



**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**HAYLA PAIXÃO VIEIRA VIVEIROS**

**FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* E DESENVOLVIMENTO DE CORAIS A PARTIR  
DE SÊMEN CONGELADO: ESTRATÉGIA PARA RESTAURAÇÃO DA  
ESPÉCIE ENDÊMICA *MUSSISMILIA HARTTII***

**PORTO ALEGRE**

**2023**

HAYLA PAIXÃO VIEIRA VIVEIROS

**FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* E DESENVOLVIMENTO DE CORAIS A  
PARTIR DE SÊMEN CONGELADO: ESTRATÉGIA PARA RESTAURAÇÃO  
DA ESPÉCIE ENDÊMICA *MUSSISMILIA HARTTII***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Animal. Área de concentração: Biodiversidade: Manejo e Conservação.  
Orientador: Prof. Dr. Leandro Cesar de Godoy

PORTO ALEGRE

2023

HAYLA PAIXÃO VIEIRA VIVEIROS

**FERTILIZAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE CORAIS A PARTIR DE SÊMEN  
CONGELADO: ESTRATÉGIA PARA RESTAURAÇÃO DA ESPÉCIE  
ENDÊMICA *MUSSISMILIA HARTTII***

Aprovada em 04 de abril de 2023.

BANCA EXAMINADORA

---

Dr/a. Avaliador/a 1

---

Dr/a. Avaliador/a 2

---

Dr/a. Avaliador/a 3

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a equipe do Projeto ReefBank pelo apoio, conselhos e ensinamentos trocados, em especial a equipe que esteve presente durante as coletas e experimentos na base do Projeto Coral Vivo, em Arraial D'ajuda/BA.

Agradeço ao apoio e estrutura fornecidos pelo Projeto Coral Vivo.

Agradeço ao apoio recebido pelos meus familiares, amigos e amigas, que nos momentos difíceis não me permitiram desistir.

Agradeço ao apoio financeiro do Fundo Brasileiro para a Biodiversidade (Funbio) e a Fundação Grupo Boticário de Proteção à Natureza, sem esses apoios o desenvolvimento da pesquisa não seria possível.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	4
RESUMO.....	6
ABSTRACT .....	7
ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO.....	8
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	9
2. OBJETIVO GERAL .....	16
2.1 Objetivos Específicos .....	16
3. METODOLOGIA.....	17
3.1 Coleta das colônias e autorizações ambientais.....	17
3.2 Coleta e separação dos gametas .....	18
3.3 Congelamento dos espermatozoides .....	19
3.4 Fertilização <i>in vitro</i> .....	21
3.5 Substrato para o assentamento larval.....	25
3.6 Avaliação do assentamento larval e desenvolvimento inicial dos recrutas	25
3.7 Análises estatísticas.....	26
4. RESULTADOS .....	27
4.1 Taxa de fertilização .....	27
4.2 Taxa de assentamento e desenvolvimento inicial dos recrutas.....	28
5. DISCUSSÃO .....	30
6. CONCLUSÃO.....	37
APÊNDICE I.....	38
ALGUNS PROBLEMAS ENFRENTADOS E SOLUÇÕES ALCANÇADAS .....	38
APÊNDICE II.....	39
PROTOCOLO DETALHADO.....	39
7. REFERÊNCIAS.....	43

## RESUMO

Os recifes de coral constituem um dos ecossistemas mais diversos do planeta, exercendo papel fundamental na manutenção de serviços ecossistêmicos que sustentam milhares de comunidades humanas em todo o mundo. No entanto, esse ecossistema vem sofrendo danos severos, ocasionados principalmente por fatores antrópicos como a crise climática. Cerca de 50% dos recifes de coral do planeta já foram perdidos, e os remanescentes encontram-se em situação preocupante. Nesse contexto, a restauração passiva sozinha já não é mais efetiva, e o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas que visem a restauração passam a ser cruciais. A criopreservação surge como uma alternativa que pode efetivamente ajudar na conservação dos corais. O objetivo desse estudo pioneiro foi desenvolver um protocolo de fertilização *in vitro* usando o sêmen congelado da espécie endêmica *Mussismilia harttii*. Para a fertilização os espermatozoides foram descongelados e diluídos para formação das doses inseminantes nas concentrações  $10^5$  e  $10^7$  espermatozoides/ mL<sup>-1</sup>. Em tubos de ensaio contendo água marinha filtrada foram adicionados oócitos frescos e em seguida alíquotas das respectivas concentrações espermáticas. Foram utilizados dois tratamentos controle, um deles contendo sêmen fresco e outro contendo apenas oócitos. Após a fecundação, as amostras foram transferidas para aquários de 500 mL, com quatro réplicas. A Taxa de fertilização alcançada para todos os tratamentos foi de 100% e a taxa de assentamento larval atingiu  $26 \pm 16\%$ . Nós conseguimos criar o primeiro banco de sêmen de coral do Atlântico Sul, com protocolo eficiente de fertilização *in vitro* utilizando sêmen congelado. Essa conquista científica mostra-se como uma poderosa ferramenta biotecnológica que poderá ajudar na restauração dos recifes de coral e na preservação da diversidade genética, e assegurar a existência futura dos recifes de coral.

**Palavras-chave:** Banco de germoplasma; Biotecnologia; Coral endêmico; Restauração recifal.

## ABSTRACT

Coral reefs are one of the most diverse ecosystems on the planet, playing a key role in maintaining ecosystem services that support thousands of human communities around the world. However, this ecosystem has been suffering severe damages, mainly caused by anthropic factors such as the climate crisis. About 50% of the planet's coral reefs have already been lost, and the remnants are in a worrying situation. In this context, passive restoration alone is no longer effective, and the development of reproductive biotechnologies aimed at conservation become crucial. Cryopreservation emerges as an alternative that can effectively help in the conservation of corals. The aim of this pioneering study was to develop an *in vitro* fertilization protocol using frozen semen from the endemic species *Mussismilia harttii*. For fertilization, spermatozoa were thawed and diluted to form inseminating doses at concentrations of  $10^5$  and  $10^7$  spermatozoa/mL<sup>-1</sup>. Fresh oocytes were added in test tubes containing filtered sea water and aliquots of the respective sperm concentrations. Two control treatments were used, one containing fresh semen and the other containing only oocytes. After fertilization, the samples were transferred to 500 mL aquariums, with four replicates. The achieved fertilization rate for all treatments was 100% and the larval settlement rate reached  $26 \pm 16\%$ . We were able to create the first coral semen bank in the South Atlantic, with an efficient *in vitro* fertilization protocol using frozen semen. This scientific achievement proves to be a powerful biotechnological tool that could help coral reef restoration programs, preserve genetic diversity and ensure the future existence of coral reefs.

**Keywords:** Germplasm bank; Biotechnology; Endemic coral; Reef restoration.

## **ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO**

Esta dissertação está estruturada no formato tradicional, seguindo a resolução n° 38/2019 do PPG Biologia Animal, compreendendo uma “Introdução Geral”, “Objetivos”, “Metodologia”, “Resultados” e “Discussão”.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Recifes biológicos são estruturas rígidas, resistentes à ação mecânica das ondas e correntes marítimas, construídos por organismos marinhos (animais e vegetais) portadores de esqueleto calcário (LEÃO, 1994). Os recifes de coral são ecossistemas definidos pelos componentes biológicos e geológicos (BUDDEMEIER *et al.*, 2004). Sua estrutura é construída por corais escleractíneos, conhecidos como corais verdadeiros, pois têm a capacidade de extrair grandes quantidades de íons cálcio e íons carbonato da água do mar e sintetizarem seu esqueleto (STANLEY JR., 2003). Os recifes de coral estão presentes em menos de 0,1% da superfície do oceano (MUHALL, 2007), ocorrem ao redor do mundo, porém são confinados às regiões rasas tropicais (entre 20°N e 20°S) (BARREIRA & CASTRO, ZILBERBERG, 2016). Aproximadamente 30% das regiões costeiras tropicais são formadas por recifes coralíneos (PITOMBO *et al.*, 1998). Esse ecossistema possui uma alta biodiversidade, sendo conhecidas em torno de 900 espécies de corais escleractíneos de águas rasas (VERON, 2000; HARRISON, 2011).

Os recifes possuem um importante papel para a sociedade humana e para a saúde da biosfera (COSTANZA *et al.*, 1997). Estima-se que cerca de 500 milhões de pessoas possuem algum tipo de dependência dos recifes de coral no mundo (WILKINSON, 2002). Os recifes de coral reciclam nutrientes, fornecem alimento, abrigo e são verdadeiros berçários para mais de 25% de todas as espécies marinhas conhecidas (COSTANZA *et al.*, 1997; KNOWLTON *et al.*, 2010; SHEPPARD *et al.*, 2018). A fauna marinha associada aos recifes é rica e provê alimento e sustento para as comunidades humanas em seu entorno (WILKINSON, 2002; BUDDEMEIER *et al.*, 2004). Os compostos bioativos extraídos de organismos recifais são utilizados na produção de produtos da indústria farmacêutica (ADEY, 2000). Além disso, os recifes geram renda para as atividades associadas ao ecoturismo e protegem a costa contra as ondas marítimas (WILKINSON, 2002; SHEPPARD *et al.*, 2005).

Os recifes de coral têm sofrido nos últimos anos uma combinação de impactos negativos, tanto naturais como antrópicos. Dentre os estressores

globais destaca-se a crise climática, provocando o aquecimento e acidificação do oceano (HUGHES *et al.*, 2017, 2018, 2019). Como estressores locais são identificados a poluição por esgoto e metais pesados, derramamento de petróleo, lixiviação de sedimentos e produtos químicos, sobrepesca, turismo desordenado, espécies invasoras, filtros químicos presentes nos protetores solares, entre outros fatores (JONES, 1997; GULDBERG *et al.*, 2007; HUGHES *et al.*, 2017, 2018; RAFFA *et al.*, 2018). Segundo o Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC, 2014) a temperatura do oceano aumentará entre 2,6 e 4,8 °C até o final do século, podendo levar a mudanças ecológicas e estruturais negativas aos recifes de coral. Se a temperatura da água do Oceano aumentar 1,5°C o declínio dos recifes de coral pode ser de 70 a 90%, caso o aumento da temperatura do oceano seja de 2°C, o declínio dos recifes de coral pode chegar a 99% (IPCC, 2023). O aumento da temperatura da superfície do oceano é a principal causa do chamado branqueamento de corais ao redor do mundo (HUGHES *et al.*, 2017, 2018, 2019).

Os corais de águas rasas possuem uma relação de simbiose mutualística com dinoflagelados fotossintetizantes da família *Symbiodiniaceae*, conhecidos como zooxantelas, que vivem dentro dos seus tecidos (MULLER-PARKER *et al.*, 2015). As zooxantelas fornecem grande parte do alimento aos corais por meio da fotossíntese (MUSCATINE, 1977; MULLER-PARKER *et al.*, 2015). Quando essas microalgas têm contato com um agente causador de estresse, como o aumento da temperatura da água, elas passam a produzir elevadas concentrações de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), as quais causam diversos danos celulares (LESSER *et al.*, 1990; LESSER, 2006). Em resposta, o coral expulsa as zooxantelas de seus tecidos, deixando seu esqueleto calcário visível sob o tecido mole, tornando-se branqueado e perdendo sua principal fonte de alimento (GLYNN, 1993; GULDBERG, 1999; HUGHES *et al.*, 2003, 2017; WEIS, 2008; LESSER, 2011). O primeiro evento global de branqueamento durou de 1998 a 1999 (NZALI *et al.*, 1998), ocorrendo novamente nos anos de 2009 a 2010, 2014 a 2017 e 2019 a 2020 (BASTIDAS *et al.*, 2012; HUGHES *et al.*, 2017 e 2019).

Mies *et al.* (2020) compilaram dados dos eventos de branqueamento de corais de 1980 a 2018, e observaram que os episódios de branqueamento estão associados com mortalidade dos corais em 48% no Indo-Pacífico, 38% no Caribe e 20% no Atlântico Sul. Ficou evidenciado que os recifes do Atlântico Sul passaram por menos episódios de branqueamento, com taxas de mortalidade inferiores quando comparados com o Indo-Pacífico e o Caribe. Apesar das taxas de mortalidade serem variáveis entre as regiões, estima-se que entre 50 e 75% da cobertura global de recifes de coral tenha diminuído nas últimas quatro décadas (BRUNO *et al.*, 2019).

No ano de 2019, a costa brasileira sofreu o mais intenso e duradouro evento de branqueamento já registrado no país. Entre março e maio de 2019, os recifes marginais do banco de Abrolhos foram afetados pela onda de calor mais forte desde 1985. O grau de aquecimento atingiu seu máximo histórico (DHW 19,65), ocasionando o branqueamento de 100% das colônias de *Millepora alcicornis* e 80% das colônias de *Mussismilia braziliensis*. Logo após o branqueamento e morte, as colônias de *Millepora alcicornis* foram rapidamente cobertas por cianobactérias, seguidas por turfs de algas e algas calcárias, ocasionando a mudança de fases e levando a mortalidade de 90% das colônias da espécie. Já *Mussismilia braziliensis* conseguiu se recuperar para um estado saudável após branqueamento de 90% de suas colônias (FERREIRA *et al.*, 2021). Os eventos de branqueamento estão se tornando cada vez mais frequentes (HUGHES *et al.*, 2019). Se as mudanças no ambiente marinho continuarem acontecendo nesse ritmo, os corais não terão tempo para se adaptarem e estaremos diante do colapso desse ecossistema, já que possuem crescimento lento e sua dinâmica é frequentemente associada a uma estreita flutuação ambiental (WILSON *et al.*, 2006; ALVAREZ-FILIP *et al.*, 2011).

O estresse térmico e o branqueamento dos corais ocasionam danos, diminuindo seu sucesso reprodutivo, podendo reduzir o tamanho dos ovócitos, afetar a fecundidade, prejudicar a gametogênese, e levar a perda de desovas sincrônicas (MENDES e WOODLEY, 2002; SUGGETT e SMITH, 2011; HAGEDORN *et al.*, 2016; SHLESINGER e LOYA, 2019). A substituição temporal de corais por organismos não construtores, como algas, conhecido como

mudança de fase pode afetar a reprodução dos corais pois gera uma menor complexidade estrutural no recife, diminui a diversidade na comunidade, e interfere no assentamento dos recrutas (HUGHES, 1994; SPEARE *et al.*, 2019).

Estudos mostraram que entre 80 e 99% dos corais *Acropora palmata* e *Acropora cervicornis* do Caribe já foram perdidos (PRECHT *et al.*, 2002; ARONSON *et al.*, 2001). Essas espécies não conseguem se reproduzir por autofecundação durante a reprodução sexuada, desta forma o sucesso reprodutivo pode ser esporádico e sobrecarregado nas pequenas populações isoladas do Caribe (HAGEDORN *et al.*, 2012). Em algumas regiões, como em Florida Keys, a diversidade genotípica pode ser tão baixa que a reprodução sexuada já é quase impossível (HAGEDORN *et al.*, 2012). Além disso, os jovens recrutas estão sendo diretamente afetados pelo aumento da cobertura de macroalgas nos recifes (HAGEDORN *et al.*, 2012). Segundo Hagedorn *et al.*, (2012), juntos, esses fatores aumentaram a probabilidade de extinção dos corais *A. palmata* e *A. cervicornis* nos recifes do Caribe nos próximos 5 a 20 anos.

Os recifes de coral do Atlântico Sul possuem características exclusivas, como maior tolerância à turbidez e ao enriquecimento de nutrientes, pois a concentração de nitrato no Atlântico Sul é naturalmente elevada (MIES *et al.*, 2020). Os corais brasileiros possuem maior resistência morfológica e associações simbióticas mais flexíveis, além de possuírem distribuição batimétrica mais profunda, pois as espécies têm uma profundidade máxima média de ocorrência de 70 metros, fatores esses que não são comumente encontradas nos habitats recifais mais estudados, como no Indo-Pacífico e Caribe (MIES *et al.*, 2020). Esses recifes têm sido considerados mais resistentes às mudanças climáticas, por possuírem maior resiliência e tolerância ao estresse térmico (LEÃO *et al.*, 2010; MIES *et al.*, 2020). No entanto, as consideráveis taxas de mortalidade provocadas pelos eventos recentes de branqueamento, tanto para corais maciços como ramificados, acendem um alerta importante (PEREIRA *et al.*, 2022).

As estruturas recifais brasileiras estão distribuídas em cinco setores ao longo da costa, são eles: Região Norte (Parcel de Manoel Luís), Região Nordeste, Região Leste (Banco dos Abrolhos), Ilhas Oceânicas (Atol das Rocas,

Fernando de Noronha, Trindade, São Pedro e São Paulo) (LEÃO *et al.*, 2016) e Região Sul (Ilha da Queimada Grande) (PEREIRA-FILHO *et al.*, 2019). O Brasil possui o único sistema recifal do Atlântico Sul, porém contém uma baixa diversidade, contando com 23 espécies de corais pétreos zooxantelados (Ordem *Scleractinia*), sendo 4 endêmicas (LEÃO *et al.*, 2016; ZILBERBERG *et al.*, 2016). A fauna de corais brasileira é composta predominantemente por formas massivas e os principais construtores de recifes são espécies endêmicas (LEÃO *et al.*, 2013). O gênero *Mussismilia* compreende os principais corais construtores do Brasil (LEÃO *et al.*, 2016), possuindo quatro espécies: *M. braziliensis* (VERRIL, 1868), *M. harttii* (VERRIL, 1868), *M. hispida* (VERRIL, 1902) e *M. leptophylla* (VERRIL, 1868).

A espécie *Mussismilia harttii* (coral couve-flor), foco do presente estudo, é uma das principais construtoras de recifes do Brasil (PIRES *et al.*, 1999), ocorrendo desde a costa do Ceará até o Espírito Santo (em recifes *offshore*), no Atol das Rocas e na ilha de Fernando de Noronha em Pernambuco, não existindo registros para o Estado de Sergipe (LIMA, 2017). A espécie é comumente encontrada em recifes rasos (2 a 6 metros) (CASTRO *et al.*, 2006), mas pode ser observada também em águas mais profundas, com registro de até 50 m de profundidade (CASTRO *et al.*, 2006). Espécie hermafrodita e liberadora de gametas (VALENTE *et al.* 2023), podendo apresentar também reprodução assexuada por brotamento (PIRES *et al.*, 1999). O ciclo reprodutivo dura em média onze meses, com períodos de pelo menos três meses consecutivos de desovas por ano (setembro a novembro), observados ao pôr do sol, na lua nova, com desovas de um até dez dias (PIRES *et al.*, 1999; PIRES *et al.*, 2016). A *Mussismilia harttii* já foi uma das espécies mais abundantes nos recifes do Brasil. Porém, desde a década de 60, tem sido registrado um declínio de sua população. Essa redução evidente é testemunhada pela presença de cemitérios de pólipos ao longo dos recifes da região nordeste (LIMA, 2017). Atualmente, a espécie é considerada em perigo (EN) pelo Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (Livro Vermelho, 2013), pela IUCN seu estado de conservação atual encontra-se como “Dados Insuficientes” (DD) (IUCN 2014).

Dada a crescente perda da cobertura de corais, é de suma importância que se busquem alternativas para a restauração e conservação de espécies endêmicas e construtoras dos recifes brasileiros. As técnicas de restauração podem ser por meio de intervenções ativas ou passivas. Intervenções ativas tem como objetivo auxiliar diretamente a recuperação da função do recife e/ou populações (Ex. Propagação, plantio de corais, reprodução assistida, entre outros). Já a restauração passiva tem por objetivo estimular os processos naturais de recuperação (Ex. Criação de áreas marinhas protegidas) (They Nature Conservancy, 2023). A utilização de larvas de coral para a restauração dos recifes é eficiente porque tende a resultar em uma maior diversidade genética do que a propagação assexuada (GUEST *et al.*, 2012). Em contrapartida, a criação de larvas é muito mais trabalhosa e intensa, em comparação com as técnicas de reprodução assexuada. Requer conhecimento prévio sobre reprodução assistida e experiência com instalações laboratoriais, sazonalidade e tempo de desova (GUEST *et al.*, 2012).

Tecnologias de reprodução assistida são relevantes para a propagação das populações de corais ameaçadas. O SECORE (Sexual Coral Restoration), com sede em Ohio (EUA), desenvolve desde 2017 um “Programa Global de Restauração de Corais” com o intuito de acelerar o desenvolvimento de novas ferramentas, métodos e estratégias para aumentar a eficiência de ações de restauração de recifes em todo o mundo, incluindo novas tecnologias, como a fertilização *in vitro* (BAYRAKTAROV *et al.*, 2020), atualmente eles produzem milhares de larvas de coral, a partir de fertilização *in vitro* e os recrutas são introduzidos no recife, com o objetivo de aumentar a diversidade genética e a resiliência das populações naturais de recifes degradados (MILLER *et al.*, 2020; BAUMS *et al.*, 2019; PAUSCH *et al.*, 2018; LADD *et al.*, 2018).

A criopreservação é considerada uma das ferramentas mais eficientes para preservar a diversidade genética dos corais (HAGEDORN *et al.*, 2012). Envolve um conjunto de técnicas que permite conservar células em temperaturas muito baixas (-196°C) utilizando nitrogênio líquido, paralisando qualquer atividade biológica, inclusive o envelhecimento, degradação do material genético e morte celular. Desta forma, é possível preservar gametas para uso posterior,

sem danificá-los, podendo ser mantidos por anos e até mesmo séculos (MAZUR 1970, 1984). Grandes referências na criopreservação e reprodução *in vitro* de corais são a Dra. Mary Hagedorn, do Smithsonian Institute (Havaí) e a Dra. Sujune Tsai (Mingdao University – Taiwan) que são pioneiras no desenvolvimento de protocolos para a criopreservação de espermatozoides de corais. Obtiveram sucesso na criopreservação de gametas masculinos de 31 espécies, sendo: 3 no Havaí, 3 no Caribe, 4 na Polinésia Francesa e 21 na Grande Barreira de Corais na Austrália (HAGEDORN *et al.*, 2019).

Hagedorn *et al.* (2012) realizaram estudos de reprodução *in vitro* e criopreservação com as espécies *Acropora palmata* e *Fungia scutaria*, com o objetivo de examinar os pontos comuns na biologia reprodutiva e na criofisiologia que poderiam levar a um procedimento de criopreservação único e eficaz, amplamente aplicável às diversas espécies de corais. Os autores obtiveram taxas consideravelmente altas para fertilização *in vitro* das espécies utilizando espermatozoides frescos, com 85% de sucesso para *A. palmata* e 75% para *F. scutaria*. Os espermatozoides de ambas as espécies dispuseram de alto sucesso de fertilização *in vitro* após a criopreservação (HAGEDORN *et al.* 2012).

No Brasil, o Projeto ReefBank, em parceria com o Projeto Coral Vivo, utilizou os conhecimentos prévios (PIRES *et al.*, 1999; PIRES *et al.*, 2016) sobre a biologia reprodutiva dos corais endêmicos para desvendar aspectos da fisiologia dos gametas tanto na água do oceano como em baixa temperatura (AMARAL *et al.* 2022; CRUZ *et al.* 2022; VALENTE *et al.* 2023). Um protocolo para congelamento dos espermatozoides de *Mussismilia harttii* já foi estabelecido pelo grupo de pesquisa do Projeto ReefBank (CRUZ *et al.*, 2022.), com resultados muito promissores de sobrevivência celular avaliados por meio de citometria de fluxo e sondas fluorescentes. No entanto, não existe protocolo de fertilização *in vitro* definido para a espécie, e a eficiência de fertilização do sêmen congelado ainda não foi avaliada.

## **2. OBJETIVO GERAL**

Desenvolver um protocolo para fertilização *in vitro* do coral *Mussismilia hartii* utilizando sêmen congelado.

### **2.1 Objetivos Específicos**

- Utilizar diferentes concentrações de sêmen congelado para fecundar oócitos recém desovados;
- Avaliar a taxa de fertilização, a porcentagem de larvas livres-natantes, taxa de assentamento e metamorfose larval.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Coleta das colônias e autorizações ambientais

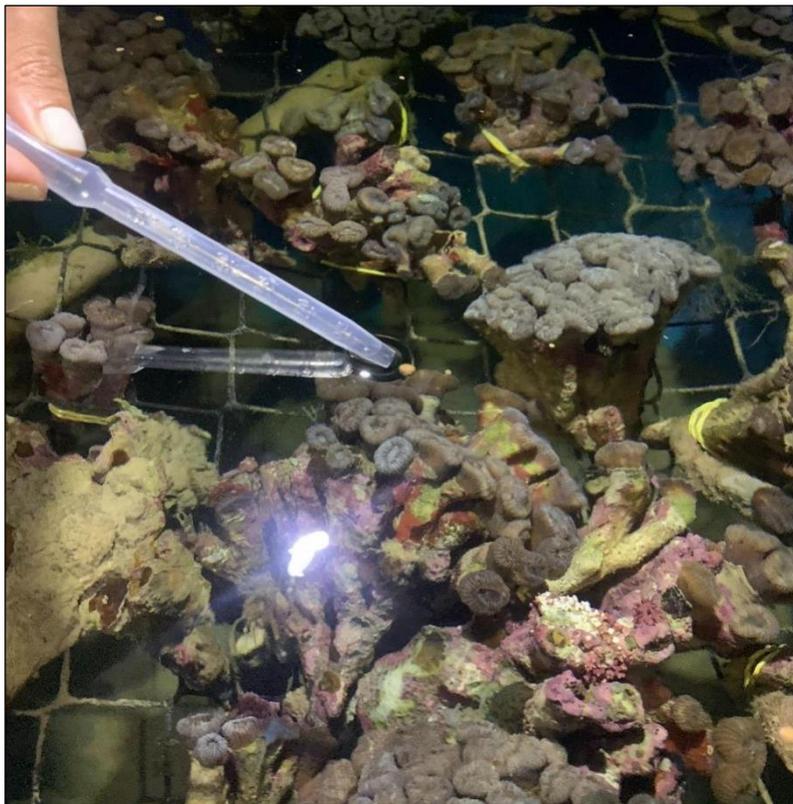
Foram coletadas 39 colônias de *M. harttii* no Parque Municipal Marinho do Recife de Fora (16 ° 24'31 " S; 038 ° 58'39 " W - Bahia, Brasil) sob a licença SISBIO Nº 63368-1 e autorização Nº 01/2019 da Secretaria Municipal de Meio Ambiente da Prefeitura de Porto Seguro. As coletas foram realizadas em setembro de 2021, duas semanas antes do período previsto para a desova da espécie (PIRES *et al.*, 1999). As colônias foram identificadas e transportadas para a Base de Pesquisa do Projeto Coral Vivo, onde todas as etapas da metodologia foram desenvolvidas. As colônias foram mantidas em tanques semifechados de 1000 L (Figura 1), e após a conclusão dos experimentos, devolvidas para o local de origem no recife.



**Figura 1.** Colônias de *Mussismilia harttii* em tanque semifechado de 1000 L na base de pesquisa do Projeto Coral Vivo (Foto: Cláudia Fernandes).

### 3.2 Coleta e separação dos gametas

Os experimentos foram realizados ao longo de quatro noites. Em duas noites de desova, em média 100 pacotes de gametas foram coletados na superfície da água dos tanques (Figura 2), e imediatamente transferidos para tubos Falcon de 50 mL (10 pacotes/tubo) contendo 5 mL de água do mar. Os pacotes foram coletados cuidadosamente a fim de identificar a colônia doadora, evitando assim qualquer chance de autofecundação durante a etapa de fertilização *in vitro*. A partir do momento que os pacotes se dissociaram, os oócitos que flutuaram para superfície dos tubos foram transferidos com a ajuda da pipeta de Pasteur para outro tubo de 50 mL, enquanto os espermatozoides concentrados na parte inferior foram transferidos para outros tubos de 15 mL (total = 10). Amostras de cada tubo foram analisadas quanto a taxa de motilidade inicial (GODOY *et al.*, 2021) e, em seguida, reunidas para compor um *pool*. O *pool* de espermatozoides foi realizado para prevenir os efeitos individuais das colônias, uma vez que a qualidade e a concentração espermática entre as colônias de *M. hartii* variam significativamente (AMARAL *et al.*, 2022). Após determinação da taxa de motilidade (100%) e a concentração espermática ( $1,59 \times 10^7$  e  $1,57 \times 10^5$ ) do *pool*, as amostras foram preparadas para o processo de congelamento.



**Figura 2.** Coleta dos pacotes de gametas na superfície dos tanques (Foto: Cláudia Fernandes).

### **3.3 Congelamento dos espermatozoides**

Após as avaliações prévias de qualidade, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 7000 rpm (centrífuga Fanem - modelo 208M). As unidades experimentais foram caracterizadas por palhetas de 250  $\mu$ L para receber a mistura de crioprotetores + espermatozoides.

Com base nos resultados de experimentos preliminares conduzidos pela equipe do projeto ReefBank (CRUZ *et al.*, 2022), a solução crioprotetora escolhida foi composta por: Dimetilsulfóxido (DMSO) 20% + sacarose 0,9 M (mantendo a mesma osmolaridade da água-marinha filtrada) + água Milli-Q®.

No processo de junção dos espermatozoides com a solução crioprotetora, as amostras foram equilibradas sobre placas de gelo a 5 °C durante 5 min e, em seguida, submetidas à técnica de congelamento lento controlado (CRUZ 2022). Para o congelamento lento das amostras foi utilizado o Bicell Freezing Container (Figura 3) previamente resfriado em freezer a -80°C, no qual as palhetas foram

acomodadas posteriormente ao tempo de equilíbrio. O Bicell foi levado para o ultra freezer *overnight*, onde passou por uma queda gradual de temperatura (-1°C por minuto) até atingir -80°C. Após essa etapa, as palhetas foram então transferidas para o botijão de nitrogênio (Figura 4), onde permaneceram até o momento da fertilização *in vitro*, que ocorreu 24h após o congelamento dos espermatozoides.



**Figura 3.** Bicell Freezing container (Imagem ilustrativa retirada da internet).

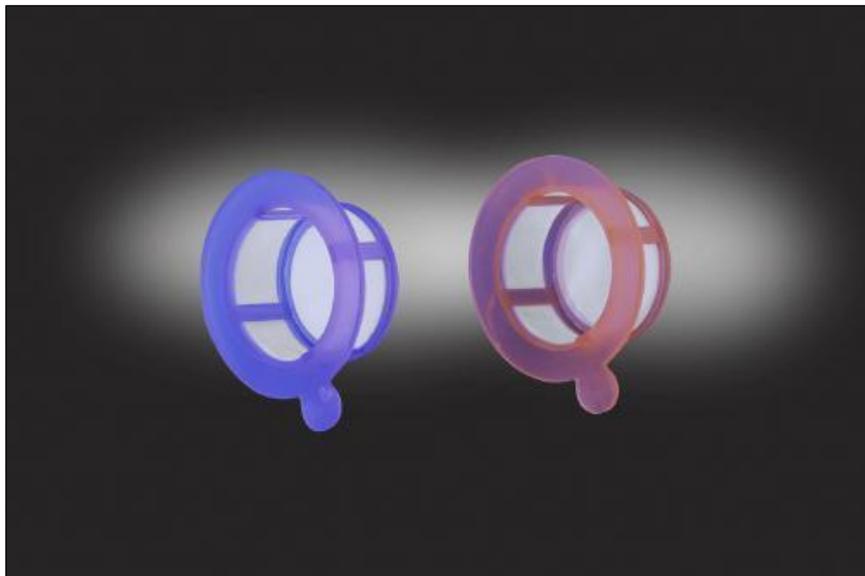


**Figura 4.** Amostras sendo estocadas no botijão de nitrogênio (Foto: Leandro Godoy).

### 3.4 Fertilização *in vitro*

Para o descongelamento dos espermatozoides, as palhetas foram retiradas do nitrogênio líquido e expostas a um banho-maria (70 °C) por 55s. Às amostras descongeladas foram adicionados 500 µL de água marinha filtrada (AMF) (0,2 µm) e em seguida foram centrifugadas a 7000 rpm por 10 min. Imediatamente após a centrifugação foram retirados 900 µL do sobrenadante, permanecendo apenas 100 µL com o pellet de espermatozoides que se formou durante a centrifugação. Esse pellet foi ressuspensão em AMF e destinado para fertilização *in vitro*.

Para obtenção dos oócitos frescos, pacotes de gametas foram coletados da superfície da água dos tanques imediatamente após a liberação pelos pólipos. Esses pacotes foram então acondicionados em peneiras de 70 µm (Figura 5) e lavados com AMF com auxílio de pipeta de Pasteur. O uso abundante da AMF além de acelerar o processo de dissociação do pacote, eliminava todo o conteúdo espermático, permanecendo na peneira apenas os oócitos e, dessa forma, evitando qualquer chance de contaminação.



**Figura 5.** Peneiras de 70 µm utilizadas na lavagem dos oócitos (Foto: Retirada do site de venda).

A suspensão de espermatozoides descongelados foi utilizada em diferentes concentrações ( $10^5$  e  $10^7$  espermatozoides  $\text{mL}^{-1}$ ) para fecundar os

oócitos frescos (que não passaram por processo de congelamento). Para realizar a fecundação, tubos de ensaio contendo 4 mL de AMF receberam  $96 \pm 17$  oócitos e, em seguida, alíquotas da respectiva concentração espermática. Decorridos 30 min, o conteúdo dos tubos foi transferido para os aquários experimentais. A incubação foi realizada em aquários de vidro (500 mL volume útil), com quatro réplicas por concentração, totalizando 14 aquários (Figura 6). Foram utilizados dois grupos controle: (1) fertilização com sêmen fresco recém coletado e, (2) oócitos sem presença de sêmen; com três réplicas por grupo (Figura 7). Os aquários receberam aeração permanente, realizada por pequenas mangueiras que permitiam regulação do fluxo, de forma a evitar que as futuras larvas ficassem presas na tensão superficial da água e não impedisse seu assentamento.



**Figura 6.** Distribuição dos aquários experimentais e aeração sendo feita por meio das mangueiras. (Foto: Hayla Viveiros).



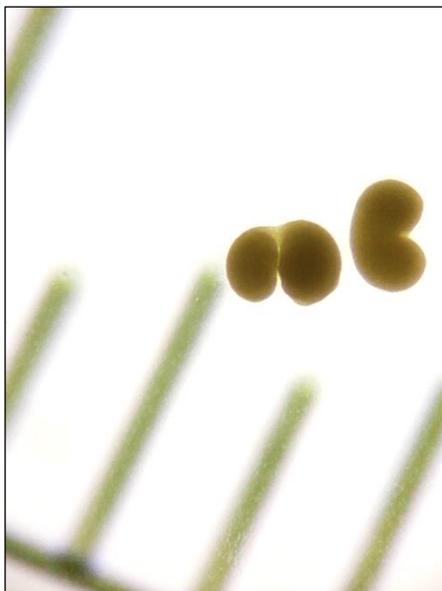
**Figura 7.** Esquema mostrando a distribuição dos tratamentos nos aquários experimentais.

A qualidade da água dos aquários foi monitorada diariamente, com a temperatura mantida em  $25,71 \pm 0,56$  °C; pH  $7,98 \pm 0,035$  e amônia não ionizada  $0,14 \pm 0,05$  mg/L (Hach DR/890 colorimeter). Para manter a qualidade da água dos aquários, uma troca parcial (50%) foi realizada a cada dois dias, sempre com cuidado para que nenhuma larva fosse perdida no processo. Para filtrar a água marinha, foi utilizada uma bomba de vácuo (Modelo 121 - Prismater a 1700 rpm) com filtro de  $1,2 \mu\text{m}$  (Marca Schleicher e Schuell) (Figura 8). O fotoperíodo (12/12) foi controlado com auxílio de luzes LED.



**Figura 08.** Bomba utilizada na filtragem da água marinha (esquerda) e filtro utilizado na bomba (direita) (Fotos: Hayla Viveiros).

A taxa de fertilização foi avaliada 3 horas após a fecundação, por meio da quantificação do número de ovos que passaram por divisões celulares (Figura 09), em relação ao número total de ovos da unidade experimental.



**Figura 09.** Início da divisão celular (Foto: Nayara Cruz).

### 3.5 Substrato para o assentamento larval

Nos aquários, o substrato para assentamento das larvas foi composto de duas cerâmicas quadradas (4x4 cm) (Figura 10), que haviam permanecido submersas por 2 meses no sistema dos viveiros, contendo pedaços de algas coralíneas coletadas do recife a fim de acelerar o processo de condicionamento (GUEST *et al.*, 2012), permitindo o desenvolvimento de biofilme.



**Figura 10.** Cerâmicas utilizadas como substrato para assentamento das larvas (Foto: Leandro Godoy).

### 3.6 Avaliação do assentamento larval e desenvolvimento inicial dos recrutas

Uma semana após o assentamento, os substratos foram analisados com auxílio de luzes LED, com o cuidado de sempre mantê-los imersos na água (Figura 11) durante a avaliação. Foi realizada uma varredura por toda cerâmica, seguindo um sentido único, tomando o cuidado para que o mesmo recruta não fosse contado mais de uma vez. Os recrutas foram quantificados com auxílio de uma lupa e o desenvolvimento dos recrutas no substrato foi classificado de acordo com a face que se desenvolveram (superior, borda e fundo interno) de acordo com Cameron e Harrison (2020). O sucesso do recrutamento foi calculado considerando o número de larvas que se converteram em pólipos

primários sedimentados (GROSSO-BECERRA *et al.*, 2021) a partir do número inicial de oócitos acondicionados no aquário experimental.



**Figura 11.** Análise do assentamento no substrato (Foto: Cláudia Fernandes).

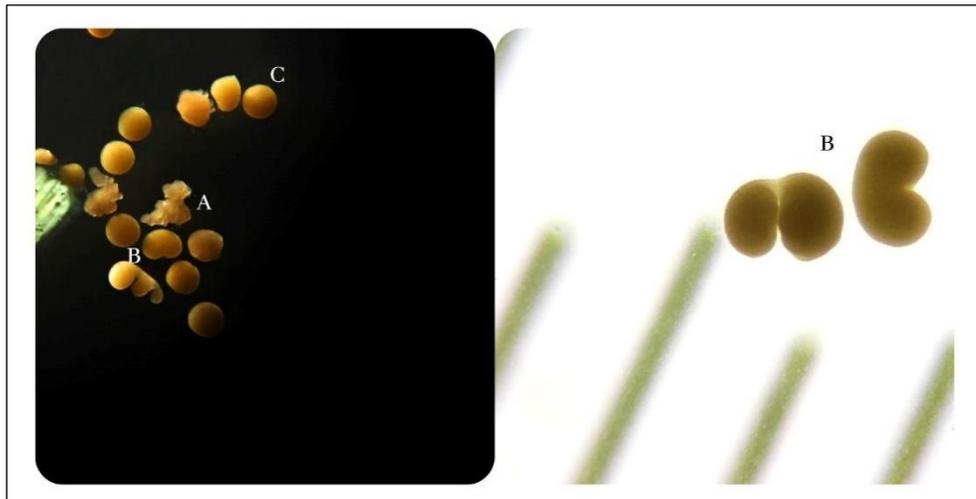
### **3.7 Análises estatísticas**

Todas as análises foram realizadas em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade de Shapiro Wilk, e o teste de homogeneidade (Levene) foi aplicado para avaliar as suposições estatísticas. Os dados que não apresentaram uma distribuição normal foram analisados usando Kruskal-Wallis. Para os dados normais usamos a ANOVA One-way, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunn e Tukey (para ANOVA) e considerados significativamente diferentes quando  $P < 0,05$ . Os dados foram plotados com médias brutas.

## 4. RESULTADOS

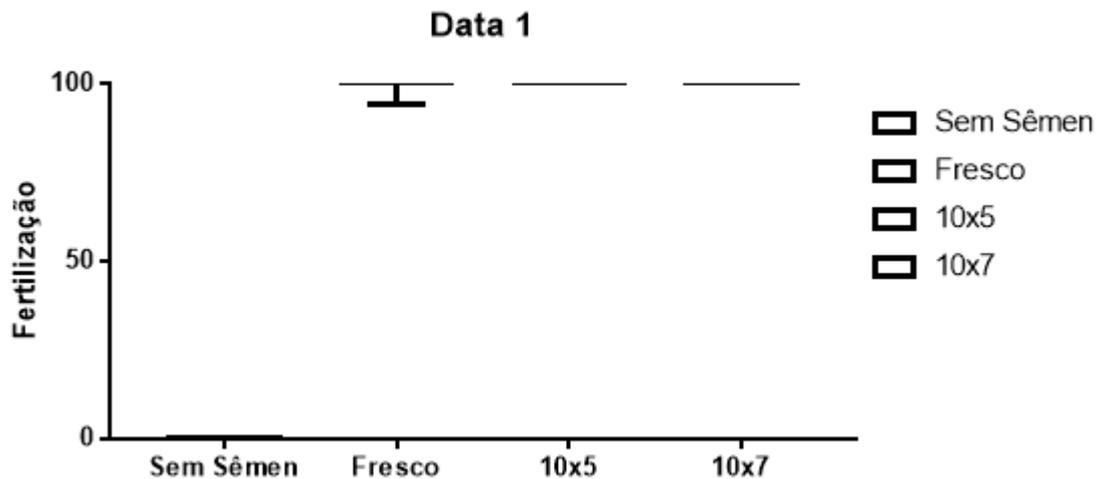
### 4.1 Taxa de fertilização

Após 3h e 20 min do encontro dos gametas foi possível observar o início do sulco de clivagem que resultará em embriões de duas células e o embrião na fase arredondada (Figura 12). Como esperado, não se observou qualquer divisão celular no grupo controle 2 (oócitos sem presença de sêmen), atestando dessa forma a ausência de desenvolvimento embrionário por partenogênese nas unidades experimentais.



**Figura 12.** Divisão celular do coral *Mussismilia harttii* após fertilização in vitro utilizando sêmen congelado. (A) início do sulco de clivagem (esquerda), (B) embrião com duas células (direita), e (C) embrião na fase arredondada. (Foto: Nayara Cruz).

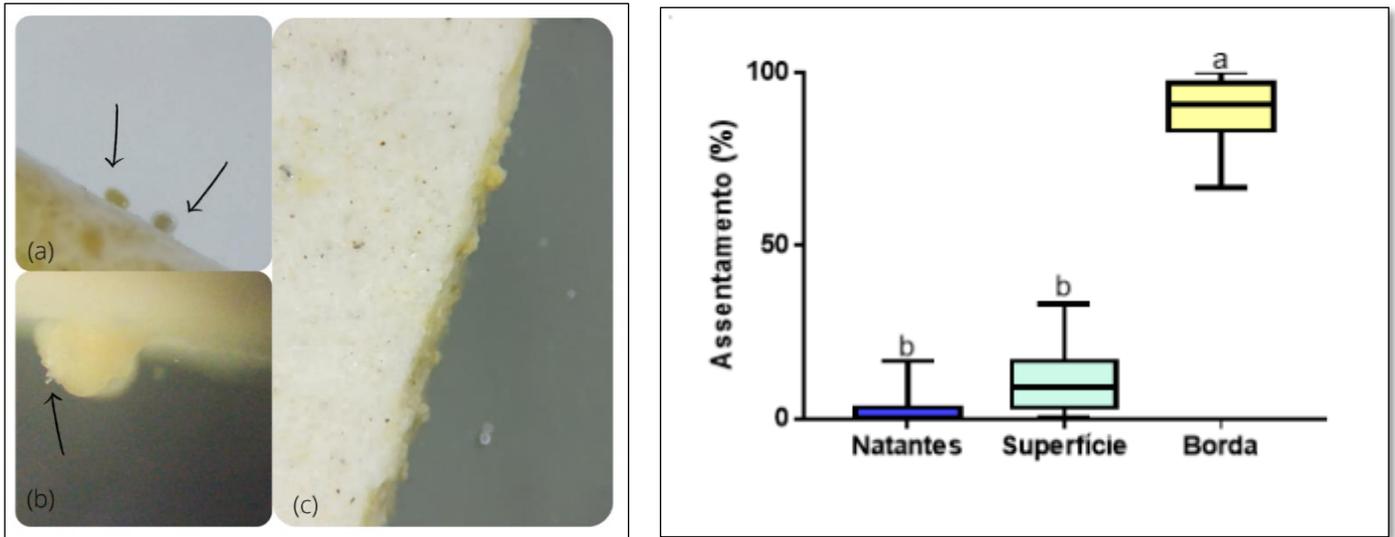
Ambos os tratamentos com sêmen congelado ( $10^5$  e  $10^7$  células/mL) apresentaram taxa de fertilização de  $100 \pm 0\%$ , não diferindo significativamente do grupo controle com sêmen fresco, o qual atingiu  $98 \pm 0,04\%$  de fertilização (Figura 13).



**Figura 13.** Taxa de fertilização *in vitro* do coral *Mussismilia harttii* utilizando sêmen congelado em duas concentrações ( $10^5$  e  $10^7$  células/mL), controle com sêmen fresco e controle oócitos sem sêmen. Testes utilizados: Normalidade Shapiro-wilk:  $p=0.000000$  / Kruskal Wallis:  $>0.9999$ .

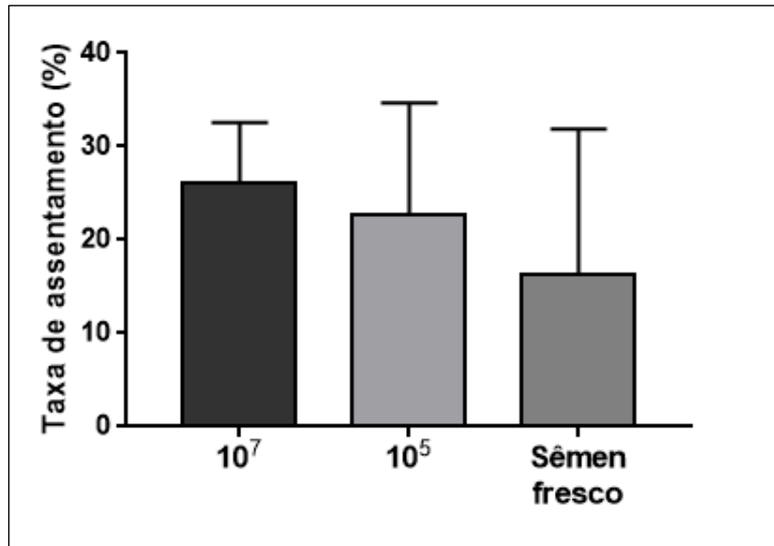
#### 4.2 Taxa de assentamento e desenvolvimento inicial dos recrutas

Nos primeiros dias após a fecundação, as larvas permaneciam próximas da superfície e das paredes do aquário, o que tornava difícil sua visualização. A partir do quarto dia pós-fecundação, foi possível observar que as larvas estavam nadando mais próximas ao fundo do aquário, apresentando uma movimentação sugestiva de busca do substrato para assentamento. Foi possível verificar que 91,32% dos recrutas assentaram nas bordas dos azulejos e apenas 8,68% assentaram na superfície (Figura 14). No momento dessa análise, apenas 4 larvas estavam livres natantes.



**Figura 14.** Padrão de assentamento larval do coral *Mussismilia hartii* a partir da fertilização *in vitro* com sêmen congelado. (a) Recruta assentado. (b) Pólipo com tentáculos visíveis. (c) Assentamento na bora do substrato. Letras distintas sobre as colunas indicam diferença significativa entre os comportamentos de assentamento (teste Kruskal-Wallis  $p < 0,0001$ ).

Os tratamentos que utilizaram sêmen congelado nas concentrações  $10^7$  e  $10^5$  células/mL produziram taxas de assentamento de  $26 \pm 6,59\%$  e  $23 \pm 12,03\%$ ; respectivamente e não apresentaram diferença significativa do controle com sêmen fresco ( $16 \pm 15,49\%$ ) (Figura 15).



**Figura 15.** Análise do assentamento larval após a FIV de corais *Mussismilia harttii*, comparando os dois tratamentos com o grupo controle 1. Testes utilizados: Normalidade Shapiro-Wilk:  $p=0.213291$  / ANOVA One-way:  $F= 0.6169$ ,  $P= 0.5634$

## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo desenvolvemos um protocolo para fertilização *in vitro* do coral endêmico *Mussismilia harttii* utilizando sêmen congelado em diferentes concentrações. Nós avaliamos a taxa de fertilização, a porcentagem de larvas livres-natantes e a taxa de assentamento larval. O protocolo aqui desenvolvido tem potencial para ser utilizado e replicado para o gênero *Mussismilia* e outras espécies liberadoras de gametas, e somar esforços para a conservação dos corais brasileiros.

São poucos os relatos na literatura que trazem informações detalhadas acerca da fertilização *in vitro* em corais usando sêmen fresco e congelado. Grosso-Becerra *et al.* (2021) obtiveram uma taxa de fertilização de 43% quando usaram sêmen congelado do coral *D. labyrinthiformis* e 67% usando sêmen fresco (Tabela 1). Já Hagedorn *et al.* (2012), apesar de alcançarem taxas de 89 e 61% de fertilização *in vitro* com o sêmen fresco dos corais *A. palmata* e *F. scutaria*, respectivamente, quando utilizaram o sêmen congelado a taxa de fertilização caiu para 22 e 18%, respectivamente (Tabela 1). No presente estudo, nós atingimos resultados superiores aos previamente relatados na literatura.

Provavelmente, por nossos recifes terem passado por menor número e menos intensos eventos de branqueamento que os do Caribe e Indo-Pacífico (MIES *et al.* 2020), ainda é possível obter sêmen de melhor qualidade nos corais brasileiros (GODOY *et al.* 2021), o que reflete em maior resistência ao processo de congelamento e, conseqüentemente, maiores taxas de fertilização. Com esses resultados foi possível validar os protocolos prévios desenvolvidos pela equipe do Projeto ReefBank, bem como os procedimentos utilizados na criopreservação dos espermatozoides e posterior manipulação dos gametas para fertilização *in vitro*.

**Tabela 1.** Comparativo de taxas de fertilização *in vitro* de corais utilizando sêmen fresco e congelado.

Espécie	Sêmen fresco	Sêmen congelado	Referência
<i>D. labyrinthiformis</i>	67%	43%	Grosso-Becerra <i>et al.</i> 2021
<i>A. palmata</i>	89%	22%	Hagedorn <i>et al.</i> 2012
<i>F. scutaria</i>	61%	18%	Hagedorn <i>et al.</i> 2012
<i>M. harttii</i>	98%	100%	Presente estudo

Grosso-Becerra *et al.* (2021) descreveram que nem todos os cruzamentos foram bem-sucedidos e que a direção do cruzamento afeta significativamente a produção larval e o assentamento. Além desse fator, antes do evento de desova de 2018, a doença de perda de tecido de coral pétreo (SCTLD) foi detectada nas colônias estudadas e, em fevereiro de 2020, sete das nove colônias (78%) haviam sucumbido à doença. Esses fatores podem auxiliar a justificar as baixas taxas de fertilização, quando comparadas com o presente estudo. O esperma das colônias utilizadas no estudo de Grosso-Becerra *et al.* (2021) foi armazenado em repositório e, desde então, vem sendo utilizado em projetos de resgate genético da espécie *D. labyrinthiformis*.

As técnicas de reprodução *in vitro* promovem um ambiente controlado que facilita a fertilização e desenvolvimento embrionário, o assentamento das larvas e potencializa a produção de recrutas de corais. Essas estratégias têm sido cada vez mais empregadas, principalmente quando o assunto é a restauração ativa

de corais criticamente ameaçados. O sucesso dessas técnicas tem sido registrado principalmente com espécies do gênero *Acropora* (CHAMBERLAND *et al.*, 2015; CALLE-TRIVIÑO *et al.*, 2018; DELA CRUZ e HARRISON, 2020).

As ameaças que acometem os recifes de coral estão se tornando cada vez mais frequentes (HUGHES *et al.*, 2019), provocando altas taxas de mortalidade. Se as mudanças no ambiente marinho continuarem nesse ritmo, os corais não terão tempo para se adaptarem e estaremos diante do colapso desse ecossistema (WILSON *et al.*, 2006; ALVAREZ-FILIP *et al.*, 2015). A diminuição da diversidade genética e a atual falha de recrutamento podem levar os recifes de coral a extinção (LAIKRE *et al.*, 2010). Vermeij *et al.* (2011) ilustram a magnitude das mudanças que ocorreram em apenas três décadas nos recifes de Curaçao, mostrando um declínio de 54,7% na abundância de corais juvenis. Técnicas de produção de larvas de corais em massa podem aumentar rapidamente as taxas de recrutamento em áreas degradadas de recifes, como ocorreu com *Acropora loripes*, melhorando as taxas de sobrevivência pós-assentamento em substratos naturais (DELA CRUZ e HARRISON, 2020).

Calle-Triviño *et al.* (2018) sugerem que a intervenção de técnicas laboratoriais como o uso da fertilização assistida aumenta o sucesso reprodutivo de colônias sexualmente maduras. Seus resultados com taxas de assentamento foram de 50% para larvas de *Acropora cervicornis*. O estudo aponta ainda a importância de se investigar diferentes formas de substratos para microhabitats, que podem ser vantajosos para o assentamento de larvas para fins de restauração em larga escala. Dela Cruz e Harrison (2020) ressaltam o desafio no refinamento das técnicas de reprodução sexuada, controle e manutenção das larvas de corais. Seus resultados demonstram que o assentamento e o recrutamento podem ser significativamente aprimorados por meio do fornecimento de um grande número de larvas sexualmente produzidas em laboratório.

O presente estudo alcançou taxas de assentamento variando de 23 a 26% utilizando sêmen congelado. Essas taxas são próximas do encontrado por Hagedorn *et al.*, (2020) para a espécie *Acropora millepora*, que obtiveram uma taxa de assentamento de 32,6% usando sêmen criopreservado. É necessário

considerar que as taxas de assentamento no ambiente natural podem variar ao longo do tempo e de acordo com escalas espaciais. Não é possível comparar as taxas de assentamento que alcançamos sequer com o mesmo gênero, pois nosso estudo é o primeiro a realizar a reprodução *in vitro* do gênero *Mussismilia*.

A maior e significativa porcentagem de assentamentos na borda dos substratos já era esperada, e bem reportada na literatura (CHAMBERLAND *et al.*, 2015; GROSSO-BECERRA *et al.*, 2021; CAMERON e HARISSON 2020). A borda do substrato possui ranhuras, que permitem diferentes faces para as larvas se fixarem (MARIEKE *et al.*, 2018; PETERSEN *et al.*, 2005; MUNDY e BABCOCK 1998). Além disso, larvas de corais podem ser fototáticas negativas e após metamorfosearem se tornam fototáticas positivas (ETTINGER-EPSTEIN *et al.*, 2008; SAKAI *et al.*, 2020), e essas ranhuras permitiam que os recrutas não ficassem totalmente voltados para a luz. Em larvas de *Acropora palmata* a taxa de assentamento na parte inferior do tripé, utilizado como substrato, foi de 79,6%. Durante o tempo observado (2,5 anos), a taxa de sobrevivência das larvas foi duas vezes maior em relação às outras áreas do substrato (CHAMBERLAND *et al.*, 2015). Dessa forma, sugerimos para futuros estudos que o substrato permaneça suspenso no aquário por alguma estrutura com formato de tripé (CHAMBERLAND *et al.*, 2015; PETERSEN *et al.* 2005; SECORE), permitindo que as larvas se assentem na face inferior e, após alguns meses de desenvolvimento do recruta, o substrato seja remanejado com a face inferior voltada para cima.

A conectividade presente nos recifes brasileiros indica relações bem-sucedidas de dispersão larval entre duas populações distantes, muitas vezes adaptadas a diferentes regimes de temperatura, desta forma ela tem potencial para desempenhar um papel importante na adaptação local ao estresse térmico (SILVA e KAMPEBEL, 2022). Tendo em vista que a tolerância térmica é herdada, as populações locais que recebem larvas de regiões mais quentes ou frias tenderiam a aumentar ou diminuir sua tolerância ao estresse térmico se esses novos indivíduos forem recrutados e se tornarem capazes de se reproduzir. Desta forma, a conectividade poderia moldar a tolerância térmica para os recifes brasileiros, dada a herança genética de larvas dispersas de diferentes condições

de estresse (SILVA e KAMPEBEL, 2022). Godoy *et al.* (2021) relataram desovas viáveis de colônias de *Mussismilia hispida* e *Mussismilia harttii* totalmente branqueadas. Levando em conta os estudos de Silva e Kampebel (2022), um ambiente natural com conectividade poderia favorecer a adaptação e resiliência dos recifes brasileiros.

Recentemente Hagedorn *et al.* (2021) testaram se o sêmen criopreservado poderia ser utilizado para transferir a diversidade genética entre populações geneticamente isoladas do coral *A. palmata*. Os pesquisadores evidenciaram que populações geneticamente distintas desses corais caribenhos podem se cruzar, demonstrando assim que a criopreservação pode permitir o fluxo gênico assistido eficiente em larga escala, podendo então aumentar a diversidade genética, que é sempre uma preocupação levantada quando se trata de reprodução assistida e recuperação de recifes degradados. Tal estratégia poderia auxiliar espécies criticamente ameaçadas a se adaptarem mais rapidamente às mudanças climáticas globais.

A criopreservação de gametas e posterior fertilização *in vitro* se mostra uma poderosa ferramenta tecnológica para fornecer material biológico a qualquer momento, podendo assim ser um recurso viável na restauração e conservação dos recifes de coral (HAGEDORN *et al.* 2012, 2019; PAREDES *et al.*, 2015; GROSSO-BECERRA *et al.*, 2021). Chamberland *et al.*, (2015) relataram o primeiro transplante bem-sucedido e sobrevivência a longo prazo de colônias de *A. palmata* geradas a partir de gametas coletados na natureza. As larvas de *A. palmata* foram assentadas em substratos argilosos e transferidas para o recife duas semanas após o assentamento ou mantidas em viveiros terrestres. Após 2,5 anos, a taxa de sobrevivência dos corais transferidos para o recife foi 6,8 vezes maior do que a dos assentados mantidos no viveiro.

Os recifes da Florida têm sido devastados pela doença da perda de tecido em corais escleractíneos (*Stony Coral Tissue Loss Disease*), que afetou mais de 20 espécies de corais (Reef Resilience Network, 2023). Sua primeira aparição foi em 2014, se espalhando pela maior parte dos recifes da Florida e por alguns do Caribe. Em 2018, a equipe de resgate de corais da Flórida, liderada pela *Florida Fish and Wildlife Conservation Commission* (FWC) e pela NOAA

Fisheries, começou a remover corais antes de serem afetados pelo surto da doença, e os distribuiu para aquários públicos ao redor do EUA, com o objetivo de salvaguardar a diversidade genética e ajudar a restaurar os recifes no futuro (PHYS.ORG, 2021). No início de maio de 2021, cientistas da Universidade de Miami - UM (*Rosenstiel School of Marine and Atmospheric Science*) fertilizaram oócitos de colônias selvagens do Coral *Diploria labyrinthiformis* usando sêmen congelado das colônias resgatadas que o Aquário da Florida mantinha sob cuidados desde 2018. Ao mesmo tempo, os cientistas do Aquário da Florida fertilizaram óocitos dos corais resgatados usando sêmen congelado de corais selvagens que desovaram em Key Largo e que foram coletados por cientistas da UM e da Fundação de Restauração de Corais. As larvas começaram a se metamorfosear e se desenvolveram no laboratório da Universidade. Vemos aqui um exemplo prático da utilização da criopreservação para recuperação de populações que vem sendo afetadas severamente por impactos antrópicos e doenças.

A capacidade de criopreservar um material biológico viável por tempo indeterminado é sem dúvidas uma estratégia que soma significativamente às demais já utilizadas na restauração ativa de recifes de coral. Apesar do avanço ao conseguirmos congelar o sêmen do coral e estabelecermos um protocolo para a fertilização *in vitro*, existe uma parte faltante, ela diz respeito ao gameta feminino – o oócito. A criopreservação do oócito da grande maioria dos organismos aquáticos é difícil e complexa devido ao seu grande tamanho, complexa estrutura de membranas pouco permeáveis, alto teor de lipídios e sua sensibilidade a baixas temperaturas (TSAI *et al.*, 2015 e 2016). Apesar de alguns resultados positivos na criopreservação de estágios imaturos (Tsai *et al.*, 2015 e 2016), o sucesso na criopreservação de oócitos maduros de corais nunca foi alcançado. Tentando driblar esse problema, recentemente os estudos conduzidos por Daly *et al.* (2018) e Cirino *et al.* (2019) relataram sucesso na criopreservação de larvas das espécies *Seriatopora caliendrum* e *Fungia scutaria* utilizando a técnica de vitrificação e aquecimento ultrarrápido com laser. Não há dúvidas de que as biotecnologias reprodutivas associadas à criobiologia podem ter uma contribuição efetiva na conservação de corais. Porém, ainda

existem lacunas acerca de conhecimentos básicos da biologia reprodutiva e, mais especificamente, dos gametas de corais escleractíneos que dificultam o avanço dessas técnicas.

## 6. CONCLUSÃO

Em virtude da necessidade urgente de se conservar os recifes de coral, se faz cada vez mais necessário estudos aprofundados em técnicas de recuperação recifal e tecnologias de reprodução assistida, como as aqui investigadas. O presente estudo desenvolveu um protocolo inédito para fertilização *in vitro* do coral endêmico *Mussismilia harttii* e gerou os primeiros corais brasileiros a partir de sêmen congelado. Foram avaliados a taxa de fertilização, a porcentagem de larvas livres-natantes e a taxa de assentamento larval. O protocolo aqui desenvolvido tem potencial para ser utilizado e replicado para o gênero *Mussismilia* e outras espécies liberadoras de gametas, deixando assim um recurso potencial para a conservação dos corais brasileiros, podendo ser colocado em prática por gestores em Unidades de Conservação e replicado por projetos de restauração recifal. Se faz necessário que próximos estudos avaliem a taxa de sobrevivência pós assentamento e acompanhe o desenvolvimento dos recrutas.

## APÊNDICE I

### ALGUNS PROBLEMAS ENFRENTADOS E SOLUÇÕES ALCANÇADAS

As colônias iniciaram a desova cerca de cinco dias antes do previsto (registrado em anos anteriores), pegando toda a equipe de surpresa. Desta forma, reduzimos nossa capacidade de coleta e manipulação dos gametas na primeira noite de desova, o que resultou em uma menor quantidade de material disponível para desenvolvermos os experimentos. Portanto, precisamos reduzir o número de aquários e congelar o sêmen apenas com duas concentrações espermáticas.

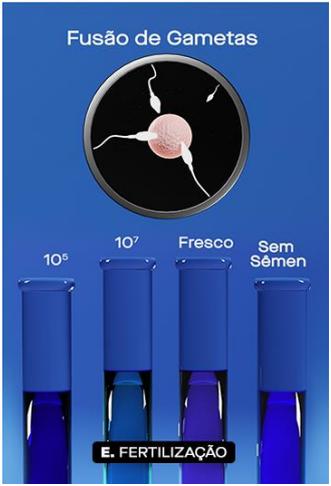
Na segunda noite de coletas enfrentamos um problema durante a lavagem do material para separação dos gametas. O método até então utilizado não foi eficiente, havendo contaminação dos oócitos por espermatozoides e assim ocorrendo a fecundação precoce e não desejada, sendo necessário realizar o descarte da coleta daquela noite. É importante lembrar que a *M. hartii* é uma espécie hermafrodita, que libera seus gametas juntos e envoltos em um pacote de muco. Para fins de criopreservação e qualquer outra metodologia que envolva posterior fertilização *in vitro*, é necessário primeiramente haver o rompimento do pacote e a separação dos gametas masculinos dos femininos, de modo que não haja autofecundação. Na referida noite, provavelmente a lavagem de muitos oócitos ao mesmo tempo e sua exposição à água marinha filtrada (AMF) com rejeitos de água contaminada (por sêmen) durante o processo de lavagem foi a causa do problema. Resolvemos o problema da autofecundação fazendo a lavagem de quantidades menores de oócitos em peneiras de 70  $\mu\text{m}$  utilizando uma pipeta de Pasteur para esguichar a água marinha filtrada, evitando que os oócitos rompessem e, assim que terminávamos a lavagem, as amostras eram separadas em microtubos com AMF livre de contaminação. Esse método mostrou-se prático e efetivo.

## APENDICE II

### PROTOCOLO DETALHADO

 <p>Pacote de Gametas</p> <p>A. DESOVA</p>	<p><b>DETALHAMENTO</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>● Coletar as colônias no recife 2 semanas antes do previsto para desova;</li><li>● Acondicionar as colônias em tanques semifechados de 1000L;</li><li>● Identificar as colônias (pode ser com nomes, números, como preferir);</li><li>● Coletar no momento das desovas em média 100 pacotes de gametas por noite;</li><li>● Transferir os pacotes para tubos Falcon de 50 mL (10 pacotes/tubo) contendo 5 mL de água marinha filtrada;</li><li>● Identificar a colônia doadora dos pacotes coletados.</li></ul>	<p><b>MATERIAL NECESSÁRIO</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>● Colônias de <i>M. hartii</i>;</li><li>● Tanques semifechados de 1000L;</li><li>● Fio de Nylon;</li><li>● Palito de picolé/plaquinha;</li><li>● Caneta permanente;</li><li>● Tubos Falcon de 50mL;</li><li>● Pipetas de Pasteur</li></ul>
 <p>Separação dos Gametas</p> <p>B. PROCESSAMENTO</p>	<ul style="list-style-type: none"><li>● Transferir os oócitos que flutuarem para a superfície dos tubos com o auxílio de pipeta Pasteur para outro tubo Falcon de 50 mL;</li><li>● Transferir os espermatozoides da parte inferior do tubo para outros tubos de 15 mL (Total = 10);</li><li>● Analisar a taxa de motilidade dos espermatozoides de cada tubo;</li><li>● Reunir essas amostras para compor um pool.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>● Tubos Falcon de 50 mL e 15 mL;</li><li>● Caneta permanente;</li><li>● Microscópio óptico.</li></ul>

 <p>Sênem Congelado</p> <p>CONGELAMENTO</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Centrifugar as amostras por 10 min a 7000 rpm;</li> <li>● Envazar em palhetas de 250 <math>\mu\text{L}</math> a solução de crioprotetores + espermatozoides, composta por: Dimetilsulfóxido (DMSO) 20% + sacarose 0,9 M + água Milli-Q®;</li> <li>● Equilibrar as amostras sobre placas de gelo a 5 °C durante 5 min;</li> <li>● Alocar as amostras no Bicell Freezing Container previamente resfriado em freezer a -80°C;</li> <li>● Levar o Bicell para o ultra freezer overnight;</li> <li>● Transferir as palhetas para o botijão de nitrogênio.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Centrifuga;</li> <li>● Palhetas de 250 <math>\mu\text{L}</math>;</li> <li>● Solução crioprotetora: DMSO 20%;</li> <li>● Placa de gelo;</li> <li>● Bicell Freezing Container;</li> <li>● Botijão de nitrogênio.</li> </ul>
 <p>Espermatozoide Viável</p> <p>D. DESCONGELAMENTO</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Retirar as palhetas do botijão de nitrogênio;</li> <li>● Levar ao banho-maria (70°C) por 55s;</li> <li>● Adicionar nas amostras descongeladas 500 <math>\mu\text{L}</math> de AMF (0,2 <math>\mu\text{L}</math>);</li> <li>● Centrifugar a 7000 rpm por 10min;</li> <li>● Retirar 900 <math>\mu\text{L}</math> do sobrenadante;</li> <li>● Permanece apenas 100 <math>\mu\text{L}</math> com o pellet de spz que se forma durante a centrifugação;</li> <li>● O pellet é ressuspenso em AMF e destinado para FIV.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Banho-maria;</li> <li>● Água marinha filtrada (AMF);</li> <li>● Centrifuga.</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antes da FIV é necessário coletar oócitos frescos;</li> <li>• Os pacotes de gametas são colocados em peneiras de 70 <math>\mu\text{m}</math> e lavados com AMF com auxílio de pipeta de Pasteur;</li> <li>• A suspensão de espermatozoides descongelados é utilizada em diferentes concentrações (<math>10^5</math> e <math>10^7</math> espermatozoides <math>\text{mL}^{-1}</math>) para fecundar os oócitos frescos (que não passaram por processo de congelamento).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Oócitos frescos;</li> <li>• Peneiras de 70 <math>\mu\text{m}</math>;</li> <li>• AMF;</li> <li>• Pipeta de Pasteur;</li> <li>• Tubos de ensaio;</li> <li>• Espermatozoides descongelados</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Colocar nos tubos de ensaio contendo 4 mL de AMF os oócitos (100 por tubo) + alíquotas da respectiva concentração espermática;</li> <li>• Após 30 min transferir o conteúdo dos tubos para os aquários experimentais;</li> <li>• 3 horas após a fecundação, avaliar a % de ovos que passaram por divisão celular.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aquários (500 mL de volume útil);</li> <li>• Tubos de ensaio;</li> <li>• Água Marinha Filtrada (AMF);</li> <li>• Alíquotas espermáticas;</li> <li>• Mangueirinhas para aeração permanente dos aquários;</li> <li>• Luzes LED para controlar o fotoperíodo (12h/12h);</li> <li>• Termostato para controlar a temperatura;</li> <li>• Bomba para filtrar a água marinha.</li> <li>• Pipeta de Pasteur;</li> <li>• Lupa.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O substrato para assentamento das larvas deve ser composto de duas cerâmicas que devem permanecer submersas por 2 meses no sistema dos viveiros, contendo pedaços de algas coralíneas coletadas do recife a fim de acelerar o processo de condicionamento permitindo o desenvolvimento de biofilme.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cerâmicas quadradas (4x4 cm);</li> </ul>



- Analisar os substratos com auxílio de luzes LED, mantendo sempre imersos;
- Quantificar os recrutas com auxílio de uma lupa e o desenvolvimento dos recrutas no substrato. (Classificado de acordo com a face que se desenvolveram (superior, borda e fundo interno) de acordo com Cameron e Harrison (2020);
- O calculado considera o número de larvas que se converteram em pólipos primários sedimentados (GROSSO-BECERRA *et al.*, 2021) a partir do número inicial de oócitos.

- Luzes LED;
- Lupa.

## 7. REFERÊNCIAS

AMARAL, A.; PASTRANA, Y.; PEREIRA, C.; VALENTE, W. & GODOY, L. (2022). Morphological assessment of free-spawned sperm in scleractinian coral: a relationship between cell morphology and motility. *Marine Biology*, 169(11), 136.

ADEY, Walter H. (2000). Coral reef ecosystems and human health: biodiversity counts. *Ecosystem health*, v. 6, n. 4, p. 227-236

ARONSON, R. B., PRECHT, W. F. (2001) White-band disease and the changing face of Caribbean coral reefs. *Hydrobiologia* 460, 25–38. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1013103928980>

ALVAREZ-FILIP, L., GILL, J. A., DULVY, N. K., PERRY, A. L., WATKINSON, A. R., CÔTÉ, I. M. (2011) Drivers of region-wide declines in architectural complexity on Caribbean reefs. *Coral reefs*, 30(4), 1051

ALVARENGA, M. F. (2004) Recrutamento de corais recifais no Banco dos Abrolhos, Brasil. Disponível em: [http://hdl.handle.net/11422/3041https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/8651/1/arquivo8143\\_1.pdf](http://hdl.handle.net/11422/3041https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/8651/1/arquivo8143_1.pdf)

BARREIRA e CASTRO, C.; ZILBERBERG, C. (2016) Recifes brasileiros, sua importância e conservação. Cap 1, pg 17-25.

BASTIDAS, Carolina *et al.* Massive hard coral loss after a severe bleaching event in 2010 at Los Roques, Venezuela. *Rev. biol. trop*, San José, v. 60, supl. 1, p. 29-37, Mar. 2012. Available from [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S003477442012000500004&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003477442012000500004&lng=en&nrm=iso). access on 26 June 2021.

BAUMS, I. B. *et al.* (2019) Considerations for maximizing the adaptive potential of restored coral populations in the western Atlantic. *Ecological Applications*, v. 29, n. 8, p. e01978, <https://doi.org/10.1002/eap.1978>

BUDDEMEIER, R. W., KLEYPAS, J. A., ARONSON, R. B. (2004) Potencial Contributions of Climate Change to Stresses on Coral Reef Ecosystems. *Coral reefs e global climate change*.

BRUNO, J. F., CÔTÉ, I. M., TOTH, L. T. (2019) Climate change, coral loss, and the curious case of the parrotfish paradigm: Why don't marine protected areas improve reef resilience? *Annual review of marine Science*. v. 11. p. 307-334

CAMERON, K. A., HARRISON, P. L. (2020) Density of coral larvae can influence settlement, post-settlement colony abundance and coral cover in larval restoration. *Sci Rep* 10, 5488. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62366-4>

CASTRO, C., AMORIM, L., CALDERON, E., SEGAL, B. (2006) Cobertura e recrutamento de corais recifais (Cnidaria: *Scleractinia* e *Milleporidae*) nos recifes Itacolomis Brasil. *Arquivos do Museu Nacional*, v. 64, n. 1, p. 29-40

CIRINO, L.; WEN, Z. H.; HSIEH, K.; HUANG, C. L.; LEONG, Q. L.; WANG, L. H.; CHEN, C. S.; DALY, J.; TSAI, S. & Lin, C. (2019). First instance of settlement by cryopreserved coral larvae in symbiotic association with dinoflagellates. *Scientific Reports*, 9 (1), 1-8.

CHAMBERLAND, V. F., VERMEJ, M. J. A., BRITTSANA, M., CARLS, M., SCHICKA, M., SNOWDNA, S., SCHRIE, A., PETERSENA, D. (2015) Restoration of critically endangered elkhorn coral (*Acropora palmata*) populations using larvae reared from wild-caught gametes. V. F. Chamberland et al. / *Global Ecology and Conservation* 4, 526–537

COSTANZA, R., D' ARGE, R., de GROOT, R. *et al.* (1997) The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* 387, 253–260. <https://doi.org/10.1038/387253a0>

CRUZ, N. O. (2022) Assessment of viability in coral oocytes: a biochemical approach to achieve reliable assays. *Marine Biology* 169:96 <https://doi.org/10.1007/s00227-022-04086-z>

DALY, J.; ZUCHOWICZ, N.; NUÑEZ LENDO, C. I. *et al.* (2018) Successful cryopreservation of coral larvae using vitrification and laser warming. *Sci Rep* 8, 15714. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34035-0>

dela Cruz D. W., Harrison P. L. (2020) Enhancing coral recruitment through assisted mass settlement of cultured coral larvae. PLoS ONE 15(11): e0242847. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242847>

ECOMARES. Fundação para pesquisa e conservação biológica marinha. (2021). <https://ecomares.org/>

ETTINGER-EPSTEIN P.; WHALAN S.; BATTERSHILL C. N.; de NYS R. (2008) A hierarchy of settlement cues influences larval behaviour in a coral reef sponge. Marine Ecology Progress Series, 365, 103-113

FERREIRA, L. C. L., GRILLO, A. C., FILHO, F. P. M. R., SOUZA, F. N. R., LONGO, G. O. (2021) Different responses of massive and branching corals to a major heatwave at the largest and richest reef complex in South Atlantic. Marine Biology 168:54. <https://doi.org/10.1007/s00227-021-03863-6>

GODOY, L., AMARAL, A., MARTIGNAGO, Y. P. D., CRUZ, N., KREIN, V., SANTOS, W., CHAVES, T. (2019) Estratégias Tecnológicas para conservação de corais. Aquaculture Brasil, 20ª ed. Parte 04. P. 24-30. Set/Out

GODOY, L., MIES, M., ZILBERBERG, C., PASTRANA, Y., AMARAL, A., CRUZ, N., PEREIRA, C., GARIIDO, A., PARIS, A., SANTOS, L., & PIRES, D. (2021) Corais construtores de recifes do Atlântico Sudoeste *Mussismilia* spp. São capazes de desovar quando totalmente branqueados. Marine Biology 168, 15. Disponível em <https://doi.org/10.1007/s00227-021-03824-z>. Acesso 22 de março de 2021.

GLYNN, P. W. (1993) Coral reef bleaching: ecological perspectives. Coral Reefs 12, 1–17. doi: 10.1007/bf00303779

GREAT BARRIER REEF MARINE PARK AUTHORITY. Crown-Of-Thorns Starfish Control Guidelines, 2nd edition, GBRMPA, Townsville. (2017). Disponível em: <https://elibrary.gbrmpa.gov.au/jspui/handle/11017/3162>. Acesso em 24 de março de 2021.

GREAT BARRIER REEF MARINE PARK AUTHORITY. Reef Snapshot Summer 2019-2020. GBRMPA, Townsville. (2020). Disponível em:

<https://www.gbrmpa.gov.au/the-reef/reef-health/reef-snapshot>. Acesso em 24 de março de 2021.

GROSSO-BECERRA, M. V., MENDOZA-QUIROZ, S., MALDONADO, E. *et al.* (2021) Cryopreservation of sperm from the brain coral *Diploria labyrinthiformis* as a strategy to face the loss of corals in the Caribbean. *Coral Reefs* <https://doi.org/10.1007/s00338-021-02098-7>

GUEST, J. R., HEYWARS, A. J., OMORI, M., IWAO, K., MORSE, A. N. C., BOCH, C. (2012) Rearing coral larvae for reef rehabilitation. Pp. 73-98 in: *Reef Rehabilitation Manual*. Ed. A.J. Edwards. Coral Reef Targeted Research e Capacity Building for Management Program: St. Lucia, Australia.

GULDBERG, H. O. (1999) Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. *Mar Freshw Res* 50: 839–866.

GULDBERG, H. O. (2007) Light-responsive cryptochromes from a simple multicellular animal, the coral *Acropora millepora*. *Science* 318:467–470

HAGEDORN, Mary *et al.* (2012) Preserving and using germplasm and dissociated embryonic cells for conserving Caribbean and Pacific coral. *PloS one*, v. 7, n. 3, p. e33354

HAGEDORN, Mary *et al.* (2016) Potential bleaching effects on coral reproduction. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 28, n. 8, p. 1061-1071

HAGEDORN, Mary *et al.* (2017) Producing coral offspring with cryopreserved sperm: a tool for coral reef restoration. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 1-9

HAGEDORN, M., SPINDLER, R., DALY, J. (2019) Cryopreservation as a Tool for Reef Restoration: 2019. In *Reproductive Sciences in Animal Conservation*, pp. 489-505. Springer, Cham.

HAGEDORN, M., PAGE, C. A., O'NEIL, K. L., FLORES, D. M., TICHY, L., CONN, T.; & MARHAVER, K. L. (2021) Assisted gene flow using cryopreserved sperm in critically endangered coral. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118 (38), e2110559118

HARRISON, P. L. (2011). Sexual reproduction of scleractinian corals. In *Coral reefs: an ecosystem in transition* (pp. 59-85). Springer, Dordrecht.

HUGHES, T. P. (1994) Catastrophes, phase shifts and large-scale degradation of a Caribbean coral reef. *Science* 265: 1547–1551.

HUGHES, T. P., BAIRD, A. H., BELLWOOD, D. R., CARD, M., CONNOLLY, S. R. *et al.* (2003) Climate change, human impacts and the resilience of coral reefs. *Science* 301(5635): 929–933. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/301/5635/929.abstract>

HUGHES, T. P., RODRIGUES, M. J., BELLWOOD, D. R., CECCARELLI, D., GULDBERG, H. O. *et al.* (2007) Phase shifts, herbivory and the resilience of coral reefs to climate change. *Curr Biol* 17: 360–365.

HUGHES, T. P., GRAHAM, N. A. J., JACKSON, J. B. C., MUMBY, P. J., STENECK, R. S. (2010) Rising to the challenge of sustaining coral reef resilience. *Trends Ecol Evol* 25:633–642.

HUGHES, T. P., KERRY, J. T., NORIEGA, M. A., ROMERO, J. G. A, ANDERSON, K. D., BAIRD, A. H. (2017) *Global warming and recurrent mass bleaching of corals*. Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved. Vol. 543.

HUGHES, T. P., ANDERSON, K. D., CONNOLLY, S. R., HERON, S. F., KERRY, J. T., LOUGH, J. M., *et al.* (2018) Spatial and temporal patterns of mass bleaching of corals in the Anthropocene. *Science*, 359 (6371), 80-83.

HUGHES, T. P., KERRY, J. T., CONNOLLY, S. R. *et al.* (2019) Ecological memory modifies the cumulative impact of recurrent climate extremes. *Nature Clim Change* 9, 40–43. <https://doi.org/10.1038/s41558-018-0351-2>

IUCN – União Internacional para Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais. Lista Vermelha de espécies ameaçadas (2008) Disponível em <https://www.iucnredlist.org/search?query=Mussismilia%20harttii&searchType=species>

JONES, R. J., YELLOWLEES, D. (1997) Regulation and control of intracellular algae (equals zooxanthellae) in hard corals. *Philos Trans R Soc Lond B* 352:457–468.

KNOWLTON, N., BRAINARD, R. E., FISHER, R., MOEWS, M., PLAISANCE, L., & CALEY, M. J. (2010) Coral reef biodiversity. *Life in the world's oceans: diversity distribution and abundance*, p. 65-74.

LABOREL, J. L. (1967) A revised list of Brazilian scleractinians corals and descriptions of a new species. *Postilla Mus. Nat. Hist. Yale Univ.*, v. 107, p. 114.

LABOREL, J. L. (1969) Madreporaires et hydrocorallinaires recifaux des côtes brésiliennes. *Systematique, ecologie, repartition verticale et geographie. Ann. Inst. Oceanogr.*, v. 47, p. 171-229.

LADD, Mark C. *et al.* (2018) Harnessing ecological processes to facilitate coral restoration. *Frontiers in Ecology and the Environment*, v. 16, n. 4, p. 239-247, <https://doi.org/10.1002/fee.1792>

LAIKRE, Linda *et al.* (2010) Neglect of genetic diversity in implementation of the convention of biological diversity. *Conservation Biology*, Boston, v. 24, n. 1, p. 86-88.

LEÃO, Z. M. A. N. (1994) The coral reefs of southern Bahia. In: B. Hetzel & C. B. Castro (eds.), *Corals of southern Bahia*. Editora Nova Fronteira, Rio de Janeiro, p. 151-159

LEÃO, Z. M. A. N., KIKUCHI, R. K. P., OLIVEIRA, M. D. M., VASCONCELLOS, V. (2010) Status of Eastern Brazilian coral reefs in time of climate changes. *Pan-Am J Aquat Sci* 5:224–235

LEÃO, Z. M. A. N., KIKUCHI, R. K. P., FERREIRA, B. P., NEVES, E. G., SOVIERZOSKI, H. H., OLIVEIRA, M. D. M., MAIDA, M., CORREIRA, M. D., JOHNSON, R. (2016) Brazilian coral reefs in a period of global change: A *synthesis*. Review Article. *ReBentos. Brazilian Journal of Oceanography*, 64 (sp2): 97-116.

LIMA, G. V. (2017) Avaliação do estado de conservação do coral endêmico *Mussismilia harttii* (Verrill, 1868) (Cnidaria: Anthozoa) no Brasil. Gislaine Vanessa de Lima – Recife: O Autor

Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume I / - 1. ed. -- Brasília, DF: ICMBio/MMA, 2018. 492 p.: il., gráfs., tabs.

LESSER, M. P., STOCHAJ, W. R., TAPLEY, D. W., SHICK, J. M. (1990) Bleaching in coral reef anthozoans: effects of irradiance, ultraviolet radiation, and temperature on the activities of protective enzymes against active oxygen. *Coral Reefs* 8:225–232

LESSER, M. P. (2006) Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annu. Rev. Physiol.*, 68, 253-278.

LESSER, M. P. (2011) Coral bleaching: causes and mechanisms. In: Dubinsky TJ, Stamler JS (eds) *Coral reefs: an ecosystem in transition*. Springer, Berlin, pp 405–419

MARIEKE, M., ANTINK, H., ROPKE, L., BARTELS, J., SOLTMANN, C., KUNZMANN, A., REZWAN, K., KROLL, S. (2018) Porous ceramics with tailored pore size and morphology as substrates for coral larval settlement. *Ceramics International*, vol 44, Issue 14

MAZUR P. (1984) Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American journal of physiology-cell physiology*, v. 247, n. 3, p. C125-C142

MAZUR P. (1970) Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science*, v. 168, n. 3934, p. 939-949

MENDES, J. M. e WOODLEY, J. D. (2002) Effect of the 1995–1996 bleaching event on polyp tissue depth, growth, reproduction and skeletal band formation in *Montastraea annularis*. *Mar Ecol Prog Ser* 235:93–102

MILLER, Margaret W. *et al.* (2020) Larval longevity and competency patterns of Caribbean reef-building corals. *PeerJ*, v. 8, p. e9705

MIES, M., FRANCINI-FILHO, R. B., ZILBERBERG, C., GARRIDO, A. G., LONGO, G. O., LAURENTINO, E., & BANHA, T. N. (2020) South Atlantic coral reefs are major global warming refugia and less susceptible to bleaching. *Frontiers in Marine Science*, 7, 514

MUHALL, M. (2007) Saving rainforests of the sea: An analysis of international efforts to conserve coral reefs. *Duke Environmental Law and Policy Forum*, 19:321-351

MULLER-PARKER G., D'ELIA C.F., COOK C.B. (2015) Interactions Between Corals and Their Symbiotic Algae. In: Birkeland C. (eds) *Coral Reefs in the Anthropocene*. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-7249-5\\_5](https://doi.org/10.1007/978-94-017-7249-5_5)

MUNDY, C. N. e BABCOCK, R. C. (1998) Role of light intensity and spectral quality in coral settlement: Implications for depth-dependent settlement? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. Vol, 223, Issue 2, 1998, pages 235-255. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(97\)00167-6](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(97)00167-6)

MUSCATINE, L.; PORTER, J. W. (1977) Reef corals: mutualistic symbioses adapted to nutrient-poor environments. *Bioscience*, v. 27, n. 7, p. 454-460.

NZALI, L. M.; JOHNSTONE, R. W. & MGAVA, Y. D. (1998). Factors affecting scleractinian coral recruitment on a nearshore reef in Tanzania. *Ambio*, 717-722.

NZALI, L. M., JOHNSTONE, R. W., MGAYA, T. D. (2021) Factors Affecting Scleractinian Coral Recruitment on a Nearshore Reef in Tanzania. *Ambio* 27, no. 8 (1998): 717-22. Accessed March 26 <http://www.jstor.org/stable/4314820>.

PAUSCH, R. E., WILLIAMS, D. E., MILLER, M. W. (2018) Impacts of fragment genotype, habitat, and size on outplanted elkhorn coral success under thermal stress. *Marine Ecology Progress Series*, v. 592, p. 109-117

PAREDES, E., BELLAS, J., COSTAS, D. (2015) Sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval rearing — Culture from cryopreserved embryos,

Aquaculture, Volume 437, Pages 366-369, ISSN 0044-8486.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.022>.

PEREIRA, P.H.C, LIMA, G. V, PONTES, A. V. F., CÔRTEZ, L. G. F, GOMES, E., SAMPAIO, C. L. S, PINTO, T. K., MIRANDA, R. J., CARDOSO, A. T. C., ARAUJO, J. C., SEOANE, J. C. S. (2022) Unprecedented coral mortality on Southwestern Atlantic coral reefs following major thermal stress. *Frontiers in Marine Science* 9:725778

PETERSEN, D., LATERVEE, M., SCHUHMACHER, H. (2005) Innovative substrate tiles to spatially control larval settlement in coral culture. *Marine Biology*, 146, 937-942

PIRES, D, CASTRO, C., RATTO, C. (1999) Reef coral reproduction in the Abrolhos Reef Complex, Brazil: The endemic genus *Mussismilia*. *Marine Biology*, v. 135, n.3, p. 463-471

PIRES, D. O., CASTRO, C. B., SEGAL, B., PEREIRA, C. M., CARMO, E. C., SILVA, R. G., CALDERON, E. M. (2016) Reprodução de corais de águas rasas do Brasil. In: Zilberberg C, Abrantes DP, Marques JÁ, Machado LF, Marangoni LFB (eds) *Conhecendo os recifes brasileiros*. Museu Nacional, Rio de Janeiro, pp 111–128

PITOMBO, F. B., RATTO, C. C., BELÉM, M. J. C. (1998) Species diversity and zonation pattern of hermatypic corals at two fringing reefs of Abrolhos archipelago, Brazil. *Proceedings of the 6th International Coral Reef Symposium*, 2: 817-820

PRECHT, W., BRUCKNER, A., ARONSON, R. et al. (2002) Endangered *acroporid* corals of the Caribbean. *Coral Reefs* 21, 41–42.  
<https://doi.org/10.1007/s00338-001-0209-2>

Projeto Coral Vivo Notícias. Nº 38. maio/Out 2019. Disponível em:  
[https://coralvivo.org.br/arquivos/documentos/CV\\_Noticias\\_38.pdf](https://coralvivo.org.br/arquivos/documentos/CV_Noticias_38.pdf)

Phys.org (2021). Disponível em: [https://phys.org/news/2021-05-scientists-successfully-corals-goal-disease.html#google\\_vignette](https://phys.org/news/2021-05-scientists-successfully-corals-goal-disease.html#google_vignette). Acesso em 29/04/23.

RAFFA, R. B., PERGOLIZZI Jr., J. V., TAYLOR Jr., R., KITZEN, J. M. (2018) Sunscreen bans: Coral reefs and skin câncer. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jcpt.12778>

Reef Resilience Network, (2023). The Nature Conservancy. Disponível em: <https://reefresilience.org/pt/management-strategies/managing-local-threats/managing-coral-disease/stony-coral-tissue-loss-disease/>. Acesso em: 29/04/23.

SAKAI, Y.; KATO, K.; KOYAMA, H. et al. (2020) A step-down photophobic response in coral larvae: implications for the light-dependent distribution of the common reef coral, *Acropora tenuis*. *Sci Rep* 10, 17680. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74649-x>

SCORE International (Sexual Coral Reproduction). Disponível em <http://www.score.org/site/home.html>.

SILVA, G. L. X. KAMPEL, M. (2022) Connectivity patterns of Brazilian coral reefs associated with potential variation on thermal stress tolerance. *Frontiers in Marine Science*, p. 2294

STANLEY JR, George D. (2003) The evolution of modern corals and their early history. *Earth-Science Reviews*, v. 60, n. 3-4, p. 195-225

SHEPPARD, C., DIXON, D. J. GOURLAY, M., SHEPPARD, A., & PAYET, R. (2005) Coral mortality increases wave energy reaching shores protected by reef flats: examples from the Seychelles. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 64(2-3), 223-234

SHEPPARD, C. R. C., DAVY, S. K., PILLING, G. M., GRAHAM, N. A. J. (2018) *The Biology of Coral Reefs*. Oxford: Oxford University Press

TRIVIÑO, J. C.; USECHE-CORTÉS, C.; SELLARES-BLASCO, R. I.; ARIAS-GONZÁLEZ, J. E. (2018) Assisted fertilization of threatened Staghorn Coral to complement the restoration of nurseries in Southeastern Dominican Republic,

*Regional Studies in Marine Science*, Volume 18, Pages 129-134, ISSN 2352-4855, <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2018.02.002>.

VERON, JEN. (2000) Corals of the World. Townsville, Australia: Australian Institute of Marine Sciences. Vol 3, 1382 p.

VERMIJ, M. J. A.; BAKKER, J.; HAL Nvd; BAK, R. P. M. (2011) Juvenile Coral Abundance Has Decreased by More Than 50% in Only Three Decades on a Small Caribbean Island. *Diversity*. 3(3):296-307. <https://doi.org/10.3390/d3030296>

SHLESINGER, T., LOYA, Y. (2019) Sexual reproduction of scleractinian corals in mesophotic coral ecosystems vs. shallow reefs. In: Loya Y, Puglise K, Bridge T (eds) Mesophotic coral ecosystems. Coral reefs of the world. Springer, Cha, pp 653–666.

SPEARE, K. E., DURAN, A., MILLER, M. W., BURKEPILE, D. E. (2019) Sediment associated with algal turfs inhibits the settlement of two endangered coral species. *Mar Poll Bull* 144:189–195

SUGGETT, D. J., SMITH, D. J. (2011) Interpreting the sign of coral bleaching as friend vs. foe. *Glob Chang Biol* 17:45–55.

TSAI, S., YEN W., CHAVANICH S., VIYAKARN V., LIN, C. (2015) Development of Cryopreservation Techniques for Gorgonian (*Junceella juncea*) Oocytes through Vitrification. *PLOS ONE* 10(5): e0123409. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123409>

TSAI, S., YANG, V. & LIN, C. (2016) Comparison of the cryo-tolerance of vitrified gorgonian oocytes. *Sci Rep* 6, 23290. <https://doi.org/10.1038/srep23290>

VALENTE, W; GALUPPO, A. G.; STREIT JR., D. P.; ZUANON, J. A. S.; GODOY, L. (2023) Morphological organization and ultrastructural evaluation of the oocyte-sperm bundle of the Southwestern Atlantic coral *Mussismilia harttii*. *Coral Reefs* <https://doi.org/10.1007/s00338-023-02346-y>

WEIS, V. M. (2008) Cellular mechanisms of cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis. *J Exp Biol* 211:3059–3066

WILKINSON, C. (1998) Status of Coral reefs of the World: 1998. Townsville, Australia: Australian Institute of Marine Science and the Global Coral Reef Monitoring Network. 184 p.

WILKINSON, C. (2002) Status of Coral Reefs in the World 2002. Townsville: Australian Institute of Marine Science and the Global Coral Reef Monitoring Network, 378p.

WILSON, S. K. *et al.* (2006) Multiple disturbances and the global degradation of coral reefs: are reef fishes at risk or resilient? *Global Change Biology*, v. 12, n. 11, p. 2220-2234

ZILBERBERG, C., ABRANTES, D., MACHADO, L., MARANGONI, L., & MARQUES, J. (2016) Os Recifes Brasileiros: Rede de Pesquisas Coral Vivo. 1. ed. Rio de Janeiro: Museu Nacional, v.1. 364p.