



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**  
**CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**JEAN TÁCIO TÔRRES DE LIRA**

**LEVANTAMENTO E ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO GÊNERO**  
***SIDERASTREA* BLAINVILLE, 1830**

**RECIFE**  
**2024**

JEAN TÁCIO TÔRRES DE LIRA

**LEVANTAMENTO E ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO GÊNERO  
*SIDERASTREA* BLAINVILLE, 1830**

Monografia apresentada à Coordenação do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, sob orientação da professora Dra. Fernanda Maria Duarte do Amaral e coorientação do professor Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, de acordo com as exigências.

**RECIFE  
2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Bibliotecário(a): Ana Catarina Macêdo – CRB-4 1781

L768l Lira, Jean Tácio Tôrres de.  
Levantamento e análise da variabilidade genética do gênero *Siderastrea* (blainville, 1830) no Oceano Atlântico Ocidental / Jean Tácio Tôrres de Lira. – Recife, 2024.  
41 f.; il.

Orientador(a): Fernanda Maria Duarte do Amaral.  
Co-orientador(a): Paulo Roberto Eleutério de Souza.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) –  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado  
em Ciências Biológicas, Recife, BR-PE, 2024.

Inclui referências.

1. Variabilidade Genética. 2. Corais. 3. Bioinformática. I.  
Amaral, Fernanda Maria Duarte do, orient. II. Souza, Paulo  
Roberto Eleutério de, coorient. III. Título

CDD 574

**JEAN TÁCIO TÔRRES DE LIRA**

**LEVANTAMENTO E ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO GÊNERO  
*SIDERASTREA* BLAINVILLE, 1830**

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, avaliada no dia 04/10/2024.

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof. Dra. Fernanda Maria Duarte do Amaral (Orientadora)  
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Cristina Bezerra Leite (2<sup>o</sup> titular)  
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

---

Prof. Dr. Ronald Moura (3<sup>o</sup> titular)  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nara Suzy de Aguiar Freitas - Suplente  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

**RECIFE  
2024**

## **DEDICATÓRIA**

À minha mãe, ao meu pai, às minhas irmãs, aos meus amigos e aos meus filhos de quatro patas.

Por fim, dedico à minha orientadora Professora Dra. Fernanda Amaral, pela paciência e pelo apoio nesta pesquisa e no meu percurso acadêmico.

## AGRADECIMENTOS

A conclusão desse ciclo atravessa muitas pessoas para além de mim. Então, essa página é um muito obrigado a todos que estiveram por mim, não apenas nos anos da graduação, mas também nos anos anteriores que me fizeram chegar até aqui.

Agradeço ao meus pais, Tony Jean de Lira e Jussara de Fátima Tôres de Lira, que sempre me proporcionaram um amor gigantesco e fizeram tudo que poderiam fazer por mim, além de me ensinarem tudo sobre persistência e determinação. À eles devo o meu eterno amor e gratidão.

Agradeço aos Himalaianos, que são meus irmãos de coração e sempre estão comigo nos momentos de alegria e tristeza. À eles devo minha lealdade e gratidão por despertarem a minha melhor versão.

Agradeço a todos meus amigos da faculdade, que não dividiram apenas os momentos de angústia e frustração durante os surtos acadêmicos, mas também compartilhamos de momentos bons e engraçados.

Agradeço aos meus demais amigos, que sempre me apoiaram e se fizeram presente quando necessitei.

Agradeço à toda minha família, as minhas irmãs Juliany e Jussany, que sempre me aconselham e apoiam, à minhas avós e a meus tias e tios, que me ensinaram sobre ser feliz independente das adversidades da vida.

Agradeço ao LAR e ao GENOMA, à professora Dr. Fernanda Amaral, que sempre me apoiou desde o início da graduação, ao professor Dr. Paulo Eleutério, a todos os professores que tive oportunidade de conversar, participar das aulas e ser monitor, e aos demais companheiros de laboratório.

Por fim, agradeço a mim, pois eu quem mais lutei para chegar até aqui.

*“Corri atrás pra ver tudo o que eu vi. Estou bem melhor por ter feito o que eu fiz, e da vitória o gosto eu senti, sim, foi o que eu quis fazer. Mas se você ficou pra trás, não tenho culpa eu batalhei, minha vida mudou. Mas o fato de eu ter mudado minha vida não mudou quem eu sou. Se o que mais me satisfaz é ser quem eu sou!”*

*(Charlie Brown Jr., 2001).*

## RESUMO

Este estudo visou preencher lacunas no conhecimento sobre a diversidade genética e filogenética do gênero *Siderastrea* (Blainville, 1830), importantes organismos construtores dos recifes de corais, com maior foco na espécie *Siderastrea stellata* (Verrill, 1868). Colônias parcialmente branqueadas da espécie *S. stellata* foram coletadas na praia de Gaibu, no período de novembro de 2022 a janeiro de 2023 e o DNA genômico das colônias foi extraído utilizando o Kit Wizard Genomic DNA Purification Kit. Foi desenhado um par de primers específico para a confirmação da espécie *S. stellata* e a identificação das colônias foi realizada pela técnica de PCR convencional. A análise da variabilidade entre as colônias foi realizada pela técnica de RAPD utilizando 06 primers randômicos do tipo ITS. Além disso, para analisar se existia variabilidade genética entre as amostras de *S. stellata*, existentes no banco de dados genômico Genbank, as sequências depositadas foram utilizadas para o alinhamento e posteriormente foram realizadas análises filogenéticas entre amostras depositadas utilizando a plataforma Mega. Por fim, análises de restrição enzimática *in silico* foram realizadas na busca de enzimas de restrição que pudessem ser utilizadas na diferenciação entre os isolados. Os resultados alcançados com a técnica de RAPD não forneceram dados suficientes para permitir identificar variabilidade genética entre as amostras analisadas no presente estudo. Por outro lado, em relação aos dados da análise filogenética, foi possível encontrar diferenças entre as sequências de isolados de diferentes regiões. Houve uma maior proximidade genética entre isolados de *S. stellata* do Panamá e do Brasil e menor proximidade com o isolado do México. A *Siderastrea savignyana* se destacou como o ancestral mais distante dentro do gênero. Além disso, foi possível detectar variações genéticas preliminares entre as populações avaliadas, utilizando dados da análise de restrição *in silico*. Desta forma, o presente estudo traz uma primeira abordagem de análise genética de variabilidade dentro das espécies de *S. stellata*. Contudo, estudos mais aprofundados são necessários e poderão auxiliar no esclarecimento da complexidade da variabilidade genética do gênero, além de auxiliar nas estratégias de manejo e conservação desses organismos e dos ecossistemas marinhos que eles sustentam.

**Palavras-chave: Variabilidade Genética, Corais, Bioinformática.**

## ABSTRACT

This study aimed to fill gaps in knowledge about the genetic and phylogenetic diversity of the genus *Siderastrea* (Blainville, 1830), important coral reef-building organisms, with a greater focus on the species *Siderastrea stellata* (Verrill, 1868). Partially bleached colonies of the species *S. stellata* were collected on Gaibu beach, from November 2022 to January 2023 and the genomic DNA of the colonies was extracted using the Wizard Genomic DNA Purification Kit. A specific primer pair was designed to confirm the species *S. stellata* and the identification of the colonies was performed by the conventional PCR technique. The analysis of the variability between the colonies was performed by the RAPD technique using 06 random ITS primers. Furthermore, to analyze whether there was genetic variability among the *S. stellata* samples in the Genbank genomic database, we downloaded all sequences and performed sequence alignment. Subsequently, phylogenetic analyses were performed among the deposited samples using the Mega platform. Finally, *in silico* restriction enzyme analyses were performed to search for restriction enzymes that could be used to differentiate between the isolates. The results obtained with the RAPD technique did not provide sufficient data to identify genetic variability among the samples analyzed in the present study. On the other hand, regarding the data from the phylogenetic analysis, it was possible to find differences between the sequences of isolates from different regions. There was greater genetic proximity between *S. stellata* isolates from Panama and Brazil and less proximity to the isolate from Mexico. *Siderastrea savigneana* stood out as the most distant ancestor within the genus. In addition, it was possible to detect preliminary genetic variations among the populations evaluated, using data from the *in silico* restriction analysis. Thus, this study provides a first approach to genetic analysis of variability within the species of *S. stellata*. However, more in-depth studies are needed and may help to clarify the complexity of the genetic variability of the genus, in addition to assisting in management and conservation strategies for these organisms and the marine ecosystems they support.

**Keywords: Genetic Variability, Corals, Bioinformatics.**

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Espécies do gênero <i>Siderastrea</i> .....	2
<b>Figura 2.</b> Registros da coleta de campo de <i>S. stellata</i> na Praia de Gaibu (PE).....	5
<b>Figura 3.</b> Materiais utilizados para coleta do coral <i>Siderastrea stellata</i> .....	6
<b>Figura 4.</b> Preparação para a raspagem do tecido coralíneo das colônias coletadas de <i>Siderastrea stellata</i> .....	7
<b>Figura 5.</b> Programação da ciclagem da PCR para região ITS de <i>S. stellata</i> .....	8
<b>Figura 6.</b> Precipitação de DNA de corais <i>Siderastrea stellata</i> com Isopropanol.....	12
<b>Figura 7.</b> Análise do DNA extraído de <i>Siderastrea stellata</i> , com o <i>Wizard Genomic DNA Purification Kit</i> em gel de agarose a 1%.....	13
<b>Figura 8.</b> Preparo da PCR para amplificação da região ITS de <i>Siderastrea stellata</i> .....	13
<b>Figura 9.</b> Eletroforese de uma amplificação da região ITS de <i>Siderastrea stellata</i> .....	14
<b>Figura 10.</b> Análise RAPD em gel de agarose a 1,5%, utilizando primers CAM ( <i>Caiman</i> ).....	15
<b>Figura 11.</b> Análise de RAPD para <i>S. stellata</i> utilizando primers CAM B04 e B07.....	15
<b>Figura 12.</b> Países com localização conhecida nas sequências de <i>Siderastrea</i> depositadas no GenBank.....	16
<b>Figura 13.</b> Contig gerado das sequências de <i>Siderastrea radians</i> .....	17
<b>Figura 14.</b> Contig gerado das sequências de <i>Siderastrea savignyana</i> .....	17
<b>Figura 15.</b> Contig gerado das sequências de <i>Siderastrea sidérea</i> .....	17
<b>Figura 16.</b> Contig gerado das sequências de <i>Siderastrea stellata</i> .....	17
<b>Figura 17.</b> Contig gerado das sequências de amostras do Brasil de <i>S. stellata</i> .....	18
<b>Figura 18.</b> Contig gerado das sequências de amostras do México de <i>S. stellata</i> .....	18
<b>Figura 19.</b> Contig gerado das sequências de amostras do Panamá de <i>S. stellata</i> .....	18
<b>Figura 20.</b> Análise filogenética usando o gene 5.8s de <i>Siderastrea</i> , mostrando as bases ancestrais e os valores de diversidade das sequências e distância genética dos ramos.....	19
<b>Figura 21.</b> Análise filogenética usando o gene ITS2 de <i>Siderastrea</i> , mostrando as bases ancestrais e os valores de diversidade das sequências e distância genética dos ramos.....	19
<b>Figura 22.</b> Análise filogenética usando o gene 5.8s de <i>Siderastrea stellata</i> , mostrando as bases ancestrais e os valores de diversidade das sequências e distância genética dos ramos.....	20

<b>Figura 23.</b> Análise filogenética usando o gene 5.8s de <i>Siderastrea stellata</i> , mostrando as bases ancestrais e os valores de diversidade das sequências e distância genética dos ramos.....	20
<b>Figura 24.</b> Análise <i>in silico</i> no gene 5.8s de <i>Siderastrea</i> , usando a enzima sfaNI.....	21
<b>Figura 25.</b> Análise <i>in silico</i> no gene ITS2 de <i>Siderastrea</i> , usando a enzima Fnu4HI...	21

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>2</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>4</b>
<b>3.1. REGISTROS E COLETAS EM CAMPO</b> .....	<b>5</b>
<b>3.2. PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS</b> .....	<b>6</b>
3.2.1. Extração de DNA genômico e análise em gel de agarose.....	7
3.2.2. <i>Identificação molecular de Siderastrea stellata</i> .....	7
<b>3.3. ACESSO E SELEÇÃO DE SEQUÊNCIAS GENÉTICAS</b> .....	<b>9</b>
<b>3.4. MONTAGEM DOS CONTIG'S</b> .....	<b>10</b>
3.4.1. <i>Caracterização e identificação de genes</i> .....	10
<b>3.5. ANÁLISE FILOGENÉTICA BIOGEOGRÁFICA</b> .....	<b>10</b>
<b>3.6. DIGESTÃO <i>IN SILICO</i></b> .....	<b>11</b>
3.6.1. <i>Análise da Digestão In Silico</i> .....	11
<b>4. RESULTADOS E CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>12</b>
4.1. OBTENÇÃO DO DNA GENÔMICO DE <i>S. STELLATA</i> (VERRIL, 1868).....	12
4.2. IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE <i>S. STELLATA</i> (VERRIL, 1868) .....	13
4.3. AVALIAÇÃO DE PRIMERS ITS PARA TESTE DE RAPD.....	14
4.4. ANÁLISE BIOINFORMÁTICA (CONTIGS) .....	16
4.5. ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	18
4.6. ANÁLISE DE DIGESTÃO ENZIMÁTICA <i>IN SILICO</i> (RFLP).....	20
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>23</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os ambientes recifais são de grande importância no ecossistema marinho, uma vez que atuam como áreas de reprodução, desova, alimentação e abrigo para uma grande diversidade de organismos marinhos (Moberg; Folke, 1999). Contudo, esses ecossistemas são extremamente sensíveis a variações abióticas das águas oceânicas, tais como: mudanças no pH, na salinidade e na temperatura, (Glynn, 1993), e nesses locais podemos encontrar os corais pétreos do gênero *Siderastrea*, objeto principal do nosso estudo.

Esses organismos marinhos são cruciais para os ambientes recifais, por fornecer habitat e alimento, dentre outras contribuições, para outros organismos. Pernambuco é um dos locais em que observamos a presença do coral *Siderastrea stellata*, sendo por isso escolhido para o desenvolvimento deste estudo.

Até o momento, não existem investigações abrangentes sobre a diversidade genética e filogenética de *Siderastrea*, baseadas em sequências genômicas disponíveis publicamente. Ademais, o *Siderastrea stellata* apresenta praticidade e facilidade de acesso à coleta.

A presente pesquisa teve como objetivo central a realização de um levantamento, no oceano atlântico ocidental, do gênero *Siderastrea*, tendo como objetivos específicos: 1) analisar a possível ocorrência de variabilidade genética dentro da espécie *Siderastrea stellata*; 2) realizar o levantamento e a análise das sequências depositadas em bancos gênicos de *Siderastrea*; e 3) elaborar Contigs para análises bioinformáticas das populações.

Dessa forma, o estudo se desenvolveu em três capítulos: 1- introdução geral do conteúdo abordado; 2- UM referencial teórico, ao qual se baseou esta pesquisa. Traremos pesquisadores como Kitahara (2016), Pinheiro (2016), Santos *et al.* (2021) e Tunala (2022); 3- trabalharemos mais detidamente sobre a metodologia, apresentando como desenvolvemos e guiamos a pesquisa e quais materiais e métodos utilizamos; 4- mostraremos o resultado de nossa pesquisa e as considerações finais, trazendo os dados e informações que reunimos a partir da nossa investigação.

Isto posto, frisa-se a importância deste estudo pelo seu ineditismo, utilizando as metodologias qualitativa, descritiva e de campo para o seu desenvolvimento. Nestes termos, seguiremos para o capítulo seguinte, avançando em nosso referencial teórico.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

Os corais pétreos do gênero *Siderastrea* são organismos marinhos fundamentais e essenciais dos recifes de coral, fornecendo estrutura, habitat e alimento para uma ampla gama de organismos marinhos, desempenhando um papel crucial na formação e manutenção desses ecossistemas (Veron, 2000). As quatro espécies do gênero, sendo elas *S. stellata*, *S. radians*, *S. siderea* e *S. savignyana* (Figura 1), se destacam por sua ampla distribuição geográfica, abrangendo o Atlântico Ocidental, o mar do Caribe e o Golfo do México (Cairns *et al.*, 2009). Sua importância ecológica e econômica, aliada à sua ampla distribuição, o torna um alvo ideal para estudos aprofundados sobre sua possível história evolutiva, diversidade genética e conectividade populacional.



**Figura 1.** Espécies do gênero *Siderastrea*. A: *S. stellata*; B: *S. radians*; C: *S. siderea*; D: *S. savignyana*. Fonte: Google Imagens.

No entanto, apesar de sua importância ecológica, estudos que integrem análises filogenéticas, biogeográficas e moleculares do gênero ainda são incipientes, causando uma lacuna significativa no conhecimento sobre a diversidade genética e filogenética desses organismos, uma vez que a maioria dos estudos existentes se concentra em aspectos específicos da biologia da espécie, como crescimento (Costa *et al.*, 2008; Hoogenboom *et al.*, 2012; Pinheiro, 2016), reprodução (Hughes *et al.*, 1992; De Barros, Pires, 2006; Harrison, 2011) ou resposta ao estresse ambiental (Kelmo, 1998; Agostinho, 2020; Drury, Lirman, 2021; Santos *et al.*, 2021; Tunalá, 2022).

A falta de estudos abrangentes limita a compreensão da história evolutiva e da variabilidade genética dentro do gênero, assim como da conectividade entre populações geograficamente distantes (Van Oppen *et al.*, 2006, 2011). Desta forma, o presente estudo se propôs a preencher essa lacuna ao realizar um levantamento das sequências genéticas de *Siderastrea* depositadas online no banco de dados do GenBank do NCBI.

Por meio da análise de sequências ribossomais, buscamos identificar possíveis padrões de diversidade genética, combinando análises filogenéticas, biogeográficas e moleculares das sequências genômicas selecionadas, a fim de desvendar possíveis graus de parentesco entre populações e as características genéticas específicas associadas a diferentes localidades geográficas (Fukami *et al.*, 2004a, 2004b; Garcia *et al.*, 2017).

Dessa forma, o estudo se dedicou em desvendar a variabilidade gênica do gênero, identificando relações de parentesco entre as populações e inferindo possíveis eventos que podem ter moldado a distribuição geográfica da espécie (Knowlton, Jackson, 2008; Pinheiro *et al.*, 2017). Além disso, foi avaliada a diversidade genética dentro da espécie, avaliando o nível de variabilidade genética entre as populações e reconhecendo possíveis áreas de endemismo genético (Baums *et al.*, 2005; Kitahara, 2016). Por fim, se investigou a conectividade populacional (Neves *et al.*, 2008), elucidando o fluxo gênico entre as populações, e identificando barreiras geográficas que possam ser fatores limitantes (Hellberg, 2009).

Nesta perspectiva, este estudo se torna relevante, em face de seu ineditismo ao combinar diferentes ferramentas e técnicas, oferecendo uma nova visão sobre o tema, uma vez que até o momento não há investigações recentes e abrangentes sobre a diversidade genética e filogenética de *Siderastrea* baseadas em sequências genômicas disponíveis publicamente, nem abordando a diversidade genética e conectividades geográficas populacionais.

Além disso, a realização deste estudo também destaca a importância crescente de estudos de bioinformática aplicados à ecologia e biologia marinha, uma vez que esse campo de pesquisa é pouco explorado, principalmente em relação aos corais (Louis *et al.*, 2017). A integração de técnicas bioinformáticas avançadas, como análises filogenéticas, montagem de Contig's e simulações de restrição enzimática *in silico*, permite uma compreensão mais abrangente e detalhada da diversidade genética e da estrutura populacional desses organismos marinhos.

Ademais, a pesquisa traz uma preocupação em face da situação climática global atual. Isto porque, os corais vêm enfrentando eventos catastróficos recorrentes, como o branqueamento em massa, associada a uma alta taxa mortalidade nas últimas décadas, que levantaram questões sobre o futuro dos ecossistemas de recifes de corais (Glynn, 1993; Leão, Kikuchi; Oliveira, 2008; Santos *et al.*, 2021). Mesmo que o branqueamento seja bem estudado, ele não é compreendido de forma íntegra, pois

ainda não há uma descrição completa e precisa de como as diversas condições ambientais interferem de fato nesse evento, além da falta de nuances na descrição dos limites biológicos dos corais e as reações fisiológicas dos organismos a temperaturas elevadas e outros fatores, bem como a grande falta de dados sobre a variação genética e sua interferência no branqueamento (Burgess, 2021; Virgen-Urcelay; Donner, 2023), uma vez que grande parte das colônias que apresentam combinações genotípicas locais sofre algum branqueamento visível atribuído ao estresse térmico (Drury; Lirman, 2021).

Assim, a existência de colônias aparentemente tolerantes ao evento do branqueamento pode estar associada à aclimatação contínua dos corais a temperaturas crescentes, bem como a questão das mudanças na composição da comunidade em direção a genótipos mais tolerantes ao calor (Thompson; Van Woesik, 2009; Hughes *et al.*, 2019; Decarlo; Harrison, 2019), sendo necessária a investigação dos seus genótipos locais.

Por fim, este tipo de análise pode fornecer insights valiosos para a conservação e manejo desses ecossistemas marinhos crescentemente ameaçados, direcionando esforços para possíveis áreas prioritárias e identificando populações geneticamente distintas que possam necessitar de proteção especial, ajudando a reduzir impactos das mudanças climáticas e outras atividades humanas sobre os recifes de coral (Lima, Coutinho, 2016; Arrigoni *et al.*, 2017; Riginos *et al.*, 2024).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

Escolhemos o gênero *Siderastrea Blainville*, 1830, como objeto de nosso estudo, por ele ter uma espécie com ampla ocorrência no litoral Sul de Pernambuco, a espécie *Siderastrea stellata* (Verrill, 1868), e pela praticidade de acesso para coleta, vez que ele pode ser encontrado em poucos centímetros de profundidade nessa região.

Para isso, a praia escolhida foi a de Gaibu, devido à facilidade de localizar colônias do gênero escolhido em poças com águas calmas durante a maré baixa, e pela grande quantidade de colônias parcialmente branqueadas, utilizadas nas análises genéticas.

### 3.1. REGISTROS E COLETAS EM CAMPO

As colônias coletadas, por meio da Licença Permanente do SISBio, Número: 15332-5, foram escolhidas aleatoriamente, desde que estivessem parcialmente branqueadas (com uma região branqueada e uma região saudável) e distantes no mínimo 10 metros umas das outras, afim de evitar a coleta de clones derivados da mesma colônia-mãe (Pinheiro, 2016) (Figura 2). Além disso, não foram coletadas colônias recrutadas, apenas maduras, e que estivessem em poças paradas (sem correnteza), a fim de assegurar que todas as regiões das colônias estivessem sob as mesmas influências e interferências ambientais.



**Figura 2.** Registros da coleta de campo de *S. stellata* na Praia de Gaibu (PE).

As colônias coletadas foram armazenadas em potes separados (Figura 3), devidamente etiquetadas e transportadas em água do mar cobertas, para evitar a exposição excessiva à radiação solar e para manter as temperaturas relativamente constantes, até serem armazenadas em um refrigerador, para posterior análise (Banaszak, 2007).



**Figura 3.** Materiais utilizados para coleta do coral *Siderastrea stellata*. Fonte: imagem do autor.

As coletas foram realizadas na Praia de Gaibu, no período de novembro de 2022 a janeiro de 2023, para realização dos testes pilotos da extração de DNA, assim como para realização dos testes de PCR.

### 3.2. PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

No Laboratório de Ambientes Recifais (LAR), localizado na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), foi realizada a estocagem das amostras em um refrigerador, com as amostras sendo, posteriormente, processadas no Laboratório de Genética, Bioquímica e Sequenciamento de DNA (GENOMA) da UFRPE.

Antes do processamento das amostras, as superfícies das colônias foram lavadas com água destilada, para remover possíveis organismos contaminantes (Figura 4), sendo feitas, posteriormente, as raspagens de 2 a 3 cm<sup>2</sup> do tecido coralíneo, com estilete ou navalhete (Banaszak, 2007). Nessa etapa, uma amostra da área branqueada e uma da área saudável foram retiradas de cada colônia, sendo colocadas em tubos de *ependorf*, devidamente etiquetados, para ter seu DNA extraído.



**Figura 4.** Preparação para a raspagem do tecido coralíneo das colônias coletadas de *Siderastrea stellata*. Fonte: imagem do autor.

### 3.2.1. Extração de DNA genômico e análise em gel de agarose

A extração do DNA piloto das colônias de coral foi realizada utilizando o Wizard Genomic DNA Purification Kit, seguindo as instruções do fabricante para a extração de DNA de tecido animal. Em seguida, o DNA extraído foi submetido à separação eletroforética em em gel de agarose a 1% para verificação da qualidade da amostra extraída, e visualizada em luz ultravioleta.

### 3.2.2. Identificação molecular de *Siderastrea stellata*

Para identificação da espécie *Siderastrea stellata*, foram desenhados primers específicos para a região ITS do RNA ribossomal 18s, utilizando dados da plataforma GenBank, NCBI (*National Center for Biotechnology Information*):

ITS1F: 5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G -3'.

ITS5F: 5'- GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G -3'.

ITSR: 5'- CCA ACT CTT TGG AAG AAA GGC CGT -3'.

A mistura dos componentes da reação da PCR para identificação da região ITS de *Siderastrea stellata*, consistiu de: 1X Tampão Taq DNA polimerase (Invitrogen), 200 $\mu$ M dNTP, 2,5mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 1pmol de cada primer; 2U Taq polimerase (Invitrogen) e 3 $\mu$ L de DNA extraído.

A amplificação da sequência foi realizada no Termociclador *LifeTouch* da BIOER, seguindo as seguintes condições de reação: *Hold* inicial de 95°C por 2 min; seguidos de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos; e uma extensão final de 72°C por 5 minutos) (Figura 5).



**Figura 5.** Programação da ciclagem da PCR para região ITS de *Siderastrea stellata*. A tela representa as condições da PCR. Na parte superior estão colocadas as amostras para serem amplificadas. Fonte: imagem do autor.

### 3.2.3. Identificação RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

A técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) foi utilizada para analisar variabilidade genética entre as diferentes regiões das colônias branqueadas, com o objetivo de identificar se esta variabilidade está relacionada com o branqueamento das colônias.

Inicialmente, foram realizadas análises utilizando primers RAPD, da região do RNAr 18S usados na identificação de variabilidade genética em *Caiman* (jacarés), com 6 primers randômicos (10-mer) da série CAM (PROMEGA), cujas sequências estão descritas abaixo:

A01: 5'- CCC AAG GTC C -3'.

A02: 5'- GGT GCG GGA A -3'.

A03: 5'- AAG ACC CCT C -3'.

A05: 5'- CAC CAG GTG A -3'.

B04: 5'- TGC CAT CAG T -3'.

B07: 5'- AGA TCG AGC C -3'

As reações foram realizadas para um volume final de 15µl, montadas com as seguintes concentrações: ~50ng/µl DNA; 0,3 pmol de cada primer; 1X tampão da Taq

polimerase 10X (PROMEGA); 2,5mM MgCl<sub>2</sub> ; 0,2mM dNTP e 2U da enzima Taq-Polimerase 5U/ µl (PROMEGA).

A reação de amplificação do DNA foi realizada no termociclador automático PTC100 da MJ, com os seguintes passos: 45 ciclos de 94°C por 2min; 36°C por 1 min; 72°C por 2 min; e uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Os fragmentos de DNA obtidos (bandas), para os 8 primers foram analisados pela técnica de eletroforese em gel de agarose 1,5% submersos no tampão TBE (Tris Borato EDTA – 1X), e corados com *Gel Red*, visualizados com o auxílio de um transiluminador de luz ultravioleta e fotografados para as análises (Ferreira; Grattapaglia, 1998). As bandas foram analisadas juntamente com um marcador de peso molecular *ladder* de 50pb (Promega).

Além disso, também foi aplicada a técnica de RAPD, utilizando os primers desenvolvidos para a identificação de *S. stellata*, usando apenas um primer por reação e reduzindo a sua temperatura de anelamento para 45°C.

### 3.3. ACESSO E SELEÇÃO DE SEQUÊNCIAS GENÉTICAS

Para realizar este estudo de bioinformática, inicialmente, acessamos o banco de dados do GenBank do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (USA, 2024a) e realizamos uma busca por sequências genômicas de *Siderastrea*, utilizando a os seguintes termos: "*Siderastrea*", "18s", "ITS1", "5.8s", "ITS2" e "28s", além de utilizar combinações entre os termos (por exemplo, "*Siderastrea stellata* 18S ITS1").

Todas as sequências encontradas foram baixadas no formato FASTA e armazenadas em um banco de dados local, sendo triadas, selecionadas e utilizadas para as análises subsequentes todas as sequências disponíveis que correspondessem aos critérios de inclusão, sendo eles:

- Sequências completas ou parciais para algum dos genes ribossomais de interesse (18S, ITS1, 5.8S, ITS2 e 28S).
- Sequências de alta qualidade (Phred score  $\geq 20$ ).
- Informações geográficas sobre o local de coleta da amostra.
- Exclusão de sequências duplicadas ou redundantes.

### 3.4. MONTAGEM DOS CONTIG'S

Após a seleção das sequências genéticas, procedeu-se a montagem de Contig's (USA, 2024b). As sequências foram agrupadas com base nas localizações geográficas das amostras, visando identificar padrões de distribuição geográfica e potenciais diferenças genéticas entre populações. O software MEGA11 foi utilizado para realizar o alinhamento entre as sequências selecionadas, e o programa Contig Assembly (CAP) do software BioEdit foi utilizado para criar Contig's a fim de fazer a montagem completa da sequência (Choudhary *et al.*, 2023) considerando os parâmetros de montagem padrões adequados para cada região genômica, e sendo ajustados de acordo com a qualidade das sequências e o tamanho dos Contig's desejados (Yang *et al.*, 2021), sendo posteriormente verificados manualmente para garantir a qualidade da montagem.

#### 3.4.1. Caracterização e identificação de genes

Com os Contig's montados, procedemos à caracterização dos genes de interesse. Focamos na identificação e análise dos genes 18s, ITS1, 5.8s, ITS2 e 28s, que são importantes marcadores genéticos para estudos filogenéticos e de diversidade genética (Takabayashi *et al.*, 1998; Cuif *et al.*, 2003; Forsman *et al.*, 2005; Grajales *et al.*, 2007; Menezes *et al.*, 2012; Gong *et al.*, 2018). Utilizamos ferramentas de bioinformática, como BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), para anotar as regiões e os limites dos genes identificados, comparando-os com sequências de referência disponíveis no banco de dados do NCBI.

### 3.5. ANÁLISE FILOGENÉTICA BIOGEOGRÁFICA

Realizamos análises filogenéticas das sequências de genes ribossomais para identificar possíveis graus de parentesco e diversidade genética (Forsman *et al.*, 2005; Grajales *et al.*, 2007; Fukami *et al.*, 2008), para tal, utilizamos o programa MEGA11 para alinhar as sequências e construir árvores filogenéticas utilizando o método de Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood* - ML) (Nunes *et al.*, 2008; Wirshing, Baker *et al.*, 2014). Foi utilizado o alinhamento ClustalW (Larkin *et al.*, 2007), usando os parâmetros padrões de alinhamento de acordo com o tamanho das sequências e o grau de divergência, com a robustez das árvores sendo avaliada utilizando *Bootstrap* ou métodos similares (Arrigoni *et al.*, 2017).

Com os Contig's mapeados e criados de acordo com a distribuição geográfica das populações de *Siderastrea*, foram correlacionados os padrões de parentesco e diversidade genética obtidos nas análises anteriores (Menezes *et al.*, 2018), tendo seus dados cruzados com o mapa das correntes marítimas, com o foco em:

- Relações de parentesco entre populações de *Siderastrea* de diferentes regiões geográficas, com o foco em *S. stellata*.
- Padrões de divergência genética entre as populações.
- Barreiras geográficas que podem estar restringindo o fluxo gênico entre populações.

### 3.6. DIGESTÃO *IN SILICO*

Para analisar o perfil de corte com enzimas de restrição foi utilizada a plataforma online NEBcutter® (v.3.0.19) da New England Biolabs. As enzimas foram escolhidas de acordo com o sítio de corte e o tamanho de bandas geradas, para facilitar a posterior análise em gel, além de serem selecionadas as enzimas que digerissem os genes escolhidos em todos os Contig's gerados (Costa *et al.*, 2008; Nissa *et al.*, 2024), sendo assim, eleitas as regiões gênicas 5.8S e ITS2, pois foram os únicos que apresentaram consistência e qualidade em todos dos Contig's gerados.

Desta forma, foram selecionadas para o estudo a enzima “Sfa NI” para o gene 5.8S e a enzima “Fnu 4HI” para o gene ITS2, uma vez que seus sítios de reconhecimento são frequentes em todos os Contig's e os padrões de corte são distintos.

#### 3.6.1. Análise da Digestão *In Silico*

Os padrões de fragmentação gerados *in silico* para cada população e gene foram comparados, a presença ou ausência dos sítios de restrição e o tamanho dos fragmentos de DNA foram utilizados para identificar possíveis polimorfismos entre as populações. Utilizamos ferramentas disponíveis nos programas para simular a digestão das sequências dos Contig's com as enzimas selecionadas e analisamos os padrões de fragmentação resultantes da digestão para observar possíveis variações genéticas (Loenen *et al.*, 2024; Nissa *et al.*, 2024).

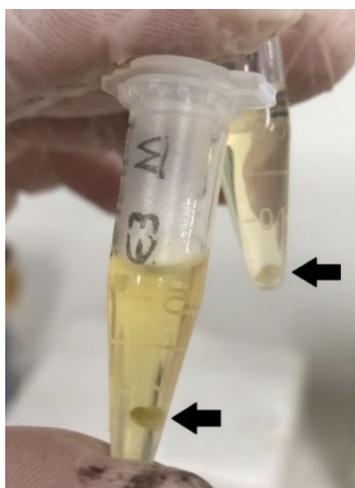
Para analisar os fragmentos gerados após a digestão utilizou-se os seguintes parâmetros: gel de agarose a 2% (para separação dos fragmentos de DNA digeridos *in silico* devido a maior qualidade da visualização das bandas) e o marcador molecular

“pBR322 MspI Digest” para melhor visualização do deslocamento entre os fragmentos gerados.

#### 4. RESULTADOS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

##### 4.1. OBTENÇÃO DO DNA GENÔMICO DE *S. STELLATA* (VERRIL, 1868)

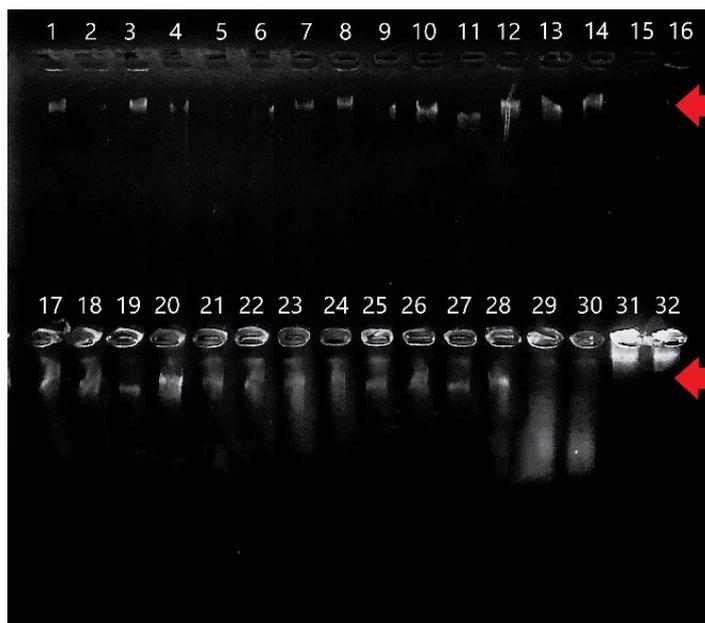
Na figura 6, observa-se precipitação do DNA genômico de *S. stellata* durante a fase de precipitação com etanol a 100%, numa das etapas finais do protocolo do kit Wizard Genomic DNA Purification Kit.



**Figura 6.** Precipitação de DNA de corais *Siderastrea stellata* com Isopropanol.

Fonte: imagem do autor.

O DNA genômico extraído de diferentes colônias foi posteriormente submetido a separação eletroforética em gel de algarose a 1%, conforme mostrado na Figura 7 abaixo. As setas abaixo indicam a posição do DNA genômico de cada amostra submetida ao processo de extração de DNA de colônia.



**Figura 7.** Análise do DNA extraído de *Siderastrea stellata*, com o Wizard Genomic DNA Purification Kit em gel de agarose a 1%. Fonte: imagem do autor.

#### 4.2. IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE *S. STELLATA* (VERRIL, 1868)

Após a extração do material genético, seguiu-se a amplificação da região ITS espécie específica para confirmação da espécie em estudo (Figura 8).



**Figura 8.** Preparo da PCR para amplificação da região ITS de *Siderastrea stellata*. Fonte: imagem do autor.

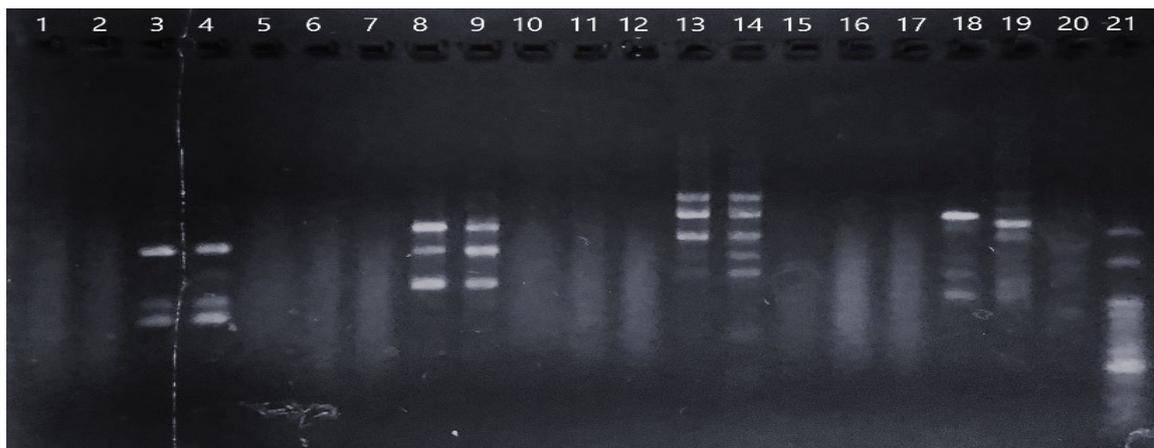
De todas as amostras extraídas e testadas, apenas quatro amplificaram para *S. stellata*. As demais amostras não amplificaram, provavelmente, devido à contaminação por organismos associados, que estão presentes no tecido do coral, dificultando a extração apenas do material genético coralíneo (Figura 9).



**Figura 9.** Eletroforese de uma amplificação da região ITS de *Siderastrea stellata*. Linhas: 1= Controle negativo (Branco); 2-7= amostras de DNA genômico; 8- marcador de peso molecular, ladder de 50 pb; 9-13 amostras de DNA genômico. A seta indica o tamanho esperado do produto amplificado de *S. stellata*. Fonte: imagem do autor.

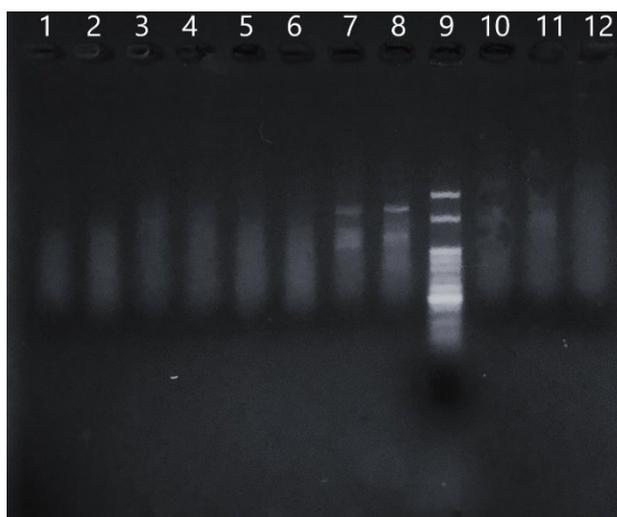
#### 4.3. AVALIAÇÃO DE PRIMERS ITS PARA TESTE DE RAPD

As quatro amostras positivas para *S. stellata* foram submetidas a amplificação com quatro sequências de primers ITS (CAM A01, CAM A02, CAM A03 e CAM A05) (Figura 10). Os resultados mostraram que apenas as amostras 3 e 4 amplificaram com os primers selecionados. As duas amostras apresentaram resultados semelhantes para os primers A01 e A02, podendo-se notar uma certa diferença entre estas duas amostras para os primers A03 e A05, sugerindo que os mesmos poderiam ser utilizados para avaliação da variabilidade genética. Contudo, o fato das amostras 1 e 2 não terem funcionado se faz ainda necessário maiores adaptações na metodologia, uma vez que todas as amostras amplificaram para a espécie *S. stellata* anteriormente.



**Figura 10.** Análise RAPD em gel de agarose a 1,5%, utilizando primers CAM (*Caiman*). Linhas 1-4: amostras de *S. Stellata* amplificadas com o primer A01; Linha 5: controle negativo sem DNA para o primer A01; Linhas: 6-9: amostras de *S. Stellata* amplificadas com o primer A02; Linha 10: controle negativo sem DNA para o primer A02; Linhas 11-14: amostras de *S. Stellata* amplificadas com o primer A03; Linha 15: controle negativo sem DNA para o primer A03; Linhas 16-19: amostras de *S. Stellata* amplificadas com o primer A05; Linha 20: controle negativo sem DNA do primer A05; Linha 21: marcador de peso molecular *ladder* de 50 pb. Fonte: imagem do autor.

As quatro amostras positivas para *S. stellata* também foram submetidas a amplificação com mais duas sequências de primers ITS (CAM B04 e B07) (Figura 11). O resultado novamente mostrou amplificação para apenas duas das quatro amostras analisadas e apenas em relação a amplificação com o primer B07, porém não mostrou diferença entre as duas amostras amplificadas.



**Figura 11.** Análise de RAPD para *S. stellata* utilizando primers CAM B04 e B07. Linhas: 1-4: amostras de *S. stellata* usando o primer B04; Linhas 5-8: amostras de *S. stellata* usando o primer B07; Linha 9: marcador de peso molecular *ladder* de 50 pb; Linha 10: controle negativo, sem DNA para o primer B04; Linha 11: controle negativo, sem DNA para o primer B07; Linha 12: controle negativo da reação, sem primers. Fonte: imagem do autor.

Sendo assim, os resultados preliminares mostraram que dos seis primers ITS utilizados, 03 mostraram-se promissores para testes de RAPD em *S. stellata*, contudo aprimoramento da técnica é necessário para que todas as amostras sejam amplificadas e analisadas. É importante salientar que a falta de recursos financeiros decorrentes de apoio de pesquisa é necessária para continuação deste projeto, uma vez que todo material de biologia molecular é muito caro, isto impossibilitou a continuidade do projeto, desde material para extração do DNA genômico até o material necessário para o desenvolvimento do RAPD.

#### 4.4. ANÁLISE BIOINFORMÁTICA (CONTIGS)

Ao investigar a diversidade genética e filogenética do gênero *Siderastrea*, utilizando as sequências genômicas disponíveis no banco de dados do GenBank do NCBI, a metodologia adotada permitiu a identificação e caracterização de Contigs distintos, representando diferentes populações e espécies dentro do gênero *Siderastrea*. Cada Contig foi categorizado e classificado com base nos seus genes ribossomais (18s, ITS1, 5.8s, ITS2 e 28s), totalizando sete Contigs gerados, um para cada uma das quatro espécies do gênero, e mais três apenas da espécie *Siderastrea stellata*, com esses se diferenciando entre si através da localização geográfica, com depósitos do Brasil, Mexico e Panamá (Figura 12).

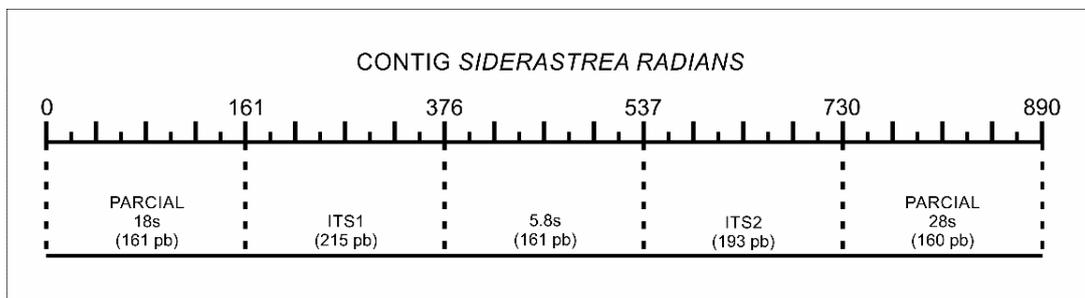


**Figura 12.** Países com localização conhecida nas sequências de *Siderastrea* depositadas no GenBank.

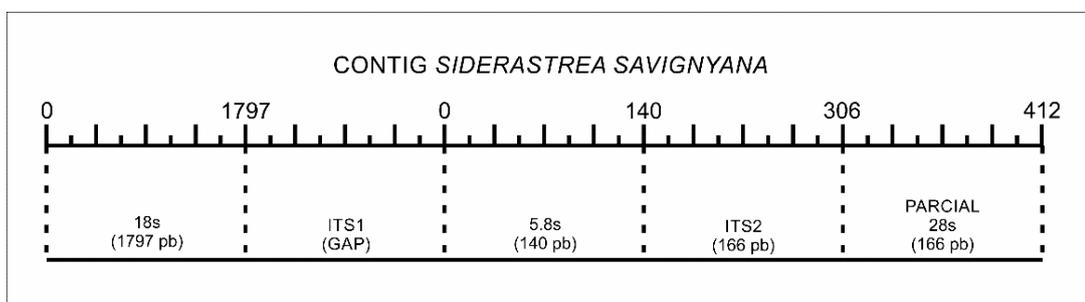
Fonte: imagem do autor, desenvolvida a partir do *MapChart*<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Disponível em: <https://www.mapchart.net/world.html>.

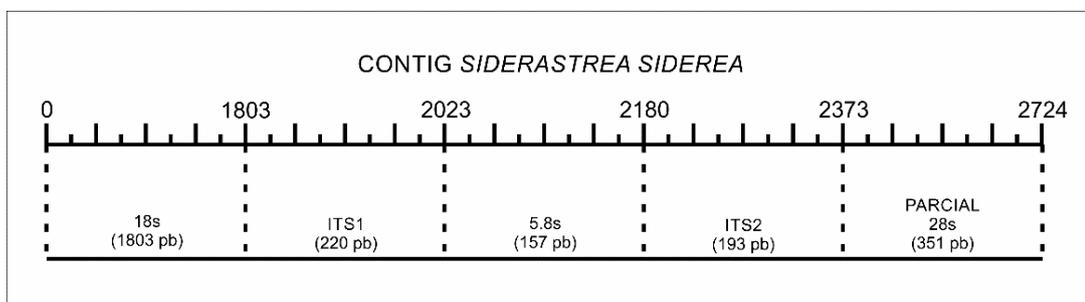
Todos os Contigs gerados tiveram seus genes identificados integralmente ou parcialmente dependendo da disponibilidade das sequências depositadas no GenBank (figuras 13 a 19).



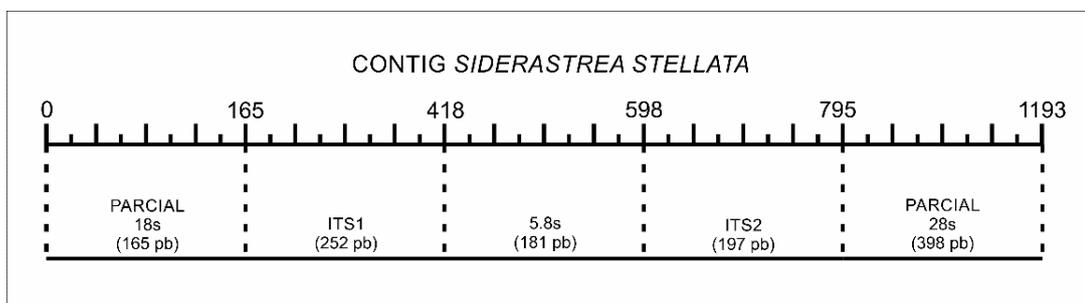
**Figura 13.** Contig gerado das sequências de *Siderastrea radians*. Fonte: imagem do autor.



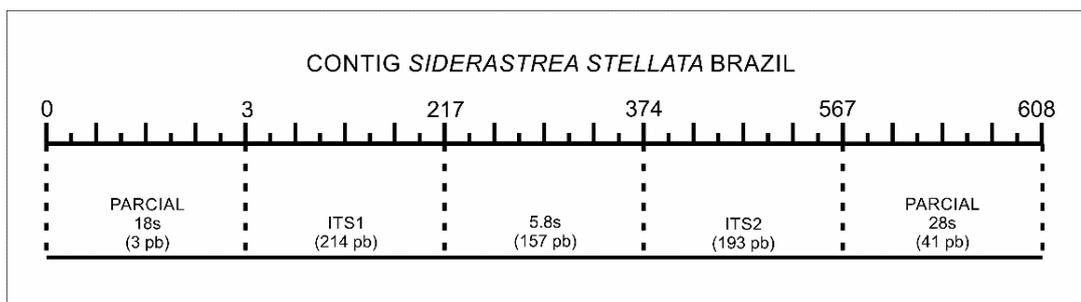
**Figura 14.** Contig gerado das sequências de *Siderastrea savignyana*. Fonte: imagem do autor.



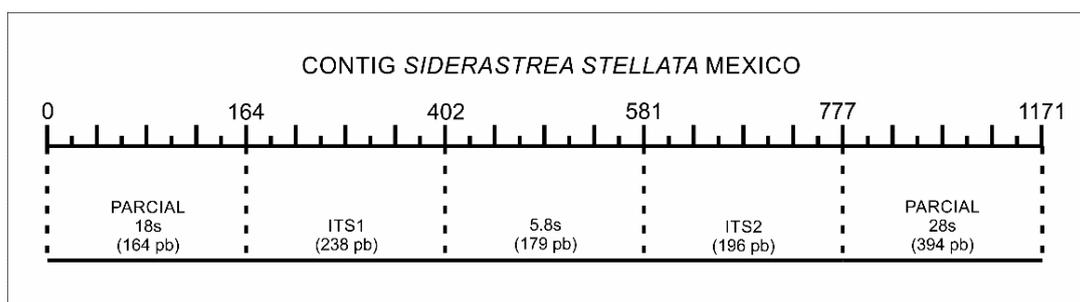
**Figura 15.** Contig gerado das sequências de *Siderastrea siderea*. Fonte: imagem do autor.



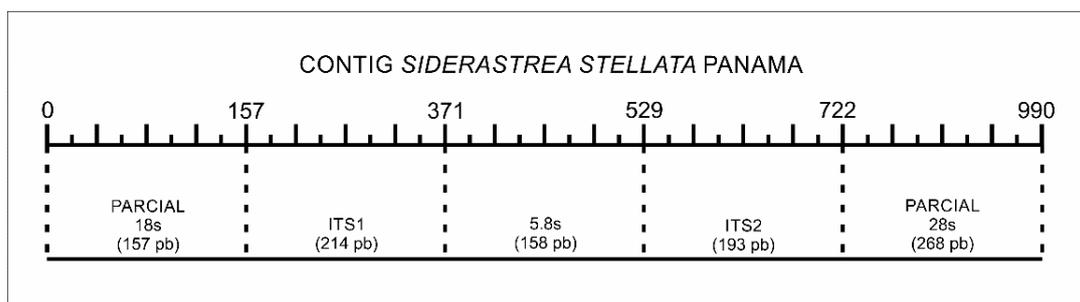
**Figura 16.** Contig gerado das sequências de *Siderastrea stellata*. Fonte: imagem do autor.



**Figura 17.** Contig gerado das seqüências de amostras do Brasil de *S. stellata*.  
Fonte: imagem do autor.



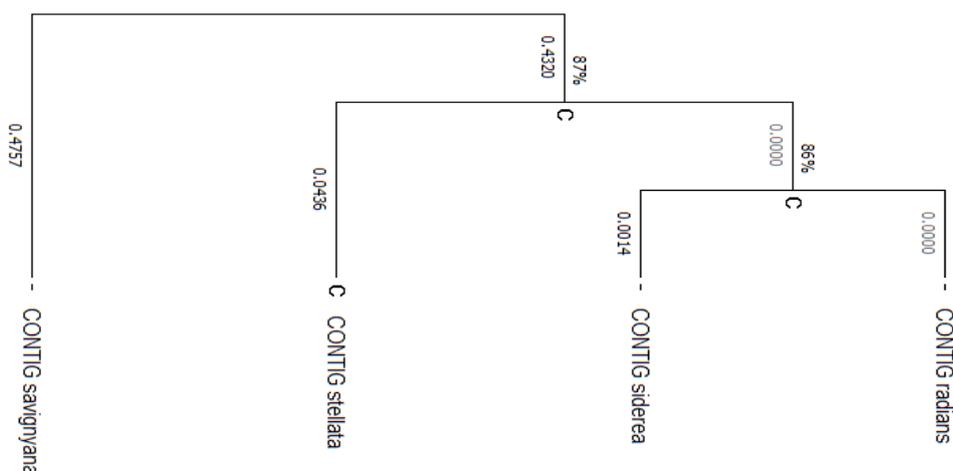
**Figura 18.** Contig gerado das seqüências de amostras do Mexico de *S. stellata*.  
Fonte: imagem do autor.



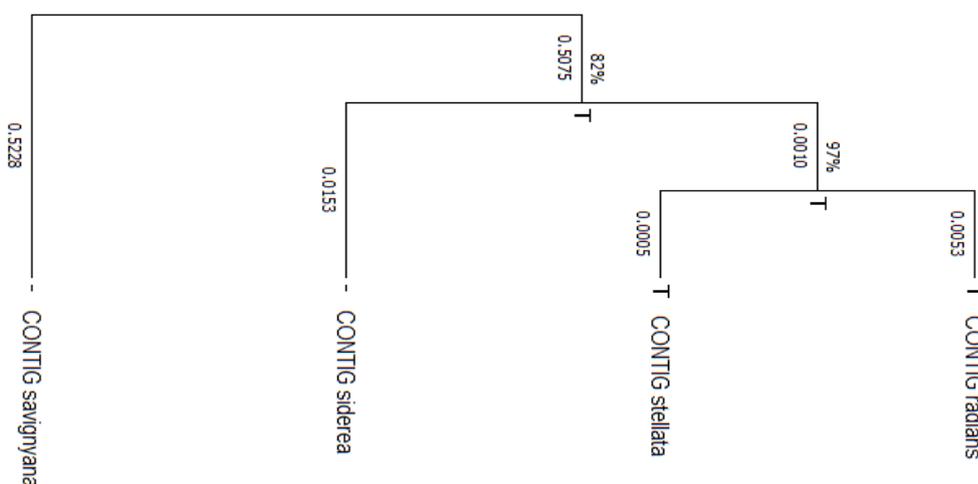
**Figura 19.** Contig gerado das seqüências de amostras do Panamá de *S. stellata*.  
Fonte: imagem do autor.

#### 4.5. ANÁLISE FILOGENÉTICA

Os resultados da análise filogenética revelaram padrões interessantes de parentesco entre as espécies de *Siderastrea*, como mostram as figuras 20 e 21. O ancestral mais distante em ambas as análises dos genes escolhidos (5.8s e ITS2) foi *Siderastrea savignyana*, sugerindo uma divergência evolutiva mais ancestral dentro do gênero. Os Contigs mais próximos na árvore filogenética divergiram entre os dois genes, apenas se mantendo *Siderastrea radians*, sugerindo uma possível distância evolutiva mais recente, ou até mesmo, a possibilidade da espécie ter compartilhamento genético mais amplo com as outras espécies do seu gênero (Nunes *et al.*, 2008).

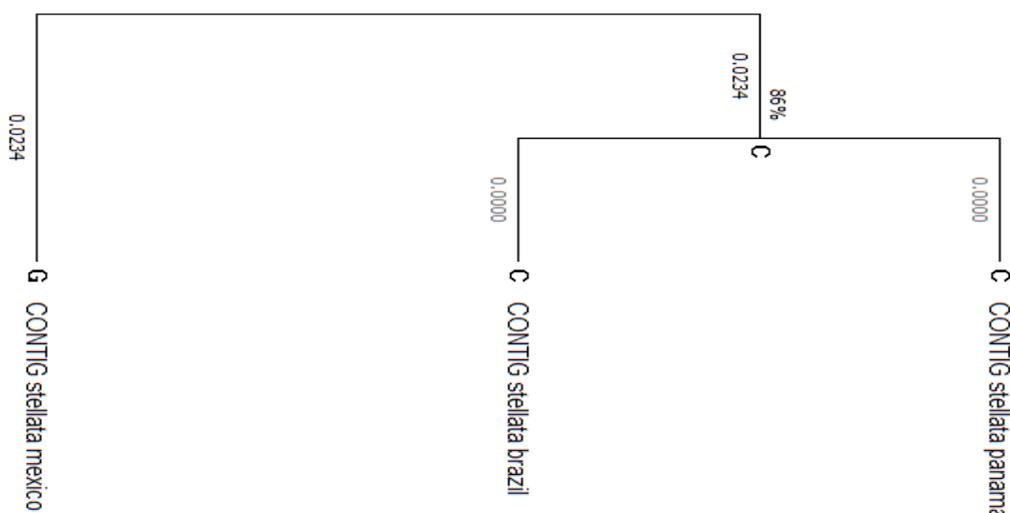


**Figura 20.** Análise filogenética usando o gene 5.8s de *Siderastrea*, mostrando as bases ancestrais e os valores de diversidade das sequências e distância genética dos ramos. Fonte: imagem do autor.



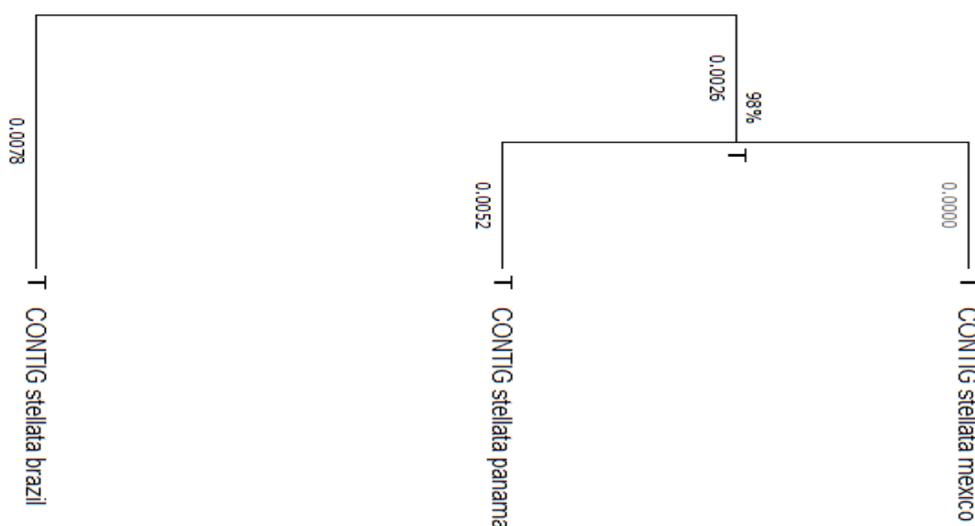
**Figura 21.** Análise filogenética usando o gene ITS2 de *Siderastrea*, mostrando as bases ancestrais e os valores de diversidade das sequências e distância genética dos ramos. Fonte: imagem do autor.

Nas análises filogenéticas biogeográficas dos Contigs isolados de *Siderastrea stellata*, observou-se que os Contigs do Panamá e do Brasil estão mais proximamente relacionados filogeneticamente do que o do México, como mostram as Figuras 22 e 23. Esses resultados sugerem uma história evolutiva compartilhada entre algumas populações (Menezes *et al.*, 2018), como Panamá e Brasil, além de indicar a existência de possíveis padrões de dispersão das populações de *S. stellata* no Atlântico Ocidental, que podem estar relacionados a fatores que moldaram a distribuição atual das populações, como correntes oceânicas e outras barreiras (vicariância geográfica, dispersão secundária, entre outros) (Kitahara, 2016), ainda a serem investigados na continuação da pesquisa.



**Figura 22.** Análise filogenética usando o gene 5.8s de *Siderastrea stellata*, mostrando as bases ancestrais e os valores de diversidade das sequências e distância genética dos ramos.

Fonte: imagem do autor.



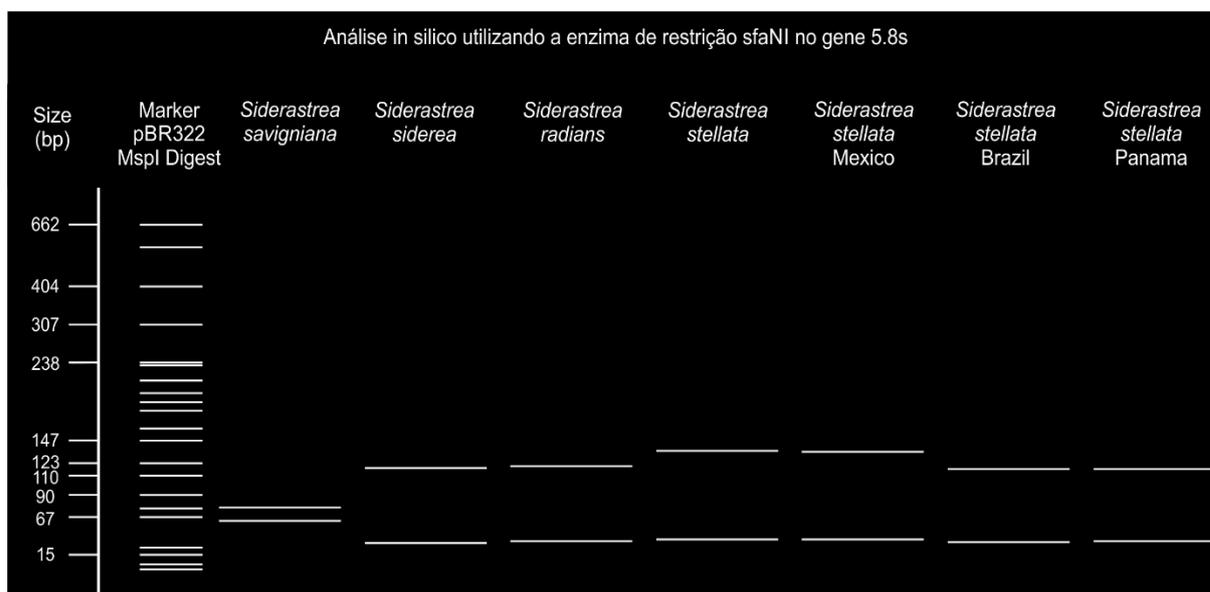
**Figura 23.** Análise filogenética usando o gene 5.8s de *Siderastrea stellata*, mostrando as bases ancestrais e os valores de diversidade das sequências e distância genética dos ramos.

Fonte: imagem do autor.

#### 4.6. ANÁLISE DE DIGESTÃO ENZIMÁTICA *IN SILICO* (RFLP)

As análises de restrição enzimática *in silico* forneceram insights adicionais sobre a variabilidade genética entre as populações de *Siderastrea*, revelando padrões de fragmentação distintos para cada Contig. Os Contigs *Siderastrea siderea*, *Siderastrea radians* e *Siderastrea stellata* do Panamá e do Brasil apresentaram fragmentos similares para a enzima SfaNI (gene 5.8S), os Contigs de *Siderastrea*

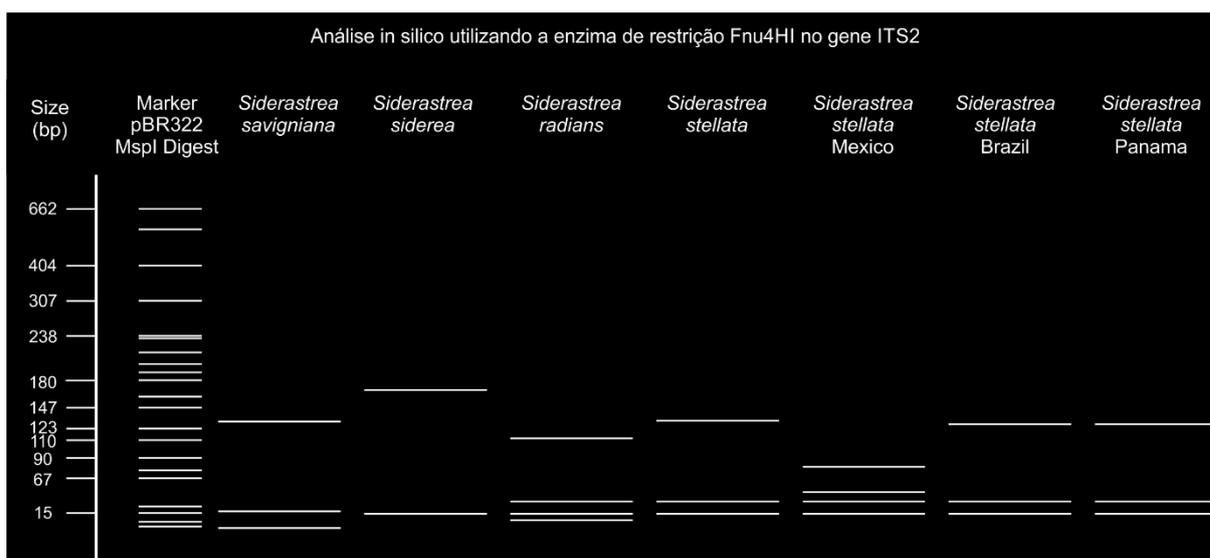
*stellata* e *Siderastrea stellata* do México também apresentaram semelhanças entre si, sendo o Contig *Siderastrea savigniana* o mais divergente (Figura 24).



**Figura 24.** Análise *in silico* no gene 5.8s de *Siderastrea*, usando a enzima sfaNI.

Fonte: imagem do autor.

Na figura 25, análise da digestão *in silico* foi para o gene ITS2, usando a digestão com a enzima Fnu4HI. Os Contigs de *Siderastrea stellata* foram divergentes para todas as amostras analisadas, com exceção do Contig do Brasil e do México, que apresentaram o mesmo resultado (Takabayashi *et al.*, 1998; Forsman *et al.*, 2005; Grajales *et al.*, 2007), sugerindo falta de variabilidade entre as duas amostras analisadas.



**Figura 25.** Análise *in silico* no gene ITS2 de *Siderastrea*, usando a enzima Fnu4HI.

Fonte: imagem do autor.

Em suma, os resultados deste estudo fornecem uma compreensão mais abrangente da diversidade genética e filogenética de *S. stellata* e das outras espécies de *Siderastrea*. Essas informações podem ser fundamentais para o manejo e conservação desses importantes organismos recifais, bem como para o entendimento dos processos evolutivos que moldaram a diversidade genética dentro do gênero.

Dessa forma, os resultados obtidos representam um avanço significativo no entendimento da diversidade genética e filogenética das espécies do gênero *Siderastrea*, com foco especial em *Siderastrea stellata*. A análise das sequências genômicas disponíveis revelou padrões interessantes de parentesco entre as populações estudadas, bem como *insights* sobre sua distribuição geográfica e possíveis processos evolutivos que influenciaram a diversidade genética no grupo.

Embora a análise biogeográfica tenha identificado possíveis padrões de parentesco entre os Contigs, a relação com as correntes marítimas ainda não foi explorada. A integração desses dados poderá fornecer vislumbres sobre o papel das correntes marítimas na dispersão larval e na conectividade populacional de *Siderastrea stellata*.

Nas análises do gene 5.8s, o Contig *Siderastrea savignyana* apresentou maior divergência entre as espécies analisadas, confirmando sua posição como o ancestral mais distante na árvore filogenética. Os Contigs *Siderastrea siderea*, *Siderastrea radians* e *Siderastrea stellata* Panamá e Brasil apresentaram fragmentos muito próximos, sugerindo um ancestral comum recente ou fluxo gênico entre essas populações, diferente do Contig *Siderastrea stellata* México, que mostrou diferenças sugerindo eventos de diversificação local ou adaptação a diferentes condições ambientais.

Em relação as análises do Gene ITS2, os únicos Contigs similares foram todos os *Siderastrea stellata*, com exceção do Contig do México, que se apresentou divergente. Essa similaridade pode indicar fluxo gênico recente entre as populações de *Siderastrea stellata*, diferente dos demais Contigs, que mostraram padrões distintos.

Por fim, a análise de digestão *in silico* com enzimas de restrição é um método preditivo e não substitui a análise experimental em laboratório. Com isso, estudos mais aprofundados se mostram necessários e esperamos que, futuramente, eles possam ser desenvolvidos.

## REFERÊNCIAS

- AGOSTINHO, P. G. F. **Resposta isotópica em *Siderastrea stellata* à variabilidade climática no Atol das Rocas - RN, Brasil**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2020.
- ARRIGONI, R., VACHERIE, B., BENZONI, F., STEFANI, F., KARSENTI, E., JAILLON, O., NOT, F., NUNES, F., PAYRI, C., WINCKER, P., & BARBE, V. A new sequence data set of SSU rRNA gene for Scleractinia and its phylogenetic and ecological applications. **Molecular ecology resources**, 17(5), 1054–1071. 2017.
- BANASZAK, A. T. Optimization of DNA Extraction from a Scleractinian Coral for the Detection of Thymine Dimers by Immunoassay. **Photochemistry and Photobiology**, 83: 833-838. 2007.
- BAUMS, I.B. A restoration genetics guide for coral reef conservation. **Molecular Ecology**, 17: 2796-2811. 2008.
- BURGESS, S. C; JOHNSTON, E. C; WYATT, A. S. J; LEICHTER, J. J; EDMUNDS, P. J. Response diversity in corals: hidden differences in bleaching mortality among cryptic *Pocillopora* species. **Ecology**, 102(6):e03324. 2021.
- CAIRNS, STEPHEN & JAAP, WALTER & LANG, JUDITH. Scleractinia (Cnidaria) of the Gulf of Mexico. Gulf of Mexico Origin, **Waters, and Biota**. 1. 333-348. 2009.
- CHOUDHARY, J; MAHENDRA, M; NARESHI M; SHRINGI, B. N. Sequence identification of toll like receptor 6 in dromedary camel (*Camelus dromedarius*). **Int J Adv Biochem Res**, 8(1):395-398. 2024.
- CORAL WATCH. **Coral Bleaching**. Australia, 2023. Disponível em: <https://coralwatch.org/>. Acesso em: 11 abr. 2023.
- COSTA, C.F., SASSI, R., & GORLACH-LIRA, K. Zooxanthellae genotypes in the coral *Siderastrea stellata* from coastal reefs in northeastern Brazil. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, 367(2), 149–152. 2008.
- CUIF, JEAN-PIERRE & LECOINTRE, GUILLAUME & PERRIN, CHRISTINE & TILLIER, ANNIE & TILLIER, SIMON. Patterns of septal biomineralization in Scleractinia compared with their 28S rRNA phylogeny: a dual approach for a new taxonomic framework. Zool. Scripta 32, 459-473. **Zoologica Scripta**. 32. 459 - 473. 2003
- CURRAN, A.; BARNARD, S. What is the role of zooxanthellae during coral bleaching? Review of zooxanthellae and their response to environmental stress. **S. Afr. J. Sci.**, Pretoria, v. 117, n. 7-8, p. 1-7, Aug. 2021.
- DECARLO, T. M. & HARRISON, H. B. An enigmatic decoupling between heat stress and coral bleaching on the Great Barrier Reef. **Peer**, J7. 2019.

DRURY, C.; LIRMAN, D. Genotype by environment interactions in coral bleaching. **Proc. R. Soc. B.** 2021.

FAUTIN, D; BUDDEMEIER, R. Adaptive bleaching: A general phenomenon. **Hydrobiologia**. n. 530-531. p. 459-467. 2004.

FERREIRA, M; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Embrapa. Brasília, 1998.

FORSMAN, Z.H., GUZMAN, H.M., CHEN, C.A. An ITS region phylogeny of *Siderastrea* (Cnidaria: Anthozoa): is *S. glynni* endangered or introduced?. **Coral Reefs**, 24, 343–347. 2005.

FUKAMI, H.; BUDD, A.F.; LEVITAN, D.R.; JARA, J.; KERSANACH, R.; KNOWLTON, N. Geographic differences in species boundaries among members of the *Montastraea annularis* complex based on molecular and morphological markers. **Evolution**. 58:324-337. 2004a.

FUKAMI, H.; BUDD, A.F.; PAULAY, O; SOLÉ-CAVA, A; CHEN, C. L. A; IWAO, K; KNOWLTON, N. Conventional taxonomy obscures deep divergence between Pacific and Atlantic corals. **Nature**. 427:832-835. 2004b.

GARCÍA, N. A. C., CAMPOS, J. E., MUSI, J. L. T., FORSMAN, Z. H., MUÑOZ, J. L. M., REYES, A. M., & GONZÁLEZ, J. E. A. Comparative Molecular and Morphological Variation Analysis of *Siderastrea* (Anthozoa, Scleractinia) Reveals the Presence of *Siderastrea stellata* in the Gulf of Mexico. **The Biological bulletin**, 232(1), 58–70. 2017.

GLYNN, P. W. Coral reef bleaching: ecological perspective. **Coral Reefs**, v.129, n.1, p. 1-17, 1993.

GONG, L., SHI, W., YANG, M. Characterization of 18S-ITS1-5.8S rDNA in eleven species in *Soleidae*: implications for phylogenetic analysis. **Hydrobiologia** 819, 161–175. 2018.

GRAJALES, A., AGUILAR, C. & SÁNCHEZ, J.A. Phylogenetic reconstruction using secondary structures of Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2, rDNA): finding the molecular and morphological gap in Caribbean gorgonian corals. **BMC Evol Biol** 7, 90. 2007.

HARRISON, P.L. Sexual Reproduction of Scleractinian Corals. In: Dubinsky, Z., Stambler, N. (eds) Coral Reefs: An Ecosystem in Transition. **Springer**, Dordrecht. 2011.

HELLBERG, M. Gene Flow and Isolation among Populations of Marine Animals. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**. 40. 291-310. 2009.

HISSA, D. C; CAMPOS, T. M; OLIVEIRA, R.G; VIANA, D. G; RABELO, E. F. Efeito da temperatura no branqueamento de corais: Avaliação de Potências Bioindicadores do Aquecimento Global. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 42, n.2, p. 50-54, 2009.

HOOGENBOOM, M. O., CAMPBELL, D. A., BERAUD, E., DEZEEUW, K., FERRIER-PAGÈS, C. Effects of light, food availability and temperature stress on the function of photosystem II and photosystem I of coral symbionts. *PloS one*, 7(1), e30167. 2012

HUGHES, TERENCE P., AYRE, DAVID, AND CONNELL, JOSEPH H. The evolutionary ecology of corals. **Trends in Ecology and Evolution**, 7 (9). pp. 292-295. 1992.

HUGHES, T.P; KERRY, J.T; CONNOLLY, S.R; BAIRD, A.H; EAKIN, C.M; HERON, S.F; HOEY, A.S; HOOGENBOOM, M.O; JACOBSON, M; LIU, G; PRATCHETT, M.S; SKIRVING, W; TORDA, G. Ecological memory modifies the cumulative impact of recurrent climate extremes. **Nature Clim Change**, n. 9, f. 40–43. 2019.

KELMO, F. **Caracterização do branqueamento de corais no recife costeiro da praia de Guarajuba, litoral norte do estado da Bahia**. 1998. 104 f. Dissertação de Mestrado (Mestre em Ciência Geologia) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 1998.

KITAHARA, M.V., FUKAMI, H., BENZONI, F., HUANG, D. The New Systematics of Scleractinia: Integrating Molecular and Morphological Evidence. In: Goffredo, S., Dubinsky, Z. (eds) *The Cnidaria, Past, Present and Future*. **Springer**, Cham. 2016.

KNOWLTON, N; JACKSON, J. Shifting Baselines, Local Impacts, and Global Change on Coral Reefs. **PLoS biology**. 6. e54. 2008.

LARKIN, M. A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N. P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P. A., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I. M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., & HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics** (Oxford, England), 23(21), 2947–2948. 2007

LEÃO, Z. M. A. N; KIKUCHI, R. K. P; OLIVEIRA, M. D. M. Branqueamento de corais nos recifes da Bahia e sua relação com eventos de anomalias térmicas nas águas superficiais do oceano. **Biota Neotropica**, v. 8, n. 3, p. 69-82. 2008.

LIMA, L; COUTINHO, R. The reef coral *Siderastrea stellata* thriving at its range limit: Population structure in Arraial do Cabo, southeastern Brazil. **Bulletin of Marine Science** -Miami-. 92. 107-121. 2016.

LOENEN, W. A., DRYDEN, D. T., RALEIGH, E. A., WILSON, G. G., & MURRAY, N. E. Highlights of the DNA cutters: a short history of the restriction enzymes. **Nucleic acids research**, 42(1), 3–19. 2014.

LOUIS, Y. D., BHAGOOLI, R., KENKEL, C. D., BAKER, A. C., & DYALL, S. D. Gene expression biomarkers of heat stress in scleractinian corals: Promises and limitations. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology**, CBP, 191, 63–77. 2017.

MENEZES, J.P., LUPATINI, M., ANTONIOLLI, Z.I., BLUME, E., JUNGES, E., & MANZONI, C.G. Variabilidade genética na região its do rDNA de isolados de *trichoderma* spp. (Biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*. **Ciencia E Agrotecnologia**, 34, 132-139. 2010.

MENEZES, N. M. Filogeografia de corais escleractíneos na costa do Brasil: **Phylogeography of Brazilian scleractinian corals**. 2018.

MOBERG, F; FOLKE, C. Ecological goods and services of coral reef ecosystems. **Ecological Economics**, v. 29, p. 215-233, 1999.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. **GenBank**. 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 11 abr. 2023.

NEVES, E.G., ANDRADE, S.C.S., DA SILVEIRA, F.L. Genetic variation and population structuring in two brooding coral species (*Siderastrea stellata* and *Siderastrea radians*) from Brazil. **Genetica** 132, 243–254. 2008.

NISSA, N; PRAMONO, A; TRILAKSONO, B; CAHYADI, MUHAMMAD; VOLKANDARI, SLAMET. Primer design and restriction site analysis targeting POU domain class 1 transcription factor 1 gene of Friesian Holstein *in silico*. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. 2024.

NUNES, F; FUKAMI, H; VOLLMER, S.V; NORRIS, R.D; KNOWLTON, N. Re-evaluation of the systematics of the endemic corals of Brazil by molecular data. **Coral Reefs**. 27. 423-432. 2008.

PINHEIRO, A. C. M. **Distribuição, recrutamento e sobrevivência do coral pétreo *Siderastrea stellata* (Verrill, 1868) em um recife arenítico do Atlântico Sul**. 2016. 74 f. Tese (Mestrado em Ecologia), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016.

PINHEIRO, B. R., PEREIRA, N. S., AGOSTINHO, P. G. F., MONTES, M. J. F. Population dynamics of *Siderastrea stellata* Verrill, 1868 from Rocas Atoll, RN: implications for predicted climate change impacts at the only South Atlantic atoll. **Anais Da Academia Brasileira De Ciências**, 89(2), 873–884. 2017.

RIGINOS, C; POPOVIC, I; MEZIERE, Z; GARCIA, V; BYRNE, I; HOWITT, S; ISHIDA, H; BAIROS-NOVAK, K; HUMANES, A; SCHARFENSTEIN, H; RICHARDS, T; BRIGGS, E; CLARK, V; LEI, C; KHAN, M; PRATA, K. Cryptic species and hybridisation in corals: challenges and opportunities for conservation and restoration. **Research Gate**, 2024.

SANTOS L. D; SILVA B. C; SILVA K. C; SANTOS R. C; SOUSA E. M; MUNIZ R. D; BARBOSA A. B. Branqueamento de corais e outros cnidários bentônicos no costão rochoso da Praia do Forno (Arraial do Cabo, RJ) durante as anomalias térmicas das águas superficiais do oceano ocorridas nos meses de fevereiro e maio de 2019. **Vértices**, Campos dos Goitacazes. v. 23(2), p. 560-579. 2021.

STANLEY JR., G. D. Photosymbiosis and the evolution of modern coral reefs. **Science**, 312(5775), p. 857-858. 2006.

SZMANT, A. M; GASSMAN, N. J. The effects of prolonged "bleaching" on the tissue biomass and reproduction of the reef coral *Montastrea annularis*. **Coral Reefs**, 8, p. 217-224. 1990

TAKABAYASHI, M; CARTER, D.A; WARD, S; HOEGH-GULDBERG, O. Inter-and intra-specific variability in ribosomal DNA sequence in the internal transcribed spacer region of corals. **Proc Aust Coral Reef Soc**, 75th Ann. Conf, p241–24, 1998.

THOMPSON, D. M; VAN WOESIK, R. Corals escape bleaching in regions that recently and historically experienced frequent thermal stress. **Proc. Biol. Sci.** **276**, p. 2893–2901. 2009.

VIRGEN-URCELAY; DONNER S. D. Increase in the extent of mass coral bleaching over the past half-century, based on an updated global database. **PLoS One**. n. 13;18(2):e0281719. Jan 2023.

TUNALA, P. L. **Ecofisiologia e resiliência do coral recifal *Siderastrea stellata* Verril, 1868 em face às pressões de diferentes gradientes ambientais**. Tese (Doutorado em DINÂMICA DOS OCEANOS E DA TERRA) - Universidade Federal Fluminense. 2022.

USA. NCBI - National Center for Biotechnology Information. **GenBank**. 2024a. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 11 abr. 2024.

USA. NHGRI - National Human Genome Research Institute. **Contig**. 2024b. Disponível em: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Contig>. Acesso em: 11 abr. 2024.

VAN OPPEN, M. J., & GATES, R. D. Conservation genetics and the resilience of reef-building corals. **Molecular ecology**, 15(13), 3863–3883. 2006.

VAN OPPEN, M; LUNDGREN, P; HOWELLS, E; HEYWARD, A; BERKELMANS, R. Novel Genetic Diversity Through Somatic Mutations: Fuel for Adaptation of Reef Corals?. **Diversity**. 3. 405-423. 2011.

VERON, J. E.N. Corals of the World. Vols 1-3. **Australian Inst Mar Sci**. 1,382pp. 2000.

VINCZE, T; JANOS, P; RICHARD, J. R. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes, **Nucleic Acids Research**, Volume 31, Issue 13, 3688–3691, 2003.

YANG, C., CHOWDHURY, D., ZHANG, Z., CHEUNG, W. K., LU, A., BIAN, Z., & ZHANG, L. A review of computational tools for generating metagenome-assembled genomes from metagenomic sequencing data. **Computational and structural biotechnology journal**, 19, 6301–6314. 2021.

WIRSHING, H. H., & BAKER, A. C. Molecular evolution of calcification genes in morphologically similar but phylogenetically unrelated scleractinian corals. **Molecular phylogenetics and evolution**, 77, 281–295. 2014.

WYATT, A. S. J; LEICHTER, J.J; WASHBURN, L; KUI, L; EDMUNDS, P. J; BURGESS, S. C. Hidden heatwaves and severe coral bleaching linked to mesoscale eddies and thermocline dynamics. **Nat Commun**, n. 14, 25. 2023.