



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA INTERUNIDADES DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOINFORMÁTICA

ANA PAULA DOS SANTOS SOBRINHO

**Microbioma endolítico de recifes biogênicos na região da Oceania
desvendado pela metagenômica de amplicon**

Belo Horizonte

2018

Ana Paula dos Santos Sobrinho

**Microbioma endolítico de recifes biogênicos na região da Oceania
desvendado pela metagenômica de amplicon**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre pelo programa Interunidades de Pós-Graduação em Bioinformática, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Aristóteles Goés Neto (UFMG)

Colaboradores: Prof^a. Dr^a.Fernanda Badotti (CEFET-MG)

Prof.Dr. Heroen Verbruggen (Universidade de Melbourne)

Dr^a.Vanessa Rosseto Marcelino (Universidade de Melbourne)

Belo Horizonte

2018

043

Sobrinho, Ana Paula dos Santos.

Microbioma endolítico de recifes biogênicos na região da Oceania desvendado pela metagenômica de amplicon [manuscrito] / Ana Paula dos Santos Sobrinho. - 2018.

86 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Aristóteles Goés Neto. Colaboradores: Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Badotti; Prof. Dr. Heroen Verbruggen; Dr^ª. Vanessa Rosseto Marcelino.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Bioinformática. 2. Metagenômica. 3. Microbioma. 4. Recifes de Corais. 5. Fungos endofíticos - Teses. I. Goés Neto, Aristóteles. II. Badotti, Fernanda. III. Verbruggen, Heroen. IV. Marcelino, Vanessa Rosseto. V. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. VI. Título.

CDU: 573:004

“No fundo do mar há brancos pavores,
Onde as plantas são animais
E os animais são flores.

Mundo silencioso que não atinge
A agitação das ondas.
Abrem-se rindo conchas redondas,
Baloíça o cavalo-marinho.
Um polvo avança
No desalinho
Dos seus mil braços,
Uma flor dança,
Sem ruído vibram os espaços.

Sobre a areia o tempo poisa
Leve como um lenço.

Mas por mais bela que seja cada coisa
Tem um monstro em si suspenso”.
(Sophia de Mello Breyner Andresen)

Aos meus pais, Sebastião (*in memoriam*) e Martinha

Meus irmãos, Bia, Greice, Dedê, Dina e Tichinha

Meus filhos, Esther, Emanuel e Guy

Meu companheiro, Helton

Agradecimentos

A Deus pela vida, por todas as oportunidades de aprendizado e por seu amor.

A toda minha família, meus pais Martinha e Sebastião (*in memoriam*), meus irmãos Dedê, Bia, Greice, meus filhos queridos Esther, Emanuel, Guy e também aos meus amigos Cristina e Rubão por todo auxílio e carinho.

Ao meu companheiro Helton por estar ao meu lado e pela verdadeira acolhida.

Ao Professor Doutor Vasco Ariston de Carvalho Azevedo e ao Prof. Dr. José Miguel Ortega pelo excelente trabalho desenvolvido na coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioinformática da UFMG.

Ao Prof. Dr. Aristóteles Góes Neto pela orientação, motivação, empreendedorismo e sobretudo por me ensinar o verdadeiro sentido de sistemas de redes, ao liderar com amor, perseverança e paciência o Laboratório de Biologia Molecular e Computacional de Fungos, uma grande lição para a vida.

A Prof.^a Dr.^a Fernanda Badotti pela colaboração, ensinamentos e contribuições imprescindíveis.

Ao Prof. Dr. Heroen Verbruggen e a Dr^a.Vanessa Rosseto Marcelino pela colaboração, por terem disponibilizado os dados do sequenciamento e as informações necessárias dos recifes estudados neste trabalho.

Ao Felipe minha profunda gratidão e reconhecimento por sua contribuição em mais um trabalho do LBMCF.

A todos os professores, colegas e demais colaboradores da Pós-Graduação em Bioinformática da Universidade Federal de Minas Gerais que contribuíram direta e indiretamente com a minha formação e para a realização deste trabalho.

A toda equipe do LBMCF em especial a Paula, Marcelo, Denner, Luz, Maiara, Valquíria, Aline, Gabriel, Diogo, Lucas, Daniel, Alefi e Bárbara, por dividirem espaço e conhecimentos tão preciosos.

Por fim, mas não menos importante aos professores da banca por aceitarem e contribuírem para o aperfeiçoamento dessa pesquisa.

RESUMO

Recifes biogênicos formam um ecossistema marinho complexo, sua importância biológica, econômica e social é incalculável. Desenvolvem-se sob condições naturais especiais e de forma muito lenta. Suas estruturas tridimensionais em geral, são bioconstruídas por corais que secretam carbonato de cálcio (CaCO_3) e por algas coralíneas que se caracterizam pela presença de carbonato de cálcio em suas paredes celulares. Organismos bioconstrutores de recifes abrigam em suas estruturas calcárias uma diversidade biológica endolítica ainda pouco explorada. Entretanto, os fungos compreendem uma comunidade pouco estudada nos recifes. Os estudos que tentam esclarecer a contribuição desses organismos no microbioma recifal são insuficientes para entendermos as interações entre fungos e recifes, bem como seus verdadeiros papéis nesse ecossistema. Nesse contexto, a metagenômica nos permite conhecer quais microrganismos estão presentes no microbioma endolítico de recifes, estimar sua quantidade e delinear o perfil taxonômico da comunidade em diferentes hospedeiros e localidades. Neste trabalho o sequenciamento de amplicon (18S rDNA) foi utilizado com o objetivo de investigar a diversidade e a distribuição de fungos endolíticos em organismos bioconstrutores de recifes em três países da Oceania: Austrália, Papua Nova Guiné e Nova Caledônia. Para a caracterização do microbioma foram sequenciadas pela plataforma Illumina MiSeq, v.3 (2 x300bp), 132 amostras coletadas de recifes em 6 localidades, Austrália Ocidental, Victória, Queensland, Madang, Kavieng e Nova Caledônia. Como resultado, identificamos o microbioma endolítico de recifes ao classificar 165 OTUs, a maioria ao nível de espécie, e demonstramos que a diversidade taxonômica encontrada indica uma comunidade micológica diversa residindo em esqueletos calcários de corais, de algas coralíneas e em fragmentos de arenito e ainda que o componente fúngico desse microbioma endolítico é diverso entre os hospedeiros e entre as localidades onde as amostras foram coletadas. A análise filogenética do microbioma mostrou uma alta diversidade de Ascomicetos (69%) Basidiomicetos (28%), Mucoromicetos (2%) e Quitridiomicetos (1%), distribuídas em 38 gêneros. Em termos de abundância o gênero *Lulworthia* (26%) foi o mais representativo na composição dessa comunidade e é estatisticamente um táxon importante, pois foi identificado em quatro das seis localidades estudadas, *Zalerion* (10,30%) esteve presente em cinco das seis localidades, *Oudemansiella* (7,30%) em três regiões, e igualmente representado, os gêneros *Malassezia* (6,10%) e *Cladosporium* (6,10%). Esta representatividade micológica, ainda que parcial, caracteriza uma interface poderosa entre bioinformática, microbiologia e ecologia ao aprofundar nosso conhecimento das comunidades endolíticas associadas aos recifes e estabelecer as bases para compreendermos a estrutura de interações dos recifes e o seu microbioma.

Palavras-chave: Metagenômica, amplicon, bioconstrução de recifes, fungos endolíticos

ABSTRACT

Biogenic reefs form a complex marine ecosystem, their biological, economic and social importance is incalculable. They develop under special natural conditions and very slowly. Its three-dimensional structures are generally bioconstructed by corals secreting calcium carbonate (CaCO₃) and by coral algae that are characterized by the presence of calcium carbonate in their cell walls. Reef bioconstructive organisms harbor in their limestone structures an endolytic biological diversity that has not yet been explored. However, fungi comprise a poorly studied reef community. Studies that try to clarify the contribution of these organisms in the reef microbioma are insufficient to understand the interactions between fungi and reefs, as well as their true roles in this ecosystem. In this context, the metagenomics allows us to know which microorganisms are present in the endolithic mycobioma of reefs, to estimate their quantity, and to delineate the taxonomic profile of the community in different hosts and localities. In this work the amplicon (18S rDNA) sequencing was used to investigate the diversity and distribution of endolithic fungi in reef bioconstructive organisms in three countries of Oceania: Australia, Papua New Guinea and New Caledonia. A total of 132 samples collected from 6 localities, Western Australia, Victoria, Queensland, Madang, Kavieng and New Caledonia was sequenced by the Illumina MiSeq platform, v.3 (2 x300bp). As a result, we identified the endolytic reef mycobioma by identifying 165 OTUs, most at the species level, and demonstrated that the taxonomic diversity found indicates a diverse mycological community residing in limestone coral skeletons, coral algae and fragments of sandstone, and still that the fungal component of this endolytic microbiome is diverse among the hosts and between the locations where the samples were collected. The phylogenetic analysis of the mycobioma showed a high diversity of Ascomycetes (69%) Basidiomycetes (28%), Mucoromycetes (2%) and Chytridiomycetes (1%), distributed in 38 genera. In terms of abundance, the genus *Lulworthia* (26%) was the most representative in this community and is statistically an important taxon, since it was identified in four of the six studied locations, *Zalerion* (10.30%) was present in five of the six localities, and *Oudemansiella* (7,30%), *Malassezia* (6,10%) and *Cladosporium* (6,10%), in three of the six localities. This mycological representation, though partial, characterizes a powerful interface between bioinformatics, microbiology and ecology, and we deepen our knowledge of endolithic communities associated to reefs and establish the bases for understanding the structure of reef interactions and their mycobioma.

Key words: Metagenomics, amplicon, reef bioconstruction, endolytic fungi

Lista de tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Programas utilizados para identificar as OTUs..... | 38 |
| Tabela 2: Base de dados consultadas..... | 38 |
| Tabela 3. Gêneros de fungos identificados por localidade de coleta..... | 50 |

Lista de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1: Mapa do Continente Oceania..... | 36 |
| Figura 2: Foto de fragmento de coral extraído da área de estudo..... | 37 |
| Figura 3: Áreas de coleta e a distribuição (%) das OTUs identificadas..... | 46 |
| Figura 4: Diversidade de hospedeiros nas localidades de estudo..... | 47 |
| Figura 5: Filos dos fungos identificados | 48 |
| Figura 6: Classes de fungos identificados..... | 48 |
| Figura 7: Frequência dos gêneros de fungos identificados..... | 49 |
| Figura 8: Hospedeiros identificados em Western Austrália..... | 52 |
| Figura 9: Filos de fungos identificados em W.A..... | 52 |
| Figura 10: Gêneros identificados no coral <i>Porites sp</i> em W.A..... | 53 |
| Figura 11: Gêneros identificados no coral <i>Montipora sp</i> em W. A..... | 55 |
| Figura 12: Gêneros identificados em fragmento de arenito W.A..... | 56 |
| Figura 13: Gêneros identificados em coral rochoso não identificado em W.A..... | 56 |
| Figura 14: Filos de fungos identificados em Queensland..... | 57 |
| Figura 15: Gêneros de fungos identificados em coral <i>Pocillopora sp.</i> em Queensland | 58 |
| Figura 16: de fungos identificados em Victória Australia..... | 59 |
| Figura 17: Gêneros de fungos identificados em Victoria Australia | 59 |
| Figura 18: Filos de fungos identificados em Noumea Nova Caledônia..... | 60 |
| Figura 19: Gênero e fungos identificados em hospedeiro coral não identificado em Noumea Nova Cadedônia..... | 61 |
| Figura 20: Hospedeiros identificados em Madang (PNG)..... | 61 |
| Figura 21: Filos de fungos identificados em Madang (PNG)..... | 62 |
| Figura 22: Gêneros identificados em Madang (PNG) nos hospedeiros <i>Porites lutea</i> e coral rochoso não identificado..... | 62 |
| Figura 23: Hospedeiros identificados em Kavieng (PNG)..... | 63 |
| Figura 24: Filos de fungos identificados em Kavieng (PNG)..... | 64 |
| Figura 25: Gêneros identificados em Kavieng (PNG)..... | 64 |
| Figura 26: Gênero identificado no hospedeiro <i>Galaxea astreata</i> coletado em Kavieng (PNG)..... | 65 |

| | |
|--|----|
| Figura 27: Gêneros identificados em <i>Platygyra carnosus</i> em Kavieng (PNG)..... | 66 |
| Figura 28: Dendrograma (OTUs localidades e hospedeiros) | 67 |
| Figura 29: Grupo de OTUs identificadas em Western Austrália..... | 68 |
| Figura 30: Espécies de fungos identificadas na região Western Australia..... | 68 |
| Figura 31: Grupo formado por OTUs identificadas nas localidades de Victoria e Queensland na Austrália..... | 69 |
| Figura 32: Espécies de fungos identificadas nas localidades de Victoria e Queensland na Austrália..... | 69 |
| Figura 33: Grupo formado por OTUs identificadas nas localidades de Madang e Kavieng (PNG)..... | 70 |
| Figura 34: Espécies de fungos identificadas nas localidades de Madang e Kavieng (PNG)..... | 70 |
| Figura 35: : Grupo formado por OTUs identificadas nas localidades de Noumea (Nova Caledônia) e Kavieng (PNG)..... | 71 |
| Figura 36: Espécies de fungos identificados nas localidades de Noumea (Nova Caledônia) e Kavieng (PNG)..... | 71 |
| Figura 37: Localidades de coleta e relação com agrupamento de OTUs..... | 72 |
| Figura 38: Agrupamento de OTUs..... | 72 |

Lista de abreviaturas

BLAST Basic Local Alignment Search Tool

CEFET Centro Federal de Educação Tecnológica

DNA Ácido desoxirribonucleico

GBC Grande Barreira de Coral

LBMCF Laboratório de Biologia Molecular e Computacional de Fungos

NGS Sequenciamento de Nova Geração

nSSU subunidade nuclear pequena

OTUs Unidade Taxonômica Operacional

pb pares de base

pCO₂ pressão parcial de gás carbônico

rDNA DNA ribossômico

UFMG Universidade Federal de Minas Gerais

UPGMA Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

VSEARCH Programa para análise de dados metagenômicos

PNG Papua Nova Guiné

W.A Western Austrália

Sumário

| | |
|--|----|
| 1. Introdução..... | 13 |
| 2. Revisão de Literatura | 15 |
| 2.1 Recifes biogênicos: um ecossistema marinho complexo..... | 15 |
| 2.2 Diversidade nos recifes..... | 17 |
| 2.3 Corais hermatípicos..... | 19 |
| 2.4 Microbioma em corais..... | 22 |
| 2.5 Micobioma endolítico..... | 25 |
| 2.6 Metagenômica | 28 |
| 2.7 Metagenômica de amplicon..... | 31 |
| 3. Justificativa..... | 33 |
| 4. Objetivos | 34 |
| 5. Material e métodos..... | 35 |
| 5.1 Coleta, extração e sequenciamento do DNA..... | 35 |
| 5.2 Pré-processamento e preparo da biblioteca..... | 37 |
| 5.3 Análises de diversidade e padrões de ocorrência..... | 42 |
| 6. Resultados e discussão..... | 44 |
| 7. Conclusão e perspectivas..... | 73 |
| 9. Referências | 75 |

1. INTRODUÇÃO

Recifes biogênicos formam um ecossistema marinho complexo, dotado de riquíssima diversidade, e que pode ser considerado um banco genético gigantesco com grande importância biológica, econômica e social. Desenvolvem-se sob condições naturais especiais, de forma muito lenta, em regiões e condições físico-químicas particulares.

Em geral, suas estruturas tridimensionais são construídas por corais, que secretam carbonato de cálcio (CaCO_3), bem como por algas da ordem *Corallinales*, um grupo de algas vermelhas, que se caracterizam pela presença de (CaCO_3) em suas paredes celulares. A vida dos diferentes organismos ali se entrelaça e compõe esse exuberante ambiente natural.

Bactérias, arqueobactérias, protozoários, fungos, algas verdes e vírus compõem a microbiota desse ecossistema e são habitantes comuns de esqueletos de corais hermatípicos e das algas coralíneas, os principais organismos construtores de recifes. Entretanto, a diversidade dessa microbiota é pouco caracterizada porque são difíceis de quantificar e identificar com as técnicas de microscopia comuns ou por sequenciamento tradicional (Sanger).

Contudo, as tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS), juntamente com ferramentas inovadoras de bioinformática, permitiram avanços rápidos no campo da ecologia microbiana e ampliaram a nossa compreensão sobre os microbiomas.

Conhecer a diversidade de comunidades ambientais usando abordagens de NGS, independentes de cultura é um assunto que ganha atenção de diversos grupos de pesquisa em todo o mundo e certamente estamos vivendo a maior era de sequenciamento genético, classificação taxonômica e conhecimento de novas linhagens.

Os fungos compreendem a comunidade simbiótica do coral e das algas coralíneas menos conhecida, cuja taxonomia, estabilidade e função ainda são pouco investigadas. Os fungos em recifes existem como endolíticos, endobiontes, saprófitos e agentes patogênicos.

As abordagens metagenômicas minimizaram as dificuldades de classificação taxonômica e superaram as limitações dos estudos baseados em cultivo de microrganismos em meios de cultura. Assim, nos fornece novas possibilidades para avaliar os papéis complexos que os microrganismos desempenham em praticamente qualquer ecossistema.

A metagenômica de amplicon usa marcadores filogenéticos e permite a avaliação simultânea da diversidade microbiana associada aos recifes, do microhabitat, bem como, indiretamente, das respostas funcionais que ali se estabelecem. O objetivo do nosso estudo é caracterizar a comunidade de fungos endolíticos em esqueletos calcários de corais hermatípicos e de algas coralíneas na região da Oceania (Austrália, Papua Nova Guiné e Nova Caledônia).

Os seguintes tópicos são abordados pelo nosso estudo: conhecimento da diversidade com base na composição taxonômica; análises de diversidade para a comparação da composição taxonômica entre os hospedeiros de uma mesma área e entre as outras áreas; riqueza de táxons e abundância relativa de leituras em diferentes escalas e tipos de hospedeiro e entre as áreas onde as coletas foram realizadas, usando metacódigos de barras de 18S rDNA.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Recifes biogênicos: um ecossistema marinho complexo

O ambiente marinho pode ser dividido em duas categorias distintas, costeira e oceânica, cada uma contém ecossistemas diversos. Nesse ambiente, recifes são habitats biogênicos para muitas espécies, macro e microscópicas e são considerados um ecossistema complexo (KELLY et al., 2014).

A importância dos recifes consiste em sua alta produtividade biológica, produção de alimentos, favorecimento da pesca, proteção física das faixas litorâneas contra correntes marítimas, tempestades e erosão. Além disso, são essenciais para o turismo e a base de um sistema econômico que gera renda à milhões de pessoas no mundo inteiro (SHEPPARD et al., 2009).

Recifes biogênicos formam um importante ecossistema, altamente diversificado ao abrigar uma variedade extraordinária de vida. São formados por organismos vivos, com capacidade de produzir esqueletos de carbonato de cálcio, como os corais hermatípicos zooxantelados e as algas calcárias da ordem *Corallinales*, que contribuem para a formação de enormes recifes. Abrigam distintas espécies e desempenham variadas funções ecossistêmicas (GORMLEY et al., 2015).

Suas formações rochosas criam uma estrutura tridimensional bastante rígida e resistente às ações mecânicas. Sua bioconstrução é feita por ações das comunidades marinhas que secretam carbonato de cálcio (CaCO_3) formadoras de um esqueleto calcário resistente. O termo geralmente, utilizado “recife de corais” se deve, sobretudo a predominância que têm esses organismos em recifes de várias partes do mundo. Porém, outros organismos, como algas calcárias são também muito importantes na formação de recifes biogênicos (AINSWORTH et al., 2010).

Conforme nos informam Zilberberg et al. (2016), numa perspectiva biológica, os recifes são formações tridimensionais criadas pela ação de comunidades de organismos denominados genericamente de “corais”, entretanto, a estrutura denominada recife, em geral, ocorre pelo acúmulo dos esqueletos calcários de corais e outros organismos. Para os recifes se formarem, é necessária a atuação conjunta de uma infinidade de seres, criando uma complexa rede de associações e eventos em sucessão.

Há três principais formatos de recifes: franjas, barreiras e atóis. No estágio inicial da formação dos recifes, eles são chamados de franjas e na maior parte dos casos, ocorrem ao longo das costas rochosas, sobre arenitos ou rochas das praias. Já as barreiras surgem quando a erosão das praias ou a flutuação do nível do mar afastam o recife da costa. O atol, tem a formação semelhante a um anel e surge quando essas barreiras circundam alguma ilha. O formato do recife pode ser capaz de revelar sua relação de resposta às variações do nível do mar (ZILBERBEG et al., 2016).

O crescimento dos recifes também está intimamente relacionado com as variações das marés. No topo do recife, somente um pequeno número de espécies pode sobreviver e não crescem acima de certa altura. Os pólipos de corais são sensíveis a grande exposição do ar na maré baixa e a grande incidência de luz no topo, impossibilitando o recife de continuar crescendo no sentido vertical, assim, o maior crescimento dos recifes ocorre nas laterais. Alguns recifes adquirem um formato típico de cogumelo e são chamados de chapeirões e correspondem a uma forma resultante das variações do nível do mar. Quando retilíneos, em geral, são formações sedimentares cimentadas por calcário, chamadas arenitos de praia ou recifes de arenito ou simplesmente arrecifes que podem indicar antigas linhas de praia (ZILBERBEG et al., 2016).

Os recifes de arenito resultam da consolidação de antigas praias, ou a partir de um ou mais bancos de areia consolidados, à custa de sedimentação com carbonato de cálcio ou óxido de ferro, posicionados mais ou menos paralelos à linha de praia, são também um berço para a biodiversidade marinha e costeira (BAPTISTA, 2010).

Como característica geral, os recifes de arenito são formados a partir de um processo de calcificação de sedimentos locais, na parte inferior das praias, esses recifes têm um papel de fundação e sobre eles pode ser desenvolvido o recife de coral (VILLAÇA, 2010).

Nos recifes existem numerosos macrorganismos com diferentes graus de associação, incluindo caranguejos e vários outros crustáceos, anelídeos, esponjas, moluscos bivalves, hidrozoários, peixes de diferentes tamanhos, polvos, estrelas do mar, ouriços, entre outros. Estes são membros itinerantes dessas "florestas tropicais do mar" (BLACKALL; WILSON; VAN OPPEN, 2015).

Os recifes, como um dos ecossistemas mais produtivos do mundo, se formam em condições muito especiais nas regiões tropicais costeiras e em águas rasas, com profundidade de até 60 metros (não foram ainda encontrados recifes abaixo dessa profundidade). Segundo Forsman (2005), embora ocupem uma extensão menor que 0,1% da superfície oceânica é o habitat de um quarto das espécies marinhas, estabelecem abrigos, áreas de alimentação, locais de reprodução e criadouro para uma superabundância de espécies. Entretanto, estão entre os ecossistemas mais ameaçados atualmente (SALA et al., 2012).

Recentes avaliações apontadas por Graham et al. (2015), relatam as pressões globais que os recifes estão sofrendo e documentam os alarmantes graus de desequilíbrio na estrutura desse ambiente. O aumento da temperatura da água do mar ocasionado pelo aquecimento global produziu um fenômeno de branqueamento sem precedentes que resultou em grande mortalidade dos recifes (HUGHES et al., 2017).

2.2 Diversidade nos recifes

A diversidade nos recifes foi estimada entre 600.000 e 9 milhões de espécies em todo o mundo (Reaka-Kuldla, 1997; Small et al., 1998; Plaisance et al., 2011). Ecossistemas de recifes são formados por uma grande deposição de material calcário que se sedimenta ao longo de milhares de anos, com uma fina camada de tecido vivo em sua superfície, que se deve, principalmente, a presença dos organismos-chave desse habitat: corais hermatípicos (corais duros com exoesqueleto calcário) e algas coralíneas (RAGHUKUMAR, 2017).

As algas coralíneas são macroalgas, classificadas dentro do filo Rhodophyta (do grego *rhodos*, vermelho; *phyton*, planta), que pertencem a ordem *Corallinales*, têm distribuição cosmopolita em diversos ambientes, mas são principalmente marinhas. São abundantes em praias e costões rochosos, distinguem-se pela presença de plastídios avermelhados, exibem formas crustosas (chatas), semelhante a uma rocha ou eretas, parecidas com galhos (MARGULIS 2001, p 180-1).

As macroalgas calcificadas são a chave para uma série de processos que formam a estrutura tridimensional do habitat marinho, funcionam como engenheiros de ecossistemas biogênicos ao contribuírem positivamente com a deposição de carbonatos e ao atraírem animais invertebrados, como os pólipos de corais (WEISS; MARTINDALE, 2017).

O carbonato de cálcio ocorre em esqueletos de invertebrados e também nos talos de determinadas algas, como nas algas vermelhas, na forma de aragonita ou calcita. As paredes celulares das algas coralíneas são compostas de calcita (CaCO_3) com alto teor de magnésio (Mg^{2+}). A composição dessas algas ajuda a consolidar a estrutura dos recifes, que por sua vez, apresenta maior resistência a penetrabilidade, suporte mecânico e proteção contra os predadores que se alimentam de muitas espécies formadoras de recifes, inclusive se alimentando de corais (BASSO, 2012).

Apesar de sua onipresença, todos os aspectos relacionados as algas, tais como, taxonomia, biologia e ecologia permanecem pouco compreendidos, devido a quantidade limitada de estudos sobre essa classe, sendo assim, as algas coralíneas são frequentemente ignoradas pelos pesquisadores que estudam os recifes (LITTLER; LITTLER, 2013).

Como todos os organismos que fazem fotossíntese, algas coralíneas precisam de gás carbônico (CO_2), água e luz, mas ao construírem os ambientes recifais demandam condições ainda mais específicas para assegurar sua calcificação e desempenhar de forma eficaz seu papel na construção e na manutenção desses ambientes, necessitam ainda de água com pH mais elevado para realizar o processo de calcificação (WEISS; MARTINDALE, 2017).

Algas da ordem *Corallinales*, são os principais produtores primários dos atuais recifes, ao depositarem sedimentos de carbonato de cálcio, cimentam e estabilizam os recifes. A presença desse tipo de alga consolida a estrutura dos recifes e aumenta a heterogeneidade desse habitat, potencializando a sua biodiversidade (MCCOY; KAMENOS, 2015).

Como construtor primário de recifes, as algas coralíneas fornecem substratos para outros organismos se fixarem, como os pólipos de corais que são fixados e se estabelecem, colonizando as formações do recife. Segundo Tierney e Johnson (2012),

esse tipo de alga pode ser considerado o principal contribuinte para a estrutura nas partes em que o recife é exposto a forças físicas reduzindo os processos erosivos, por exemplo, na frente do recife em mar aberto.

As algas coralíneas atingem seu potencial de diversidade em ambientes de recife tropical e são a base da cadeia alimentar marinha, da sedimentação e da biogênese nesses sistemas, atraindo quimicamente as larvas do coral ao facilitar a colonização e sobrevivência dos recifes (LITTLER; LITTLER, 2013).

2.3 Corais hermatípicos

Os corais são animais sésseis, espécies-chave em ambientes de recife tropicais. Podem ser divididos em duas categorias: corais hermatípicos (corais duros), que formam grandes extensões rochosas e os corais ahermatípicos (corais moles), que não formam recifes, mas podem ser encontrados coabitando o sistema de recifes. Os corais hermatípicos secretam (CaCO_3) formando um exoesqueleto rígido, vivem em simbiose com as algas dinoflageladas do gênero *Symbiodinium*, comumente chamadas de zooxantelas (RIEGL et al., 2009).

Os corais são exclusivamente marinhos, pertencem ao filo Cnidaria e a classe Anthozoa. Os membros dessa classe apresentam uma única forma, denominada pólipos, durante todo seu ciclo de vida. O pólipos de coral é semelhante a um saco em forma de tubo, com uma boca central circundada por um anel de tentáculos, a base oposta o fixa ao substrato e, nesses animais, ainda se observa o início de uma organização tecidual complexa, com presença de cavidade gastrovascular especializada em digerir suas presas e um sistema de redes nervosas ao longo do corpo (HENKEL, 2012).

O corpo dos corais contém duas camadas celulares que formam a epiderme e a gastroderme, a qual é revestida por um tipo de muco que se conecta ao esqueleto de carbonato de cálcio poroso. Entre os poros do esqueleto calcário são encontrados representantes microbianos dos três reinos, Eubacteria, Archaea e Eucarya, além de inúmeros vírus, que fazem dessa estrutura um habitat surpreendente (ROSENBERG et al., 2007).

Os corais hermatípicos crescem somente em águas tropicais e subtropicais, com temperaturas superiores a 18° Celsius. Produzem (CaCO₃) na forma de cristais de aragonita que compõem um exoesqueleto que protege o pólipó enquanto ele está vivo. Para Wild et al. (2013), os corais são o arcabouço dessa estrutura dinâmica e os principais organismos construtores desse ecossistema. Ao morrer, o pólipó do coral sedimenta-se, novas colônias se desenvolvem sobre essa estrutura rígida e, com o passar do tempo, grandes paredões são formados, os quais são chamados de recifes (MUSCATINE et al., 2005).

Os corais vivem em relação mutualística com as zooxantelas, algas fotossintéticas que habitam o interior dos seus tecidos, segundo Hoegh-Guldberg (1999), em densidades de 0,5 x 10⁶ até 5 x10⁶ por cm², são, portanto, os microrganismos eucariotos com a maior prevalência encontrados nos ecossistemas dos recifes, habitando os tecidos internos do hospedeiro coral.

Como fotossintetizantes obrigatórios, tais algas necessitam de águas rasas e limpas, ideais para que o processo de fotossíntese seja viabilizado, de maneira que zooxantelas e corais troquem moléculas orgânicas e inorgânicas, permitindo o crescimento e a proliferação de ambos (LAJEUNESSE; PARKINSON; REIMER, 2012).

A simbiose entre corais e zooxantelas é bem conhecida, conforme descreveram Davy, Allemand e Weis (2012), esses dinoflagelados residem no interior das células da gastroderma, tecido que reveste a cavidade gastrovascular do coral e promovem o crescimento, a reprodução e a deposição do esqueleto calcário.

As zooxantelas vivem dentro de vesículas aderidas à membrana do pólipó e constituem a principal fonte de nutrição do coral, disponibilizando cerca de 60-80% de seus fotossintatos, permitindo que os corais se estabeleçam e se desenvolvam em águas com baixas quantidades de nutrientes (TREMBLAY et al., 2012).

A simbiose que ocorre entre corais e algas do gênero *Symbiodinium*, promove o aumento das taxas de calcificação na medida em que apenas os corais zooxantelados são capazes de construir extensas estruturas carbonáticas que constituem os recifes de regiões marinhas tropicais (HUME et al., 2013).

O aumento da temperatura de forma brusca e os seus efeitos imediatos no clima continuam a ser um dos fatores que mais produzem impactos negativos nos ecossistemas de recifes em todos os principais oceanos do mundo. Assim, de acordo com Monroe et al. (2018), as grandes extensões de branqueamento ocorridos nos anos de 2015 e 2016 foram declaradas o 3º maior evento de branqueamento e morte dos corais nos últimos vinte anos.

O branqueamento de corais é causado pela elevação da temperatura da água do mar que leva a dissociação do coral e do seu simbiote zooxantela. Ao perder as suas zooxantelas o coral perde sua principal fonte nutricional, sua pigmentação e passa a exibir o estado de branqueamento. As principais consequências desse processo são a diminuição da calcificação, aumento da suscetibilidade às doenças e a mortalidade parcial ou total das grandes colônias formadas pelos pólipos de corais (BAKER; GLYNN; RIEGL, 2008).

A frequência de grandes eventos de branqueamento pode ser irreversível para a recuperação dos recifes. Os corais zooxantelados, são muito exigentes quanto a localidade onde se desenvolvem, necessitando de condições específicas de salinidade, pH, nutrientes, temperatura, incidências fótticas, entre outros, pequenas oscilações de apenas 1 grau Celsius, durante algumas semanas causam fatores estressores nos corais que, ao expelirem suas zooxantelas, perdem sua principal fonte nutricional e também a sua pigmentação (HOEGH-GULDBERG et al., 2007).

Ainda de acordo com Hoegh-guldberg et al. (2007), o aquecimento global e a acidificação dos oceanos comprometem a produção de carbonato nos corais, que são cada vez mais raros nos sistemas de recifes. O resultado será comunidades de recifes menos diversas e estruturas de recifes de carbonato que se fragmentam e não conseguem ser mantidas.

Esse fator é o principal promotor de degradação dos recifes, desencadeando o desequilíbrio dos processos reguladores da sua construção. São observados efeitos diretos e progressivos, como diminuição da produtividade primária e baixa calcificação dos corais. Além disso, essas mudanças refletem diretamente na disponibilidade de produtos orgânicos e inorgânicos e altera os ciclos biogeoquímicos e a composição biológica desse ecossistema (WILD et al., 2013).

Tendo em vista que os corais são os principais seres construtores dos ecossistemas de recifes, Work e Meteyer (2014), alertam para as crescentes degradações que podem potencializar a diminuição dessa população quase ao nível de extinção, bem como os efeitos que essas perdas acarretariam. A redução dos corais devido ao aquecimento global, eventos de branqueamento e ações antrópicas, como, por exemplo, pesca excessiva, ocupação humana e aumento da poluição nas regiões costeiras têm impactos negativos nas espécies que dependem diretamente dos recifes (JONES et al., 2004).

Os corais também realizam atividade filtradora sendo expostos ao fluxo de água nos recifes e a mistura de água das marés, os quais promovem alta dispersão de microrganismos, sobretudo os planctônicos. Dessa maneira, eles representam um sistema bem adaptado de interações e podem ser reconhecidos como habitat microbiano especializado (SUNAGAWA; WOODLEY; MEDINA, 2010).

Corais saudáveis são organismos essenciais para a manutenção da dinâmica de produtividade e sustentabilidade dos ecossistemas de recife. Além de apresentar inúmeras funções dentro desse ecossistema, eles são considerados excelentes modelos de pesquisa, onde se observam interações surpreendentes entre o hospedeiro e o seu microbioma (ROHWER et al., 2002).

Segundo Rosenberg e Zilber-Rosenberg (2016), o termo microbioma pode ser definido como a soma das informações genéticas da microbiota simbiote residente no hospedeiro eucariótico multicelular, já a microbiota, refere-se a todos os microrganismos associados a um animal ou a uma planta.

O microbioma associado aos corais parece estar fortemente ligado à capacidade dos corais em se recuperar frente as constantes mudanças climáticas do cenário mundial. Os microrganismos podem mediar a resiliência dos corais e melhorar a resistência contra patógenos específicos (COLEMAN-DERR; TRINGE, 2014).

As questões temporárias relacionadas a diversidade de microrganismos, como, forças ecológicas específicas do hospedeiro e ambientais, devem ser consideradas e analisadas de modo integrado dentro do hospedeiro coral (BOURNE; MORROW; WEBSTER, 2016)

2.4 Microbioma em corais

Um microbioma é formado por uma comunidade de microrganismos que vivem em um ambiente específico. O hospedeiro e seu microbioma representam uma unidade evolutiva que pode ser considerada um holobionte. As relações que o microbioma mantém com seu holobionte coral têm importância potencial na manutenção da saúde dos corais e do recife como um todo, são fundamentais para manter a sua sobrevivência, restauração ou resiliência (PEIXOTO et al., 2017).

O termo holobionte descreve bem um hospedeiro e a interação com a sua comunidade endossimbiótica (ROHWER et al 2002). O coral pode ser definido como um hospedeiro holobionte associado aos seus microrganismos simbióticos (ZILBER-ROSENBERG; ROSENBERG, 2008).

A teoria do holobionte foi proposta, em 1991, por Margulis e, considera que todas as plantas e todos os animais se associam com microrganismos que passam a ser parte integrante destes, entendidos como unidades evolutivas ao integrarem-se em relações genéticas e metabólicas que melhor se adaptam ao meio ambiente (ROHWER et al., 2002; THOMPSON et al., 2015).

O termo e o conceito de coral holobionte são análogos ao termo micorrizas, associação mutualística do tipo simbionte entre as raízes de algumas plantas e alguns tipos de fungos que vivem nas rizosferas (região do solo em contato com as raízes das plantas), e, contribuem direta ou indiretamente, promovendo o crescimento e desenvolvimento das plantas através da produção de sinais regulatórios, antibióticos, nutrientes entre outras substâncias (PEIXOTO et al., 2017).

Atualmente é aceito que todos os macrorganismos vivem em associações com microrganismos que são fundamentais para sua sobrevivência. O reconhecimento da onipresença e importância dos microrganismos mudou a maneira de entendermos a unidade biológica e as forças seletivas que direcionam a evolução (SKILLINGS, 2016)

Comunidades microbianas associadas a corais foram estudados por Thurber et al. (2009), em relação à saúde e doença do coral, por Geffen, Ron e Rosenberg (2009), que apresentaram propriedades antimicrobianas do muco coral e por Wild et al. (2004), que descreveram o papel potencial na reciclagem da matéria orgânica nos ecossistemas dos recifes.

Além disso, tem sido hipotetizado que os parceiros microbianos associados aos seus hospedeiros possuem diferentes papéis e que estes são importantes na resposta (e potencialmente na adaptação) do holobionte coral quando este é exposto a eventos adversos (RESHEF et al., 2006).

Corais construtores de recifes vivem em relação mutualística e de simbiose com seus endossimbióticos fotossintéticos, zooxantelas, juntamente com outros microrganismos, que incluem bactérias, arqueobactérias, fungos e vírus. Essas interações estabelecem características fisiológicas que beneficiam a saúde do hospedeiro coral e seus associados (BAYER et al., 2013).

O holobionte coral é uma montagem dinâmica entre zooxantelas, algas endolíticas, fungos endolíticos, bactérias, arqueias e vírus. Zooxantelas e algumas bactérias formam associações relativamente estáveis e exclusivas com corais, já as outras associações são menos específicas (WEGLEY et al., 2007).

O núcleo de um animal saudável é uma relação dinâmica, controlada e duradoura com microrganismos que passam a ser benéficos naquele sistema, os genomas combinados do holobionte formam um hologenoma e suas interações genéticas podem contribuir para definir o fenótipo do coral, fundamental para a sua sobrevivência no meio. Esses microrganismos contribuem para a fertilidade do coral, homeostase, modulam a diversidade, o padrão e a distribuição de seus simbiontes (BOURNE; MORROW; WEBSTER, 2016) .

Microrganismos que vivem no interior de substratos rochosos, como conchas de animais bivalves ou em corais, podem ser denominados endolíticos e são comumente encontrados habitando o exoesqueleto dos pólipos de corais. Entretanto, sua diversidade é pouco caracterizada, pois são difíceis de serem identificados pelos métodos usuais de microscopia e sequenciamento tradicional, apresentando inclusive, baixa resolução taxonômica com grande perda da representatividade, constituindo assim um grande desafio representar a comunidade total (MARCELINO; VERBRUGGEN, 2016).

Ainda segundo Marcelino et al. (2017), em esqueletos de corais há uma diversidade biológica endolítica ainda pouco explorada, onde as bactérias, algas verdes e os fungos são os habitantes mais facilmente encontrados.

A relação de algas e fungos endolíticos em corais saudáveis é equilibrada, mas se os recifes são expostos a estresse ambiental esse equilíbrio é rompido e a relação, outrora estabelecida, passa a ser prejudicial à saúde dos corais (GOLUBIC; RADTKE; CAMPION-ALSUMARD, 2005).

Os corais hermatípicos e as algas coralíneas abrigam em seu interior uma comunidade micológica diversificada. São protegidas do ambiente externo, suportam níveis muito baixos de luz, flutuações diárias extremas de pH e de níveis de oxigênio. Portanto, essa diversidade é vital para a saúde e resiliência dos recifes, sendo assim este habitat endolítico contém, um sistema microbiológico característico (BLACKALL; WILSON; VAN OPPEN, 2015).

Os fungos realizam funções ecológicas importantes em ecossistemas terrestres e marinho. No entanto, Amend et al. (2012), apontam que é a comunidade menos conhecida do coral. Sua presença e associação com animais marinhos, como o coral são descritas de forma geral, mas informações sobre a extensão da diversidade de fungos associados, ainda necessitam de muitos estudos.

2.5 Micobioma endolítico

O micobioma é caracterizado pela comunidade fúngica que habita um ecossistema. Os organismos do Reino Fungi desempenham papéis essenciais na maioria dos ecossistemas. São eucarióticos, possuem paredes celulares formada principalmente de quitina e formam propágulos quitinosos resistentes (esporos). A obtenção de nutrientes acontece pela heterotrofia absorvativa. É um grupo com grande diversidade morfológica, ecológica e em seus ciclos reprodutivos (KAVANAG, 2005).

Em esqueletos calcários de corais, os fungos endolíticos são onipresentes e distribuídos globalmente, derivam sua nutrição da matriz orgânica de seus esqueletos de (CaCO₃). Sob condições normais de simbiose, fungos e corais vivem em equilíbrio de comensalismo ou mutualismo (AMEND et al., 2012).

Os fungos marinhos são um grupo ainda relativamente pouco estudado quando comparados com outros tipos de fungos terrestres. A diversidade de habitat e taxonômica de fungos constitui a base para a exploração da biotecnologia fúngica marinha (DAMARE;; SINGH; RAGHUKUMAR, 2012).

A maioria dos fungos identificados em corais descritas por Golubic et al. (2005) são marinhos facultativos, anteriormente reconhecidos somente como fungos terrestres, e foram isolados em corais de muitas partes do mundo.

Os fungos endolíticos se associam ao coral poucas horas após a larva do pólipó se instalar no recife, posteriormente colonizam completamente o esqueleto do coral e crescem com o esqueleto se posicionando logo abaixo dos tecidos do coral (ROSENBERG et al., 2007).

A presença de fungos no ambiente marinho é conhecida já faz algum tempo, mas pesquisas sobre sua diversidade encontram ainda muitos desafios. As espécies de fungos endolíticos em ecossistemas marinhos são mais conhecidas por causar bioerosão significativa e doenças em animais aos quais se associam (Gleason et al., 2017), o que demonstra que os fungos nesse ambiente precisam ser melhor caracterizados.

Fungos endolíticos, podem, por vezes, ser observados *in vivo* crescendo nas estruturas calcárias através de técnicas especializadas de microscopia. Entretanto, sua correta identificação nem sempre é fácil. Alguns fungos diferem somente em características sutis: detalhes da estrutura, de pigmentos e dos compostos orgânicos. Sendo assim, métodos tradicionais de cultivo para a visualização de todos os estágios de seus ciclos de vida muitas vezes foram necessários e muito do que é conhecido sobre a diversidade de fungos foram baseados em culturas de fungos terrestres (RICHARDS et al., 2012)

As técnicas de identificação tradicionais são ainda muito utilizadas nos estudos de fungos. No entanto, possuem limitações que dificultam a identificação de novas espécies. Para Woo et al. (2008), a maioria dos microrganismos não são capazes de crescer fora do seu ambiente natural, isso torna a identificação bem restritiva ao selecionar apenas uma pequena fração da comunidade. Além disso, organismos raros ou que ainda não foram descritos podem não ser identificados usando amostragem tradicional (REES et al., 2014).

Estimativas apontadas por Hyde e Soytong (2008) sugerem que apenas cerca de 1% dos microrganismos são capazes de crescer nos meios de cultura atualmente utilizados. Nesse contexto, as técnicas moleculares estabelecem papel fundamental em pesquisas avançadas que se propõem a desvendar a dinâmica das comunidades microbianas, de vida livre ou associadas a um hospedeiro. Microrganismos são as formas de vida mais diversas e abundantes do planeta, ocupam variados ambientes, mas a grande maioria não se desenvolve quando cultivados em meios artificiais (GILBERT; DUPONT, 2011).

O sequenciamento do genoma aumentou nossa compreensão do mundo biológico fornecendo modelos evolutivos e a diversidade funcional que moldam e estabelecem a vida. No entanto, os genomas de microrganismos atualmente disponíveis são de amplitude filogenética reduzida, devido à nossa incapacidade de cultivar a maioria dos microrganismos em laboratório (RINKE et al., 2013).

Com apenas uma pequena fração da comunidade fúngica conhecida, a compreensão do papel desses microrganismos nos ecossistemas pode ser aumentada com o advento das técnicas que vem sendo estabelecidas pela evolução genômica. A identificação de fungos associados a animais marinhos por métodos moleculares é ainda recente. Por isso muitas espécies com características únicas, bem como, seus papéis ecológicos não foram ainda descritos (YARDEN, 2014).

Os avanços tecnológicos nos permitiram aplicar métodos moleculares para desenvolver uma classificação estável, descobrir e identificar novos táxons fúngicos. Durante muito tempo os fungos foram convencionalmente classificados por estudos que combinavam observações macroscópicas e microscópicas sobretudo, pela observação de suas estruturas reprodutivas (RAGHUKUMAR, 2017).

Ao estudar um ecossistema, podemos entender sua composição biológica, capacidade metabólica e história evolutiva. A esse respeito, a Metagenômica é uma abordagem que permite conhecermos os genomas presente em uma comunidade de microrganismos, utilizado pela primeira vez em 1997, apresentada no estudo molecular da diversidade microbiana presente na biosfera. por (PACE et. al., 1997)

Os padrões de distribuição presentes em uma comunidade nos auxiliam a entender a abundância de espécies e as interações que ali se estabelecem, bem como realizar inferências evolutivas e análises da expressão gênica em determinadas condições. Desse modo, no campo da ecologia microbiana, a metagenômica, através da análise do sequenciamento genômico de todos os microrganismos de um determinado substrato, permite acesso a essa diversidade (LIN et al., 2016).

2.6 Metagenômica

A Metagenômica é o estudo dos genomas presente em uma amostra ambiental, acessível por meio de análise do DNA coletivo que permite a análise de organismos cultiváveis e incultiváveis por técnicas laboratoriais. É um tipo de abordagem com capacidade para representar o genoma comunitário das espécies presentes na amostra extraída de um determinado habitat (NESME et al., 2016).

Segundo Thomas, Gilbert e Meyer (2012), a Metagenômica aplica um conjunto de tecnologias ômicas e ferramentas avançadas de bioinformática para acessar diretamente o conteúdo genético de comunidades inteiras.

Foi desenvolvida com o objetivo de complementar os métodos de microbiologia clássica para compreendermos com maior representatividade a diversidade de microrganismos presente em um determinado ambiente, tendo em vista as evidências que apontam para a maioria dos microrganismos presentes nos diferentes ecossistemas como não cultiváveis (HANDELSMAN, 2004).

Os genomas são obtidos diretamente das amostras ambientais sem que sejam necessárias etapas prévias de isolamento e cultivo dos microrganismos, ampliando as chances de caracterizar melhor a comunidade. As técnicas metagenômica são executadas com base em sequenciamento por extração direta do material genético de uma amostra ambiental (KUNIN et al., 2008).

Sequenciamentos de nova geração (NGS) do material genético, surgem como excelente ferramenta com capacidade para monitorar a biodiversidade em qualquer ecossistema que se queira conhecer a composição da comunidade microbiana, aumentando a sensibilidade dos métodos de identificação, de modo a representar as

espécies, com metodologia para obtenção das amostras de modo mais simples e economicamente mais barato (COWART; MURPHY; CHENG, 2018).

As tecnologias de sequenciamento de amostras genéticas de alto rendimento (*high throughput*) geram grandes quantidades de dados que, juntamente com ferramentas avançadas desenvolvidas no campo da Bioinformática, permitiram grande desenvolvimento na área da biologia molecular e da ecologia microbiana nos últimos anos (NAVAS-MOLINA et al., 2013).

Explicar o papel do microbioma em recifes é uma nova fronteira na compreensão desse ecossistema que exigirá esforços de pesquisa colaborativa em larga escala e de maneira interdisciplinar (BOURNE; MORROW; WEBSTER, 2016).

Com as abordagens da metagenômica atual, uma mudança significativa ocorre no sentido de desvendar a composição, função e equilíbrio do microbioma e pode-se ainda obter caracterizações de comunidades totais de modo mais profundo (MARTINS et al., 2013).

As tecnologias NGS buscam resgatar a composição biológica de determinada comunidade e a retrata de forma “aproximada”, as amostras devem ser capazes de representar a comunidade de onde elas foram retiradas, levando-se em consideração um conjunto de metadados, com informações relevantes relacionadas as amostras e aos locais de coleta. Coletar dados associados com uma amostra ambiental melhora bastante a habilidade de interpretar as sequências (DELONG, 2006).

Em metagenômica, duas metodologias são tipicamente usadas: 1) Amplicon, estudo de diversidade que utiliza sequências curtas de regiões genômicas e marcadores amplificados; 2) Shotgun, o DNA total é extraído, fragmentado e sequenciado, além disso, essa metodologia permite montar e analisar os fragmentos metagenômicos a fim de identificar, além da diversidade dos microrganismos ali presentes, novas regiões genômicas. (DELMONT et al., 2011).

A obtenção das amostras a serem sequenciadas é uma etapa muito importante em toda pesquisa que envolve metagenômica e é fundamental para se obter alta eficiência de amplificação nos protocolos de sequenciamento (KUNIN et al., 2008).

Posteriormente, o processamento das amostras possibilita a extração do material genético que inclui: fragmentação e purificação das amostras, que deverão ser separadas das demais estruturas celulares, precipitadas e suspensas em água ultrapura ou soluções-tampão específicas (OLIVEIRA, 2007).

O sequenciamento das amostras já processadas é realizado em sequenciadores de alto desempenho, com tecnologias que possibilitam a decodificação de cada base, com leituras de diferentes tamanhos de sequências (reads), com capacidade de gerar o resultado em poucas horas com milhões de pares de bases (VOLLMERS; WIEGAND; KASTER, 2017).

As sequências genéticas correspondem à uma sequência linear de nucleotídeos ou aminoácidos, que em determinada posição da sequência estará presente apenas um dos nucleotídeos ou aminoácidos possíveis, dessa forma, as sequências obtidas podem ser atribuídas a um determinado organismo com alto grau de resolução taxonômica, através de buscas por similaridades entre as sequências metagenômicas e as sequências genômicas de referência depositadas em grandes bases de dados (SCZYRBA et al., 2017).

Os dados obtidos das diferentes técnicas metagenômicas são essenciais para análises integradas de comunidades microbianas. Nessa perspectiva, os organismos vivos passam a ser vistos como sistemas compostos por milhares de unidades complexas, organizadas e interdependentes, tais como genes, proteínas e metabólitos. Conhecer melhor quais são os microrganismos ali presentes, como interagem entre si e com o hospedeiro e ainda, como e para quais finalidades produzem determinados compostos, constitui o fundamento da metagenômica atual (ANDREOTE et al., 2012).

Uma análise muito comum, utiliza os dados metagenômicos em agrupamentos de sequências denominadas Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs). As sequências atribuídas as OTUs podem ser usadas para estimar espécies, diversidade, composição, riqueza e podem inclusive ser útil na análise de comunidades microbianas menos estudadas. (CHEN et al., 2013).

Embora muitas pesquisas dependam da identificação de espécies Hebert et al. (2003), afirmam que uma excelente perspectiva capaz de identificar de forma confiável, econômica e acessível é o sistema que usa sequências de DNA como "códigos de barras". Sua implantação também produz importantes novos direcionamentos sobre a diversificação da vida e as regras da evolução molecular.

Nesse sentido, a identificação correta de uma comunidade ambiental pode ser feita com base em sequenciamento de metacódigos de barras e assim alcançar resultados precisos em pouquíssimo tempo se existe um banco de dados de referência, onde são realizadas buscas por identidade, similaridade, homologia entre outras (ROBIDEAU et al., 2011).

2.7 Metagenômica de Amplicon

As análises de sequências codificadoras das regiões de interesse (Amplicon), tornaram-se uma das abordagens mais importantes em projetos com o propósito de conhecer a diversidade microbiana. É crescente, a caracterização por amplificação apenas de regiões específicas, que são amplificadas por Reação da Cadeia em Polimerase (PCR), como, por exemplo, 16S para os microrganismos procaríotos, 18S para quaisquer organismos eucariotos e regiões espaçadoras internas transcritas (ITS) para fungos (SCHOCH et al., 2012).

Os métodos baseados em Amplicon, com o sequenciamento apenas da região alvo geram menores quantidades de dados, possuem custos menores na preparação da biblioteca e de sequenciamento, permitindo o conhecimento da composição e abundância de uma comunidade microbiana. O sequenciamento Amplicon 18S de sequências de DNA ribossômico (rDNA ou nSSU subunidade nuclear pequena) foi projetado para amplificar eucariotos de modo amplo (AMARAL-ZETTLER et al., 2009).

Ainda segundo Damashek e cols. (2015), os espaçadores internos transcritos (ITS), apresentam a probabilidade maior de uma identificação bem apurada para uma ampla variedade de fungos, inclusive em relação a diversidade marinha. Porém, quando consideramos a metagenômica de Amplicon como importante ferramenta na compreensão das comunidades microbianas, os estudos sobre o microbioma endolítico de recifes biogênicos ainda são raros.

Fica evidente que ter uma identificação rápida e precisa de espécies fúngicas é vantajoso para muitos campos, incluindo conservação e uso sustentável da biodiversidade, monitoramento ecológico, prevenção e controle de patógenos fúngicos. Além disso, a metagenômica de amplicon pode ser usada para identificar novas linhagens de fungos e ajudar em estudos futuros de biodiversidade (XU, 2016).

Entretanto, nenhuma abordagem isolada é capaz de oferecer uma visão completa da comunidade microbiana. A escolha de qual abordagem utilizar é geralmente ditada pela natureza dos estudos a serem realizados e obtém sucesso quando o desenho experimental é bem delineado. Por exemplo, 16S rDNA é bem adequado para a análise de um grande número de amostras, como estudos longitudinais, mas oferece uma resolução limitada, geralmente a nível de gênero e poucas espécies (SOERGEL et al., 2012).

3. JUSTIFICATIVA

Organismos bioconstrutores de recifes apresentam um papel indiscutível na formação dos ecossistemas recifais. Os recifes são importantes em termos de biodiversidade, de serviços e produtos utilizados pela sociedade. Nas últimas décadas, têm recebido uma maior atenção, por causa do estado de degradação avançado que apresentam, exigindo grandes esforços para sua preservação.

Processos que levaram a mudanças climáticas, como o aumento da temperatura global, acidificação oceânica e outras ações antrópicas, fizeram com que esses ambientes ganhassem, em certa medida, olhares mais atentos, principalmente pelo entendimento de que eles podem estar em risco de desaparecer mundialmente. Estudos recentes sobre o fenômeno de branqueamento, aumento da temperatura devido ao aquecimento global, diminuição do pH oceânico e morte dos recifes apontaram que em poucos anos pode ocorrer, inclusive, a extinção de muitas espécies, se medidas viáveis de conservação não forem adotadas.

Além disso, a compreensão de que a contínua degradação desse ecossistema implicará em perdas significativas de recursos e trará consequências desastrosas para a sociedade em nível mundial nos leva a pensar que desenvolver medidas de proteção e manutenção sejam talvez uma maneira eficaz para manter os recifes vivos e saudáveis. Desse modo, entende-se que conhecer profundamente um ecossistema é o primeiro passo para propor medidas efetivas na tentativa de preservá-lo.

Como medida inicial podemos resgatar a diversidade biológica que compõe o microbioma endolítico presente em corais e algas coralíneas ao complementar outros estudos que já vem sendo desenvolvidos com essa perspectiva, através do sequenciamento da comunidade onde a bioinformática e a metagenômica assumem uma posição central. Nesse campo, a metagenômica é uma abordagem robusta de acesso a essa diversidade e abre novas perspectivas ecológicas com auxílio da Bioinformática.

Algas vermelhas e corais zooxantelados são os dois organismos construtores de recifes com maior produtividade de estruturas de carbonato de cálcio. Entretanto, estudos de diversidade que buscam desvendar a composição e a contribuição dos fungos nesse microbioma são insuficientes para entendermos as interações entre o microbioma e recifes.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo geral do nosso estudo foi investigar a diversidade do microbioma endolítico em corais hermatípicos e algas coralíneas, os principais organismos bioconstrutores de recifes, nas regiões da Oceania: Austrália, Papua Nova Guiné e Nova Caledônia através da metagenômica de amplicon 18S rDNA.

Objetivos Específicos

1. Identificar os táxons de fungos endolíticos;
2. Comparar a incidência (presença/ausência e abundância relativa) desses fungos endolíticos em diferentes hospedeiros e áreas de estudo.
3. Verificar se há um padrão de distribuição de fungos capaz de formar grupos-chave no sistema de recifes.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Coleta, extração e sequenciamento

A coleta das amostras, a extração do material genético e o sequenciamento metagenômico utilizados no presente estudo foram realizados pela equipe do Prof. Dr. Heroen Verbruggen, coordenador do Laboratório de Biociências da Universidade de Melbourne na Austrália, que gentilmente nos cedeu os dados brutos do sequenciamento.

Os dados sequenciais, *a priori*, foram obtidos para o projeto que atualmente, se concentra em revelar a diversidade evolutiva das algas marinhas, com enfoque na sua filogenética, modos geográficos de especiação, macroecologia, biodiversidade, biologia molecular e computacional.

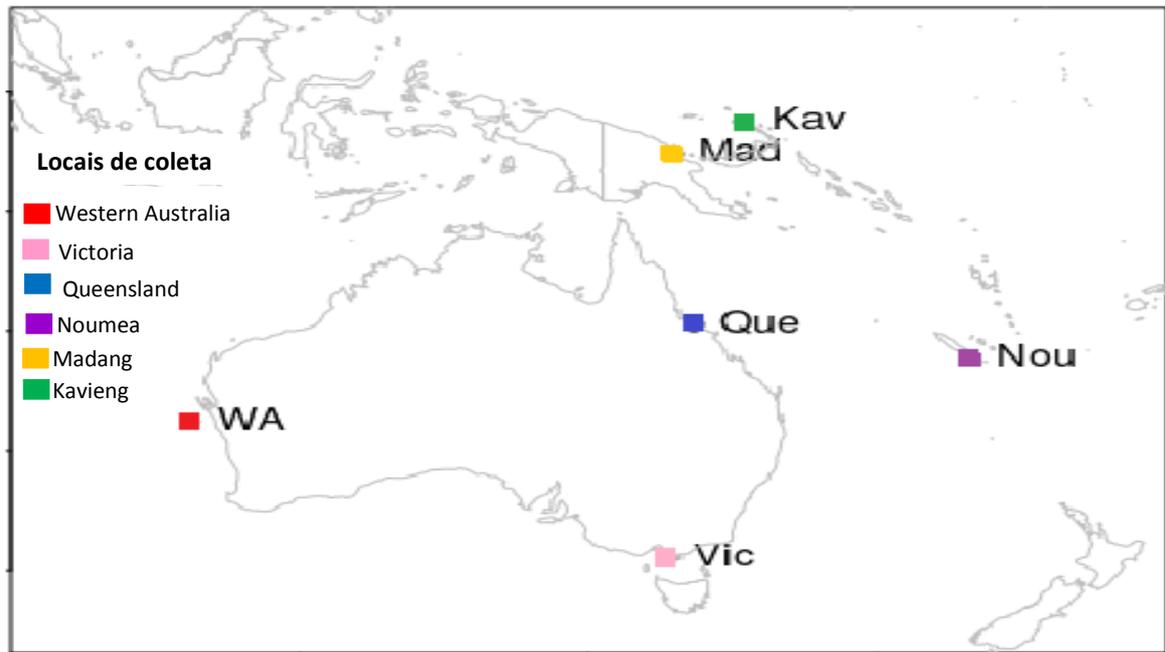
Estudos no campo da metagenômica, geralmente, exigem grupos de pesquisa que colaboram entre si e desenvolvem trabalhos em parceria. Desse modo, esse trabalho faz parte de uma rede colaborativa internacional que envolveu laboratórios de pesquisa da Austrália e Brasil.

A rede foi estabelecida entre o Laboratório de Biologia Molecular e Computacional de Fungos (LBMCF) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob a coordenação do Prof. Dr. Aristóteles Góes Neto, em associação com a Prof. Dr^a. Fernanda Badotti do Centro Federal Tecnológico de Educação de Minas Gerais (CEFET-MG) e o Laboratório de Biociências da Universidade de Melbourne chefiado pelo Prof. Dr. Heroen Verbruggen.

As coletas das amostras, fragmentos de recifes de águas rasas tropicais, foram realizadas em três países da Oceania, o continente com o maior conjunto de ilhas do planeta: Austrália, Papua Nova Guiné e Nova Caledônia, em 6 localidades (Figura 1): Western Australia, Victoria e Queensland, que ficam na Austrália, Madang, e Kavieng que ficam na Papua Nova Guiné e Noumea que atualmente é capital da Nova Caledônia.

A quantidade de fragmentos dos recifes coletados, foram diferentes, entre as regiões, pois, a proposta principal era estabelecer uma base sólida da biodiversidade da comunidade endolítica. Assim, ficou delineado não focar em amostras sistemáticas para fins de estudos comparativos.

Figura 1: Mapa com as 6 localidades onde as amostras forma coletadas.



A amostragem, 132 amostras de fragmentos de recifes, macroscopicamente saudáveis, foi projetada para estabelecer uma representatividade adequada da biodiversidade do microbioma de recifes, presente nos esqueletos calcários dos corais e em tecidos de algas coralíneas, os principais organismos construtores desses recifes.

As amostras foram coletadas pela pesquisadora Dr^a Vanessa Rosseto Marcelino, membro da equipe do Prof. Dr. Heroen Verbruggen. Dessa forma, buscou-se ampliar as chances de representar espécies endolíticas nesse habitat incomum e de difícil acesso.

Após a coleta realizou-se o processo de extração do material genético. Os tecidos dos fragmentos de recifes foram removidos (Fig. 2), com alicates e lâminas de barbear. Posteriormente, as amostras foram acondicionadas em solução de etanol 100%. Extraiu-se o DNA ambiental através do protocolo modificado de Cremen et al. (2016).

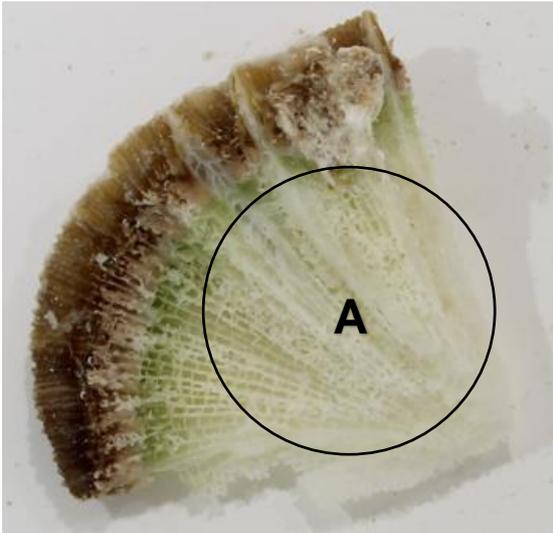


Figura 2: Foto de um fragmento de coral coletado. **A**: área do tecido extraído.

Para a purificação do DNA utilizou-se o Kit de Purificação de DNA Genômico Wizard Promega, com uma pequena modificação: incubou-se pequenos fragmentos de recife no tampão de lise por 3 horas sem triturar a amostra, após, seguiu-se então, as instruções do fabricante para o tecido padrão.

5.2 Pré-processamento e preparo da biblioteca

O sequenciamento metagenômico das amostras foi realizado na plataforma Illumina MiSeq (2 x 300 pb). A saída do sequenciamento metagenômico, contendo 4.102.867 sequências, foi um arquivo FASTQ (“18S.fastq”) e um arquivo de texto com o codinome de cada amostra (“sample_names”). Para identificar os táxons e em quais amostras eles ocorrem, usamos um pipeline que foi escrito em linguagens Bash e Lua, e, usamos os programas VSEARCH (versão 2.5.1) e BLAST (versão 2.6.0).

O pipeline é subdividido em: (1) preparar banco de dados de referência; (2) separar as sequências por amostra; (3) filtragem; (4) desrepliação; (5) mover sequências para um arquivo único; (6) agrupamento; (7) classificação de OTUs; (8) gerar tabela de resultados.

O VSEARCH é um programa de código aberto utilizado para processar e preparar dados de sequências nucleotídicas metagenômicas e genômicas, projetado para ser uma ferramenta alternativa do USEARCH, amplamente utilizado mas, para o qual o código fonte não se encontra publicamente disponível. O programa utiliza uma heurística baseada em sequências de consulta e de destino, a fim de identificar as sequências similares. Ele executa o alinhamento global, além de agrupamento por semelhança, busca de sequências quiméricas, desreplicação, classificação e subamostragem.

Já o BLAST, é um programa de pesquisa de alinhamento local, desenvolvido para realizar buscas por segmentos das sequências biológicas que são comparadas contra um grande banco de dados de referência. Muito utilizado na Bioinformática, o BLAST está hospedado na página do NCBI, executa o alinhamento e retorna sequências similares e estatisticamente significativas.

Tabela 1: Programas utilizados para identificação das OTUs.

| Programas | Versão |
|------------------|-------------------|
| VSEARCH | (2.5.1) |
| BLAST | (v. 2.6.0) |

Banco de dados de referência

Para identificar as sequências buscou-se o banco de dados de referência, contendo sequências já conhecidas, com as quais foram possíveis comparar nossas sequências por meio de similaridade. Para utilizar os dados do banco de referência, foi feito o download das sequências de fungos 18S do NCBI no formato FASTA.

Tabela 2: Base de dados consultados.

| |
|----------------------|
| NCBI database |
|----------------------|

Os termos de pesquisa para obter as sequências foram:

```
18S[All Fields] NOT uncultured[All Fields] AND (fungi[filter] AND ("2000/01/01"[PDAT] : "2018/01/31"[PDAT]))
```

Após o download, foi utilizado o BLAST para fazer o alinhamento com o banco de dados de referência, utilizado posteriormente na etapa de identificação. O alinhamento de sequências consiste em comparar duas sequências, que podem ser de nucleotídeos, de maneira que poderão ser observadas seu nível de identidade.

Os comandos utilizados para baixar o banco de dados de referência compatível com o BLAST foram:

```
makeblastdb -dbtype nucl -in $NCBI.fasta
```

Sequências por amostra

Como todas as sequências estavam em um único arquivo, foi necessário separar as sequências por amostra. Criou-se um arquivo para cada nome de amostra contido no arquivo “sample_names” e as seqüências do arquivo “18S.fastq” foram transferidas para o arquivo da amostra a que pertenciam.

Isso foi feito especificamente para auxiliar a etapa de desreplicação, pois ao manter essas amostras no mesmo arquivo durante a etapa de desreplicação, havia a possibilidade de perda de informações de que um determinado táxon também ocorreu em uma amostra específica.

Filtragem

Para realizar a filtragem das sequências que apresentavam baixa qualidade, como, por exemplo, sequências com menos de 300 pares de bases (pb) e de acordo com os parâmetros estabelecidos, foi utilizado o programa VSEARCH.

Os comandos utilizados para executar esta etapa foram:

```
vsearch --threads 4
--fastq_filter $ INPUT.fastq
--fastq_maxee 0,5
--fastq_minlen 300
--fastq_maxns 0
--fastaout $ OUTPUT.fasta
--fasta_width 0
```

Desreplicação

Para tornar as etapas a seguir menos intensivas em recursos, foi utilizado o VSEARCH para desreplicar as sequências. Nessa etapa as sequências idênticas são mantidas, bem, como, as informações de quantas dessas sequências existem em cada grupo. A desreplicação não verifica se as sequências são da amostra antes de agrupá-las. Por isso, o passo seguinte foi separar as sequências por amostra, realizado para evitar que o processo de desreplicação agrupasse sequências de diferentes amostras.

Com cada sequência em seu respectivo arquivo de amostra, a desreplicação ocorre apenas com sequências da mesma amostra. O nome da amostra a que cada sequência pertence também foi adicionado ao cabeçalho da sequência. Isso nos permitiu recuperar mais tarde em qual amostra cada OTU ocorreu.

Os comandos utilizados para essa etapa de desreplicação foram:

```
vsearch --threads 4
--derep_fulllength $INPUT
--strand plus
--output $OUTPUT
--sizeout
--relabel $SAMPLE_NAME
--fasta_width 0
```

Sequências movidas para um único arquivo

Todas as sequências foram mescladas em um único arquivo antes do clustering. A mesclagem se justifica mediante os seguintes apontamentos:

1. Se o mesmo táxon ocorrer em duas ou mais amostras, aumenta-se o tamanho da amostra, o que resulta em um melhor agrupamento.
2. Os clusters serão mais representativos: as sequências do mesmo táxon terão maior probabilidade de cair no mesmo cluster.
3. Redução das chances de atribuição de um táxon errado as sequências, uma vez que as sequências estão em clusters mais representativos.

O comando utilizado nesta etapa foi:

```
cat $INPUT.fasta >> all_samples.fasta
```

Agrupamento

O VSEARCH foi utilizado para agrupar sequências com pelo menos 98% de identidade, o que gerou um arquivo FASTA contendo as OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais) e um arquivo com informações sobre cada grupo formado.

Os comandos executados para esta etapa foram:

```
vsearch --threads 4
  --cluster_fast "$OUTPUT_DIR"/all_samples.fasta
  --id 0.98
  --sizein
  --sizeout
  --relabel "otu_"
  --uc $OUTPUT.uc
  --centroids otus.fasta
```

Identificação

O BLASTN foi utilizado para comparar as sequências geradas com o banco de dados de referência do BLAST. Foram classificadas apenas sequências com pelo menos 97% de similaridade e pelo menos 90% de cobertura.

O comando para executar esta etapa foi:

```
blastn -num_threads 4
       -db $REFERENCE_DATABASE
       -qcov_hsp_perc 90.0
       -perc_identity 97.0
       -query otus.fasta
       -outfmt '6 qseqid stitle pident'
-out taxonomy.blast
```

Formato de saída dos resultados

Para gerar a tabela de resultados foram criados comandos escritos em linguagem Lua. A saída com os resultados de identificação gerou uma tabela no formato CSV (Comma-Separated Values), com uma lista de cada OTU identificada e em qual amostra elas ocorrem, o valor de similaridade com a referência e sua abundância.

5.3 Análise de diversidade das sequências e padrões de ocorrência

As sequências foram agrupadas em OTUs com uma identidade mínima de 97%, o que corresponde a classificação a nível de espécie.

A seguir, as sequências de cada OTU classificada foram manualmente analisadas nos seguintes programas NCBI, BLASTN, UNITE, MOLEBLAST, com o objetivo de certificar se as OTUs pertenciam realmente ao Reino Fungi.

Dessa maneira cada arquivo gerado pelos referidos programas foi salvo segundo o modelo abaixo:

1. OTUXXX NCBI Blastn
2. OTUXXX Mycobank
3. OTUXXX UNITE
4. OTUXXX MOLEBLAST

Posteriormente, realizou-se uma análise de agrupamento hierárquico, utilizando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) e o índice de semelhança de Gower utilizando-se o programa PAST v. 3.0 (Hammer et al., 2001).

A matriz de dados foi composta de 165 linhas (combinação vetorial entre as variáveis das colunas) e 3 colunas (OTU, Localidade de Coleta e Hospedeiro). Esse método de estatística multivariada foi utilizado com o objetivo de revelar padrões contido nos dados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo caracterizou o microbioma de organismos construtores de recifes, algas coralíneas e corais hermatípicos, na região da Oceania: Austrália, Papua Nova Guiné e Nova Caledônia; em seis localidades distintas (Western Austrália, Queensland, Victoria, Kavieng, Madang, Noumea). Foram coletadas 132 amostras fragmentos de recifes que se mostravam aparentemente saudáveis.

Toda a parte de coleta e sequenciamento foram realizadas pela equipe do Dr. Heroen Verbruggen, para o projeto que buscava identificar através da abordagem metagenômica, combinada com vários metacódigos, organismos endolíticos presentes em esqueletos de corais com foco em algas verdes.

As etapas de pré-sequenciamento e sequenciamento das amostras ambientais são muito importantes para o desenvolvimento de um estudo metagenômico, pois a qualidade das análises metagenômicas estão diretamente relacionadas com a qualidade do material genético a ser extraído (GREEN e KELLER, 2006).

Os dados utilizados para as análises de Bioinformática são provenientes de amostras sequenciadas pela metodologia de *metabarcoding* 18S rDNA. A região 18S rDNA é um metacódigo de barras de DNA comumente utilizado para organismos eucariotos em geral, conforme avaliou Porazinska et al. (2009) ao analisar espécies nematóides de diversidade desconhecida.

Nossa compreensão da complexidade dos fungos está se expandindo à medida que são utilizados cada vez mais métodos moleculares com o propósito de investigar a diversidade ambiental (RICHARDS et al., 2012).

O sequenciamento metagenômico realizado gerou como resultado um total de 4.102.867 sequências que são chamadas de “sequências brutas”. A obtenção de tais sequências foi o passo inicial do presente estudo, pois de posse desses dados deu-se início ao projeto para executar e gerar perfis taxonômicos da comunidade fúngica, presente nas sequências e nos possibilitou chegar aos resultados que descreveremos a seguir.

Inicialmente, foi necessário realizar o processamento de qualidade, das sequências brutas. Desse modo, as sequências que apresentavam características

inadequadas conforme os padrões descritos em materiais e métodos foram retiradas. Assim, as sequências com baixa qualidade foram excluídas das nossas análises. Após esse controle, foram obtidas 3.673.780 sequências.

A etapa seguinte, chamada de desreplcação, gerou como resultado 275.677 sequências.

Após a etapa de identificação das sequências foram geradas 13.502 grupos com perfis taxonômicos de fungos. Utilizamos buscas por similaridade contra o banco de dados de referências.

As sequências agrupadas que foram 97% semelhantes as sequências do banco de dados de referência foram atribuídas a um grupo taxonômico (gênero ou espécie) para cada região de coleta.

O número total de OTUs identificadas foi 165. A grande quantidade de OTUs não identificadas podem significar novas linhagens de fungos endolíticos marinhos, para as quais ainda não existe banco de referência. As poucas sequências NGS identificadas como sendo de fungos com atribuições taxonômicas precisas, com base em alinhamentos de sequência, ainda são um desafio computacional.

Outro fator limitante é a falta de organismos referência que são específicos em determinados habitats, como os fungos marinhos, complicando ainda mais a correta classificação taxonômica das sequências metagenômicas.

Embora o volume de dados metagenômicos depositados em repositórios públicos tenha aumentando de modo exponencial, ainda não existem padrões para métodos experimentais e computacionais necessários para analisar os grandes conjuntos de dados gerados (OULAS et al., 2015).

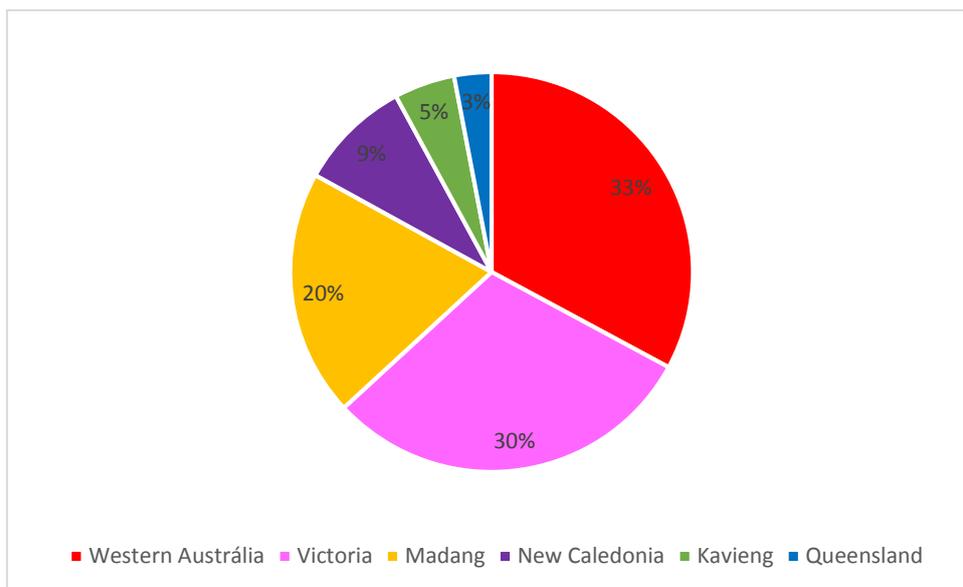
Outro fator que merece atenção quando se trata de análises de sequências metagenômicas é o desenvolvimento de pipelines de Bioinformática e o uso de ferramentas *online* com qualidade suficiente para se trabalhar com a complexidade dos dados gerados (DUDHAGARA et al., 2015).

Grupos clasificados com poucos representantes podem indicar que a comunidade fúngica presente está subestimada nesse conjunto de dados recuperados, além disso, pode significar que as abordagens atualmente disponíveis ainda não foram suficientes para identificar toda a comunidade de fungos endolíticos, por isso, novas ferramentas e diferentes abordagens seriam necessárias para estimar

a real diversidade dos fungos endolíticos presentes nas estruturas calcárias dos atuais recifes.

Nossos resultados demonstram que o componente fúngico do microbioma endolítico recifal é diverso, como revelado pela presença das 165 OTUs identificadas através do nosso pipeline, nas diferentes áreas de coleta (Figura 3)

Figura 3: Áreas de coleta e a distribuição (%) das OTUs identificadas



As regiões onde as coletas foram realizadas e a distribuição das OTUs em cada localidade começam a revelar a diversidade de fungos recuperadas nas diferentes localidades.

Na localidade Western Australia 54 OTUs foram identificadas, em Victoria 50 OTUs foram identificadas, em Madang 33 OTUs foram identificadas e em Nova Caledônia 15 OTUs foram identificadas, esse resultado reflete a maior quantidade de coletas realizadas nessas regiões. As outras duas regiões Kavieng com 8 OTUs identificadas e Queensland com 5 OTUs identificadas foram regiões com menor quantidade de coletas.

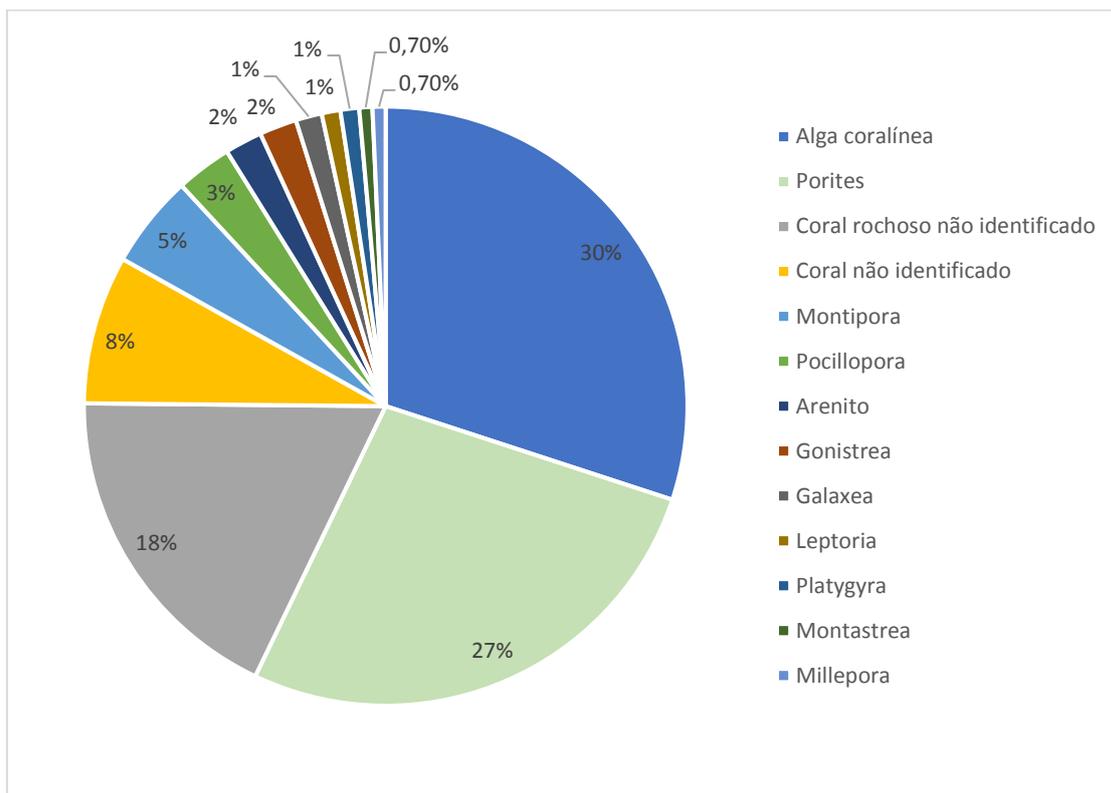
A diversidade de espécies que habitam os recifes é diferente entre as regiões do planeta segundo sua origem, sobreposição, acumulação e sobrevivência (BARBER; MEYER, 2015).

As sequências identificadas estavam presentes em treze tipos de hospedeiros (Figura 4) coletados de fragmentos de recifes em diferentes formações nas regiões de estudo.

As algas coralíneas (30%) e corais do gênero *Porites* (27%) foram os hospedeiros presentes em maior quantidade, observa-se também um tipo de coral rochoso (18%) que não foi possível identificar e um outro tipo de coral também não identificado (8%), o coral *Montipora* (5%), e o coral *Pocillopora* (3%) em concentrações maiores, os demais hospedeiros foram menos prevalentes.

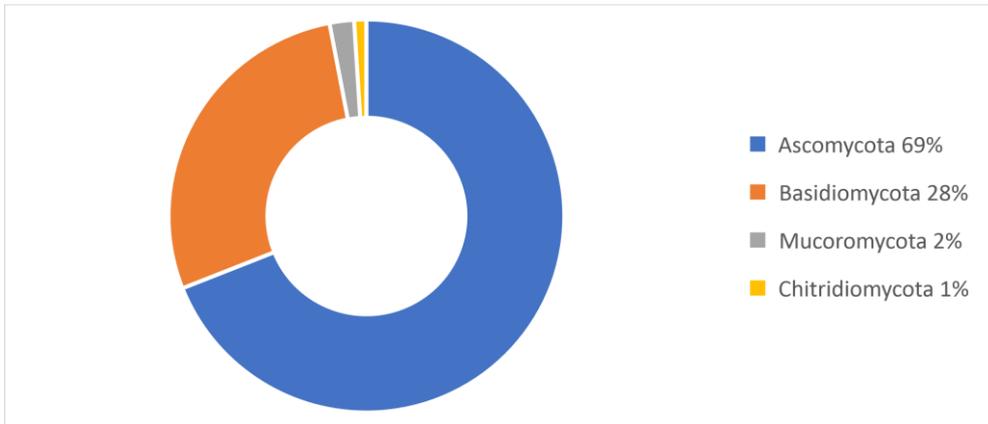
Em nossas análises também verificamos que o número total de OTUs recuperados nos hospedeiros variou entre 1 e 19 gêneros. As algas coralíneas com 19 gêneros de fungos endolíticos identificados e o coral do gênero *Porites* com 18 gêneros foram os hospedeiros que apresentaram a maior diversidade de fungos identificados.

Figura 4: Diversidades de hospedeiros nas localidades de coleta



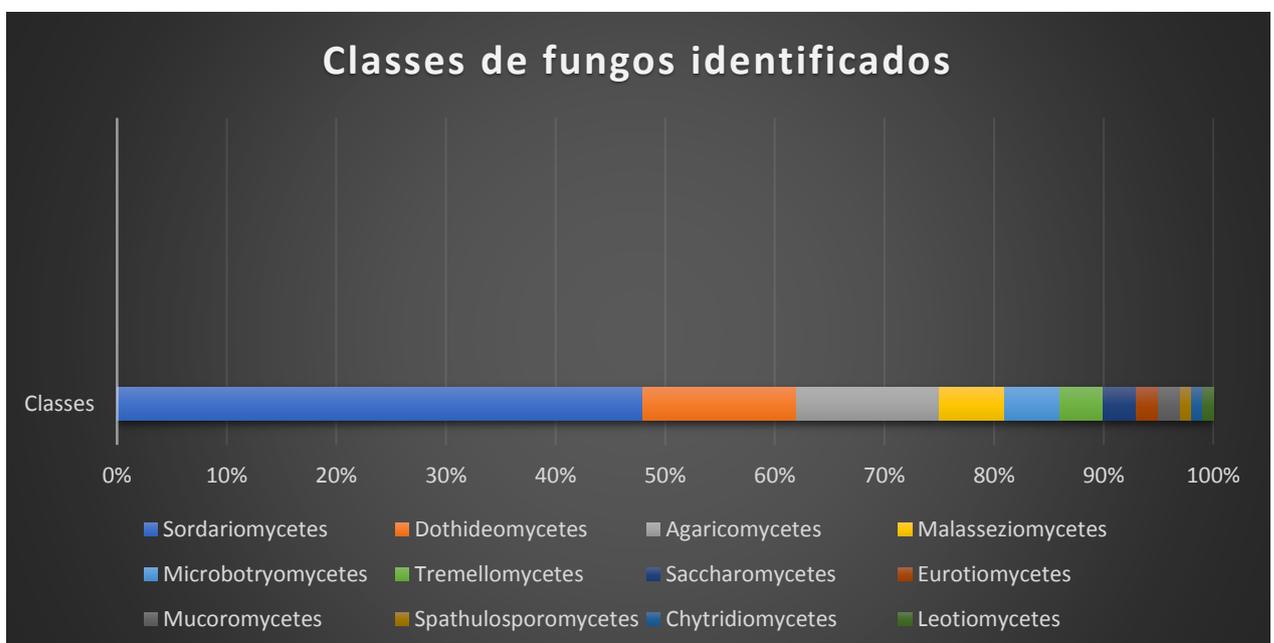
A classificação taxonômica das OTUs identificadas pertencem a quatro tipos de Filos (Figura 5) dos quais 69% são Ascomycota, 28% Basidiomycota, 2% Mucoromycota e 1% Chytridiomycota.

Figura 5: Filos dos fungos identificados

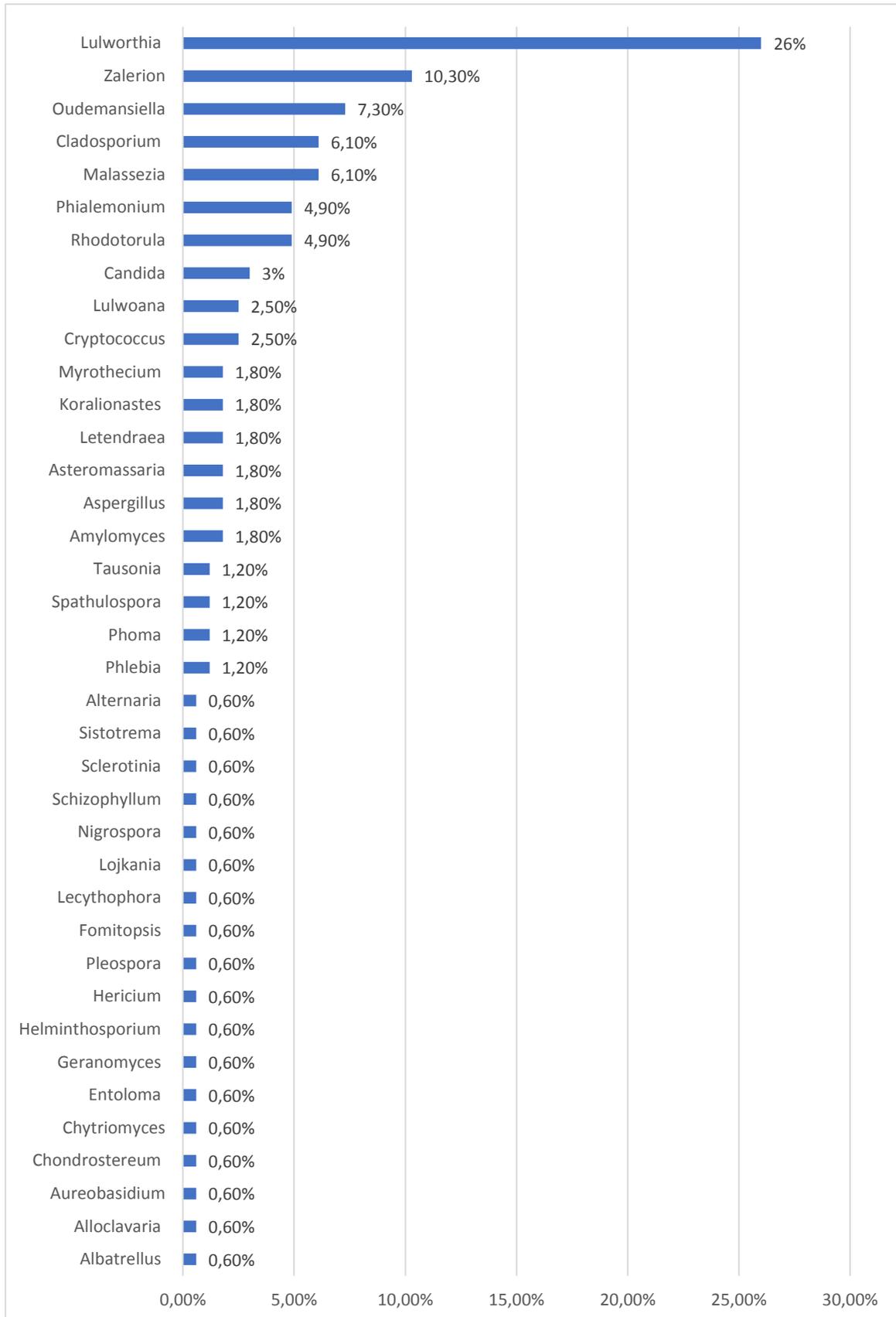


Os 38 gêneros identificados (Figura 6). se distribuem em doze classes. A classe dos Sordariomycetes foi a mais abundante, com quase metade dos fungos (48%) incluídos. Além da classe citada, relatamos a frequência das demais classes, Dothideomycetes (14%), Agaricomycetes (13%), Malasseziomycetes (6%), Microbotryomycetes (5%), Tremellomycetes (4%), Saccharomycetes (3%), Eurotiomycetes (2%), Mucoromycetes (2%), Spathulosporomycetes (1,2%), Chytridiomycetes (1,2%) e Leotiomyces (0,6%)

Figura 6: Classe de fungos identificados



A diversidade de fungos identificados é apresentada a nível de gêneros (Figura 7) onde observa-se a frequência total de cada gênero.



As seis localidades do estudo (TABELA 3), se apresentaram heterogêneas em relação aos hospedeiros e conseqüentemente diferem em microrganismos residentes. O fungo *Zalerion sp.* presente em 5 das 6 regiões, foi o gênero mais recorrente, *Candida sp.*, *Rhodoturoloa sp.*, *Phialemonium sp.*, *Malassezia sp.* e *Lulworthia sp.*, foram identificados em 4 das 6 regiões, *Cladosporium sp.*, *Oudemansiella sp.*, *Letendrea sp.*, presente em 3 das 6 regiões, *Amylomyces sp.*, *Aspergillus sp.*, *Cryptococcus sp.*, presente em 2 das 6 regiões, os demais gêneros ocorreram em uma única região.

Tabela 3: Distribuição dos gêneros de fungos identificados por localidade de coleta

| Fungo seq. 18S rDNA | W. Austrália | Queensland | Victória | Noumea | kavieng | Madannng |
|-----------------------------|--------------|------------|----------|--------|---------|----------|
| <i>Aerobasidium sp.</i> | | X | | | | |
| <i>Alternaria sp.</i> | X | | | | | |
| <i>Amylomyces sp.</i> | X | X | | | | |
| <i>Albatrellus sp.</i> | | | | | | X |
| <i>Alloclavaria sp.</i> | | | | | | X |
| <i>Asteromassaria sp.</i> | | | | | | X |
| <i>Aspergillus sp.</i> | X | | X | | | |
| <i>Candida sp.</i> | X | | X | X | | X |
| <i>Claudosporium sp.</i> | X | | | X | | X |
| <i>Chytriumyces sp.</i> | | | X | | | |
| <i>Cryptococcus sp.</i> | X | | | | | X |
| <i>Chondrostereum sp.</i> | | | | | | X |
| <i>Entaloma sp.</i> | X | | | | | |
| <i>Fomitopsis sp.</i> | | | | | | X |
| <i>Geranomyces sp.</i> | | X | | | | |
| <i>Helminthosporium sp.</i> | | | X | | | |
| <i>Hericium sp.</i> | | | | | | X |
| <i>Koralionastes sp.</i> | X | | X | | | |
| <i>Letendrea sp.</i> | X | | X | | | X |
| <i>Lecythopora sp.</i> | | | | | | X |
| <i>Lojkania sp.</i> | | | X | | | |

| | | | | | | |
|--------------------------|---|---|---|---|---|---|
| <i>Lulwoana sp.</i> | | | X | | | |
| <i>Lulworthia sp.</i> | X | | X | X | | X |
| <i>Malassezia sp.</i> | X | X | X | X | | X |
| <i>Myrothecium sp.</i> | X | | X | | | |
| <i>Nigrospora sp.</i> | | | X | | | |
| <i>Oudemansiella sp.</i> | X | | X | X | | |
| <i>Phlebia sp.</i> | | | X | | | X |
| <i>Phoma sp.</i> | | | X | | | X |
| <i>Phialemonium sp.</i> | X | | | X | X | X |
| <i>Pleospora sp.</i> | X | | | | | |
| <i>Rhodotorula sp.</i> | X | X | | X | | X |
| <i>Schizophyllum sp.</i> | | | | | | X |
| <i>Sclerotinia sp.</i> | | | X | | | |
| <i>Sistotrema sp.</i> | | | X | | | |
| <i>Spathulospora sp.</i> | | | X | | | |
| <i>Tausonia sp.</i> | | | | | X | |
| <i>Zalerion sp.</i> | X | | X | X | X | X |

Os recifes abrigam fungos que podem ser bem diferentes entre as regiões. Muitos fatores ambientais, conforme apresentado na revisão de literatura interagem entre e si de maneira complexa influenciando a distribuição desses organismos. Assim a contribuição de cada fator pode variar dependendo da identidade do hospedeiro.

O conhecimento sobre o microbioma ainda é bastante escasso, embora seja essencial para projeções sobre a conservação dos recifes. Outros estudos, incluindo outras espécies de hospedeiros, são ainda necessários para entendermos como fatores ambientais e biológicos podem influenciar as relações de interação entre recifes e fungos.

Compreender quais são os grupos de fungos presentes e quais são os fatores que levam à ocorrência de certos grupos em regiões específicas é fundamental para um melhor entendimento da natureza das relações ecológicas que ocorrem entre estes e os organismos construtores de recifes.

Na região Western Austrália, foram identificados sete hospedeiros (Figura 8), que apresentaram 3 filós de fungos (Figura 9).

Figura 8: Hospedeiros identificados em Western Australia

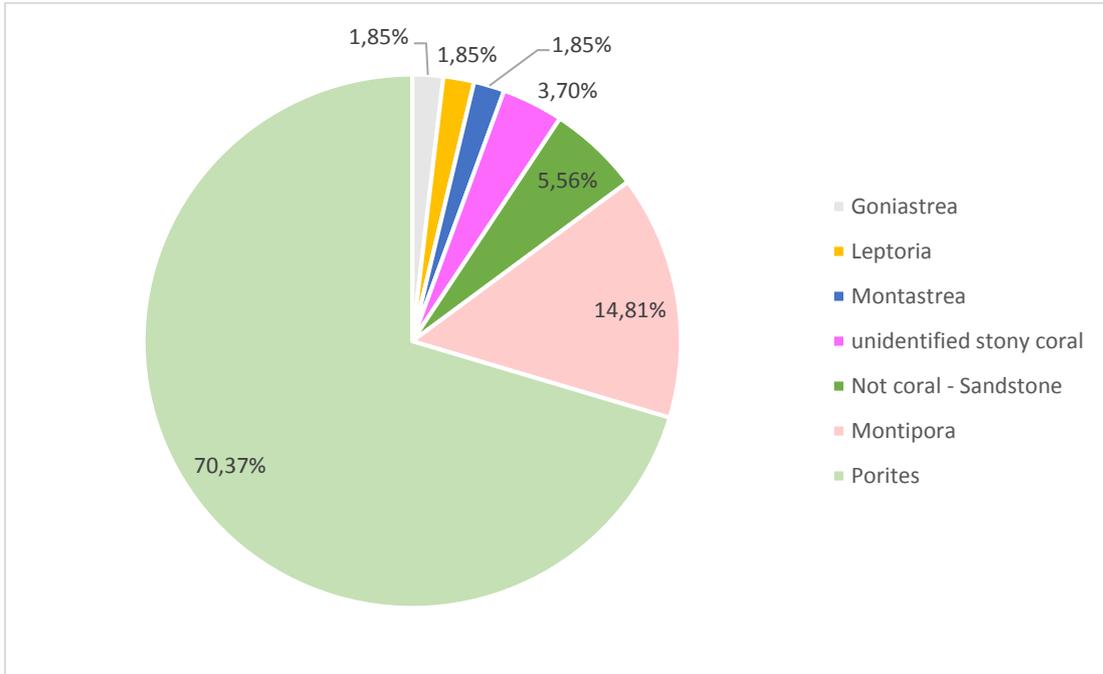
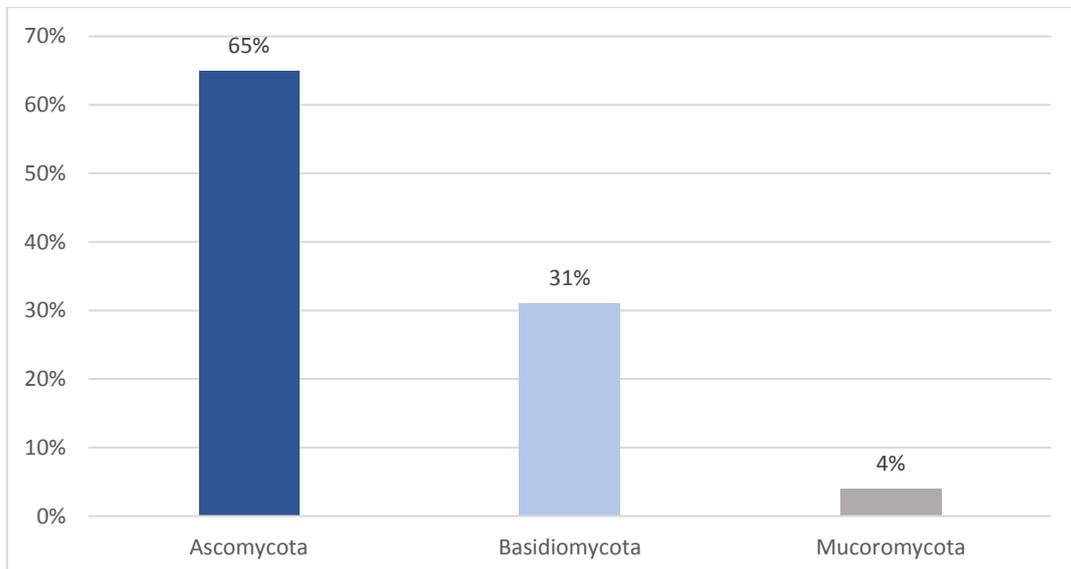
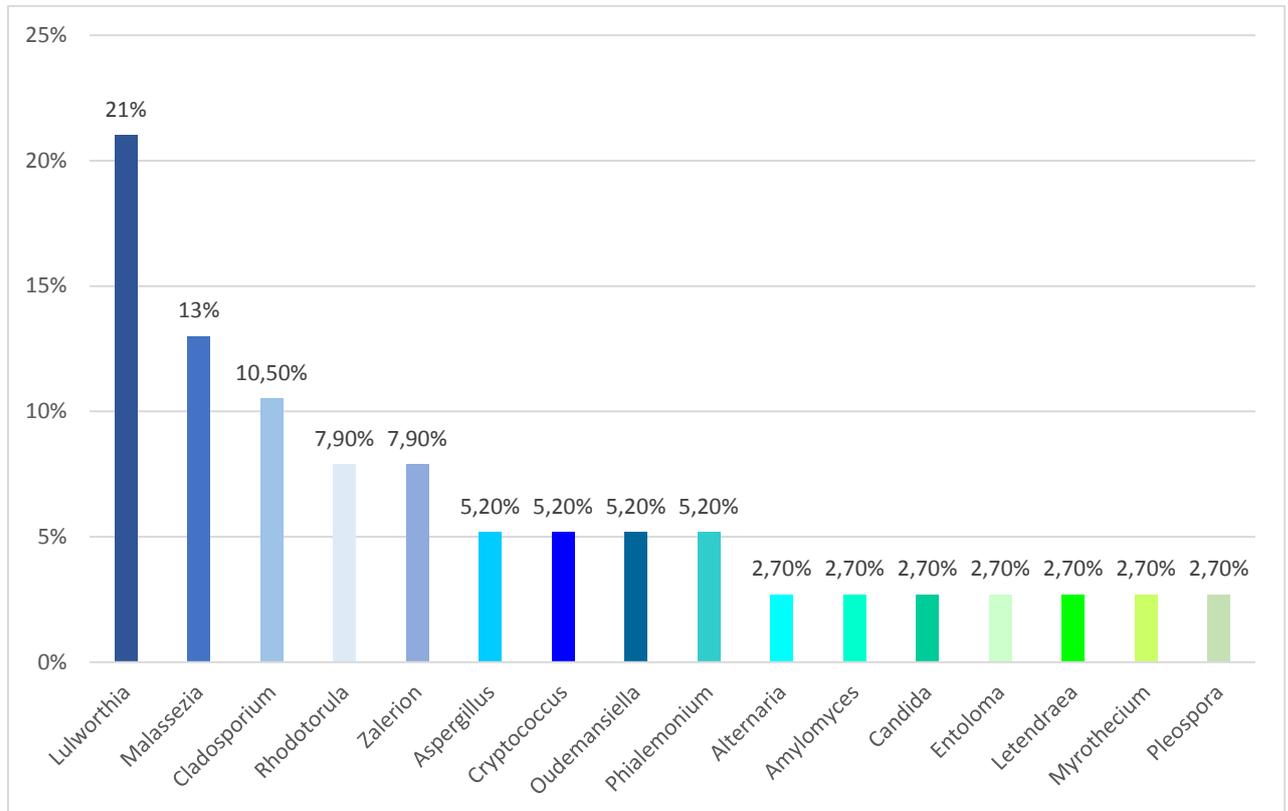


Figura 9: Filos de fungos identificados em Western Australia



O coral do gênero *Porites sp.* é o hospedeiro mais comum da região Western Australia (70,37%), com a maior abundância de gêneros de fungos identificados (dezesseis) apresentado (Figura 10).

Figura 10: Gêneros de fungos identificados em coral *Porites sp.* Western Australia.



Algumas das espécies aqui apresentadas são relacionadas a espécies encontradas e isoladas em estudos que se basearam em fungos marinhos, incluindo *Lulworthia sp.*, *Malassezia sp.*, *Myrothecium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Cladosporium sp.*, entre outros (JONES et al., 2015).

Todavia, para Hyde et al., (2000) não há consenso sobre a definição de fungos marinhos, ao nos apontar que o agrupamento de fungos identificados como marinhos foi feito primariamente com base em características ecológicas e não taxonômicas. A maioria dos fungos endolíticos de coral são fungos classificados como marinhos facultativos, pertencentes a espécies terrestres, isoladas e cultivadas dos tecidos dos corais de várias partes do mundo.

Em outros estudos, foram isoladas e identificadas espécies de *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium pullulans*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Hormonema dematioides*, *Phialophora bubakii* e *Phoma* ocorrem em uma variedade de corais escleractinianos saudáveis (Kendrick et al. 1982; Ravindran et al. 2001; Yarden et al. 2007).

Porém, descrições posteriores incluíram usualmente os seguintes termos: “derivados de ambientes marinhos” ou “associados ao ambiente marinho”, ou ainda “facultativo-marinho” ou “obrigatório-marinho (JONES, 2011).

Essa classificação agrupa de maneira mais adequada os fungos isolados diretamente de ambientes marinhos e amplia o grupo daqueles que foram anteriormente classificados como restritos ao ambiente marinho.

Claramente, nota-se que a diversidade de fungos em ambientes marinhos ainda necessita de padronização ou ainda critérios mais rigorosos capaz de fundamentar o grupo de fungos marinhos, embora um estudo recente de Jones et al. (2015) documenta 1.112 espécies de supostos fungos marinhos, incluindo detalhes de mudanças recentes de nomenclatura de ordem mais elevada ao nos apresentar novas famílias, gêneros e espécies descritas nos últimos cinco anos.

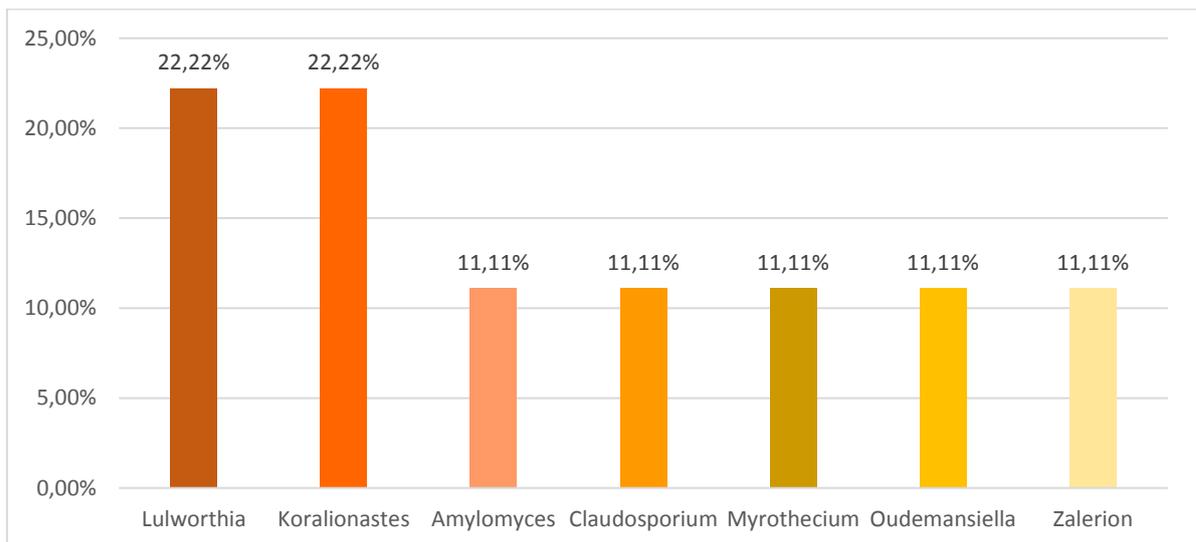
Os primeiros trabalhos que descreveram a presença de fungos em corais os consideravam somente como parasitas e os associavam com doenças em recifes. Foi verificado que as hifas dos fungos atacavam as algas endolíticas e eram capazes de lhes penetrar crescendo dentro delas, aparentemente as utilizando como hospedeiros alternativos. O branqueamento de corais ou outro tipo de estresse ambiental resulta em concentração de algas endolíticas que pode alterar as concentrações de fungos que em desequilíbrio estabelecem relação parasítica. O parasitismo maciço de fungos em algas produz bandas negras no coral e caracteriza colônias formadas por corais doentes (GOLUBIC; RADTKE; CAMPION-ALSUMARD, 2005).

Análises metagenômicas realizada por Wegley et al. (2007) no coral *Porites astreoides* identificou grupos de fungos altamente prevalentes em desempenhar possíveis funções em pelo menos dois processos no ciclo do nitrogênio no interior do coral, juntamente com outros microrganismos associados. Neste importante estudo, as sequências fúngicas associadas aos corais *P. astreoides* foram mais semelhantes aos Ascomycota (93%) e a maioria dos fungos estava na classe Sordariomycetes (77% para o 18S rDNA). Concluíram ainda que fungos do filo Ascomycota são encontrados em corais saudáveis de todos os lugares, embora, particularmente *Aspergillus sp.*, sejam conhecidos patógenos de corais.

Os resultados por nós apresentados parecem seguir o mesmo padrão em relação ao filo e classe de fungos mais abundantes onde os dados mostrados em relação ao filo Ascomycota e a classe Sordariomycetes corroboram estão de acordo com o trabalho realizado por Wegley et al. (2007) em corais saudáveis, mencionado acima.

Fragmentos de coral coletados em Western Australia do gênero *Montipora sp.* (Figura 11), apresentaram os mesmos gêneros de fungos que também estavam presentes no coral *Porites sp.*, coletado na mesma localidade, exceto o gênero *Koralionastes*.

Figura 11: Gêneros identificados no coral *Montipora sp* em Western Austrália



Muitos estudos demonstraram a composição de comunidades microbianas associadas ao coral, contudo há diferentes apontamentos que defendem ou contestam a especificidade do hospedeiro coral e a sua microbiota associada.

Vale destacar que meta-análises por sequência de comunidades ambientais são difíceis de serem estabelecidas por vários fatores, entre os quais ressaltam-se: 1) diferenças na amostragem; 2) diferentes técnicas e abordagens; 3) diferentes tecnologias usadas para definir a composição dos microbiomas. Entretanto, ao longo do tempo, técnicas complementares foram sendo desenvolvidas e usadas para definir associações mais específicas da microbiota do coral (KREDIET et al., 2013).

Na localidade de coleta Western Austrália, foram classificados dois gêneros em fragmentos de arenito (Figura 12). Já em um outro hospedeiro coral rochoso não identificado, da mesma localidade, foram classificados outros dois gêneros de fungos (Figura 13).

Figura 12: Gêneros identificados no arenito Western Austrália.

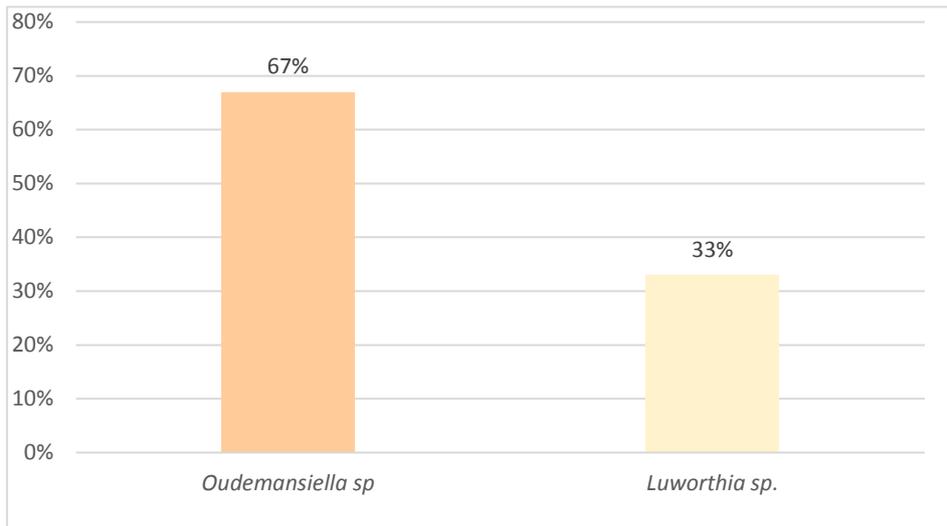
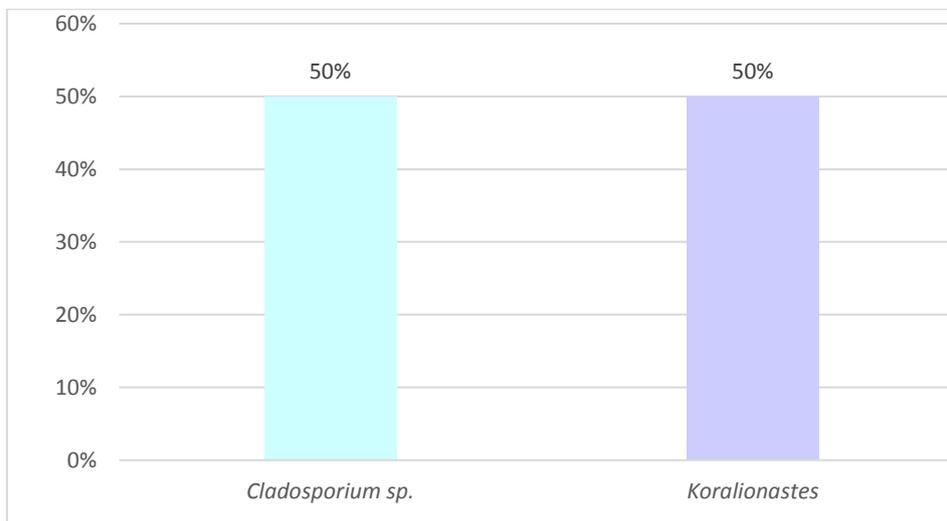


Figura 13: Gêneros em coral rochoso não identificado em Western Austrália



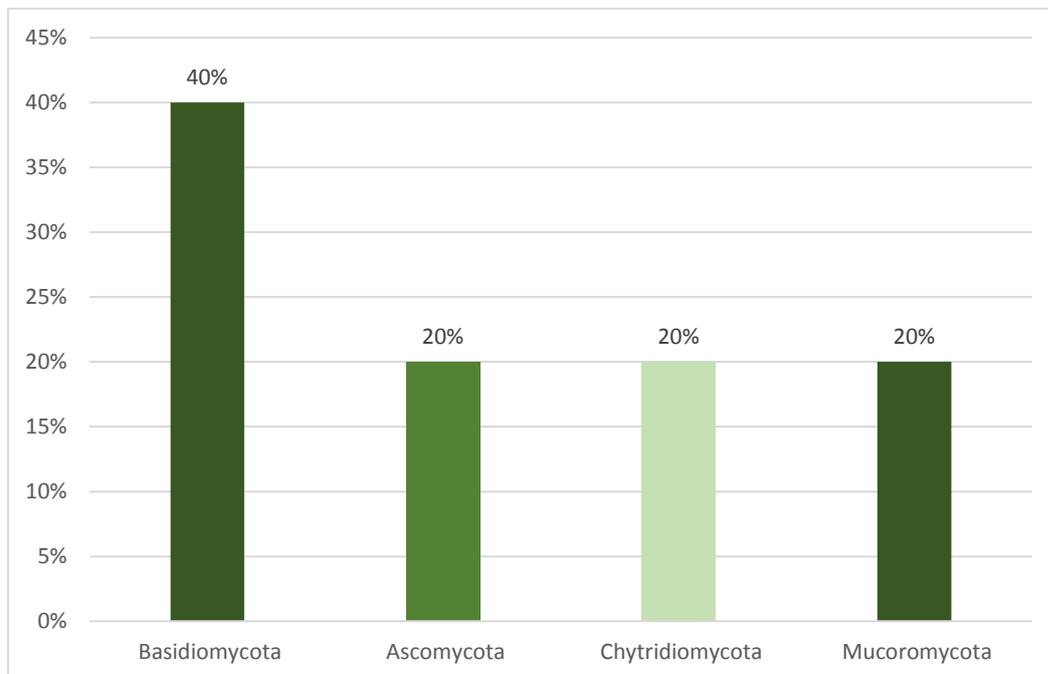
A OTU classificada a nível de gênero no coral *Gonistrea sp.*, coletado em Western Austrália pertence ao gênero *Phialemonium*.

No hospedeiro coral *Monastrea sp.* coletado em Western Austrália a OTU classificada pertence ao gênero *Zalerion*. Já o hospedeiro coral *Leptoria sp* também coletado em Western Austrália a OTU classificada pertence ao gênero *Malassezia sp.*

A região de Queensland abriga parte da Grande Barreira de Recifes (GBR) Australiana, uma imensa faixa composta por cerca de 2.900 recifes que pode ser vista do espaço e é a maior estrutura tridimensional do mundo feita por organismos vivos. A GBR é por vezes, considerada o ecossistema de recife mais emblemático do mundo, reconhecida internacionalmente como Área de Patrimônio Mundial da Biodiversidade desde 1981 (RICHARDS; DAY, 2018).

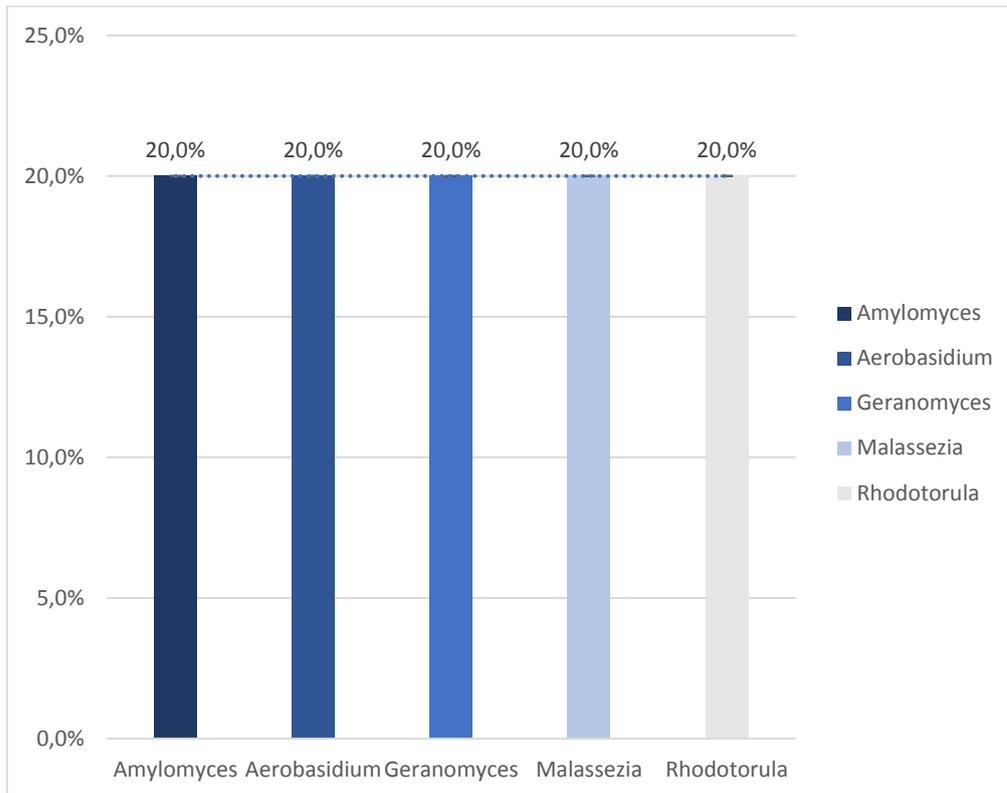
Em Queensland outra importante localidade onde são desenvolvidos muitos estudos sobre diversidade, identificação e preservação dos ecossistemas de recifes, foram identificados quatro tipos de filamentos (Figura 14) em um único tipo de hospedeiro *Pocillopora sp.*

FIGURA 14: Filos de fungos identificados em Queensland Austrália



O hospedeiro coral do gênero *Pocillopora sp.* apresentou em seu esqueleto cinco gêneros de fungos (Figura 15).

Figura 15: Gêneros de fungos identificados no coral *Pocillopora sp.* Queensland



Diferentemente da região Western Austrália, em que o filo de fungos com maior prevalência foi Ascomycota (65%), em Queensland o filo mais prevalente foi Basidiomycota (40%).

É preciso não perder de vista que, um menor percentual de amostras foi coletado nessa região. Entretanto, nosso estudo da diversidade de fungos endolíticos de estruturas calcárias de recifes, incluiu a determinação dos aspectos quantitativos da composição taxonômica geral, entre os hospedeiros e nas diferentes áreas onde os fragmentos de recifes foram coletados.

Em Victoria localidade de coleta que também fica na Austrália, os fragmentos de recifes ali coletados foram identificados como pertencentes a algas do tipo coralínea incrustante. Foram identificados três tipos de filios (Figura 16) e dezenove gêneros de fungos identificados (Figura 17).

Figura 16: Filios de fungos identificados em Victoria

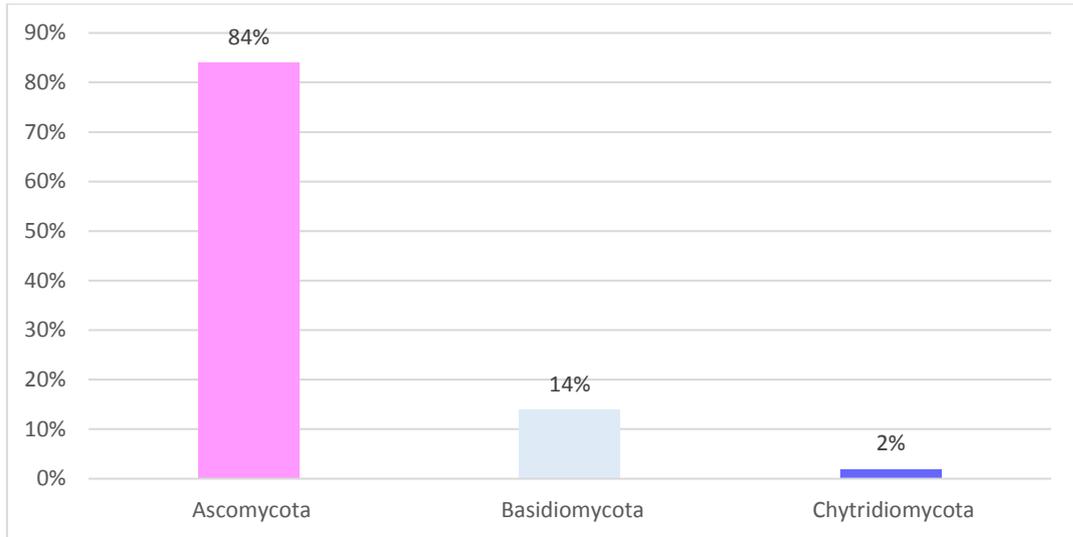
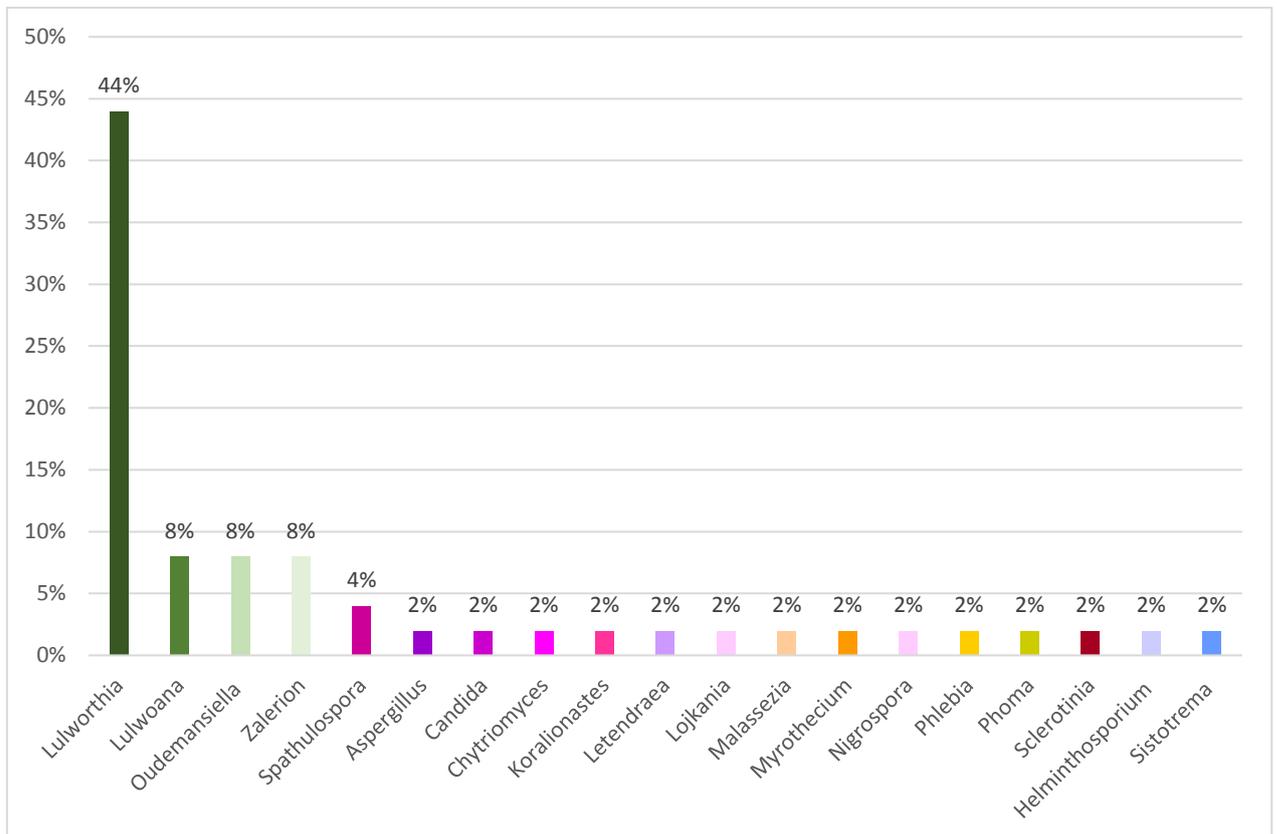


Figura 17: Gêneros de fungos identificados em Victoria Austrália



Ao estudar a literatura especializada em recifes e em fungos endolíticos, concluímos que são raros os trabalhos em que as algas coralíneas são sequer citadas, assim, percebemos que a maioria das pesquisas tem focado quase sempre em questões relacionadas aos corais.

Verifica-se também que quando se trata de trabalhos em que a abordagem de estudo empregada é o sequenciamento metagenômico a maioria dos estudos se concentram em comunidade procarióticas, principalmente bactérias, dessa maneira, outros microrganismos são quase sempre negligenciados.

Nova Caledônia é um exemplo de ecossistema de recifes de alta diversidade. Formam um dos três sistemas de recifes mais extensos do mundo, com uma barreira de recifes de 1600 quilômetros. Os recifes da Nova Caledônia são a localização da mais diversa estrutura de recifes do mundo, com espécies excepcionais de corais e uma ampla variedade de formas, contêm diversos recifes de diferentes idades, seus recifes atuais e antigos fósseis são um importante registro histórico natural da Oceania (UNESCO, 2011).

Na região de Noumea que fica na Nova Caledônia, identificamos dois filões de fungos (Figura 18), em fragmentos de coral não identificado, que abriga uma diversidade de oito gêneros de fungos (Figura 19).

Figura 18: Filões de fungos identificados na região Noumea Nova Caledônia

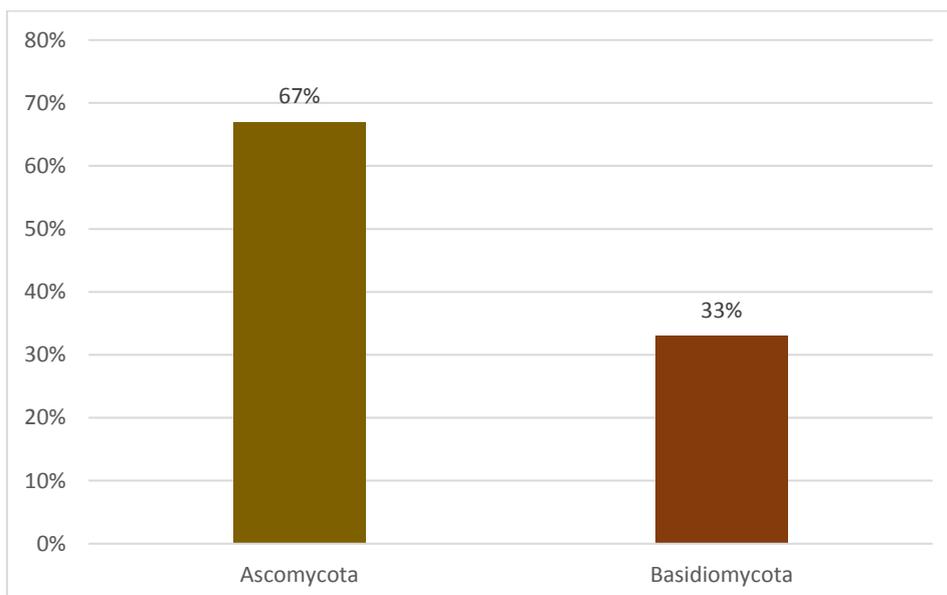
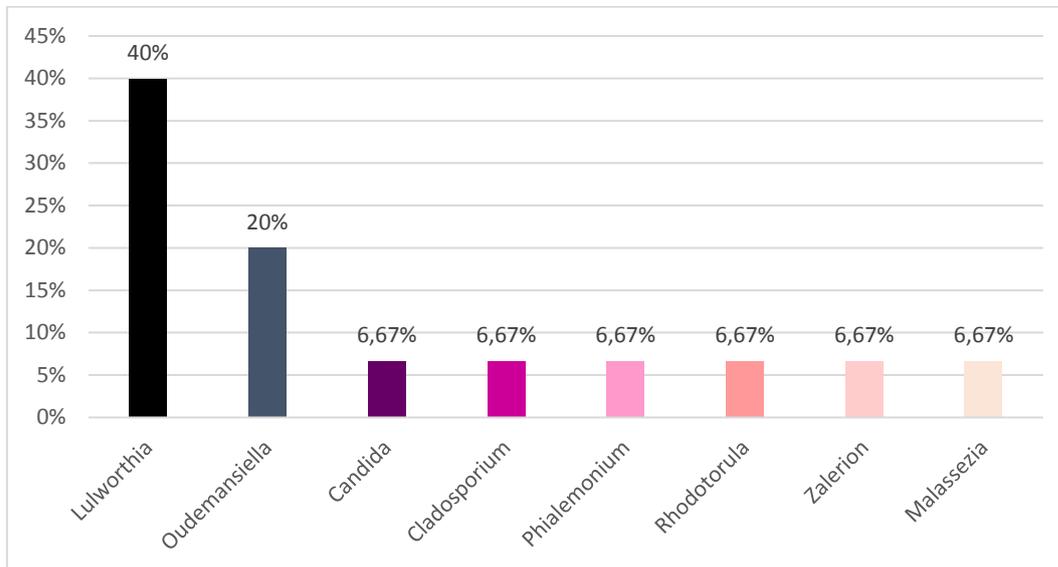


FIGURA 19: Gêneros de fungos identificados em hospedeiro coral não identificado na região de coleta Noumea na Nova Caledônia.



Em Madang, que fica em Papua Nova Guiné, os fragmentos de recifes ali coletados foram de dois tipos de hospedeiros (Figura 20), coral rochoso que não foi possível identificar e outro tipo de coral da espécie *Porites lutea*. Nesses corais, foram identificados dois filos de fungos (Figura 21) classificados em dezenove gêneros (Figura 22).

Figura 20: Hospedeiros identificados em Madang Papua Nova Guiné.

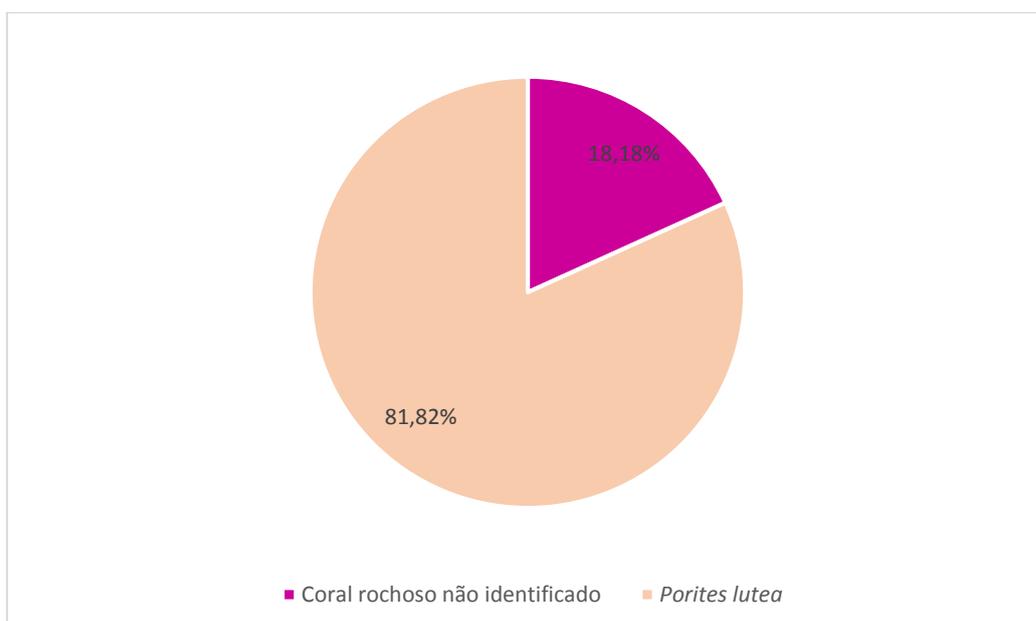


Figura 21: Filos de fungos identificados em Madang Papua Nova Guiné

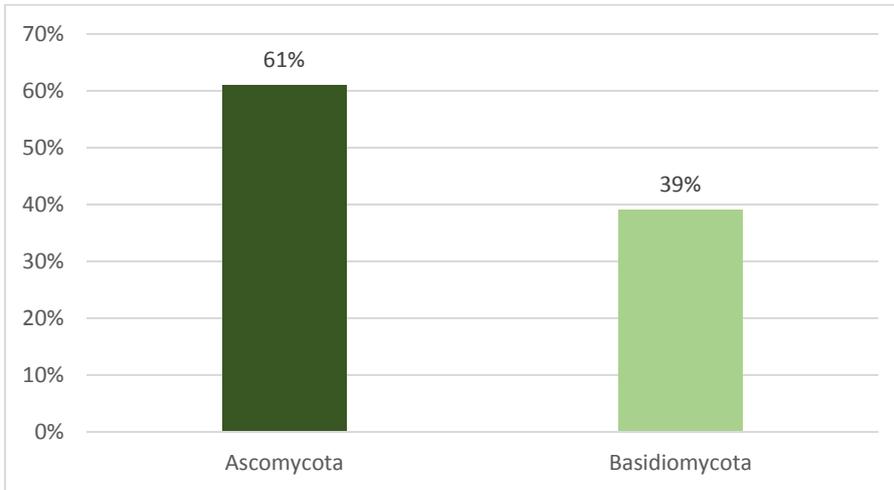
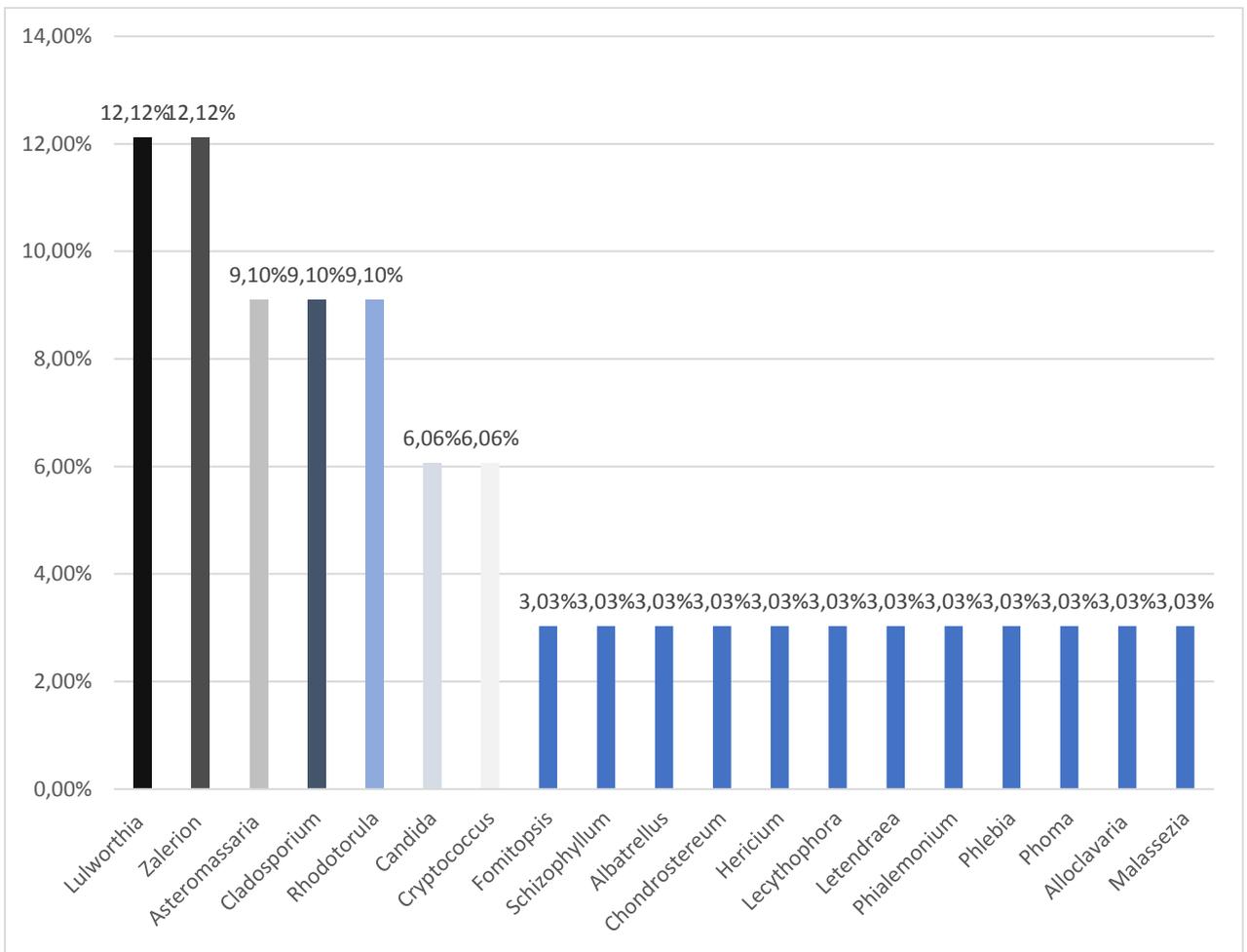


Figura 22: Táxons identificados em Madang Papua Nova Guiné em hospedeiros *Porites lutea* e coral rochoso não identificado.



Em um outro estudo sobre diversidade e estabilidade de microrganismos endolíticos de coral em comunidades de um recife sobre efeito da pressão parcial de gás carbônico ($p\text{CO}_2$), realizado por Marcelino et al. (2017), foi testado se a espécie hospedeira tem efeito sobre a estrutura da comunidade endolítica. Ficou demonstrado que a comunidade endolítica de *Porites spp.*, é substancialmente diferente e mais diversa do que a encontrada nos esqueletos de outras espécies, como, por exemplo, em *Pocillopora damicornis*, assim o estudo revelou que as comunidades microbianas são possivelmente mais diversificadas e estruturadas em *Porites sp.*, do que em outras espécies de corais.

É possível que o perfil de diversidade de OTUs fúngicas amostradas em corais do gênero *Porites sp.*, esteja relacionado ao sucesso de colonização desses corais em sistemas de recifes de várias partes do mundo, sugerindo que um subconjunto de fungos presentes em maior diversidade e abundância nesse tipo de hospedeiro seja provavelmente funcional nesse micro-habitat.

Em Kavieng foram identificados cinco hospedeiros corais (Figura 23), que apresentaram dois tipos de filós (Figura 24) e três gêneros de fungos (Figura 25).

Figura 23: Hospedeiros identificados coletados em Kavieng, Papua Nova Guiné

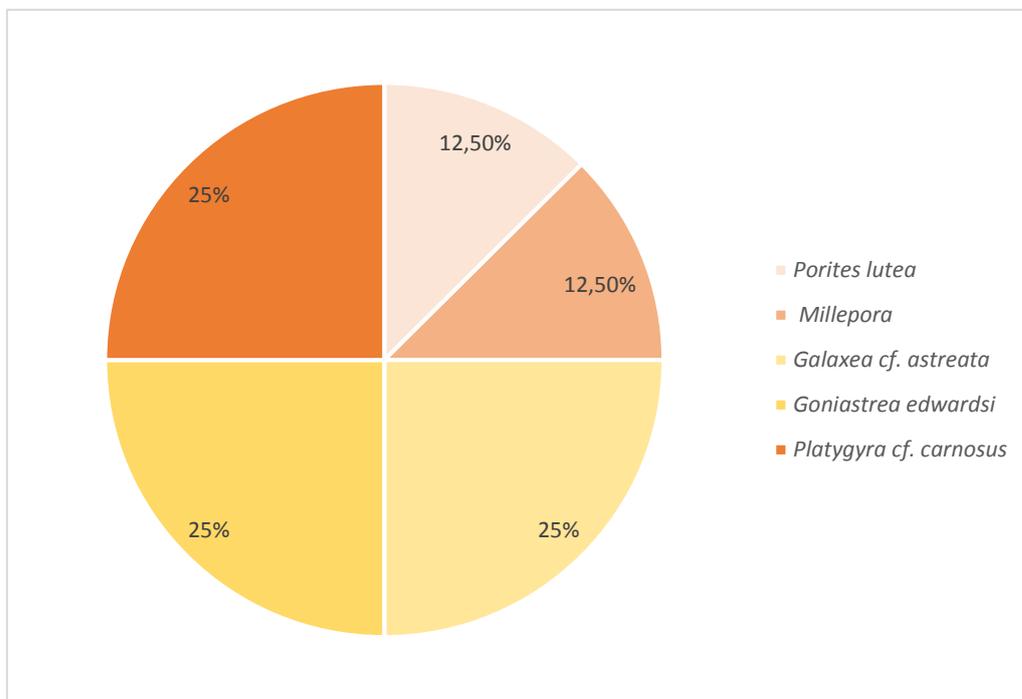


Figura 24: Filos de fungos identificados em Kavieng Papua Nova Guiné

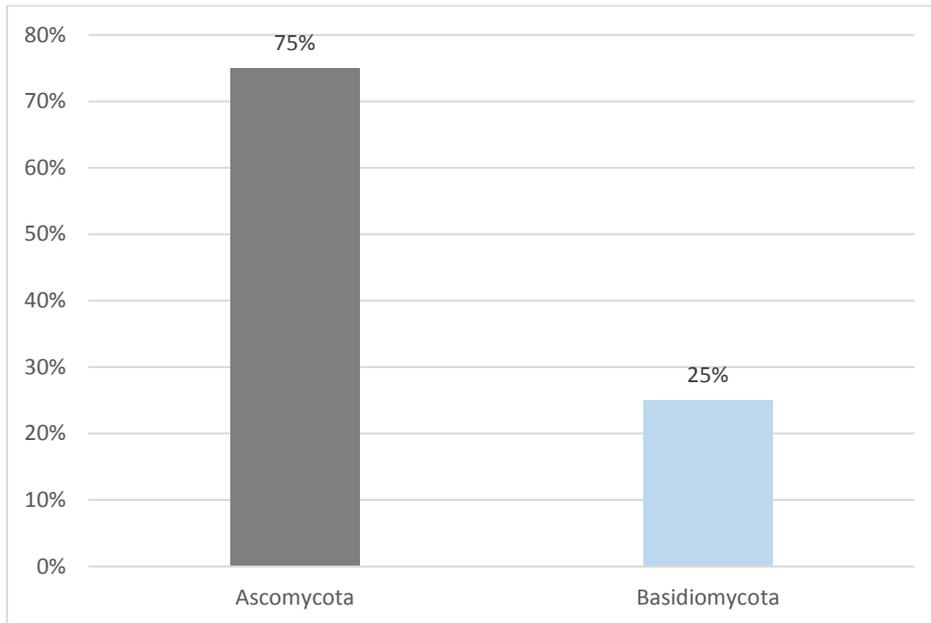
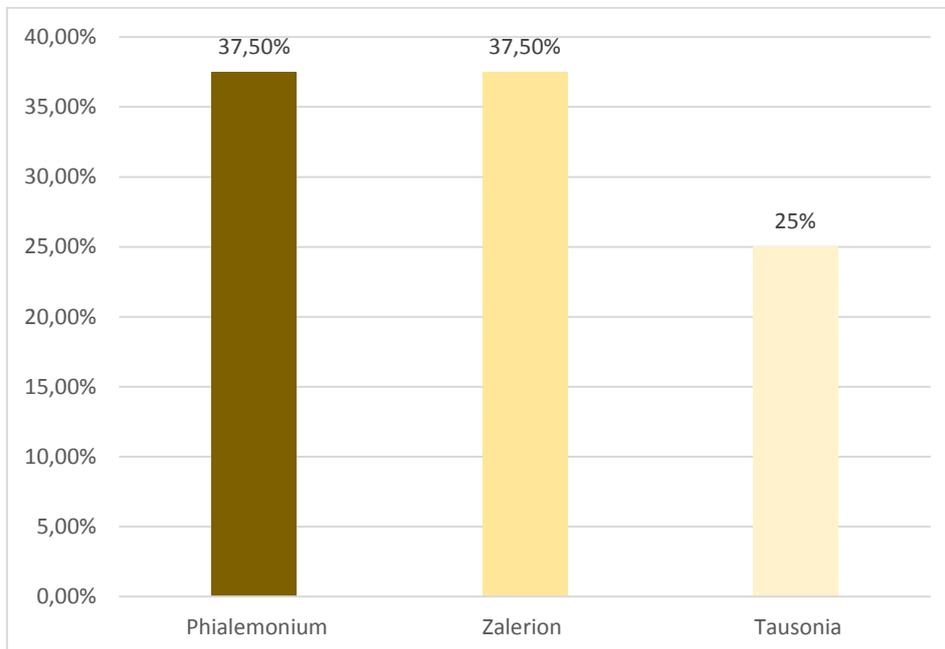


Figura 25: Gêneros identificados em Kavieng Papua Nova Guiné.



Estes resultados são consistentes com achados anteriores, descritos em estudos realizados por Bass et al. (2007) e também por Richards et al (2015), de que os fungos do filo Ascomycota são dominantes no ambiente marinho seguidos do filo Basidiomycota.

Os estudos atuais baseados em sequenciamento genético de amostras ambientais forneceu novos insights sobre a composição da comunidade microbiana e revelou que sua diversidade havia sido subestimada. Comunidades em ambientes marinhos são comumente compostas de alguns táxons dominantes e um alto número de organismos taxonomicamente diversificados e de baixa abundância (SUNAGAWA; WOODLEY; MEDINA, 2010).

Nesse aspecto, foi observado que alguns gêneros se apresentaram em concentrações muito baixas, com poucas sequências, quanto para outros em número mais elevado. No entanto, classificar em níveis taxonômicos, filogenéticos e ainda os papéis e informações genômicas desses organismos ditos "raros" permanece ainda um grande desafio.

Nos fragmentos de recifes coletados na localidade de Kavieng o hospedeiro coral da espécie, *Galaxea astreata*, apresentou um único tipo de OTU classificada a nível de gênero como *Tausonia sp.* O hospedeiro coral da mesma localidade, *Millepora sp.*, apresentou uma única OTU pertencente ao gênero *Zalerion sp.* E a espécie de coral *Porites Lutea*, apresentou também uma única OTU classificada ao nível de gênero como *Phialemonium sp.*

Ainda nessa mesma região os corais *Gonistrea edwardsi* (Figura 26) e *Platygyra carnosus* (Figura 27) apresentaram os mesmos gêneros fúngicos e ainda com a mesma proporção.

Figura 26: Táxons identificado no coral *Gonistrea edwardsi* em Kavieng Papua Nova Guiné

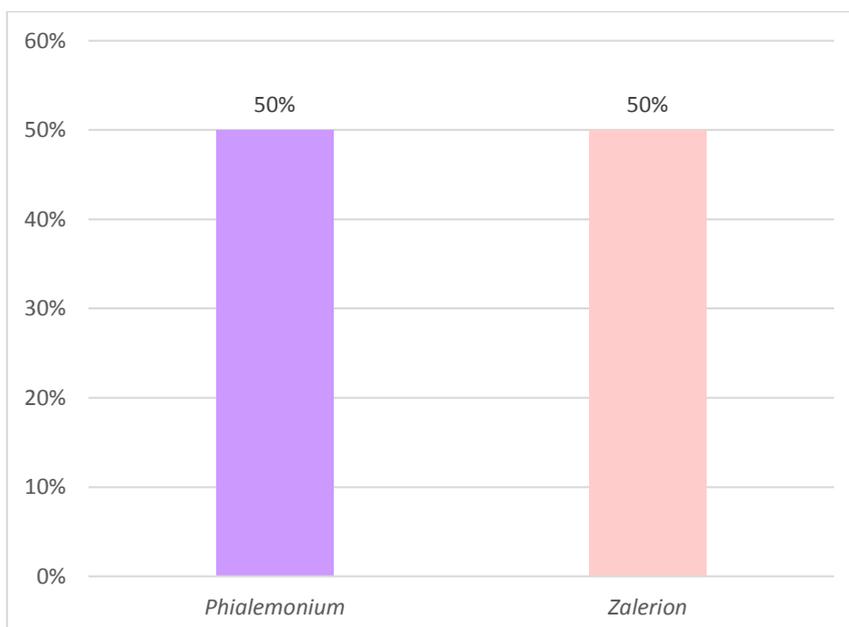
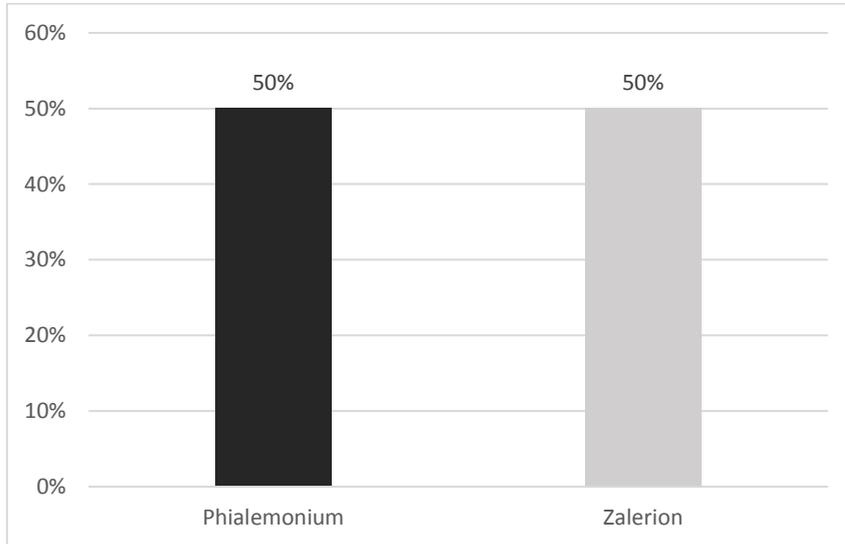
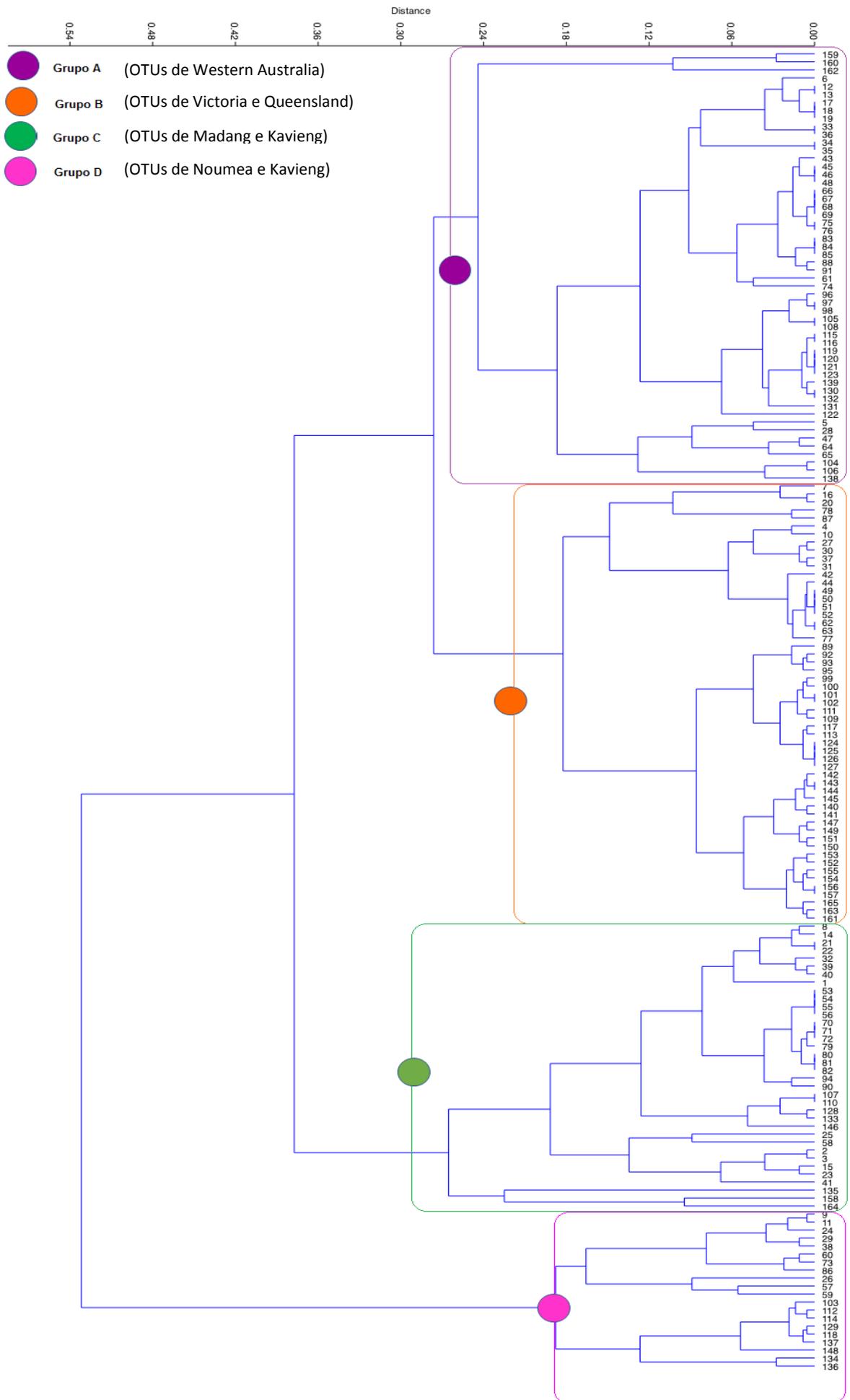


FIGURA 27: Táxons identificados em *Platygyra carnosus* em Kavieng Papua Nova Guiné



O registro da comunidade de fungos em recifes conforme a presença e abundância de cada OTU pode ser utilizado para verificar se os dados apresentam algum tipo de associação, mesmo que seja uma associação discreta.

Nesse aspecto, analisou-se o agrupamento hierárquico levando em consideração a combinação de três variáveis (OTUs, localidades de coleta e hospedeiros). Os padrões contidos nos dados agruparam cada OTU representada por números de 1 até 165 em quatro grandes grupos, nomeados de grupos A, B, C e D, apresentados em forma de dendrograma (Figura 28).

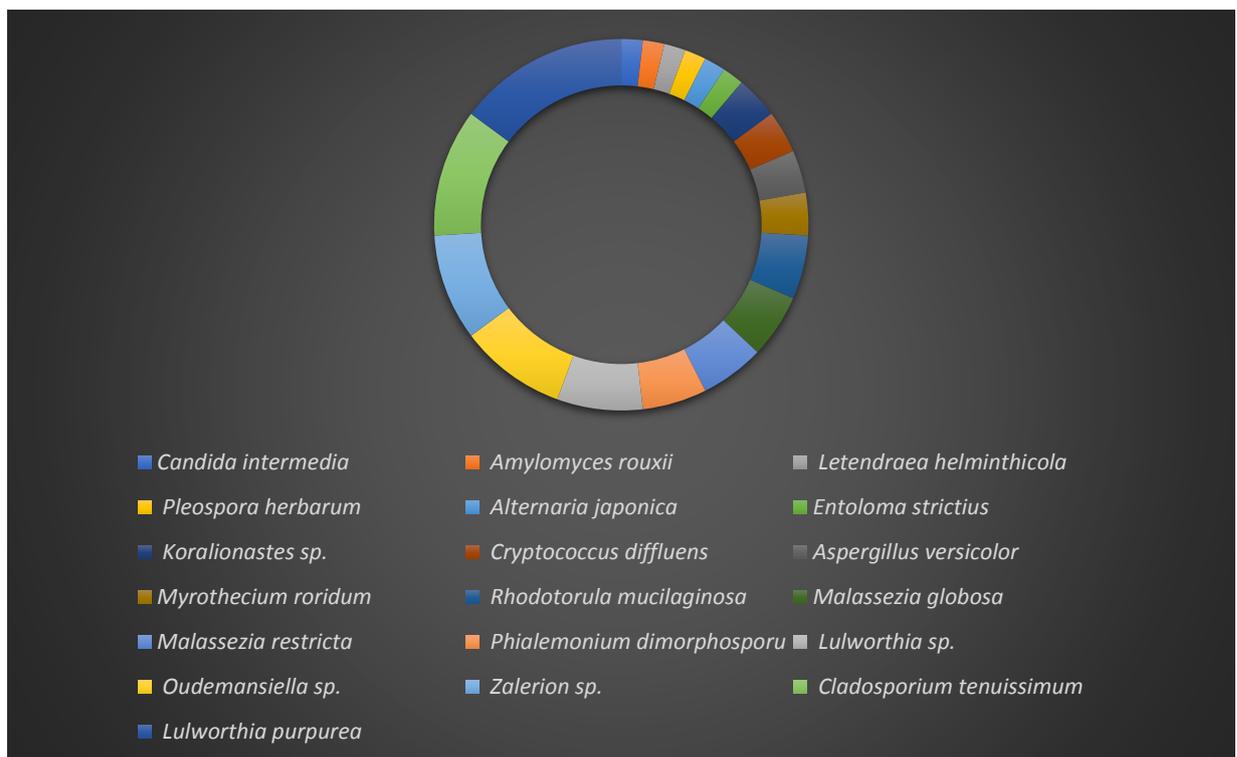


O agrupamento hierárquico nos apontou um padrão em que as comunidades de fungos foram ordenadas de acordo com os locais de coleta. O grupo A foi formado pelo agrupamento das cinquenta e quatro OTUs (Figura 29) de fungos identificadas ao nível de espécie (Figura 30) que ocorreram na localidade de coleta em Western Australia, em diferentes hospedeiros.

Figura 29: Grupo formado por OTUs identificadas na localidade Western Austrália



Figura 30: Espécies de fungos identificadas na região Western Australia



O grupo B foi formado principalmente por cinquenta OTUs (Figura 31), atribuídas as espécies de fungos (Figura 32), que ocorreram em Victoria (sul da Austrália) em hospedeiros do tipo algas coralíneas, além de cinco OTUs (retângulo em vermelho) de fungos que ocorreram em Queensland, que é uma localidade do leste da Austrália e, portanto, mais próxima de Victoria do que dos outros quatro locais de coleta.

Figura 31: Grupo formado por OTUs identificadas nas localidades de Victoria e Queensland na Austrália.

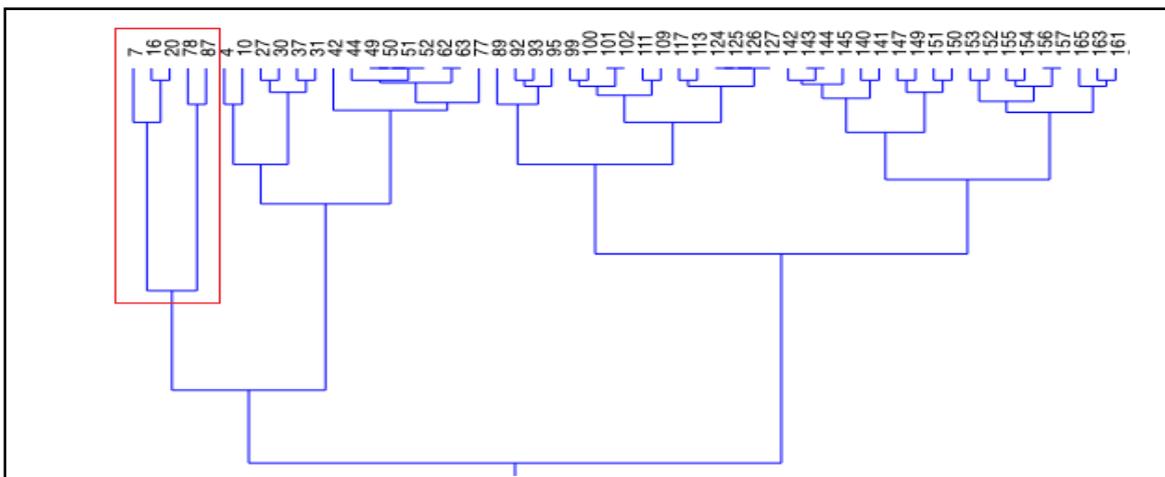
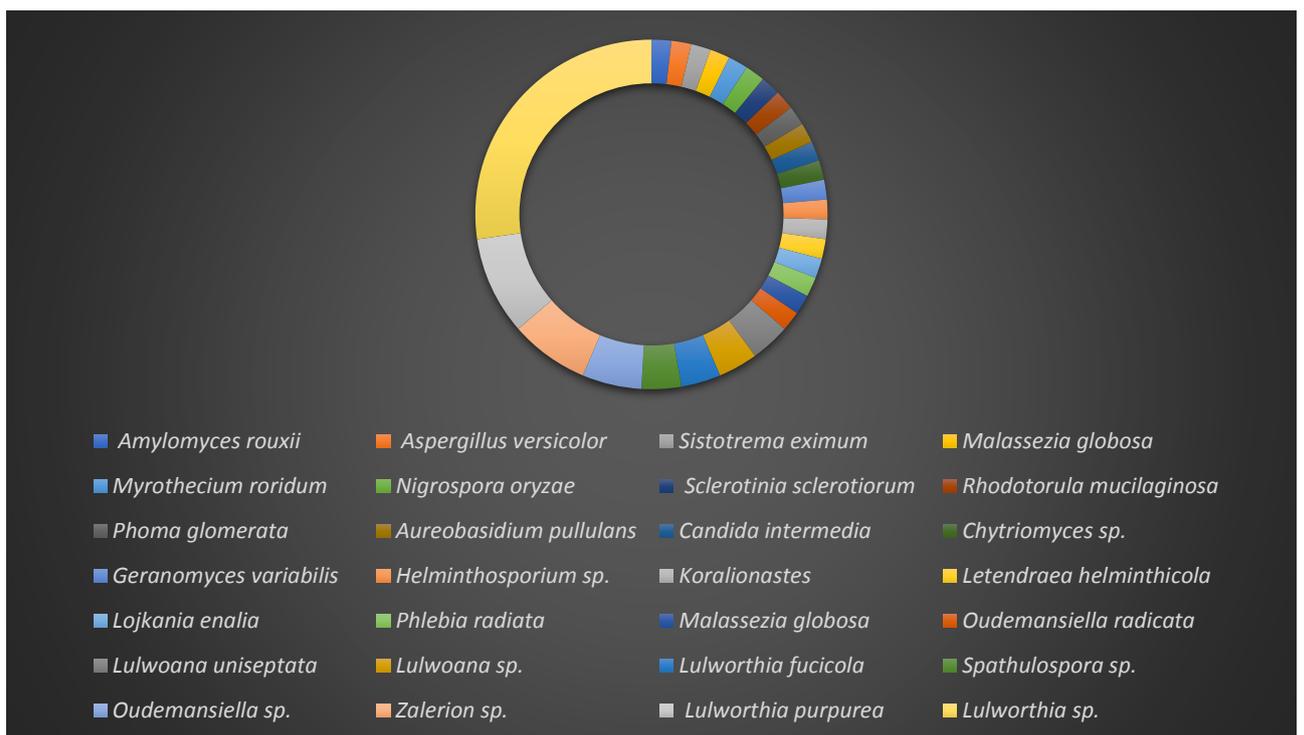


Figura 32: Espécies de fungos identificadas nas localidades de Victoria e Queensland na Austrália



O grupo C é formado principalmente por trinta e três OTUs de fungos (Figura 33) que ocorreram em Mandang (PNG) em fragmentos de hospedeiro coral rochoso não identificado e em *Porites lutea*, além de outras três OTUs da região de Kavieng (Papua Nova Guiné) em três hospedeiros distintos (*Millepora sp.*, *Platygyra carnosus* e *Galaxea astreata*). As OTUs de fungos do grupo C foram identificadas ao nível de espécies (Figura 34).

Figura 33: Grupo formado por OTUs das localidades de Madang e Kavieng (PNG).

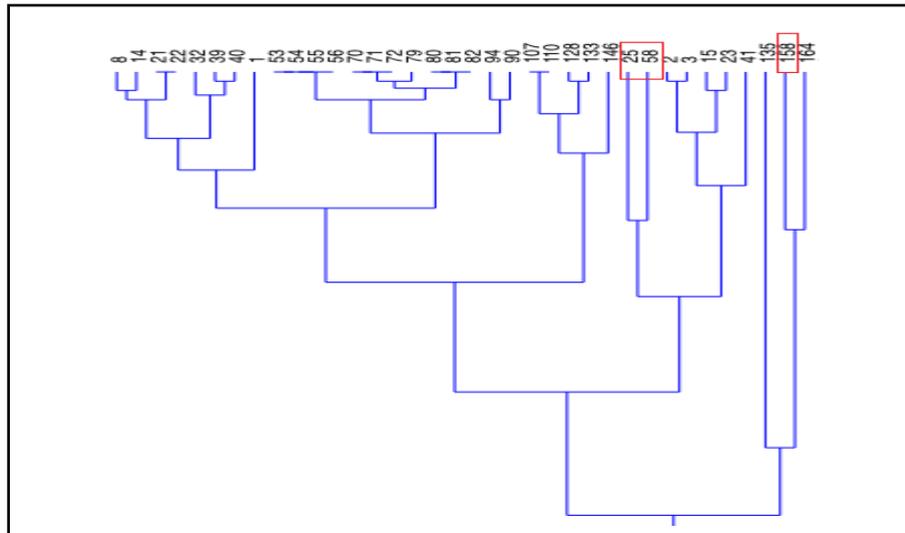
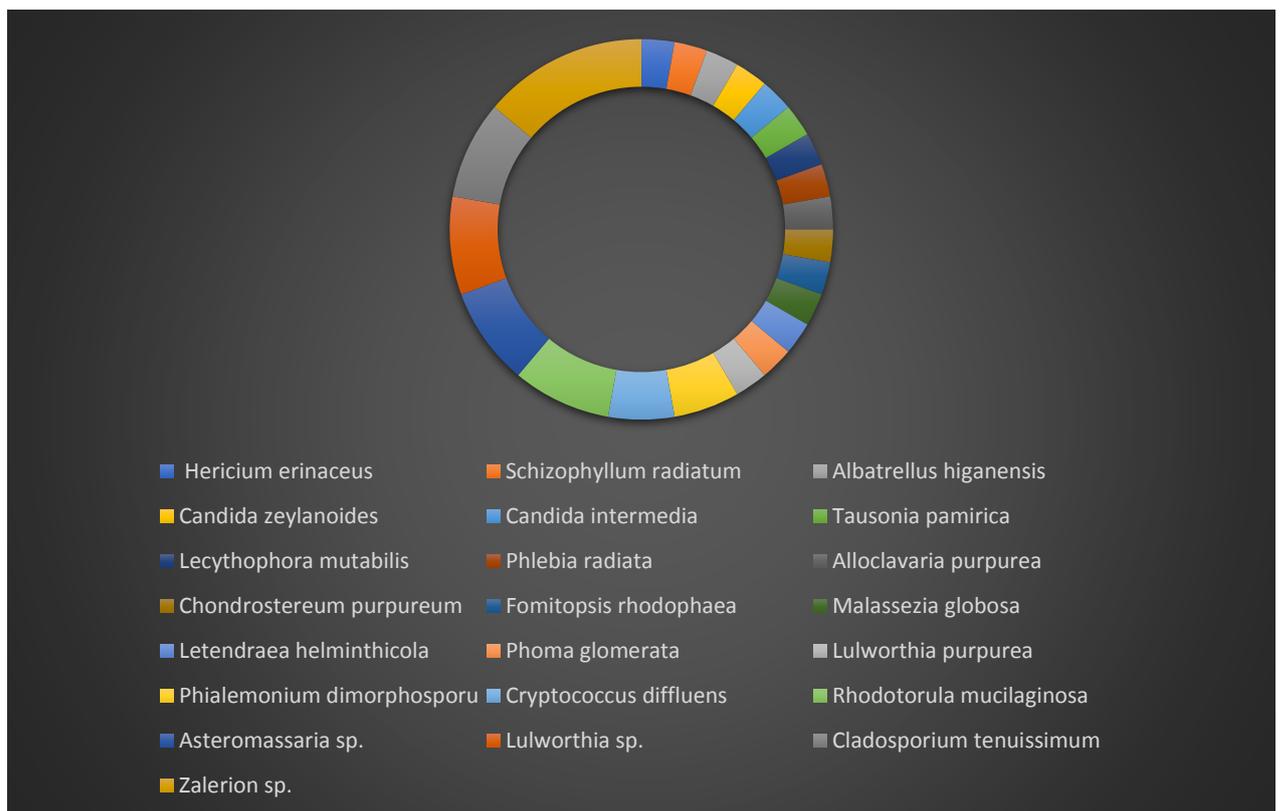


Figura 34: Espécies de fungos identificadas em Madang e Kavieng (PNG).



O grupo D (Figura 35) é formado principalmente por quinze OTUs de fungos que ocorreram em Noumea, além de outras cinco OTUs da região de Kavieng (Figura 36).

Figura 35: Grupo formado por OTUs identificadas nas localidades de Noumea (Nova Caledônia) e Kavieng (PNG).

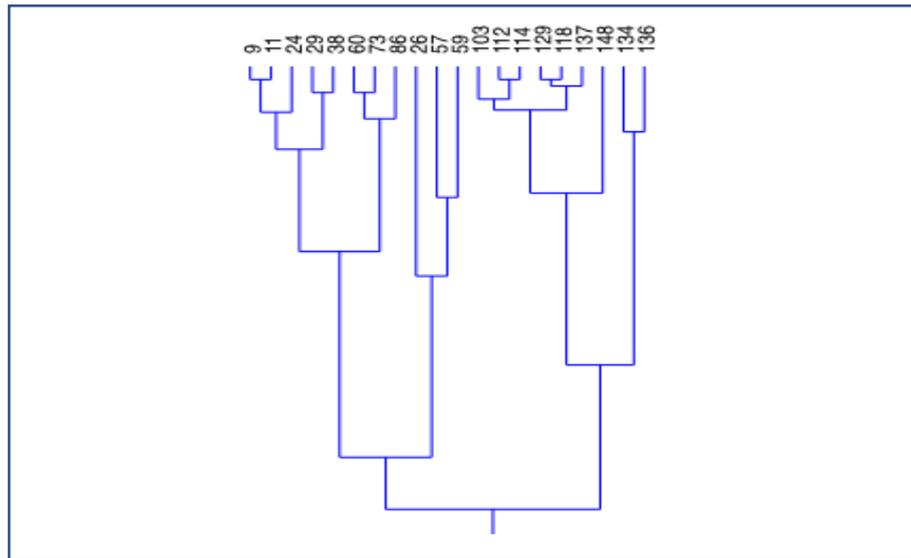


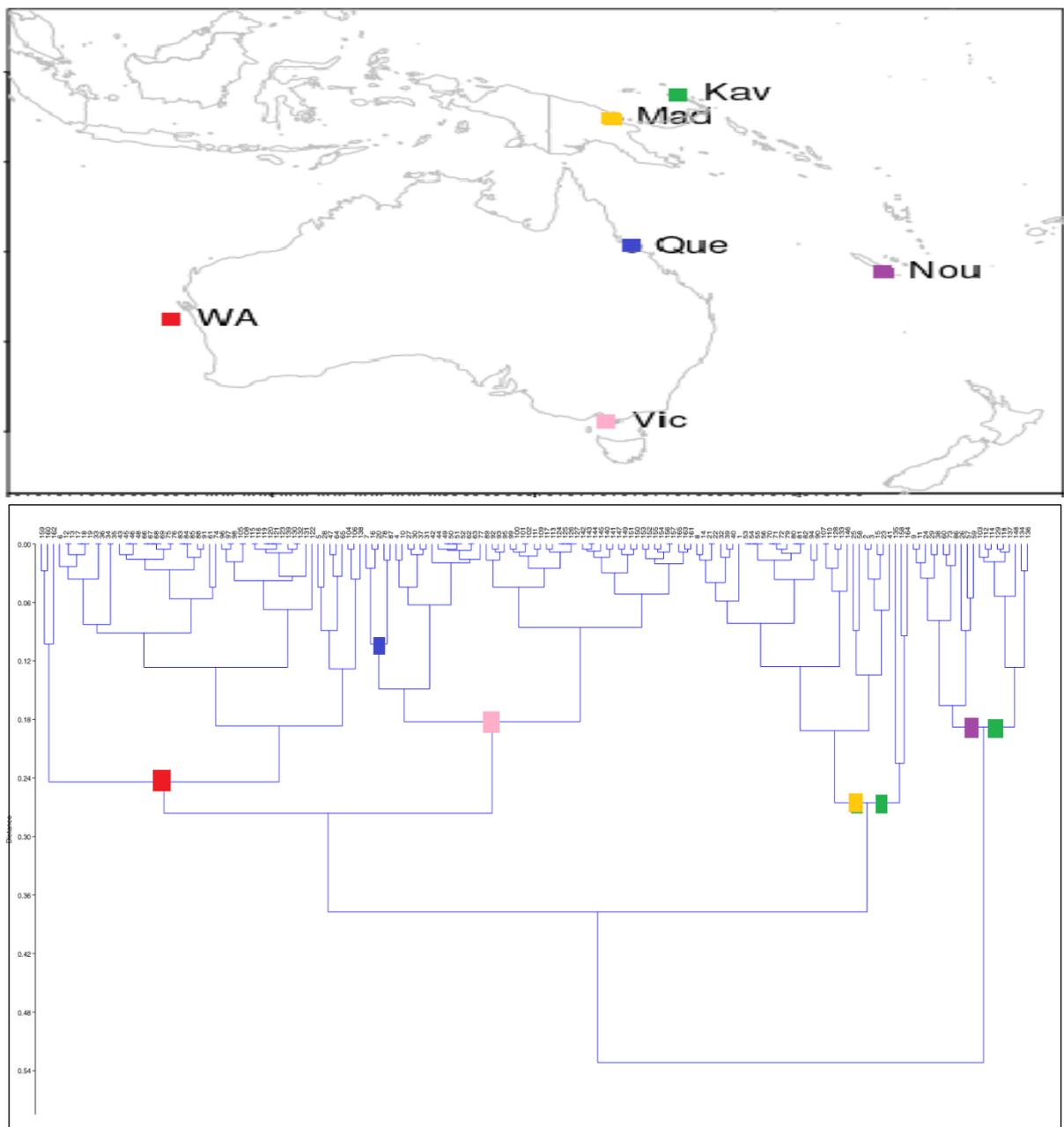
Figura 36: Espécies de fungos identificados nas localidades de Noumea (Nova Caledônia) e Kavieng (PNG).



Uma visão geral da composição da comunidade de fungos endolíticos em diferentes hospedeiros e nas diferentes localidades (Figura 38) nos aponta um padrão de agrupamento das comunidades de fungos com base principalmente, nos locais de coleta que compreendem as regiões onde os fragmentos de recifes foram coletados.

O agrupamento de OTUs com características semelhantes podem indicar que quanto mais próximas duas regiões se encontram no dendrograma (Figura 39) maior é a chance de existir similaridade entre os hospedeiros dessas regiões com chance de apresentarem

Figura 37 e Figura 38 locais de coleta e relações de agrupamento das OTUs.



6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

No presente estudo demonstramos que a diversidade taxonômica encontrada indica uma comunidade micológica diversa residindo em esqueletos calcários de corais, tecidos de algas coralíneas e em fragmentos de recifes de arenito e ainda que o componente fúngico desse microbioma endolítico é diverso entre os hospedeiros e entre as localidades onde as amostras foram coletadas.

As análises de diversidade do micobioma associado ao recife mostrou uma alta diversidade de Ascomicetos (69%) e Basidiomicetos (28%), enquanto que Mucoromicetos (2%) e Quitridiomicetos (1%) são filos raros para esse ambiente e nesse micro-habitat. Em termos de abundância de gênero *Lulworthia* (26%) foi o mais representativo na composição dessa comunidade e é estatisticamente um táxon importante, pois foi identificado em quatro das seis localidades estudadas, além de *Zalerion* (10.30%) que esteve presente em cinco das seis localidades, *Oudemansiella* (7,30%) presente em três regiões, igualmente representado foi o gênero *Malassezia* (6,10%) também presente em cinco localidades e o gênero *Cladosporium* (6,10%) presente em três localidades.

Dentre as 13.502 sequências metagenômicas com perfis taxonômicos de fungos, identificamos 165 com níveis confiáveis ao serem comparadas com o banco de dados de referência. Apesar do baixo número de OTUs classificadas nas amostras de recifes foi possível obter uma visão geral da composição da comunidade de fungos em diferentes hospedeiros e nas diferentes localidades e um padrão bem claro de que as comunidades de fungos estão agrupadas de acordo principalmente com os locais de coleta que compreendem distintas regiões geográficas.

Esse nosso primeiro estudo forneceu dados importantes sobre a composição taxonômica dos fungos endolíticos cuja a compreensão de sua biodiversidade já foi muito limitada e destaca o potencial da abordagem metagenômica de metacódigo de barras e a construção de pipelines de bioinformática otimizados. Consideramos ser fundamental a caracterização total das comunidades como o micobioma endolítico em recifes a fim de ser entendido a funcionalidade desse ecossistema.

Claramente, os desafios para os nossos próximos trabalhos serão aumentar a identificação e conhecer mais sobre a diversidade do microbioma existente nos organismos bioconstrutores de recifes. A grande quantidade de OTUs ainda não identificadas (mais de 13.000), sugerem uma associação muito mais profunda e com grandes chances de serem ainda identificadas

As informações geradas complementam os estudos que têm buscado identificar o microbioma endolítico de recifes. Inferir a composição desse microbioma a partir da metagenômica também nos permitiu complementar com dados de qualidade o que já tem sido desenvolvido.

Desse modo, esse trabalho não se encerra aqui, mas abre perspectivas para melhorias que podem ser implementadas no atual pipeline com o intuito de continuidade para identificar as demais OTUs que ainda não foram possíveis a identificação, assim poderemos fornecer mais dados de espécies, com grandes chances de melhorar os resultados da composição da comunidade fúngica endolítica até então descrita.

Além disso, a integração de dados metagenômicos, ambientais e de diversidade são capazes de ampliar a elaboração de modelos de funcionamento dessas comunidades para compor outros estudos.

Esta representatividade micológica, ainda que parcial, caracteriza uma interface poderosa entre bioinformática, microbiologia e ecologia ao aprofundar nosso conhecimento das comunidades endolíticas associadas aos recifes e estabelecer bases para compreendermos a estrutura de interações entre recife e o seu microbioma.

8. REFERÊNCIAS

AINSWORTH, Tracy D.; THURBER, Rebecca Vega; GATES, Ruth D. **The future of coral reefs: a microbial perspective**. Trends In Ecology & Evolution, [s.l.], v. 25, n. 4, p.233-240, abr. 2010. Elsevier BV.

AMEND AS; BARSHIS DJ; OLIVER TA. **Coral-associated marine fungi form novel lineages and heterogeneous assemblages**. The ISME Journal. 2012;6(7):1291-1301. doi:10.1038/ismej.2011.193.

ANDREOTE, F. D.; JIMÉNEZ, D. J.; CHAVES, D.; DIAS, A. C. F.; LUVIZOTTO, D. M.; DINI-ANDREOTE, F.; FASANELLA, C. C.; LOPEZ, M. V.; BAENA, S.; TAKETANI, R. G.; DE MELO, I. S. The microbiome of Brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. 1-14, 2012.

BAKER, Andrew C.; GLYNN, Peter W.; RIEGL, Bernhard. Climate change and coral reef bleaching: An ecological assessment of long-term impacts, recovery trends and future outlook. **Estuarine, Coastal And Shelf Science**, [s.l.], v. 80, n. 4, p.435-471, dez. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecss.2008.09.003>.

BARBER, Paul H.; MEYER, Christopher P.. Pluralism explains diversity in the Coral Triangle. **Ecology Of Fishes On Coral Reefs**, [s.l.], p.258-263, maio 2015. Cambridge University Press. <http://dx.doi.org/10.1017/cbo9781316105412.032>.

BASS, D. et al. Yeast forms dominate fungal diversity in the deep oceans. **Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences**, [s.l.], v. 274, n. 1629, p.3069-3077, 22 dez. 2007. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2007.1067>.

BASSO, Daniela. Carbonate production by calcareous red algae and global change. **Geodiversitas**, [s.l.], v. 34, n. 1, p.13-33, mar. 2012. Museum National d'Histoire Naturelle, Paris, France. <http://dx.doi.org/10.5252/g2012n1a2>.

BAPTISTA, E. M. C. Estudo morfossedimentar dos recifes de arenito da zona litorânea do estado do Piauí, Brasil. 305f. Tese de Doutorado em Geografia. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Florianópolis, SC, 2010.

BAYER, Till et al. The Microbiome of the Red Sea Coral *Stylophora pistillata* Is Dominated by Tissue-Associated Endozoicomonas Bacteria. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 79, n. 15, p.4759-4762, 24 maio 2013. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.00695-13>.

BLACKALL, Linda L.; WILSON, Bryan; VAN OPPEN, Madeleine J. H.. Coral-the world's most diverse symbiotic ecosystem. **Molecular Ecology**, [s.l.], v. 24, n. 21, p.5330-5347, 21 out. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/mec.13400>.

BOURNE, David G.; MORROW, Kathleen M.; WEBSTER, Nicole S.. Insights into the Coral Microbiome: Underpinning the Health and Resilience of Reef Ecosystems. **Annual Review Of Microbiology**, [s.l.], v. 70, n. 1, p.317-340, 8 set. 2016. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095440>.

CHEN, Wei et al. A Comparison of Methods for Clustering 16S rRNA Sequences into OTUs. **Plos One**, [s.l.], v. 8, n. 8, p.1-10, 13 ago. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0070837>.

COLEMAN-DERR, Devin; TRINGE, Susannah G. Building the crops of tomorrow: advantages of symbiont-based approaches to improving abiotic stress tolerance. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 5, p.1-20, 6 jun. 2014. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00283>.

COWART, Dominique A.; MURPHY, Katherine R.; CHENG, C.-h. Christina. Metagenomic sequencing of environmental DNA reveals marine faunal assemblages from the West Antarctic Peninsula. **Marine Genomics**, [s.l.], v. 37, p.148-160, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.margen.2017.11.003>.

CREMEN, Ma. Chiela M. et al. Taxonomic revision of Halimeda (Bryopsidales, Chlorophyta) in south-western Australia. **Australian Systematic Botany**, [s.l.], v. 29, n. 1, p.41-54, 2016. CSIRO Publishing. <http://dx.doi.org/10.1071/sb15043>.

DAMARE, Samir ; SINGH, Purnima; RAGHUKUMAR, Seshagiri . Biotechnology of Marine Fungi. In: RAGHUKUMAR, Chandralata (Org.). **Biotechnology of Marine Fungi**. Goa: Springer, 2012. cap. 14, p. 277-297.

DAMASHEK, Julian. et al. Benthic ammonia oxidizers differ in community structure and biogeochemical potential across a riverine delta. **Frontiers In Microbiology**. Califórnia, p. 1-18. jan. 2015.

DAVY, S. K.; ALLEMAND, D.; WEIS, V. M.. Cell Biology of Cnidarian-Dinoflagellate Symbiosis. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, [s.l.], v. 76, n. 2, p.229-261, 1 jun. 2012. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/membr.05014-11>.

DELMONT, Tom O. et al. Metagenomic comparison of direct and indirect soil DNA extraction approaches. **Journal Of Microbiological Methods**, [s.l.], v. 86, n. 3, p.397-400, set. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2011.06.013>.

DELONG, E. F.. Community Genomics Among Stratified Microbial Assemblages in the Ocean's Interior. **Science**, [s.l.], v. 311, n. 5760, p.496-503, 27 jan. 2006. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1120250>.

DUDHAGARA, Pravin et al. Web Resources for Metagenomics Studies. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, [s.l.], v. 13, n. 5, p.296-303, out. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gpb.2015.10.003>.

FORSMAN, RB. **Life and death on the coral reef**. J Med Libr Assoc 93(1) January 2005.

GEFFEN, Yuval; RON, Elicora Z.; ROSENBERG, Eugene. Regulation of release of antibacterials from stressed scleractinian corals. **Fems Microbiology Letters**, [s.l.], v. 295, n. 1, p.103-109, jun. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01590.x>.

GILBERT, Jack A.; DUPONT, Christopher L.. Microbial Metagenomics: Beyond the Genome. **Annual Review Of Marine Science**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.347-371, 15 jan. 2011. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142811>.

GLEASON, Frank H. et al. **The roles of endolithic fungi in bioerosion and disease in marine ecosystems. I. General concepts.** Mycology An International Journal On Fungal Biology. Austrália, p. 1-12. ago. 2017.

GOLUBIC, Stjepko; RADTKE, Gudrun; CAMPION-ALSUMARD, Therese Le. Endolithic fungi in marine ecosystems. **Trends In Microbiology**, [s.l.], v. 13, n. 5, p.229-235, maio 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2005.03.007>.

GORMLEY, Kate et al. Connectivity and Dispersal Patterns of Protected Biogenic Reefs: Implications for the Conservation of *Modiolus modiolus* (L.) in the Irish Sea. **Plos One**, [s.l.], v. 10, n. 12, p.1-17, 1 dez. 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0143337>.

GRAHAM, Nicholas A. J. et al. Predicting climate-driven regime shifts versus rebound potential in coral reefs. **Nature**, [s.l.], v. 518, n. 7537, p.94-97, 14 jan. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature14140>.

GREEN, B. D. E KELLER, M. Capturing the uncultivated majority. **Current Opinion in Biotechnology**. v 17: p 236–240 (2006).

HANDELSMAN, J. et al. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 4, p. 669-685, 2004.

HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica** 4(1): 9pp, 2001.

HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences**, [s.l.], v. 270, n. 1512, p.313-321, 7 fev. 2003. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>.

HENKEL, TP. [Coral Reefs](#), Nature Education Knowledge **3**, 12 (2012).

HOEGH-GULDBERG, Ove. Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. **Marine And Freshwater Research**, [s.l.], v. 50, n. 8, p.839-866, 1999. CSIRO Publishing. <http://dx.doi.org/10.1071/mf99078>.

HOEGH-GULDBERG, Ove et al. **Coral Reefs Under Rapid Climate Change and Ocean Acidification**. *Science*, Queensland, v. 318, n. 5857, p.1737-1742, 14 dez. 2007.

HUGHES, Terry P. et al. Global warming and recurrent mass bleaching of corals. **Nature**, [s.l.], v. 543, n. 7645, p.373-377, mar. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature21707>.

HUME, B. et al. Corals from the Persian/Arabian Gulf as models for thermotolerant reef-builders: Prevalence of clade C3 Symbiodinium, host fluorescence and ex situ temperature tolerance. **Marine Pollution Bulletin**, [s.l.], v. 72, n. 2, p.313-322, jul. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.11.032>.

HYDE, K. D., SARMA, V. V., JONES, E. B. G. Morphology and taxonomy of higher marine fungi. In: **Marine Mycology A Practical Approach**, eds K. D. Hyde, S. B. Pointing (Hong Kong: Fungal Diversity Press), 172–204, jan. 2000.

JONES, E. B. Gareth. Fifty years of marine mycology. **Fungal Diversity**, [s.l.], v. 50, n. 1, p.73-112, 4 ago. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-011-0119-8>. HYDE, K.D.; SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. *Fungal Divers* 33:163- 173, 2008.

JONES, E. B. Gareth et al. Classification of marine Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota and Chytridiomycota. **Fungal Diversity**, [s.l.], v. 73, n. 1, p.1-72, jul. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-015-0339-4>.

JONES, G. P. et al. Coral decline threatens fish biodiversity in marine reserves. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 101, n. 21, p.8251-8253, 18 maio 2004. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0401277101>.

KAVANAGH, Kevin. **Fungi Biology and Applications**. John Wiley & Sons Ltd, 3ed, U.K, 2005.

KELLY, LW; WILLIAMS, GJ; BAROTT, KL; CARLSON, CA; DINSDALE, EA; Edwards RA et al. Local genomic adaptation of coral reef-associated microbiomes to gradients of natural variability and anthropogenic stressors. **Proc Natl Acad Sci USA** **111**: 10227–10232, 2014.

KENDRICK, B. et al. Amphibious microborers: bioeroding fungi isolated from live corals. **Bull Mar Sci** 32:862–867, 1982.

KREDIET, C. J. et al. Coral-associated micro-organisms and their roles in promoting coral health and thwarting diseases. **Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences**, [s.l.], v. 280, n. 1755, p.1-9, 30 jan. 2013. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2012.2328>.

KUNIN, V. et al. A Bioinformatician's Guide to Metagenomics. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, [s.l.], v. 72, n. 4, p.557-578, 1 dez. 2008. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/membr.00009-08>.

LAJEUNESSE, Todd C.; PARKINSON, John E.; REIMER, James D. A genetics-based description of *Symbiodinium minutum* sp. nov. and *S. psugmophilum* sp. nov. (Dinophyceae), two dinoflagellates symbiotic with cnidaria. **Journal Of Phycology**, [s.l.], v. 48, n. 6, p.1380-1391, 18 set. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8817.2012.01217.x>.

LIN, Jia-ying et al. An Effective Approach for Cloud-Based Microbial Metagenomics Analysis. **2016 International Computer Symposium (ics)**, Chiayi, Taiwan, p.33-37, dez. 2016. IEEE. <http://dx.doi.org/10.1109/ics.2016.0016>.

LITTLER, Mark M.; LITTLER, Diane S.. The Nature of Crustose Coralline Algae and Their Interactions on Reefs. **Smithsonia Contributions To The Marine Sciences**. Washington, Usa, p. 200-212. 5 mar. 2013.

MARCELINO, Vanessa Rossetto; VERBRUGGEN, Heroen. **Multi-marker metabarcoding of coral skeletons reveals a rich microbiome and diverse evolutionary origins of endolithic algae**. *Scientific Reports*, [s.l.], v. 6, n. 1, p.1-9, 22 ago. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/srep31508>

MARCELINO, Vanessa Rossetto et al. Diversity and stability of coral endolithic microbial communities at a naturally high pCO₂ reef. **Molecular Ecology**, [s.l.], v. 26, n. 19, p.5344-5357, 24 ago. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/mec.14268>.

MARGULIS, L. Symbiogenesis and symbiogenesis, p 1–14. In Margulis L, Fester R (ed), **Symbiosis as a source of evolutionary innovation: speciation and morphogenesis**. MIT Press, Cambridge, MA, 1991. p 1–14.

MARTINS, Layla Farage et al. Metagenomic Analysis of a Tropical Composting Operation at the São Paulo Zoo Park Reveals Diversity of Biomass Degradation Functions and Organisms. **Plos One**, [s.l.], v. 8, n. 4, p.1-13, 24 abr. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0061928>.

MCCOY, Sophie J.; KAMENOS, Nicholas A.. Coralline algae (Rhodophyta) in a changing world: integrating ecological, physiological, and geochemical responses to global change. **Journal Of Phycology**, [s.l.], v. 51, n. 1, p.6-24, 23 jan. 2015. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/jpy.12262>.

MONROE, Alison A. et al. In situ observations of coral bleaching in the central Saudi Arabian Red Sea during the 2015/2016 global coral bleaching event. **Plos One**, [s.l.], v. 13, n. 4, p.1-13, 19 abr. 2018. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0195814>.

MUSCATINE, L. et al. Stable isotopes (¹³C and ¹⁵N) of organic matrix from coral skeleton. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 102, n. 5, p.1525-1530, 25 jan. 2005. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0408921102>.

NAVAS-MOLINA, José A. et al. Advancing Our Understanding of the Human Microbiome Using QIIME. **Methods In Enzymology**, [s.l.], p.371-444, 2013. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-407863-5.00019-8>.

NESME, Joseph et al. Back to the Future of Soil Metagenomics. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 7, p.1-5, 10 fev. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00073>.

OLIVEIRA, Márcia et al. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase. **Embrapa Pecuária Sudeste** São Carlos, SP 2007.

OULAS, A. et al. Metagenomics: tools and insights for analyzing nextgeneration sequencing data derived from biodiversity studies. *Bioinform Biol Insights*, v. 9, p. 75-88, 2015. ISSN 1177-9322.

PEIXOTO, Raquel S. et al. **Beneficial Microorganisms for Corals (BMC): Proposed Mechanisms for Coral Health and Resilience. *Frontiers In Microbiology***, [s.l.], v. 8, p.1-16, 7 mar. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00341>.

PLAISANCE, Laetitia et al. The Diversity of Coral Reefs: What Are We Missing? ***Plos One***. California (us), p. 1-7. 13 out. 2011.

PORAZINSKA, Dorota L. et al. Evaluating high-throughput sequencing as a method for metagenomic analysis of nematode diversity. ***Molecular Ecology Resources***, [s.l.], v. 9, n. 6, p.1439-1450, nov. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02611.x>.

RAGHUKUMAR, Seshagiri. **Fungi in Coastal and Oceanic Marine Ecosystems: Marine Fungi**. Goa India: Springer, 2017. 383 p.

RAVINDRAN J; RAGHUKUMAR C; RAGHUKUMAR S. Fungi in *Porites lutea*: association with healthy and diseased corals. ***Dis Aquat Org*** 47:219–228, 2001.

REAKA-KUDLA, M. The global biodiversity of coral reefs: a comparison with rain forests. In: Reaka-Kudla M, Wilson DE, Wilson EO, eds. ***Biodiversity II: understanding and protecting our biological resources***. Washington, D.C.: Joseph Henry Press. pp 83–108, 1997.

RESHEF, Leah et al. The Coral Probiotic Hypothesis. ***Environmental Microbiology***, [s.l.], v. 8, n. 12, p.2068-2073, dez. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01148.x>.

RICHARDS, Thomas A. et al. Marine Fungi: Their Ecology and Molecular Diversity. **Annual Review Of Marine Science**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.495-522, 15 jan. 2012. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-marine-120710-100802>.

RICHARDS, Zoe T.; DAY, Jon C.. Biodiversity of the Great Barrier Reef—how adequately is it protected? **Peerj**, [s.l.], v. 6, p.1-26, 8 maio 2018. PeerJ. <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.4747>.

RIEGL, Bernhard et al. Coral Reefs. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 1162, n. 1, p.136-186, abr. 2009.

RINKE, Christian et al. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. **Nature**, [s.l.], v. 499, n. 7459, p.431-437, jul. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12352>.

ROBIDEAU, Gregg P. et al. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. **Molecular Ecology Resources**, [s.l.], v. 11, n. 6, p.1002-1011, 20 jun. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03041.x>.

ROHWER, F et al. Diversity and distribution of coral-associated bacteria. **Marine Ecology Progress Series**, [s.l.], v. 243, p.1-10, 2002. Inter-Research Science Center. <http://dx.doi.org/10.3354/meps243001>.

ROSENBERG, Eugene et al. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 5, n. 5, p.355-362, 26 mar. 2007. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1635>.

SALA, Enric et al. The Structure of Mediterranean Rocky Reef Ecosystems across Environmental and Human Gradients, and Conservation Implications. **Plos One**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.1-13, 29 fev. 2012. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0032742>.

SCHOCH, C. L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 109, n. 16, p.6241-6246, 27 mar. 2012. Proceedings of the National Academy of Sciences.

SCZYRBA, Alexander et al. Critical Assessment of Metagenome Interpretation – a benchmark of computational metagenomics software. **Nature Methodes**, [s.l.], p.1063-1072, 9 jan. 2017. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/099127>.

SHEPPARD, CRC; DAVY, SK; PILLING, GM. The biology of coral reefs. **Oxford University Press**, Oxford. 2009.

SKILLINGS, Derek. Holobionts and the ecology of organisms: Multi-species communities or integrated individuals?. **Biology & Philosophy**, [s.l.], v. 31, n. 6, p.875-892, 20 out. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10539-016-9544-0>.

SUNAGAWA, Shinichi; WOODLEY, Cheryl M.; MEDINA, Monica. Threatened Corals Provide Underexplored Microbial Habitats. **Plos One**. San Diego, Usa, p. 1-7. 5 mar. 2010.

SOERGEL, David A W et al. Selection of primers for optimal taxonomic classification of environmental 16S rRNA gene sequences. **The Isme Journal**, [s.l.], v. 6, n. 7, p.1440-1444, 12 jan. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2011.208>.

TIERNEY, Peter W.; JOHNSON, Markes E.. Stabilization Role of Crustose Coralline Algae During Late Pleistocene Reef Development on Isla Cerralvo, Baja California Sur (Mexico). **Journal Of Coastal Research**, [s.l.], v. 279, p.244-254, jan. 2012. Coastal Education and Research Foundation. <http://dx.doi.org/10.2112/jcoastres-d-11t-00009.1>.

THOMPSON, Janelle R. et al. Microbes in the coral holobiont: partners through evolution, development, and ecological interactions. **Frontiers In Cellular And**

Infection Microbiology, [s.l.], v. 4, p.1-20, 7 jan. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2014.00176>.

THOMAS, Torsten; GILBERT, Jack; MEYER, Folker. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. **Microbial Informatics And Experimentation**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.1-12, 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/2042-5783-2-3>.

TREMBLAY, P. et al. Autotrophic carbon budget in coral tissue: a new ¹³C-based model of photosynthate translocation. **Journal Of Experimental Biology**, [s.l.], v. 215, n. 8, p.1384-1393, 21 mar. 2012. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.065201>.

THURBER, Rebecca Vega et al. Metagenomic analysis of stressed coral holobionts. **Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 11, n. 8, p.2148-2163, ago. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01935.x>.

UNESCO. Lagoons of New Caledonia: Reef Diversity and Associated Ecosystems. 2011. Disponível em < <http://whc.unesco.org/en/list/1115>>. Acesso em 23/06/2018.

VILLAÇA, Roberto. Recifes biológicos. Pp. 399-420, In: PEREIRA, Renato Crespo; SOARES-GOMES, Abílio. (Orgs.). **Biologia Marinha**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, p. 399-420, 2009.

VOLLMERS, John; WIEGAND, Sandra; KASTER, Anne-kristin. Comparing and Evaluating Metagenome Assembly Tools from a Microbiologist's Perspective - Not Only Size Matters! **Plos One**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.1-31, 18 jan. 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0169662>.

WEGLEY, Linda et al. Metagenomic analysis of the microbial community associated with the coral *Porites astreoides*. **Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 9, n. 11, p.2707-2719, nov. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01383.x>.

WEISS, Anna; MARTINDALE, Rowan C. Crustose coralline algae increased framework and diversity on ancient coral reefs. **Plos One**, [s.l.], v. 12, n. 8, p.1-12, 4 ago. 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0181637>.

WILD, Christian et al. Coral mucus functions as an energy carrier and particle trap in the reef ecosystem. **Nature**, [s.l.], v. 428, n. 6978, p.66-70, mar. 2004. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature02344>.

WILD, Christian et al. Climate change impedes scleractinian corals as primary reef ecosystem engineers. **Marine And Freshwater Research**, [s.l.], v. 62, n. 2, p.1-12, 2013. CSIRO Publishing. <http://dx.doi.org/10.1071/mf10254>.

WOO, P.C. et al. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. **Clinical Microbiology and Infection**, Review, 14(10), p. 908-934, 2008.

WORK, Thierry; METEYER, Carol. To Understand Coral Disease, Look at Coral Cells. **Ecohealth**, [s.l.], v. 11, n. 4, p.610-618, 11 abr. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10393-014-0931-1>.

XU, Jianping. Fungal DNA barcoding. **Genome**, [s.l.], v. 59, n. 11, p.913-932, nov. 2016. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/gen-2016-0046>.

YARDEN, O. et al. Increased prevalence of ubiquitous Ascomycetes in an acroporid coral (*Acropora formosa*) exhibiting symptoms of brown band syndrome and skeletal eroding band diseases. **Appl Environ Microbiol** 73:2755–2757, 2007.

YARDEN, Oded. Fungal association with sessile marine invertebrates. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 5, p.1-6, 15 maio 2014. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00228>.

ZILBERBEG, C.et al. Conhecendo os Recifes Brasileiros: Rede de Pesquisas Coral Vivo. Rio de Janeiro: Museu Nacional, UFRJ, 2016.

ZILBER-ROSENBERG, Ilana; ROSENBERG, Eugene. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. **Fems Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 32, n. 5, p.723-735, ago. 2008. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574>