87, 2007.
- FINNEY, J. C.; PETTAY, D. T.; SAMPAYO, E. M.; WARNER, M. E.; OXENFORD, H. A.; LAJEUNESSE, T. C. The relative significance of host-habitat, depth, and geography on the ecology, endemism, and speciation of coral endosymbionts in the genus *Symbiodinium*. *Microbiology Ecology*. 60: 250–263, 2010.
- FONSECA, J.S; MARANGONI, L.F.B.; MARQUES, J.A.; BIANCHINI, A. Effects of increasing temperature alone and combined with copper exposure on biochemical and physiological parameters in the zooxanthellate scleractinian coral *Mussismilia harttii*. *Aquatic Toxicology*. 190: 121-132, 2017.
- FREITAS, L. M.; OLIVEIRA, M. D. M.; KIKUCHI, R. K. P. Os mecanismos de sobrevivência dos corais diante do impacto das mudanças climáticas sobre o ecossistema de recifes. *Caderno de Geociências*. 9(2): 142-156, 2012.
- FREUDENTHAL, H. D. *Symbiodinium* gen. nov. and *Symbiodinium microadriaticum* sp. nov., a zooxanthella: taxonomy, life cycle, and morphology. *Journal of Protozoology*. 9(1): 45–52, 1962.
- FUKAMI, H.; BUDD, A. F.; LEVITAN, D. R.; JARA, J.; KERSANACH, R.; KNOWLTON, N. Geographic differences in species boundaries among members of

- the *Montastraea annularis* complex based on molecular and morphological markers. *Evolution*. 58(2): 324–337, 2004.
- FURLA, P.; ALLEMAND, D.; ORSENIGO, M.N. Involvement of H⁺-ATPase and carbonic anhydrase in inorganic carbon uptake for endosymbiont photosynthesis. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 278(4): 870-881, 2000.
- GARRIDO, A.G. Diversidade genética de zooxantelas do hidrocoral *Millepora alcicornis* (Linnaeus, 1758) (Cnidaria, Hydrozoa) no Brasil e sua resposta a anomalias térmicas. Dissertação apresentada ao PPG em Zoologia do MNRJ/UFRJ. 97pp, 2015.
- GAZEAU, F.; ALLIOUANE, S.; BOCK, C.; BRAMANTI, L.; CORREA, M. L.; GENTILE, M.; HIRSE, T.; PORTNER, H.O.; ZIVERI, P. Impact of ocean acidification and warming on the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Frontiers in Marine Science*. 1:1-12, 2014.
- GLYNN, P. W.; MATÉ, J. L.; BAKER, A. C.; CALDERÓN, M. O. Coral bleaching and mortality in Panama and Ecuador during the 1997-1998 El Niño-Southern Oscillation Event: spatial/temporal patterns and comparisons with the 1982-1983 event. *Biologic Marine Science*. 69(1): 79–109, 2001.
- GROTTOLI, A. G.; RODRIGUES, L. J.; PALARDY, J. E. Heterotrophic plasticity and resilience in bleached corals. *Nature*. 440: 1186-1189, 2006.
- GRUBER, N.; SARMIENTO, J. L. Large-scale biogeochemical-physical interactions in elemental cycles. Em: ROBINSON, A. L.; MCCARTHY, J. J.; ROTHSCHILD, B. J. *The Sea: Biological-physical interactions in the oceans*. New York: Wiley. 12:337-399, 2002.

- GUINOTTE, J. M.; FABRY, V. J. Ocean acidification and its potential effects on marine ecosystems. *New York Academy of Science*. 1134:320-342, 2008.
- HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST – Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica*. 4:1-9, 2001.
- HETZEL, B.; CASTRO, C. B. *Corais do Sul da Bahia*. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 189pp, 1994.
- HOEGH-GULDBERG, O.; MCCLOSKEY, L. R.; MUSCATINE, L.; Expulsion of zooxanthellae by symbiotic cnidarians from the Red Sea. *Coral Reefs*. 5:201-204, 1987.
- HORVATH, K. M.; CONNOLLY, B. D.; WESTFIELD, I. T.; CHOW, E.; CASTILLO, K. D.; RIES, J. B. Calcification rates of the Caribbean reef-building coral *Siderastrea siderea* adversely affected by both seawater warming and CO₂-induced ocean acidification. *AGU Spring Meeting Abstracts*. 2013.
- JOKIEL, P.L.; RODGERS, K.S.; KUFFNER, I.B.; ANDERSSON, A.J.; COX, MACKENZIE, F.T. Ocean acidification and calcifying reef organisms: a mesocosm investigation. *Coral Reefs*. 27:473-483, 2008.
- JONES, A.M.; BERKELMANS, R.; VAN OPPEN, M.J.H.; MIEOG, J.C.; SINCLAIR, W. A community change in the algal endosymbionts of a scleractinian coral following a natural bleaching event: field evidence of acclimatization. *Proceedings of the Royal Society B*. 275: 1359-1365, 2008.
- JONES, R. J.; HOEGH-GULDBERG, O.; LARKUM, A.W.D.; SCHREIBER, U. Temperature-induced bleaching of corals begins with impairment of the CO₂ fixation mechanism in zooxanthellae. *Plant, Cell & Environment*. 21: 1219-1230, 1998.

- KEMP, D.W.; HERNANDEZ-PECH, X.; IGLESIAS-PRIETO, R.; FITT, W.K.; SCHMIDT, G.W. Community dynamics and physiology of *Symbiodinium* spp. before, during and after a coral bleaching event. *Limnology and Oceanography*. 59(3):788-797, 2014.
- KIKUCHI, R. K. J.; LEÃO, Z.M.A.N.; OLIVEIRA, M.D.M.; DUTRA, L.X.C.; CRUZ, I.C. Branqueamento de corais nos recifes da Bahia associado aos efeitos do El niño 2003. Recife: IX Congresso da Associação Brasileira de Estudos do Quaternário, 446-446p, 2003.
- LAJEUNESSE, T. C. Investigating The Biodiversity, Ecology, And Phylogeny Of Endosymbiotic Dinoflagellates In The Genus *Symbiodinium* Using The Its Region: In Search Of A “Species” Level Marker. *Journal of Phycology*. 37(5): 866-880, 2001.
- LAJEUNESSE, T.C. Diversity and community structure of symbiotic dinoflagellates from Caribbean coral reefs. *Marine Biology*. 141: 387–400, 2002.
- LAJEUNESSE, T.C.; BHAGOOLI, R.; HIDAKA, M.; DEVANTIER, L.; DONE, T.; SCHMIDT, G.W.; FITT, W.K.; HOEGH-GULDBERG, O. Closely related *Symbiodinium* spp. Differ in relative dominance in coral reef host communities across environmental, latitudinal and biogeographic gradients. *Marine Ecology Progress Series*. 284: 147-161, 2004.
- LEÃO, Z.M.A.N.; KIKUCHI, R.K.P.; TESTA, V. Corals and coral reefs of Brazil. *Latin American Coral Reefs*. 1:9-52, 2003.
- LECLERCQ, N.; GATTUSO, J.; JAUBERT, J. Primary production, respiration, and calcification of a coral reef mesocosm under increased CO₂ partial pressure. *Limnology and Oceanography*. 47(2): 558-564, 2002.

- LENAERS, G.; SCHOLIN, C.; BHAUD, Y.; SAINT-HILAIRE, D.; HERZOG, M. A molecular phylogeny of dinoflagellate protists (Pyrrhophyta) inferred from the sequence of 24S rRNA divergent domains D1 and D8. *Journal of Molecular Evolution*. 32: 53–63, 1991.
- LESSER, M. P. Elevated temperatures and ultraviolet radiation cause oxidative stress and inhibit photosynthesis in symbiotic dinoflagellates. *Limnology Oceanography*. 41: 271-283, 1996.
- LESSER, M. P. Oxidative stress causes coral bleaching during exposure to elevated temperatures. *Coral Reefs*. 16: 187-192, 1997.
- LOH, W.; CARTER, D.; HOEGH-GULBERG, O. Diversity of zooxanthellae from Scleractinian corals of One Tree Island (The Great Barrier Reef). *Proceedings of the Australian Coral Reef Society 75th Anniversary Conference*. 87-99, 2006.
- LUCKETT, C.; ADEY, W.H.; MORRISSEY, J.; SPOON, D.M. Coral reef mesocosms and microcosms – successes, problems, and the future of laboratory models. *Ecological Engineering*. 6(1-3): 57-72, 1996.
- MARUBINI, F.; ATKINSON, M. J. Effects of lowered pH and elevated nitrate on coral calcification. *Marine Ecology Progress Series*. 188: 117-121, 1999.
- MCNALLY, K.L.; GOVIND, N.S.; THOMÉ, P.E.; TRENCH, R.K. Small-subunit ribosomal DNA sequence analyses and a reconstruction of the inferred phylogeny among symbiotic dinoflagellates (Pyrrhophyta). *Journal of Phycology*. 30: 316–329, 1994.
- MIRANDA, R.J.; CRUZ, I.C.S.; LEÃO, Z.M.A.N. Coral bleaching in the Caramuanas reef (Todos os Santos Bay) during the 2010 El Niño event. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 41(2): 351-366, 2013.

- MUSCATINE, L. Productivity of Zooxanthellae. Em: FALKOWSKI, P. G. Primary Productivity in the Sea. Environmental Science Research. 19: 381-402, 1980.
- NAKAMURA, H.; ASARI, T.; OHIZUMI, Y.; KOBAYASHI, J.; YAMASU, T.; MURAI, A. Isolation of zooxanthellatoxins, novel vasoconstrictive substances from the zooxanthella *Symbiodinium* sp. Toxicon. 31(4): 371-376, 1993.
- NAKAMURA, T.; IGUCHI, A.; SUZUKI, A.; SAKAI, K.; NOJIRI, Y. Effects of acidified seawater on calcification, photosynthetic efficiencies and the recovery processes from strong light exposure in the coral *Stylophora pistillata*. Marine Ecology. 38:1-7, 2017.
- OHAD, N.; KEREN, H.; ZER, H.; GONG, T.S.; MOR, A.; GAL, S.; TAK, S.; DOMOVICH, Y. Light-induced degradation of the photosystem II reaction center D1 protein in vivo: an integrative approach. Em: Baker N.R.; Bowyer J.R.. Photoinhibition of Photosynthesis: From Molecular Mechanisms to the Field. Oxford, UK: Bios Scientific Publishers. 161–177, 1994.
- ORR, J. C.; FABRY, V. J.; AUMONT, O.; BOPP, L.; DONEY, S. C.; FEELY, R. A.; GNANADESIKAN, A.; GRUBER, N.; ISHIDA, A.; JOOS, F.; KEY, R. M.; LINDSAY, K.; MAIER-REIMER, E.; MATEAR, R.; MONFRAY, P.; MOUCHET, A.; NAJJAR, R. G.; PLATTNER, G.; RODGERS, K. B.; SABINE, C. L.; SARMIENTO, J. L.; SCHLITZER, R.; SLATER, R. D.; TOTTERDELL, I. J.; WEIRIG, M.; YAMANAKA, Y.; YOOL, A. Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms. Nature. 437: 681-686, 2005.
- PANDOLFI, J.M.; CONNOLLY, S.R.; MARSHALL, D.J.; COLLEN, A.L. Projecting coral reef future under global warming and ocean acidification, Science. 333: 418-422, 2011.

- PAWLOWSKI, J.; HOLZMANN, M.; FAHRNI, J. F.; POCHON, X.; LEE, J. L. Molecular identification of algal endosymbionts in Large Miliolid Foraminifera: 2. Dinoflagellates. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 48(3): 368-373, 2001.
- PICCIANI-DE-SOUZA, N. Diversidade molecular de zooxantelas associadas a corais do gênero *Mussismilia* (Cnidaria, Scleractinia) no Brasil. Dissertação apresentada ao PPG em Zoologia do MNRJ/UFRJ. 71pp, 2013.
- PICCIANI-DE-SOUZA, N.; SEIBLITZ, I. G. L.; PAIVA, P. C.; CASTRO, C. B.; ZILBERBERG, C. Geographic patterns of *Symbiodinium* diversity associated with the coral *Mussismilia hispida* (Cnidaria, Scleractinia) correlate with major reef regions in the Southwestern Atlantic Ocean. *Marine Biology*. 163:236, 2016.
- POCHON, X.; GATES, R. D. A new *Symbiodinium* clade (Dinophyceae) from soritid foraminifera in Hawai'i. *Molecular Phylogenetic Evolution*. 56: 492–497, 2010.
- POWELL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, J.; TINGEY, S.; RAFALSKI, A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*. 2: 225-238, 1996.
- Prefeitura Municipal de Porto Seguro. Prefeitura de Porto Seguro. 2017. Disponível em: <<http://www.portosegurotur.com/>>. Acesso: 05/06/2017.
- RALPH, P. J.; GANDEMANN, R. Rapid light curves: A powerful tool to assess photosynthetic activity. *Aquatic botany*. 82:222-237, 2005.
- RIEBSELL, U.; TORTELL, P. D. Effects of ocean acidification on pelagic organisms and ecosystems. In GATTUSO, J.P.; HANSSON, L. *Ocean Acidification*. New York: OUP Oxford. 1:99-116, 2011.

- ROWAN, R.; KNOWLTON, N.; BAKER, A.; JARA, J. Landscape ecology of algal symbionts creates variation in episodes of coral bleaching. *Nature*. 388: 265-269, 1997.
- ROWAN, R.; POWERS, D.A. Molecular genetic identification of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae). *Marine Ecology Progress Series*. 71: 65–73. 1991a.
- ROWAN, R.; POWERS, D.A. A molecular genetic classification of zooxanthellae and the evolution of animal-algal symbioses. *Science*. 251: 1348–1351, 1991b.
- ROWAN, R.; POWERS, D.A. Ribosomal RNA sequences and the diversity of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89: 3639–3643, 1992.
- ROWAN, R.; KNOWLTON, N. Intraspecific diversity and ecological zonation in coral-algal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The USA*. 92(7): 2850-2853, 1995.
- SCHOENBERG, D.A.; TRENCH, R.K. Genetic variation in *Symbiodinium* (=Gymnodinium) *microadriaticum* Freudenthal, and specificity in its symbiosis with marine invertebrates. I. Isoenzyme and soluble protein patterns of axenic cultures of *Symbiodinium microadriaticum*. *Proceedings of the Royal Society B*. 207: 405–427, 1980.
- SCHRAMEYER, V.; KRÄMER, W.; HILL, R.; JEANS, J.; LARKUM, A. W. D.; BISCHOF, K.; CAMPBELL, D. A.; RALPH, P. J. Under high light stress two Indo-Pacific coral species display differential photodamage and photorepair dynamics. *Marine Biology*. 163:168, 2016.
- SMITH, S. V.; KEY, G. S. Carbon dioxide and metabolism in marine environments. *Limnology and Oceanography*. 20:493-495, 1978.

- STANLEY, G. D. Photosymbiosis and the evolution of modern coral reefs. *Science*. 312:857-858, 2006.
- STAT SOFT, Inc. STATISTICA (data analysis software system). Versão 12. www.statsoft.com, 2004.
- STOCKER, T. F.; SCHIMITTNER, A. Influence of CO₂ emission rates on the stability of the thermohaline circulation. *Nature*. 388:862-865, 1997.
- SUGGETT, D.J.; KIKUCHI, R.K.P.; OLIVEIRA, M.D.M.; SPANÓ, S.; CARVALHO, R.; SMITH, D.J. Photobiology of corals from Brazil's near-shore marginal reefs of Abrolhos. *Marine Biology*. 159: 1461-1473, 2012.
- TCHERNOV, D.; GORBUNOV, M. Y.; DE VARGAS, C.; NARAYAN YADAV, S.; MILLIGAN, A. J.; HAGGBLOM, M.; FALKOWSKI, P. G. Membrane lipids of symbiotic algae are diagnostic of sensitivity to thermal bleaching in corals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101: 13531-13535, 2004.
- THOMAS, L.; KENDRICK, G. A.; KENNINGTON, W. J.; RICHARDS, Z. T.; STAT, M. Exploring *Symbiodinium* diversity and host specificity in *Acropora* corals from geographical extremes of Western Australia with 454 amplicon pyrosequencing. *Molecular Ecology*. 23, 3113-3126, 2014.
- THORNHILL, D.J.; LEWIS, A.M.; WHAM, D.C.; LAJEUNESSE, T.C. Host-specialist lineages dominate the adaptive radiation of reef coral endosymbionts. *Evolution*. 68(2): 352–367, 2014.
- TOWANDA, T.; THUESEN, E.V. Prolonged exposure to elevated CO₂ promotes growth of the algal symbiont *Symbiodinium muscatinei* in the intertidal sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Biology Open*. 1(7): 615-621, 2012.

- TRENCH, R. K.; WETHEY, D. S.; PORTER, J. W. Observations on the symbiosis with zooxanthellae among the Tridacnidae (Mollusca, Bivalvia). *Biological Bulletin*. 161(1): 180-198, 1981.
- VENN, A. A.; LORAM, J. E.; DOUGLAS, A. E. Photosynthetic symbioses in animals. *Journal of Experimental Botany*. 59 (5): 1069-1080, 2008.
- VENTURA, P.; JARROLD, M.D.; MERLE, P.; BARNAY-VERDIER, S.; ZAMOUM, T.; RODOLFO-METALPA, R.; CALOSI, P.; FURLA, P. Resilience to ocean acidification: decreased carbonic anhydrase activity in sea anemones under high $p\text{CO}_2$ conditions. *Marine Ecology Progress Series*. 559:257-263, 2016.
- VERRILL, A. E. Notes on the radiata in the Museum of Yale College, with descriptions of new genera and species. *Transactions of the Connecticut Academy of Arts and Sciences*. 45:247–613, 1868.
- VILLAÇA, R. Recifes Biológicos. Em: PEREIRA, R.C.; SOARES-GOMES, A. *Biologia Marinha*. Rio de Janeiro: Editora Interciência. 2:399-420, 2009.
- WALL, C.B.; FAN, T.Y.; EDMUNDS, P.J. Ocean acidification has no effect on thermal bleaching in the coral *Seriatopora caliendrum*. *Coral Reefs*. 33(1): 119–130, 2013.
- WARNER, M. E.; FITT, W. K.; SCHMIDT, G. W. Damage to photosystem II in symbiotic dinoflagellates: a determinant of coral bleaching. *Proceedings of the National Academy of Science*. 96: 8007-8012, 1999.
- WEIS, V. M. Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis. *The Journal of Experimental Biology*. 211: 3059-3066, 2008.
- WILCOX, T.P. Large-subunit ribosomal RNA systematics of symbiotic dinoflagellates: morphology does not recapitulate phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 10(3): 436–448, 1998.

WINTER, A. P. M.; CHALOUB, R. M.; DUARTE, G. A. S.; CASTRO, C. B.

Photosynthetic responses of corals *Mussismilia harttii* (Verrill, 1867) from turbid waters to changes in temperature and presence/absence of light. *Brazilian Journal of Oceanography*. 63(3): 203-216, 2016.

WOOLDRIDGE, S.A. Differential thermal bleaching susceptibilities amongst coral taxa: re-posing the role of the host. *Coral Reefs*. 33(4): 1-13, 2013.

ZEEBE, R. E.; RIDGWELL, A. Past changes in ocean carbonate chemistry. Em: GATTUSO, J. P.; HANSSON, L. *Ocean Acidification*. New York: OUP Oxford. 1:21-37, 2011.