Universidade Federal de São Paulo
Campus Baixada Santista
PPG em Biodiversidade e Ecologia Marinha e Costeira

Isabela Galvão de Lossio e Seiblitz

Mitogenômica da ordem Scleractinia (Cnidaria, Anthozoa): relações entre evolução da ordem e mudanças climáticas

Dissertação submetido(a) ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Ecologia Marinha e Costeira da Universidade Federal de São Paulo para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Visentini Kitahara

Santos
2020

Ficha catalográfica elaborada por sistema automatizado
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Seiblitz, Isabela.
S457m Mitogenômica da ordem Scleractinia (Cnidaria, Anthozoa): relações entre evolução da ordem e mudanças climáticas. / Isabela Seiblitz; Orientador Marcelo Kitahara. -- Santos, 2020.
99 p. ; 30cm

Dissertação (Mestrado – Pós Graduação em Biodiversidade e Ecologia Marinha e Costeira) -- Instituto do Mar, Universidade Federal de São Paulo, 2020.

1. genoma mitocondrial. 2. reconstrução filogenética. 3. corais azooxantelados. 4. corais zooxantelados. 5. sequenciamento de última geração. I. Kitahara, Marcelo, Orient. II. Título.

CDD 551.46

Bibliotecária Daianny Seoni de Oliveira - CRB 8/7469

Isabela Galvão de Lossio e Seiblitz

Mitogenômica da ordem Scleractinia (Cnidaria, Anthozoa): relações entre evolução da ordem e mudanças climáticas

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de "Mestre" e aprovada em sua forma final pelo Programa Pós-Graduação em Biodiversidade e Ecologia Marinha e Costeira

Santos, 24 de janeiro de 2020.

_____
Prof. Dr. Guilherme Henrique Pereira Filho
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

_____
Prof. Dr. André Carrara Morandini
1º titular
Universidade de São Paulo (USP)

_____
Prof. Dr. André Victor Lucci Freitas
2º titular
Universidade Estadual de Campinas (Unicamp)

_____
Prof. Dr. Sérgio do Nascimento Stampar
3ª titular
Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho (UNESP)

_____
Profª. Drª. Daniela Milstein
Suplente
Universidade Federal de São Paulo (Unifesp)

Dedico este trabalho aos meus pais, Valéria Galvão e José Antonio Seiblitz, que me apoiam sempre e de todas as formas que podem.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos que contribuíram diretamente para o presente estudo, seja na forma de sugestões e ideias ou auxiliando com análises. Ao meu orientador, Prof. Marcelo Kitahara, pela oportunidade de participar deste projeto, por confiar em mim para sua realização e por sempre estar disponível para discutir toda e qualquer questão, referente ao projeto ou à vida acadêmica em geral. Ao Cebimar (Centro de Biologia Marinha da USP), pelo enorme apoio às minhas análises e ao meu projeto. Aos integrantes do laboratório do Prof. André Morandini e do Laboratório de Evolução Molecular, ambos da USP, por sempre serem extremamente solícitos e por permitirem que eu mantenha parte dos reagentes e consumíveis lá. Em especial, ao Dr. Max Maronna, por ter confiado em mim para realizar os testes de enriquecimento de DNA mitocondrial, por sempre me dar dicas quanto à vida acadêmica e por ter recomendado um dos protocolos de separação de zooxantelas. Ao laboratório Genial (CEFAP - USP) e seus integrantes, Susan, Tábata e Aurélio, pela disponibilidade em não apenas ceder a bancada para que eu prepare minhas bibliotecas, mas por auxiliarem na interpretação dos perfis do Bioanalyzer e na tomada de decisão quanto ao sequenciamento. Ao meu tutor do PPG, Prof. Gustavo Gregoracci, pelas sugestões de metodologia e programas a utilizar, além de recomendações para minha vida acadêmica futura. Além desses, à Capes, pelo financiamento nos primeiros meses de Mestrado, e à FAPESP, pelo financiamento até o final do Mestrado, tanto na forma de bolsa no país (nº 2017/11615-7) quanto por meio de uma BEPE (nº 2018/19661-0).

Regarding the Singaporean crew, I would like to thank Prof Danwei Huang for inviting and encouraging me to participate in all activities of REL during my six months there and Randolph Quek for the HUGE support with my analyses! Besides the lab, I would like to thank Daryl Lim Shern for being such a great person to be with and at the same time for understanding my absence on Friday evenings or Sundays. Also, a huge Grazie to Mitch (Michele Sodano), for all the moments we spent together adapting to a new culture! I am also extremely grateful to my friends from the NUS Astronomical Society, who welcomed a girl who could understand ~50% of what they said. Thank you for the patience and for teaching me so much not only about the sky but also about Singaporean and Asian culture (I even had a personal tour guide! Thank you, Michelle!)

Quero agradecer novamente aos meus amigos e familiares, que, de diferentes formas, contribuíram para os resultados alcançados até então. Aos alunos do PPGBEMC, por dividirem comigo momentos de alegria (e.g. dança, caipirinhas e risadas) e também de desespero (e.g. prazos) e por sempre me ajudarem quando preciso de algum favor ou

auxílio (buscando documentos, entregando outros na secretaria, etc.). Agradeço mais uma vez à Ana Clara Becker pelas sextas-feiras em que me abrigou em sua casa, e à Carolina Schnoor, por sempre se preocupar comigo. Às meninas do Cebimar, que tornaram minha vida a mais divertida possível! Aos amigos do Rio, que acabo encontrando pouco, mas que sempre me divirto muito quando encontro, agradeço pela compreensão de eu nem sempre conseguir estar geograficamente presente. Aos meus pais, agradeço por me entenderem quando preciso estudar em vez de passar toda a noite de Réveillon com eles, por sempre me estimularem a seguir na carreira que amo e pelo auxílio, não apenas financeiro, mas logístico e, principalmente, psicológico.

RESUMO

Os corais escleractíneos, metazoários não bilatérios pertencentes ao filo Cnidaria, encontram-se ameaçados pelo aumento da temperatura e acidificação dos oceanos. Essas mudanças podem levar à morte ou saída de algas endossimbiontes (zooxantelas) dos corais, assim como à dissolução do esqueleto carbonático desses metazoários. A ordem Scleractinia, à qual esses organismos pertencem, não teve ainda sua história evolutiva totalmente resolvida. A filogenia de suas subordens e mesmo seu monofiletismo são incertos e essa dificuldade se deve, principalmente, ao baixo número de táxons incluídos nas filogenias, principalmente espécies de corais azooxantelados. Além disso, o escasso número de marcadores moleculares pode também levar a uma variação entre as topologias das diferentes reconstruções evolutivas da ordem. Desse modo, o presente estudo tem como objetivo principal recuperar a história evolutiva de Scleractinia com base em genomas mitocondriais de espécies de corais zooxantelados e azooxantelados, que foram analisadas por sequenciamento de última geração (NGS) nas plataformas NextSeq500 e MiSeq (Illumina). Durante a preparação de bibliotecas para sequenciamento, modificações no protocolo foram feitas e seus resultados indicam que: 1) a integridade do DNA parece ser relevante, mas dependendo do quão íntegro o DNA se encontra, pode-se utilizar os parâmetros de fragmentação do protocolo ou uma adaptação; 2) a diluição dos adaptadores não é essencial para prevenir a formação de dímeros dos mesmos, mas o número de ciclos na amplificação da biblioteca parece ser. Comparações de protocolos de enriquecimento de DNA mitocondrial indicaram o sucesso apenas de um dos protocolos testados, enquanto tentativas de separação de zooxantelas do tecido do coral não foram bem sucedidas. Um total de 62 genomas mitocondriais foi determinado/montado com sucesso e um foi obtido a partir de colaborações. Nesses, três padrões de rearranjo de genes foram encontrados, dois deles até então desconhecidos. Na reconstrução filogenética da ordem, a maior parte dos ramos apresenta suporte alto e a topologia parece, de modo geral, similar à recuperada em outros estudos. Algumas das diferenças observadas parecem ser suportadas com base em características morfológicas ou geográficas e outras indicam que alguns grupos precisam ser estudados de modo mais aprofundado. Dentre os passos futuros na execução deste estudo, fatores paleoclimáticos serão mapeados nessas reconstruções a partir de uma calibração por meio de relógio molecular. Com isso, será possível identificar o momento no qual certas características surgiram ou desapareceram, o que auxiliará na elaboração de hipóteses a respeito do futuro desses organismos frente às mudanças climáticas.

Palavras-chave: genoma mitocondrial, reconstrução filogenética, corais azooxantelados, corais zooxantelados, sequenciamento de última geração.

ABSTRACT

Scleractinian corals, nonbilaterian Metazoa belonging to phylum Cnidaria, are currently threatened by global warming and ocean acidification. These changes may lead to either death or release of symbiotic algae (zooxanthellae) from corals, as well as to skeleton dissolution in these metazoans. The order Scleractinia, to which these organisms belong, has not had its evolutionary history completely resolved yet. The phylogeny of its suborders and even its monophyly are uncertain and the main reason for this difficulty is the low number of taxa included in phylogenies, especially in regard to azooxanthellate corals. Moreover, the low number of molecular markers used may also lead to a variation among topologies of different reconstructions of this order. For this purpose, this study aimed to recover the evolutionary history of Scleractinia based on mitochondrial genomes of 50 species of azooxanthellate and 50 of zooxanthellate corals, which are currently being analysed by next generation sequencing (NGS) on NextSeq500 and MiSeq platforms (Illumina). During library preparation for sequencing, protocol modifications were tested and their results indicate that: 1) DNA integrity seems to be relevant, but depending on how degraded the DNA is, it is possible to either use the default shearing parameters provided on the protocol or use an adaptation; and 2) dilution of adapters does not seem to be essential to prevent adapter dimer formation, but the number of cycles for library amplification seems to be. Among compared mitochondrial DNA enrichment protocols, only one seems to be successful while none of the attempts to dissociate Symbiodiniaceae from coral tissue succeeded. In total, 62 mitogenomes were assembled and one was obtained through collaboration. Three patterns of gene rearrangement were found, two of which were described for the first time. In a phylogenetic reconstruction of Scleractinia, the majority of branches were highly supported and broad tree topology was similar to previous studies. Some of the observed differences seem to be supported based on morphological or geographic traits while other divergences indicate that some groups need to be studied in a more comprehensive way. Regarding future steps for this study, palaeoclimate factors will be mapped to these reconstructions based on a molecular clock calibration. Therefore, it will be possible to identify when specific features appeared and disappeared, supporting the elaboration of hypotheses regarding the future of scleractinian corals towards climate change.

Keywords: mitochondrial genome, phylogenetic reconstruction, azooxanthelate corals, zooxanthellate corals, next generation sequencing.

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 2.3.1.1: Exemplo de gel de eletroforese de amostras extraídas (1 a 3) e purificadas com o kit *Puregene*, Apêndice C (4 a 7). Nele, observa-se padrões de fragmentação do DNA que podem ser encontrados na outras amostras do estudo. “Ld” refere-se a um padrão de peso molecular no qual a menor banda corresponde a 500 bp e a maior a 10 kbp. As amostras referem-se as espécies *Stephanocyathus coronatus* (1), *Trochocyathus rhombocolumna* (2), *Trochocyathus vasiformis* (3), *Deltocyathus magnificus* (4), *Favia gravida* (5), *Letepsammia franki* (6) e *Solenosmilia variabilis* (7). 34

Figura 2.3.1.2: Esquema da preparação de bibliotecas indicando o perfil de tamanho de cada amostra (eletroforese), e das bibliotecas correspondentes, ao final e, em alguns casos, em etapas intermediárias do protocolo (perfis do Bioanalyzer). Os perfis sublinhados dentre os relativos aos testes de fragmentação do DNA (testes 1, 2 e 3) indicam os parâmetros de fragmentação que funcionaram para essas amostras. Os perfis do Bioanalyzer apresentam, na abscissa, o tamanho dos fragmentos (em pares de base, bp) e, na ordenada, a fluorescência deles (FU). O marcador menor (‘lower marker”) localiza-se em 35 bp e o maior (“upper marker”) em 10380 bp. O padrão molecular da eletroforese apresenta como bandas mais brilhantes os tamanhos de 2 kbp e 5 kbp. A biblioteca #25 foi aplicada no Bioanalyzer com concentração superior à máxima, o que gerou o padrão diferente observado e alterou o ínicio de #26. “*” indica que foi feita purificação na etapa “Purificação do DNA fragmentado” (“Clean Up Fragmented DNA”), após a fragmentação. 43

Figura 2.3.2.1: Validação dos testes de enriquecimento em amostras de Tubastraea com o marcador cox2 para as metodologias macher e qproteome (A) e miniprep (B). Amostras “dilM” estão na mesma concentração das amostras “M” ao lado delas (e.g. T1TdilM tem concentração igual a T1M). Amostras “CF30” estão diluídas a 30 ng/uL, “T2Tmacher dil ~13x” é um controle positivo, “Bco” refere-se ao branco da PCR e “Ld”, aos padrões de peso molecular (a banda inferior tem 500 bp e a superior 10 kbp). As setas mostram as bandas referentes à metodologia miniprep apresentando maior intensidade na amostra enriquecida (“M”) do que no controle (“T”). 51

Figura 2.3.2.2: Validação dos testes de enriquecimento em amostras de *Aiptasia* com o marcador cox1 para as metodologias macher, qproteome e miniprep com 30 ciclos (acima) e 22 ciclos (abaixo). Amostras “dilM” estão na mesma concentração das amostras “M” ao lado delas (e.g. ATdilM tem concentração igual a AM). “Bco” refere-se ao branco da PCR e “Ld”, ao padrão de peso molecular (a banda inferior tem 500 bp e a superior 10 kbp). 52

Figura 2.3.3.1: Eletroforese das extrações de DNA dos testes de separação de Symbiodiniaceae, tentativas 1 (à esquerda) e 3 (à direita). “Sider” refere-se a *Siderastrea* sp, “Pas” ou “Pas01” a *Porites astreoides* e “Mde” a *Madracis decactis*. “E” ou “esquel” representa extrações do fragmento de coral, “Z” ou “symb”, a fração que deveria conter os simbiontes (precipitado) e “C” ou “coral”, o sobrenadante da etapa de centrifugação. Em B, “T” refere-se à incubação com TE e “N” à com NaOH. “Ld” é o peso molecular, cuja banda menor indica 500 bp e a maior, 10 kbp. 53

Figura 2.3.3.2: Eletroforese das PCRs dos testes de separação de Symbiodiniaceae, tentativas 1 (acima) e 3 (abaixo), sendo “mtCOIIscler” referente ao marcador mitocondrial e “ITS2 zoox” ao do simbionte. “Sider01” refere-se a Siderastrea sp, “Pas01” a *Porites astreoides* e “Mde01” a *Madracis decactis*. “E” ou “esquel” representa extrações do fragmento de coral, “Z” ou “symb”, a fração que deveria conter os simbiontes (precipitado) e “C” ou “coral”, o sobrenadante da etapa de centrifugação. Em B, “T” refere-se à incubação com TE e “N” à com NaOH. “Ld” é o peso molecular, cuja banda menor indica 500 bp e a maior, 10 kbp, “Bco” indica o branco de cada PCR e “+”, um controle positivo. 54

Figure 3.1: Micrabaciidae mitogenomes gene content, order and size compared to gene order patterns present in Scleractinia. Scleractinian gene order patterns were obtained from Addamo et al., 2016; Emblem et al., 2011; Flot et al., 2013; Lin et al., 2012a; Lin et al, 2014. Figure showing scleractinian gene patterns was modified from Lin et al., 2014. 62

Figure 3.2: Partitioned phylogeny run on RaxML using GTR model with gamma distributionand 1000 bootstrap replicates. Support values are in percentage and the ones that are not shown are 100%. 63

Figura 4.3.1: Diagrama ilustrando a ordem dos genes mitocondriais e principais padrões de organização encontrados em Scleractinia no presente estudo. 79

Figura 4.3.2: Filogenia particionada de genes mitocondriais (12S, 16S, *atp6*, *cob, cox1, cox2,* 81
cox3, nad1, nad2, nad3, nad4L, nad4, nad5-5', nad5-3', nad6, trnM e *trnW*) obtida a partir de Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (IB). (a) Árvore obtida por MV tem sua topologia evidenciada de duas formas: à esquerda possibilita a visualização dos valores de suporte, enquanto à direita prioriza a visualização dos comprimentos relativos dos ramos. Os valores acima de cada ramo indicam o suporte calculado por reamostragens de bootstrap e probabilidades posteriores, respectivamente. (b) e (c) são subconjuntos da filogenia obtida por IB indicando duas regiões nas quais a topologia das filogenias foi diferente entre as metodologias (família Faviidae e gênero *Dipsastrea*, respectivamente).

LISTA DE TABELAS

Pág

Tabela 2.2.1.1: Parâmetros do ultrasonicador Covaris S2 comparados para fragmentação do DNA no início do protocolo de preparação de bibliotecas. Testes 1 e 2 foram recomendados pela empresa Covaris e o Teste 3 é o conjunto de parâmetros recomendado no protocolo do kit *TruSeq DNA Nano*. 28

Tabela 2.2.2.1: Protocolos testados para enriquecimento de DNA mitocondrial. * indica que cada organismo foi simultaneamente extraído no protocolo descrito (“mitocondrial”, "mitoc" ou "M") e em um protocolo adaptado para ser controle (“total”, "tot" ou "T"), passando por todas as fases sem retirada de material. No caso de Macher, essa adaptação já é parte do protocolo, mas nos outros as amostras “totais” foram igualmente centrifugadas e incubadas e tiveram soluções a elas adicionadas, mas não tiveram material (como sobrenadantes ou precipitados) retirados. Esse desenho foi um pouco diferente em françoso (**), para o qual foi inicialmente utilizado um único tubo até a primeira etapa de centrifugação, após a qual o sobrenadante passou a ser “M” (Tc2-6M e RtyM) e o precipitado, “T” (Tc2-6T e RtyT). 30

Tabela 2.2.2.2: Iniciadores utilizados para amplificação de genes da mitocôndria, simbionte e núcleo utilizados para validação de testes de enriquecimento e separação, bem como as regiões amplificadas, o genoma a que elas pertencem, os sentidos de amplificação dos iniciadores, suas sequências, o tamanho esperado e as referências que os delinearam. 31

Tabela 2.2.2.3: Ciclagens das PCRs relativas aos testes de enriquecimento de DNA mitocondrial e separação de Symbiodiniaceae. Foram utilizados menos ciclos do que os estudos originais para que diferenças de concentração das sequências amplificadas fossem evidentes visualmente na eletroforese (Dr Jan Macher, comunicação pessoal). * indica que, a cada dois ciclos, a temperatura de anelamento diminui 1 ºC, começando em 62 ºC e terminando em 53 ºC (técnica denominada *touchdown*). 33

Tabela 2.3.1.1: Amostras com qualidade ideal para sequenciamento. Data de extração ou purificação, método usado, massa de amostra com a qual se iniciou a extração (ou volume, no caso das purificações), concentração e razões de pureza (260/280 e 260/230) medidas no Nanodrop e volume de eluição após a extração ou purificação. 35

Tabela 2.3.1.2: Purificação de amostras e sua concentração e razões de pureza (260/280 e 260/230) antes e depois do processo, assim como as espécies às quais pertencem, seus códigos antigo e novo, e o método de purificação utilizado. 37

Tabela 2.3.1.3: Preparação de biblioteca SureSelect QXT (Agilent). Amostras usadas, sua concentração medida em Qubit antes (“Concentração amostra”) e depois (“Concentração biblioteca”) do processo, tamanho médio das bibliotecas medido em Bioanalyzer e a molaridade, calculada com base no tamanho médio e concentração da biblioteca. Após uma diluição e uma tentativa de corrigir a concentração, as amostras indicadas com asteriscos apresentaram concentração diferente da ideal, então * foi re-diluída a partir do estoque e ** teve 1 uL adicionado a ela e ambas foram incluídas na preparação sem serem medidas novamente. 39

Tabela 2.3.1.4: Preparação de bibliotecas com o kit *TruSeq DNA Nano*. Amostras usadas, suas concentrações e razões de pureza, modificações feitas no protocolo, perfil de tamanho das bibliotecas finais e de algumas etapas intermediárias, concentração da biblioteca final e se essa biblioteca estava adequada para sequenciamento. Na coluna “Fragmentação”, os hífens indicam o teste que funcionou para as amostras que foram fragmentadas com mais de um conjunto de parâmetros. “**” indica que o pico era tão inferior à concentração da biblioteca que esta não foi purificada. 40

Tabela 2.3.1.5: Bibliotecas sequenciadas, espécies a que pertencem e número de “clusters” (por se tratar de sequenciamento “paired end”, refere-se ao número de pares desses agrupamentos). “PF” ou “Passing Filter” refere-se aos “clusters” que passaram pelo filtro de qualidade do sequenciador; Q é uma escala que indica a probabilidade de um par de bases estar errado e varia entre 0 a 40 (Q30 indica probabilidade de 1/1000 de um par de base estar errado). “R1” e R2” correspondem aos componentes do par de reads (o sequenciamento foi do tipo paired-end), “Pares de reads pareados” indica quantos pares R1+R2 permaneceram após a filtragem, enquanto “Reads não pareados” indica o número de reads com qualidade e tamanho ideais mas cujos pares não passaram pela filtragem. As colunas “Q limite” indicam o valor mínimo de qualidade para os pares de bases serem considerados de boa qualidade e “Comprimento limite” indica o tamanho mínimo que um read deveria ter para ser mantido no conjunto de dados. “*” indica amostras que tiveram seu comprimento reduzido no programa SolexaQA++ e, não, no programa Trimmomatic. 49

Tabela 4.2.1.1: Amostras preparadas para sequenciamento na Universidade de São Paulo (USP) e 68

na National University of Singapore (NUS) e informações sobre sua origem, extração de DNA, preparação de bibliotecas e sequenciamento. Quanto aos parâmetros de fragmentação, “Teste2” e “Teste3” referem-se ao ultrassonicador Covaris (ver capítulo 2) enquanto os parâmetros utilizados no sonicador Bioruptor são indicados por concentração do DNA; volume em uL; número de ciclos; duração. [1] indica bibliotecas cujos adaptadores não foram diluídos, [2] indica que o tamanho alvo do protocolo TruSeq DNA Nano seguido foi 550 bp, e, não 350 bp (outras amostras), [3] indica que a PCR do protocolo TruSeq DNA Nano foi feito com 8 ciclos. “Corridas” indica as corridas de sequenciamento nas quais as amostras foram incluídas, sendo que “Hi” refere-se à corrida de sequeciamento realizada pela empresa Macrogen; “Mi”, às corridas MiSeq 2x300; “MiN”, à realizada em modo nano 2x250; e “N”, à corrida NextSeq 2x75, explicadas com maior grau de detalhamento no corpo da dissertação. Nenhuma amostra foi colocada em mais de uma corrida “Mi”.

Tabela 4.3.1: Amostras preparadas para sequenciamento na Universidade de São Paulo (USP) e na National University of singapore (NUS) e informações sobre seus mitogenomas, tais como o programa utilizado para sua montagem, seu comprimento e conteúdo GC. “Spades+Mitobim” indica amostras nas quais o programa Spades foi utilizado para obtenção de um gene que pudesse ser uma referência para uma montagem no programa Mitobim. '>' indica mitogenoma não circularizados e, portanto, mais longos do que o tamanho encontrado.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

12S - rDNA,gene da subunidade ribossomal mitocondrial 12S
16S - rDNA,gene da subunidade ribossomal mitocondrial 16S
18S – rDNA, gene da subunidade ribossomal nuclear 18S
28S - rDNA,gene da subunidade ribossomal nuclear 28S
A - *Aiptasia*
atp6 - gene da subunidade 6 da ATP-sintase mitocondrial
atp8 - gene da subunidade 8 da ATP-sintase mitocondrial
BLAST - ferramenta básica de busca por alinhamento local (*Basic Local Alignment Search Tool*)
bp - par de base (*base pair*)
C - *Cassiopea*
CEFAP - Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa da Universidade de São Paulo
cob - gene do citocromo b
cox1 - gene da subunidade 1 da citocromo oxidase
cox2 - gene da subunidade 2 da citocromo oxidase
cox3 - gene da subunidade 3 da citocromo oxidase
DNA - ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)
dsDNA - DNA dupla fita (D*ouble Stranded DNA*)
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético (*ethylenediamine tetraacetic acid*)
esquel - esqueleto
françoso - protocolo de enriquecimento de mitocôndria de Françoso e colaboradores (2015)
FU - unidade de fluorescência (F*luorescence Unit*)
g - força G
h – hora
HCl - ácido clorídrico
IB - Inferência Bayesiana
IPCC - painel intergovernamental sobre mudanças climáticas (*Intergovernmental Panel on Climate Change*)
ITS2 rDNA - gene do espaçador interno transcrito 2 ribossomal nuclear
IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)K - mil (1000)
kbp - quilobase (*kilobase pair*)
M - molar
M, mitoc - mitocondrial, amostras extraídas com protocolos de enriquecimento de mitocôndria descritos
macher - protocolo de enriquecimento de mitocôndria de Macher e colaboradores (2017)
min - minuto
miniprep - protocolo de enriquecimento de mitocôndria a partir do *QIAprep miniprep kit* (Qiagen)
mL - mililitro
mM - milimolar
mm² - milímetro quadrado
MV - Máxima Verossimilhança
nad1- gene da subunidade 1 da NADH-desidrogenase
nad2- gene da subunidade 2 da NADH-desidrogenase
nad3 - gene da subunidade 3 da NADH-desidrogenase
nad4 - gene da subunidade 4 da NADH-desidrogenase
nad4L - gene da subunidade 4L da NADH-desidrogenase
nad5 - gene da subunidade 5 da NADH-desidrogenase
nad6 - gene da subunidade 6 da NADH-desidrogenase
NaOH - hidróxido de sódio

NCBI - centro nacional para informação biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*)
ng - nanograma
NGS - sequenciamento de última geração (N*ext Generation Sequencing*)
nM - nanomolar
ºC - grau Celsius
ORF - fase aberta de leitura (O*pen Reading Frame*)
PCR - reação em cadeia da polimerase
pM – picomolar
PCR - reação em cadeia da polimerase quantitativa
qproteome - protocolo de enriquecimento de mitocôndria a partir do *Qproteome mitochondria isolation kit* (Qiagen)
rDNA - DNA ribossomal
RNA - ácido ribonucleico (*Ribonucleic Acid*)
RNAse - ribonuclease
rpm - rotação por minuto
s - segundo
symb - Symbiodiniaceae
T, tot - total, amostras extraídas com protocolos de enriquecimento de mitocôndria adaptados para serem controle
TAE - Tris-acetato-EDTA
TE - Tris-EDTA
tRNA - RNA transportador
trnM - gene do RNA transportador da metionina
trnW - gene do RNA transportador do triptofano
uL - microlitro
USP - Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL 18
1.1 OBJETIVOS 24
1.1.1 Objetivo geral 24
1.1.2 Objetivos específicos 24
2 CAPÍTULO 2: OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS E TESTES DE ENRIQUECIMENTO DE DNA MITOCONDRIAL 25
2.1 OBJETIVO 26
2.2 MATERIAL E MÉTODOS 26
2.2.1 Extração de DNA, montagem de bibliotecas e sequenciamento 26
2.2.2 Testes de enriquecimento de mitocôndrias 28
2.2.3 Testes de separação de Symbiodiniaceae 31
2.3 RESULTADOS 32
2.3.1 Extração de DNA, montagem de bibliotecas e sequenciamento 32
2.3.2 Testes de enriquecimento de mitocôndrias 51
2.3.3 Teste de separação de Symbiodiniaceae 52
2.4 DISCUSSÃO 54
2.4.1 Extração de DNA, montagem de bibliotecas e sequenciamento 54
2.4.2 Testes de enriquecimento de mitocôndrias 56
2.4.3 Teste de separação de Symbiodiniaceae 57
3 CAPÍTULO 3: MITOGENOMAS DE MICRABACIIDAE 58
3.1 ABSTRACT 58
3.2 INTRODUCTION 59
3.3 MATERIAL AND METHODS 60
3.4 RESULTS 62
3.5 DISCUSSION 63
3.6 ACKNOWLEDGEMENTS 64
4 CAPÍTULO 4: MITOGENOMAS DE "COMPLEX" E "ROBUST" 66
4.1 OBJETIVOS 66
4.2 METODOLOGIA 66
4.2.1 Extração de DNA, montagem de bibliotecas e sequenciamento 66
4.2.2 Amostras sequenciadas na Universidade de São Paulo 67
4.2.3 Amostras sequenciadas por meio da National University of Singapore 71
4.2.4 Controle de qualidade, montagem e anotação de mitogenomas 72
4.2.5 Análises filogenômicas 73
4.3 RESULTADOS 74
4.4 DISCUSSÃO 80
4.4.1 *Distolotrochus* + *Fungiacyathus* 82
4.4.2 *Cyathotrochus pileus* + Flabellidae 83
4.4.3 *Stephanocoenia intersepta* 83
4.4.4 *Anthemiphyllia* 84
4.4.5. Caryophylliidae 84
4.4.6. *Madrepora* 87
4.4.7. *Plerogyra* 88
4.4.8. *Leptastrea* + Fungiidae 88
4.4.9. Lobophylliidae e Faviidae 89
4.4.10 Outros corais e observações gerais 89
5 CAPÍTULO 5: CONCLUSÃO GERAL 91
6 REFERÊNCIAS 93

1 CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL

O filo Cnidaria é um dos mais basais dentre os metazoários, compreendendo animais diploblásticos com simetria radial (Brusca e Brusca, 2007). Esse filo apresenta como uma de suas principais características a presença de células urticantes denominadas nematocistos, que parecem ter se originado de um único ancestral (Caldwell, 2008). Dentro desse filo, a classe Anthozoa é caracterizada por algumas estruturas, entre elas os mesentérios, que são camadas de tecido dispostas radialmente e estendendo-se total ou parcialmente da parede do corpo ao centro do pólipo (Daly et al., 2007) e, dentre suas seis ordens, a Scleractinia é representada pelos corais verdadeiros, que secretam esqueleto carbonático contínuo na forma de aragonita (Brusca e Brusca, 2007). Algumas espécies de corais escleractíneos estabelecem relações de simbiose com dinoflagelados da família Symbiodiniaceae (Trench, 1993), que fornecem aminoácidos e compostos orgânicos ao hospedeiro em troca de dióxido de carbono, compostos nitrogenados e fotoproteção (Gordon e Leggat, 2010; Smith et al., 2013). Essa relação ocorre em aproximadamente metade das espécies dessa ordem, também conhecidas como corais zooxantelados, sendo que os corais que não apresentam essa relação de simbiose são denominados corais azooxantelados (Cairns, 2007). Esses últimos não estão restritos a regiões tropicais ou à abundância de luz, podendo ocorrer em locais como o Nordeste do Atlântico (Rogers, 1999) e Antártica (Cairns, 1982), em profundidades superiores a 5000 m (Cairns, 1982).

Os recifes de corais rasos e profundos estão entre os ecossistemas de maior biodiversidade do planeta (Rogers, 1999; Reed, 2002). Por abrigarem grande diversidade de invertebrados, os recifes de profundidade agregam diversas espécies de peixes e crustáceos em ao menos algum estágio ontogenético, destacando espécies economicamente importantes, como *Lophius gastrophisus* e *Chaceon ramosae* (Botelho et al., 2009; Kitahara, 2009). Contudo, atividades de origem antrópica têm resultado em diversos impactos nesses ecossistemas. Enquanto os recifes rasos são impactados principalmente pela sobrepesca e poluição (Pandolfi et al., 2003), os recifes de profundidade são prejudicados pela pesca e exploração de petróleo e gás (Rogers, 1999). A pesca em profundidade, em especial, já representa uma ameaça aos recifes de mar profundo da costa brasileira (Kitahara, 2009), onde a diversidade de corais azooxantelados é grande (Rogers, 1999; Kitahara, 2007).

De forma geral, os recifes também vêm sendo impactados pelas mudanças climáticas. As taxas de emissão de gás carbônico oriundo de queima de combustível fóssil

e produção de cimento aumentou de 1,3% para 3,3% entre 1990 e 2006 (Canadell et al., 2007), sendo os combustíveis fósseis a principal causa do aumento da temperatura global (IPCC, 2013). Além disso, calcula-se que cerca de 30% das emissões sejam absorvidas pelos oceanos (IPCC, 2013), o que pode resultar em uma diminuição de seu *pH* em 0,4 até o final do século XXI (Hoegh-Guldberg et al., 2007). Em corais zooxantelados, o efeito sinergético do aumento da temperatura e acidificação dos oceanos, podem levar à expulsão ou morte das zooxantelas, fenômeno denominado branqueamento (Glynn, 1993; Brown, 1997; Anthony et al., 2008; Hughes et al., 2017). Ademais, a aragonita, forma de deposição do esqueleto calcário dos corais escleractíneos, apresenta uma profundidade máxima na qual pode ser depositada e esse horizonte pode tornar-se mais raso com a diminuição do *pH* do meio (Guinotte e Fabry, 2008). Abaixo dessa profundidade, a produção de esqueleto carbonático para a vasta maioria das espécies de corais torna-se impossível (Hoegh-Guldberg et al., 2007), ou energeticamente mais dispendiosa, podendo haver, inclusive, dissolução do esqueleto (Fine e Tchernov, 2007). Considerando que algumas espécies de corais apresentam estruturação populacional ao longo de um gradiente batimétrico, uma redução na profundidade máxima de deposição da aragonita pode significar a morte de populações mais profundas e consequente perda de diversidade genética (Miller et al., 2011). Entretanto, simbiose e colonialidade parecem ter sido adquiridas e perdidas mais de uma vez ao longo da história evolutiva de Scleractinia, o que indica que essas características podem não ser estáveis em uma escala de tempo evolutiva (Barbeitos et al., 2010). Embora seja possível que algumas espécies sobrevivam, assim como ocorreu durante eventos de extinção em massa anteriores, os corais escleractíneos certamente sofrerão perda de biodiversidade, sendo incerto o futuro dessa ordem (Kitahara et al., *em preparação* a).

Embora despertem interesse científico e econômico, a história evolutiva desses cnidários ainda não foi totalmente esclarecida. O aparecimento dos corais escleractíneos no registro fóssil alude que o surgimento da ordem tenha ocorrido no Triássico Médio (Romano e Palumbi, 1996). Contudo, o fato desses fósseis apresentarem grande diversidade sugere divergência anterior a essa época, e o uso de dados moleculares indica o Ordoviciano como início da linhagem (Romano e Palumbi, 1996; Stolarski et al., 2011). Consequentemente, a origem da ordem permanece controversa, existindo três hipóteses principais para o seu surgimento. A primeira defende que os corais escleractíneos tenham se originado diretamente dos corais da ordem Rugosa, no Permiano (Stolarski, 1996). As

críticas a essa hipótese baseiam-se em diferenças quanto à inserção de septos e ao modo de deposição do esqueleto carbonático entre esses grupos (calcita em Rugosa e aragonita em Scleractinia; Stolarski, 1996; Ezaki, 1997), assim como na existência, durante o Paleozóico, de um gênero com características próximas aos escleractíneos (Ezaki, 1997). A segunda hipótese sugere o parafiletismo de Scleractinia, incluindo a ordem Corallimorpharia, antozoários que não secretam esqueleto carbonático, dentre os corais escleractíneos. Nessa hipótese, os coralimorfários poderiam ter se originado de escleractíneos entre 110 e 132 milhões de anos atrás (Medina et al., 2006), época em que os oceanos apresentavam alta concentração de gás carbônico, direcionando a pressão seletiva para grupos de Scleractinia que não eram capazes de secretar esqueleto calcário (hipótese denominada "Naked corals"; Stanley e Fautin, 2001; Medina et al., 2006; Hönisch et al., 2012). Em estudos recentes, essa hipótese foi suportada por reconstruções evolutivas oriundas de sequências de aminoácidos do genoma mitocondrial de antozoários (Kitahara et al., 2014; Lin et al., 2016), enquanto sequências nucleotídicas mitocondriais e de genes nucleares indicaram o monofiletismo de Scleractinia (Kitahara et al., 2010a; Kitahara et al., 2014; Lin et al., 2016). O parafiletismo dessa ordem parece ter sido resultado de artefatos nas análises filogenéticas causados por peculiaridades do genoma mitocondrial em uma de suas "subordens", que possui um maior conteúdo A+T e diferenças na utilização de códons (Kitahara et al., 2014). A terceira hipótese defende o monofiletismo de Scleractinia, que teria divergido a partir de linhagens que não produziam esqueleto calcário (Ezaki, 1997; Stolarski et al., 2011) e atualmente é a hipótese mais aceita. Embora dados moleculares (Kitahara et al., 2010a; Kitahara et al., 2014; Lin et al., 2016) e fósseis denominados "scleractiniamorphs" (Ezaki, 1997; Stolarski et al., 2011) sustentem essa hipótese, a ausência de fósseis desses organismos no Triássico, quando outros corais surgiram no registro fóssil, constitui uma das principais críticas (Stolarski et al., 2011).

Há também divergências quanto à divisão dentro de Scleractinia. Em filogenias feitas com dados morfológicos, essa ordem é dividida em cinco subordens (Vaughan e Wells, 1943), enquanto filogenias com dados moleculares a dividem em três agrupamentos: "Basal", "Robust" e "Complex" (Romano e Palumbi, 1996; Kitahara et al., 2010a; Stolarski et al., 2011). Não obstante, analisando genes mitocondriais e nucleares, a maioria das famílias estabelecidas por dados morfológicos representadas exclusivamente por espécies zooxanteladas foram recuperadas como polifiléticas, incluindo alguns casos

em que espécies de uma mesma família foram recuperadas como pertencendo aos corais "robustos" e outras a subordem dos corais "complexos" (Fukami et al., 2008).

O genoma mitocondrial pode apresentar diferentes taxas evolutivas em diferentes grupos de organismos (Lavrov e Pett, 2016). Na classe Anthozoa, essa taxa evolutiva é considerada baixa dentre os metazoários (Huang et al., 2008; Shearer et al., 2002), permitindo que sejam feitas comparações a nível de ordem utilizando sequências mitocondriais (e.g. Goddard et al., 2006; Kitahara et al., 2010a; Kitahara et al., 2014; Lin et al., 2011; Lin et al., 2014; Medina et al., 2006). Além dessa, outras peculiaridades dos genomas mitocondriais (mitogenomas) de Anthozoa podem ser apontadas, como a presença de poucos genes para RNA transportador (tRNA) e a ocorrência de íntrons (Beagley et al., 1998; Celis et al., 2016; Chen et al., 2008a; Emblem et al., 2011; Flot et al., 2013; Kitahara et al., 2014, Lin et al., 2011; Lin et al., 2012a; Lin et al., 2014; Medina et al., 2006; Paz-Garcia et al., 2016; Del Rio-Portilla et al., 2014; Terraneo et al 2018a; Terraneo et al 2018b; Tisthammer et al., 2016). Quanto ao número de genes de tRNA, apenas um é encontrado em Zoantharia (trnM; Sinniger et al., 2007; Chi e Johansen, 2017), enquanto dois (trnM e trnW) são encontrados em Actiniaria (Beagley et al., 1998; Emblem et al., 2014), Corallimorpharia (Lin et al., 2014), Antipatharia (Brugler e France, 2007) e Scleractinia (Beagley et al 1998; Celis et al., 2016; Chen et al., 2008a; Emblem et al., 2011; Flot et al., 2013; Lin et al., 2011; Lin et al., 2012a; Lin et al., 2014; Medina et al., 2006; Paz-Garcia et al., 2016; Del Rio-Portilla et al., 2014; Terraneo et al 2018a; Terraneo et al 2018b; Tisthammer et al., 2016), exceto nos gêneros *Seriatopora* e *Stylophora*, nos quais ocorreu uma duplicação do gene trnW (Chen et al., 2008a; Chen et al., 2008b). Os íntrons desses mitogenomas podem estar presentes em dois genes, *nad5* e *cox1*. No gene *nad5*, o íntron parece estar presente em todas as ordens de Hexacorallia (Medina et al., 2006; van Oppen et al., 2000) e inclui, em Actiniaria (Beagley et al., 1998; Emblem et al., 2014), Antipatharia (Brugler e France, 2007; Sinniger e Pawlowski, 2009) e Zoantharia (Sinniger et al., 2007; Chi e Johansen, 2017), dois genes codificantes de proteínas (*nad1* e *nad3*). Em Corallimorpharia, o número de genes inclusos no íntron pode variar, tendo sido observados três padrões até o momento: (1) nove genes codificantes de proteína; (2) doze desses genes e mais dois ribossomais ou, ainda, (3) dez genes codificantes de proteínas e um gene ribossomal (Lin et al., 2014). O terceiro padrão é mais similar ao observado em Scleractinia, que também inclui dez genes codificantes de proteínas e um de RNA ribossomal (Medina et al., 2006; Lin et al., 2014) e está presente

em todos os gêneros até então estudados, exceto *Desmophyllum*, que apresenta sete em vez de dez genes codificantes de proteínas (Addamo et al., 2016) e *Madrepora*, que possui uma inversão na ordem dos genes *cox2* e *cox3* (Lin et al., 2012a). Em oposição ao íntron do gene *nad5*, o do gene *cox1* parece ter sido adquirido e perdido diversas vezes em Scleractinia (Celis et al., 2017; Chuang et al., 2017). Em Complex e Corallimorpharia, esse íntron parece ter sido adquirido próximo ao início da história evolutiva de Cnidaria, posteriormente tendo suas características alteradas em alguns grupos (Celis et al., 2017). Em contrapartida, parece ter aparecido pelo menos cinco vezes em Robust ao longo dos últimos 31 milhões de anos (Celis et al., 2017). As aquisições e perdas desse íntron em Scleractinia parecem estar associadas às grandes extinções (Chuang et al., 2017). Quanto aos outros grupos de Hexacorallia, Antipatharia teve sequenciados genomas de duas espécies e *Leiopathes glaberrima* apresentou o íntron (Sinniger e Pawlowski, 2009) mas *Chrysopathes formosa* não (Brugler e France, 2007). Em Actiniaria, a maioria das espécies parece apresentar essa característica, mas *Nematostella vectensis*, por exemplo, não apresenta (Emblem et al., 2014). Já em Zoantharia, os mitogenomas até então analisados indicam a presença de íntron em *cox1* e sua estrutura e sítio de inserção parecem ser diferentes dos outros grupos (Chi e Johansen, 2017). A subclasse Hexacorallia apresenta poucos rearranjos de genes se comparada com a subclasse Octocorallia, na qual há blocos de genes conservados que foram transpostos e invertidos ao longo da evolução do grupo (e.g. Brockman e McFadden, 2012; Hogan et al., 2019). Além disso, os mitogenomas de octocorais apresentam, em sua maioria, apenas um cromossomo, à exceção de alguns membros do gênero *Umbellula*, que possuem dois (Hogan et al., 2019). Embora a ordem seja bastante variável, os genes transcritos pela mitocôndria em Octocorallia são similares a Hexacorallia, diferindo apenas pela presença do gene codificador da proteína mutS (mt*mutS*) e pela ausência de trnW (Brockman e McFadden, 2012; Hogan et al., 2019). A subclasse Ceriantharia apresenta mitogenomas pouco usuais para Anthozoa, sendo eles aparentemente lineares, organizados em mais de um fragmento e de tamanho muito superior ao observado para as outras subclasses (Stampar et al., 2019).

O principal fator relacionado às incertezas sobre a evolução de Scleractinia parece ser o número de espécies utilizadas nas filogenias e essa baixa representatividade refere-se principalmente a espécies de corais azooxantelados (Kitahara et al., 2010a). Portanto, sua inclusão poderá auxiliar na compreensão da história evolutiva da ordem. Com o uso da técnica de relógio molecular, será possível observar como essa evolução ocorreu nas

condições ambientais do passado e identificar o momento no qual algumas características foram obtidas ou perdidas, como no caso do íntron no gene codificador da proteína citocromo oxidase I, que está presente em algumas espécies de Scleractinia (Chen et al., 2008a; Chuang et al., 2017). Desse modo, será possível criar hipóteses acerca da resposta dessa ordem frente às mudanças climáticas futuras. Outra possível causa das divergências entre filogenias de Scleractinia parece ser a quantidade de marcadores. Já foi observado que utilizar apenas um ou poucos marcadores pode recuperar de modo errôneo as relações entre linhagens (Maddison, 1997). Nesse sentido, o uso do genoma mitocondrial poderá auxiliar na obtenção de relações filogenéticas mais próximas da realidade. Ainda que o genoma mitocondrial de Scleractinia apresente certos obstáculos a análises filogenéticas, como diferenças de composição de nucleotídeos entre subordens (Kitahara et al., 2014; Lin et al., 2016), os resultados deste estudo serão utilizados posteriormente na comparação dos dados obtidos com genomas nucleares das mesmas espécies.

Considerando o presente trabalho, o capítulo 2 compreende testes visando otimizar a metodologia do presente estudo, desde a extração de DNA até a etapa de sequenciamento. Já o capítulo 3 apresenta resultados obtidos a partir da comparação de mitogenomas do grupo “Basal”, refinando o posicionamento taxonômico das famílias desse grupo e fazendo considerações com relação à origem de Scleractinia. Esse capítulo já segue o formato de manuscrito para publicação. Quanto ao capítulo 4, esse inclui as outras amostras analisadas, pertencentes aos grupos “Complex” e “Robust”, que levam a discussões a respeito do relacionamento entre as diferentes famílias dessa ordem. As etapas referentes à calibração de uma filogenia e inclusão de dados paleoclimáticos poderão ser incluídas apenas na apresentação oral desta dissertação.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Reconstruir a história evolutiva da ordem Scleractinia com base em genomas mitocondriais;

1.1.2 Objetivos específicos

- Otimizar protocolos associados à obtenção de DNA mitocondrial no sentido de maximizar o número de amostras que possam ser sequenciadas em conjunto (capítulo 2);
- Identificar, montar e descrever genomas mitocondriais de espécies de corais escleractíneos, especialmente de espécies azooxanteladas de mar profundo (capítulos 3 e 4);
- Reconstruir as relações evolutivas entre as espécies dessa ordem (capítulos 3 e 4).

2 CAPÍTULO 2: OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS E TESTES DE ENRIQUECIMENTO DE DNA MITOCONDRIAL

A maior parte das amostras utilizadas no presente trabalho provém de coleções de museu, tendo sido coletadas, em alguns casos, há mais de uma década, o que pode levar ao DNA extraído não estar tão íntegro ou puro quanto recomendado para uso em estudos de genômica (ver manuais de kits de preparação de biblioteca, como *SureSelect QXT Whole Genome library preparation kit* ou *TruSeq DNA Nano kit*). Embora haja publicações desse campo adaptando protocolos de preparação de bilbiotecas para amostras de museu (e.g. Besnard et al., 2016), nenhum dos encontrados até aquele momento poderia ser diretamente utilizado. No caso de Besnard e colaboradores (2016), por exemplo, o sonicador utilizado (Bioruptor, Diagenode) não seria o mesmo, em princípio, do presente estudo (Covaris, Covaris), o que impossibilitava o uso dos mesmos parâmetros. Com isso, fez-se necessário testar a alteração de algumas etapas desse protocolo, assim como comparar diferentes protocolos de extração e purificação de DNA genômico, com o objetivo de determinar.

Outro desafio a ser enfrentado em estudos de genômica é a otimização do número de amostras a serem sequenciadas em conjunto. Por se tratar de técnicas caras, unir certo número de amostras em uma corrida de sequenciamento é uma forma interessante de reduzir custos. Contudo, é possível que, caso sejam incluídas mais amostras do que o ideal, a quantidade de sequências obtidas não seja suficiente para se conseguir a informação desejada. Desse modo, metodologias que levem à redução de outros tipos de DNA na amostra, seja ele proveniente de DNA nuclear do organismo alvo ou de simbiontes, tornam-se interessantes. Protocolos com esse objetivo originalmente envolviam isolamento do DNA mitocondrial por meio de gradiente de cloreto de césio, que demanda centrifugação por período longo (e.g. Garber e Yoder, 1983), mas também podem ser baseados em metodologias de isolamento de plasmídeo (e.g. extração alcalina, Palva e Palva, 1985; protocolos miniprep, Quispe-Tintaya et al., 2013) ou na separação da organela inteira (*Qproteome mitochondria isolation kit*, Qiagen). Contudo, os organismos com os quais esses protocolos foram desenvolvidos são ecológica ou taxonomicamente distantes de corais escleractíneos (e.g. insetos, Françoso et al., 2015; crustáceos, Macher et al., 2017), tornando-se interessante testá-los para essa ordem. Além disso, metodologias para separação de zooxantela e coral não parecem ter como objetivo o estudo da mitocôndria (e.g. estudo de fotobiologia em Kaniewska et al., 2011; isolamento da

zooxantela em Zamoum e Furla, 2012), tornando-se interessante investigar se seria possível utilizá-los para reduzir a proporção de Symbiodiniaceae nas amostras de corais zooxantelados.

2.1 OBJETIVO

Otimizar protocolos associados à obtenção de DNA mitocondrial no sentido de maximizar o número de amostras que possam ser sequenciadas em conjunto.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Extração de DNA, montagem de bibliotecas e sequenciamento

Para extração de DNA total de corais escleractíneos, foi utilizado inicialmente o *Gentra Puregene Tissue kit* (Qiagen) seguindo o protocolo suplementar "Purification of archive-quality DNA from marine invertebrate tissue using the Gentra Puregene Tissue Kit" (Qiagen, 2018), com algumas modificações. As amostras não foram maceradas com pistilos, o vórtex foi utilizado apenas antes da etapa de digestão tecidual (posteriormente a essa etapa, foi substituído por inversão do tubo 50 vezes) e as amostras tiveram sua temperatura reduzida de 55 para 37 ºC antes da adição de RNAse. Além desse, foram testados os kits *DNeasy Blood and Tissue kit* (Qiagen) e *Quick DNA Miniprep Plus kit* (Zymo Research). Tanto as modificações no protocolo quanto o teste de outros kits de extração foram feitos com o objetivo de melhorar a qualidade do DNA extraído, em especial sua pureza.

Também foram comparadas metodologias de purificação do DNA extraído: purificação por colunas *Genomic DNA Clean and Concentrator* (Zymo Research), uma purificação com esferas magnéticas seguindo as instruções do fabricante (*Beckman Coulter Agencourt Ampure XP beads*) e uma purificação para amostras com alto conteúdo proteico seguindo o Apêndice C do manual do *Gentra Puregene kit* (Qiagen).

O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro de microvolumes (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific), no qual também foram observadas as razões de pureza, e em fluorímetro (Qubit, Thermo Fisher Scientific), que fornece medida acurada da concentração de DNA dupla fita, por meio do *Qubit dsDNA Broad Range (BR) Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific). A integridade das amostras extraídas foi observada via eletroforese em gel de agarose a 1% m/v com TAE 0,5X. As amostras foram coradas com o corante *Blue Juice* (Thermo Fisher Scientific) e observadas sob iluminação ultravioleta.

Como primeira tentativa de preparação de bibliotecas para NGS, foi utilizado o *SureSelect QXT Whole Genome library preparation kit* (Agilent Technologies), sendo que todas as amostras utilizadas foram purificadas com o *Genomic DNA Clean and Concentrator kit* (Zymo Research) acima mencionado. O preparo seguiu as instruções do fabricante e as bibliotecas foram quantificadas no fluorímetro Qubit utilizando o *Qubit dsDNA HS Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific). Para avaliar a distribuição de tamanho das bibliotecas, foi utilizado o equipamento para eletroforese em capilar automatizada Bioanalyzer (Agilent Technologies) com *High Sensitivity DNA chips*. O sequenciamento (*paired-end*) foi feito em um sequenciador Illumina NextSeq 500, com um kit *High Output* v2 150 ciclos.

Considerando os resultados insatisfatórios do kit *SureSelect QXT* (seção "Resultados" abaixo), um novo kit de preparação de bibliotecas foi adquirido (*TruSeq DNA Nano kit*, Illumina). Embora esse kit já tenha se mostrado eficiente em amostras coletadas até um século antes do início do projeto e provenientes de uma coleção de museu (Besnard et al., 2016), foi necessário otimizar o protocolo para as amostras do presente estudo, uma vez que não era possível reproduzir os parâmetros de fragmentação do DNA de Besnard e colaboradores (2016). Para tal, alguns componentes e etapas foram modificados, sendo eles: (1) a massa de DNA para início do protocolo (100 ou 200 ng); (2) a etapa de fragmentação no ultrasonicador Covaris S2 (em tubos *microTUBE AFA Fiber Pre - Slit Snap*; Covaris), que seguiu parâmetros recomendados pela empresa fabricante (Tabela 2.2.1.1, sendo o "teste 3" sugerido no protocolo da Illumina) ou não foi feita (nesse caso, podendo ou não incluir a etapa de purificação do DNA fragmentado); (3) a concentração dos adaptadores (sem diluição ou diluídos 3x); e (4) a etapa de amplificação das bibliotecas ligadas a adaptadores (8 ou 12 ciclos na reação de PCR, reação em cadeia da polimerase, ou sem essa reação). As bibliotecas foram igualmente quantificadas com o *Qubit dsDNA HS Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific) em um fluorímetro Qubit v2.0 (Thermo Fisher Scientific) e tiveram sua distribuição de tamanho avaliada no Bioanalyzer (Agilent Technologies) com *High Sensitivity DNA chips*. Algumas bibliotecas tiveram sua distribuição de tamanho avaliada não apenas no final do protocolo, mas também em certas etapas, como antes da ligação de adaptadores e antes da amplificação. Quatro corridas de sequenciamento foram feitas até o momento: a primeira foi uma corrida nano com um kit de 500 ciclos no sequenciador MiSeq (*paired-end*), sendo injetados 12 pM da combinação equimolar das amostras no sequenciador e 10% da biblioteca controle PhiX; a segunda,

uma corrida de 150 ciclos (*paired-end*) em um sequenciador NextSeq 500 com o kit *High Output* v2 150 ciclos e injetando 2 pM da combinação das amostras e 5% de PhiX; a terceira incluiu apenas as bibliotecas já sequenciadas de espécies que não apresentavam mitogenoma de referência do mesmo gênero (N = 9) e foi feita com um kit de 600 ciclos (*paired-end*) em um sequenciador MiSeq com um kit v3 600 ciclos, injetando 12 pM da combinação equimolar das amostras e 5% de PhiX; e a quarta incluiu bibliotecas até então não sequenciadas e também foi feita em sequenciador MiSeq, com kit v3 600 ciclos (*paired-end*), injetando 12 pM e 1% de PhiX. A corrida Nano apresenta menor quantidade de sequências produzidas (até 1 milhão de sequências; Illumina, 2013) e foi feita com o objetivo de confirmar se os adaptadores haviam sido ligados com sucesso às bibliotecas.

A preparação das bibliotecas com ambos os kits, os sequenciamentos, a fragmentação do DNA no ultrasonicador Covaris S2 e as corridas no Bioanalyzer foram realizados no laboratório de sequenciamento Genial, no Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa da Universidade de São Paulo (CEFAP – USP).

Tabela 2.2.1.1: Parâmetros do ultrasonicador Covaris S2 comparados para fragmentação do DNA no início do protocolo de preparação de bibliotecas. Testes 1 e 2 foram recomendados pela empresa Covaris e o Teste 3 é o conjunto de parâmetros recomendado no protocolo do kit *TruSeq DNA Nano*.

	Teste 1	Teste 2	Teste 3 (Illumina)
Tamanho final almejado (bp)	350	350	350
Intensidade	5	5	5
"Duty Cycle" (%)	10	5	10
"Cycles per Burst"	200	200	200
Duração (s)	55	70	45
Temperatura (°C)	4.9	4.9	4.9
Nível da água	15	15	15
Volume de amostra (µl)	50	50	50

2.2.2 Testes de enriquecimento de mitocôndrias

Testes visando o enriquecimento de DNA mitocondrial estão sendo realizados com o objetivo de aumentar a concentração de DNA mitocondrial em relação ao nuclear em amostras de coral. Um aumento dessa concentração resultará em uma maior "profundidade de cobertura" (*depth of coverage*) de sequenciamento do DNA mitocondrial e, consequentemente, permitirá que mais amostras sejam simultaneamente sequenciadas.

Foram comparadas até o momento quatro metodologias: 1) a proposta por Macher e

colaboradores (2017; denominada “macher”); 2) o *Qproteome mitochondria isolation kit* (Qiagen; chamada de “qproteome”); 3) a desenvolvida por Quispe-Tintaya e colaboradores (2013), sem incluir a purificação com esferas magnéticas (denominada “miniprep”); e 4) o protocolo desenvolvido por Françoso e colaboradores (2015; chamada de “françoso”). Informações sobre as amostras utilizadas nos testes estão especificadas na Tabela 2.2.2.1.

Exceto para miniprep, o enriquecimento foi seguido de uma extração de DNA: 300 uL de solução de lise (Tris base 10 mM, EDTA 100 mM, SDS 2%) e 10 uL de proteinase K (20 mg/mL) foram adicionados ao volume de material enriquecido. Após incubação a 55 ºC do dia para a noite (exceto françoso, para o qual foram usadas 2 h a 65 ºC), 300 uL de acetato de amônio (7 M) foram adicionados às amostras, sendo então incubadas a -20 ºC por pelo menos 30 min, centrifugadas a 13000 rpm por 10 min a 4 ºC e, posteriormente, tendo sobrenadantes transferidos para novos tubos. A eles foram adicionados 600 uL de isopropanol e os tubos foram incubados por pelo menos 30 min a -20 ºC, seguindo centrifugação a 13000 rpm por 10 min a 4 ºC e descarte do sobrenadante. Foram adicionados 600 uL de etanol 70% seguidos de centrifugação a 13000 rpm por 10 min a 4 ºC, descarte do etanol e secagem do precipitado a temperatura ambiente por algumas horas. O DNA foi ressuspenso em TE (10 mM Tris base, 0,1 mM EDTA). No caso de françoso e qproteome, o protocolo iniciou com a adição de 300 uL de solução de lise, ao qual já havia sido adicionada proteinase K (em françoso), ou à solução de mitocôndrias resultante do processo (em qproteome). Já para macher, a extração seguiu a partir da adição de 300 uL de acetato de amônio.

A validação dos enriquecimentos foi realizada com reações de PCR de um fragmento do gene da citocromo oxidase subunidade II (*cox2*) para as amostras de Scleractinia e de parte do gene da citocromo oxidase subunidade I *(cox1*) em *Aiptasia* (também testado em *Cassiopea*, pertencente à classe Scyphozoa). A amplificação do gene da subunidade ribossomal maior nuclear (28S rDNA) e de um segundo gene mitocondrial (*nad5*) também foi testada nos corais escleractíneos. Todas as reações foram preparadas com a enzima polimerase TopTaq (Qiagen), seu Master Mix, os iniciadores indicados na Tabela 2.2.2.2 e água ultrapura, seguindo as instruções do fabricante. As reações de PCR seguiram as condições especificadas na Tabela 2.2.2.3a (Anthozoa) a ciclagem foi similar, mas com temperatura de anelamento de 52 ºC (Sinniger et al., 2007). Quanto ao 28S rDNA, a ciclagem usada foi modificada de Luz (2015), sendo: 95 ºC, 3 min; 20 ciclos de: 94 ºC

Tabela 2.2.2.1: Protocolos testados para enriquecimento de DNA mitocondrial. * indica que cada organismo foi simultaneamente extraído no protocolo descrito ("mitocondrial", "mitoc" ou "M") e em um protocolo adaptado para ser controle ("total", "tot" ou "T"), passando por todas as fases sem retirada de material. No caso de Macher, essa adaptação já é parte do protocolo, mas nos outros as amostras "totais" foram igualmente centrifugadas e incubadas e tiveram soluções a elas adicionadas, mas não tiveram material (como sobrenadantes ou precipitados) retirados. Esse desenho foi um pouco diferente em françoso (**), para o qual foi inicialmente utilizado um único tubo até a primeira etapa de centrifugação, após a qual o sobrenadante passou a ser "M" (Tc2-6M e RtyM) e o precipitado, "T" (Tc2-6T e RtyT).

Protocolo	Organismo	Amostras*	Tipo de tecido	Massa (g)	Quantidade
macher	*Cassiopea* sp.	CT	fresco	~0.3158	1 sem alguns dos tentaculos
		CM	fresco	~0.5196	1 inteira e alguns tentaculos da CT
	Aiptasia sp.	AT	fresco	0.0662	2
		AM	fresco	0.0594	3
	Tubastraea sp.	T1T	fixado em etanol (há ~1 ano)	0.4915	fragmento da colônia nº 1 com esqueleto
		T1M	fixado em etanol (há ~1 ano)	>0.5	fragmento da colônia nº 1 com esqueleto
		T2T	fixado em etanol (há ~1 ano)	0.5284	fragmento da colônia nº 2 com esqueleto
		T2M	fixado em etanol (há ~1 ano)	0.5317	fragmento da colônia nº 2 com esqueleto
qproteome	*Aiptasia* sp.	A1T	fresco	0.0088	1
		A1M	fresco	0.0460	2
		A2T	fresco	0.0105	2
		A2M	fresco	0.0447	3
	Tubastraea sp.	T1T	fixado em etanol (há ~1 ano)	0.1352	fragmento da colônia nº 1 com esqueleto
		T1M	fixado em etanol (há ~1 ano)	0.1637	fragmento da colônia nº 1 com esqueleto
		T2T	fixado em etanol (há ~1 ano)	0.1279	fragmento da colônia nº 2 com esqueleto
		T2M	fixado em etanol (há ~1 ano)	0.1480	fragmento da colônia nº 2 com esqueleto
miniprep	*Aiptasia* sp.	A1T	fresco	0.0578	parte de uma grande
		A1M	fresco	0.0505	2 ou 3
		A2T	fresco	0.0376	1 inteira e parte da A1T
		A2M	fresco	0.0433	2 ou 3
	Tubastraea sp.	T1T	fixado em etanol (há ~1 ano)	0.3256	fragmento da colônia nº 1 com esqueleto
		T1M	fixado em etanol (há ~1 ano)	0.4787	fragmento da colônia nº 1 com esqueleto
		T2T	fixado em etanol (há ~1 ano)	0.4074	fragmento de uma 3ª colônia com esqueleto
		T2M	fixado em etanol (há ~1 ano)	0.5685	fragmento de uma 3ª colônia com esqueleto
françoso**	*Tubastraea* sp.	Tc2-6	fresco	0.2920	fragmento de outra colônia, pouco esqueleto
	Rhizotrochus typus	Rty	fixado em etanol (há ~5 anos)	0.1280	tecido de um pólipo, sem esqueleto

por 30 s, 45 ºC por 1 min, 72 º C por 2 min; extensão final de 72 ºC por 10 min). A concentração de DNA de cada amostra foi padronizada para a concentração da amostra "mitocondrial" correspondente para que diferenças de intensidade nas bandas de uma eletroforese fossem atribuídas apenas a diferenças na concentração relativa dos produtos dos marcadores e, não, diferenças de concentração da amostra como um todo.

Tabela 2.2.2.2: Iniciadores utilizados para amplificação de genes da mitocôndria, simbionte e núcleo utilizados para validação de testes de enriquecimento e separação, bem como as regiões amplificadas, o genoma a que elas pertencem, os sentidos de amplificação dos iniciadores, suas sequências, o tamanho esperado e as referências que os delinearam.

Região	Genoma	Desenhado para	Iniciador	Sentido	Sequência	Tamanho esperado (bp)	Referência
Parte do *nad5*	Mitocondrial	Scleractinia	Cs01F	Senso	5' – AAGCCATGTTAGTTAATCGAGTG - 3'	984	Lin et al., 2011
			Cs01R	Anti-senso	5' – GATCAACCCAATCGAAACTTCA - 3'		
Parte do *cox2*	Mitocondrial	Scleractinia	Cs12F	Senso	5' - CCAGGGACGTTTTATGGTCA – 3'	~500	Lin et al., 2011
			Cs11R	Anti-senso	5' – CGCAACCATAATAGCTAAACCA – 3'		
Parte do *cox1*	Mitocondrial	Anthozoa	COII0a	Senso	5' - TCTTACCACAGATATTTAGTT - 3'	Entre 100 e 200	Sinniger et al., 2007
			COII1r	Anti-senso	5' - TARGACCAATACCATTGATG - 3'		
Parte do 28S rDNA	Nuclear	Eucariontes	F63sq	Senso	5' – AATAAGCGGAGGAAAAGAAAC – 3'	1348	Medina et al., 2001
			R1411	Anti-senso	5' – GTTGTTACACACTCCTTAGCGG - 3'		
ITS2 rDNA	Nuclear	*Symbiodinium*	ITSintfor2	Senso	5' - GAATTGCAGAACTCCGTG – 3'	~500	LaJeunesse e Trench, 2000
			ITSRev	Anti-senso	5' – GGGATCCATATGCTTAAGTTCAGCGGGT – 3'		Coleman et al., 1994

2.2.3 Testes de separação de Symbiodiniaceae

Três testes foram feitos para separação de endosimbiontes da família Symbiodiniaceae com base no protocolo de Zamoum e Furla (2012) também usado por Rädecker e colaboradores (2017). Esses tiveram como objetivo diminuir a quantidade de DNA de Symbiodiniaceae em amostras de corais zooxantelados e, consequentemente, aumentar a cobertura do DNA do hospedeiro, reduzindo a probabilidade de erros na montagem do genoma mitocondrial dos organismos alvo. Amostras de três espécies de coral recentemente coletadas, fixadas em nitrogênio líquido e congeladas foram utilizadas. Na primeira tentativa, foi usado um fragmento de *Siderastrea* sp. e um de *Porites astreoides;* na segunda tentativa, um de *Madracis decactis* e um de *Siderastrea* sp. e, na terceira, um fragmento de *Madracis decactis* e um de *Porites astreoides*. Uma vez que o protocolo original visava extrair DNA de Symbiodiniaceae e, não, do hospedeiro, foi necessário adaptá-lo para descobrir em que fração haveria maior proporção de DNA mitocondrial de coral. A cada pedaço de tecido com esqueleto removido da colônia original, foram adicionados 500 uL de NaOH 1M seguindo-se incubação a 37 ºC por 1 h, homogeneizando em um agitador de tubos por ~ 20 s a cada 15 min. Após a incubação, o pedaço de coral foi lavado com TE e passado para um novo tubo, ao qual foi adicionado 300 uL tampão de lise para extração de DNA total. O tubo contendo NaOH, denominado "symb", foi centrifugado a 3000 x g por 3 min a temperatura ambiente (na 2ª tentativa, foi centrifugado a 4000 x g, 5 min, 4 ºC, como em Kaniewska et al., 2011) e, então, o sobrenadante foi passado para um novo tubo, "coral". Ao tubo "symb", agora contendo apenas o precipitado, foram adicionados 500 uL de TE, seguindo centrifugação de 12000 x

g por 5 min e descarte do sobrenadante. A lavagem foi repetida e foram adicionados 300 uL de tampão de lise para extração. No tubo “symb”, de acordo com Zamoum e Furla (2012), devem estar os simbiontes. O tubo “coral” foi centrifugado a 16000 x g por 5 min e teve o sobrenadante (NaOH) descartado. O precipitado foi lavado duas vezes e centrifugado aos 16000 x g por 5 min. Após o descarte do segundo sobrenadante, foram adicionados 300 uL de solução de lise. A extração de DNA seguiu o mesmo protocolo da seção “Testes de enriquecimento de mitocôndrias”. Ao contrário da 1ª tentativa, as amostras das outras tentativas foram observadas no microscópio. Além disso, nas tentativas 2 e 3, as lavagens com TE foram feitas apenas em “coral”.

Para tentar validar o enriquecimento, foi utilizada uma abordagem similar à da seção “Testes de enriquecimento de mitocôndrias”, com o uso de PCRs de poucos ciclos em amostras padronizadas para uma mesma concentração e comparação do intensidade das bandas no gel de eletroforese. Neste caso, foram utilizados dois marcadores, um relativo ao DNA mitocondrial do hospedeiro (*cox2* Scleractinia, com as mesmas condições da seção “Testes de enriquecimento de mitocôndrias”; Tabelas 2.2.2.2 e 2.2.2.3) e outro relativo ao DNA de zooxantela (espaçador interno transcrito do DNA ribossomal, ITS2 rDNA; Tabelas 2.2.2.2 e 2.2.2.3).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Extração de DNA, montagem de bibliotecas e sequenciamento

Durante os primeiros meses do projeto de Mestrado, foram feitas 89 extrações de DNA utilizando o kit *Gentra Puregene*, 15 com o *DNeasy Blood and Tissue kit* (Qiagen) e 4 com o *Quick DNA Miniprep Plus kit* (Zymo Research). A maior parte das amostras utilizadas a princípio neste estudo apresentam DNA degradado, com fragmentos de DNA de diferentes tamanhos distribuídos ao longo da eletroforese (Figura 2.3.1.1, poços 1 a 6) em vez de uma única banda de material íntegro (Figura 2.3.1.1, poço 7). Contudo, o maior desafio encontrado naquele momento era a obtenção de amostras com qualidade adequada ao sequenciamento de última geração. Embora a quantidade de DNA obtida com o kit *Gentra Puregene* seja suficiente para a preparação de bibliotecas (50 ng para o *SureSelect QXT Whole Genome library preparation kit* e 100 ng ou 200 ng para o TruSeq DNA Nano kit, de acordo com os respectivos manuais), as razões de pureza obtidas, em sua maioria, ainda não são ideais (260/280 próxima a 1,8 e 260/230 próxima a 2). Para o kit *DNeasy* as razões de pureza parecem mais adequadas, assim como a integridade do DNA, mas em

contrapartida, a quantidade de DNA extraído é menor. Quanto ao kit *Quick DNA*, embora apenas 4 amostras tenham sido extraídas, algumas dessas amostras mostraram boas razões de pureza e, de acordo com as instruções do fabricante, uma alternativa para as amostras com razões ruins seria fazer uma nova extração de DNA com menos material inicial. Das extrações realizadas nos primeiros meses de Mestrado (N=108), 13 podem ser consideradas ótimas para sequenciamento quanto às suas razões de pureza (Tabela 2.3.1.1).

Tabela 2.2.2.3: Ciclagens das PCRs relativas aos testes de enriquecimento de DNA mitocondrial e separação de Symbiodiniaceae. Foram utilizados menos ciclos do que os estudos originais para que diferenças de concentração das sequências amplificadas fossem evidentes visualmente na eletroforese (Dr Jan Macher, comunicação pessoal). * indica que, a cada dois ciclos, a temperatura de anelamento diminui 1 ºC, começando em 62 ºC e terminando em 53 ºC (técnica denominada *touchdown*).

Marcador	Ciclos	Temperatura (ºC)	Tempo	Referência
cox2 e *nad5* Scleractinia	1	95	3 min	Lin et al., 2011
	22	94	30 s	
		50	45 s	
		72	1 min 30 s	
	1	72	10 min	
cox1 Anthozoa	1	95	3 min	Sinniger et al., 2007
	22	94	30 s	
		52	45 s	
		72	1 min 30 s	
	1	72	10 min	
28S rDNA	1	95	3 min	Luz, 2015
	20	94	30 s	
		45	1 min	
		72	2 min	
	1	72	10 min	
ITS2 rDNA *Symbiodinium*	1	94	5 min	Ciclagem de LaJeunesse e Trench, 2000; técnica de *touchdown* de Don et al., 1991
	2	94	45 s	
		62, 61, ..., 53*	45 s	
		72	30 s	
	15	92	45 s	
		52	45 s	
		72	30 s	
	1	72	10 min	

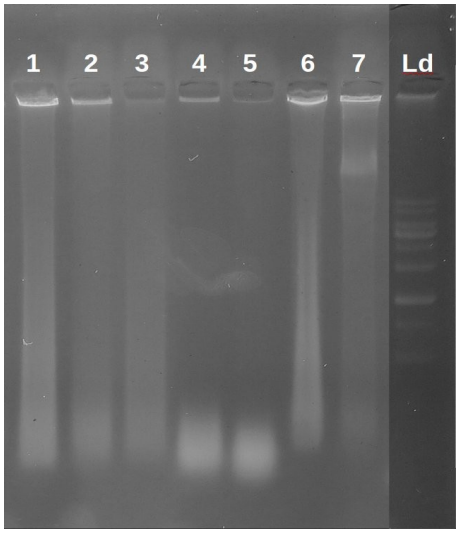

Figura 2.3.1.1: Exemplo de gel de eletroforese de amostras extraídas (1 a 3) e purificadas com o kit *Puregene*, Apêndice C (4 a 7). Nele, observa-se padrões de fragmentação do DNA que podem ser encontrados na outras amostras do estudo. "Ld" refere-se a um padrão de peso molecular no qual a menor banda corresponde a 500 bp e a maior a 10 kbp. As amostras referem-se as espécies *Stephanocyathus coronatus* (1), *Trochocyathus rhombocolumna* (2), *Trochocyathus vasiformis* (3), *Deltocyathus magnificus* (4), *Favia gravida* (5), *Letepsammia franki* (6) e *Solenosmilia variabilis* (7).

Quanto às metodologias de purificação do DNA extraído, nenhum dos métodos se sobressaiu (*Genomic DNA Clean and Concentrator*, N = 24; purificação com esferas magnéticas, N = 4; purificação *Gentra Puregene* Apêndice C, N = 4; Tabela 2.3.1.2). Dessas, apenas 4 foram consideradas amostras com condições ideais para preparação de biblioteca. Nos protocolos testados, é notável a perda de DNA e o fato de nenhum deles melhorar de forma significativa as razões de pureza, em especial nas amostras com menores razões 260/230 (e.g. 0,3; Tabela 2.3.1.2). É importante mencionar que o método das esferas magnéticas foi recomendado pela Illumina como método de limpeza do DNA para preparação de bibliotecas e ainda passará por mais testes. Além disso, tentativas de purificar DNA incluindo RNAse no protocolo do *Genomic DNA Clean and Concentrator* geraram razões 260/280 muito superiores a 2, para as quais ainda não obtivemos uma explicação. Mesmo a implementação de mudanças no protocolo do *Gentra Puregene kit* sugeridas pela Qiagen, como aumento do volume de proteinase K, não foi possível observar uma melhora substancial na pureza das amostras. Foram também encomendadas amostras de kits da própria Qiagen para purificação de DNA extraído, mas a mudança do kit de extração mostrou-se mais eficiente (mencionado a seguir).

Tabela 2.3.1.1: Amostras com qualidade ideal para sequenciamento. Data de extração ou purificação, método usado, massa de amostra com a qual se iniciou a extração (ou volume, no caso das purificações), concentração e razões de pureza (260/280 e 260/230) medidas no Nanodrop e volume de eluição após a extração ou purificação.

Código	Espécie	Data (ano-mês-dia)	Método	Massa de amostra (g)
IGS042	*Anthemiphyllia dentata*	2018-02-16	Puregene Supp	0.0387
IGS050	*Anthemiphyllia patera costata*	2018-02-28	Puregene Supp	0.1023
IGS044	*Anthemiphyllia spinifera*	2018-02-16	Puregene Supp	0.3351
IGS096	*Cyathotrochus pileus*	2018-05-17	Puregene Supp	0.0088
IGS028	*Deltocyathus magnificus*	2018-01-30	Puregene Supp	0.0232
IGS020	*Deltocyathus rotulus*	2018-05-15	Beads	35 uL
IGS033	*Enallopsammia rostrata*	2018-03-05	Zymo DNA Clean and concentrator	50 uL
IGS079	*Endopachys grayi*	2018-05-04	Puregene Supp	0.1602
IGS066	*Letepsammia franki*	2018-04-26	QuickDNA miniprep	0.0171
IGS070	*Letepsammia franki*	2018-04-28	Dneasy	0.0146
IGS067	*Porites branneri*	2018-04-26	QuickDNA miniprep	0.1574
IGS062	*Porites branneri*	2018-04-13	Zymo DNA Clean and concentrator	50 uL
IGS014	*Rhombopsammia niphada*	2018-01-16	Puregene Supp	N.A.
IGS003	*Rhyzotrochus typus*	2017-12-19	puregene fixed tissue	N.A.
IGS063	*Siderastrea* sp.	2018-04-13	Zymo DNA Clean and concentrator	50 uL
IGS029	*Stephanophyllia complicata*	2018-01-30	Puregene Supp	0.1812
IGS031	*Trochocyathus caryophillada*	2018-01-30	Puregene Supp	0.0386

Código	Concentração (ng/uL)	260/280	260/230	Volume (uL)
IGS042	234.40	1.87	1.58	100
IGS050	52.20	1.84	1.72	100
IGS044	200.00	1.85	1.66	100
IGS096	174.70	1.87	1.7	50
IGS028	70.20	1.79	1.85	100
IGS020	339.40	1.90	2.07	35
IGS033	114.20	1.9	1.82	50
IGS079	296.50	1.87	1.88	100
IGS066	120.63	1.81	1.81	100
IGS070	91.17	1.83	1.67	150
IGS067	54.20	1.8	1.91	100
IGS062	129.50	1.89	1.7	50
IGS014	223.90	1.89	1.54	100
IGS003	136.00	1.88	1.8	100
IGS063	53.50	1.91	1.85	50
IGS029	660.70	1.86	1.71	100
IGS031	156.80	1.82	1.79	100

As amostras selecionadas para a primeira preparação de biblioteca foram quantificadas com o kit *Broad Range DNA Assay* (Thermo Fisher Scientific) no fluorímetro Qubit. Ao serem diluídas para 25 ng/uL, concentração de início do protocolo do *SureSelect QXT library preparation kit*, e requantificadas, constatou-se que a maior parte das concentrações era, na realidade, inferior a esse valor, mesmo tendo-se iniciado a diluição com um valor superior. A maior parte das amostras foi, portanto, usada com concentração inferior a 25 ng/uL (Tabela 2.3.1.3)

A primeira preparação de bibliotecas resultou em oito bibliotecas produzidas com sucesso (as outras 8 não apresentaram curva de distribuição no Bioanalyzer), das quais

seis possuíam tamanho em torno de 2 kbp, muito superior ao máximo adequado ao sequenciador (500 bp; Illumina, comunicação pessoal) e duas apresentavam tamanho mais próximo ao ideal (Tabela 2.3.1.3), sendo que em geral, todas apresentavam baixa concentração (Tabela 2.3.1.3). O pool final foi colocado no sequenciador com concentração de 0,5 nM, adicionando-se volumes maiores das bibliotecas com menor concentração e volumes menores das com maior concentração. Contudo, a corrida foi automaticamente interrompida. Observando a quantidade de *clusters* (agrupamentos de sequências idênticas) presentes na célula de sequenciamento (~100 K/mm²), a causa mais provável dessa parada parece ter sido uma baixa quantidade desses agrupamentos, que seria menor do que o mínimo necessário para o sequenciamento acontecer (170 a 220 K/mm²; Illumina, 2017a). Frente aos resultados negativos, o protocolo de preparação de bibliotecas foi mudado e passou a ser utilizado o kit *TruSeq DNA Nano*, que utiliza quebra física do DNA. Esse protocolo já foi executado com sucesso a partir de amostras provenientes de coleções de museu (Besnard et al., 2016). Por esse motivo, algumas amostras da Tabela 2.3.1.1 foram incluídas no segundo teste de montagem de bibliotecas, junto a outras amostras que apresentavam integridade e razões de pureza variadas (Tabela 2.3.1.4; Figura 2.3.1.2).

Quanto à massa de DNA para início da preparação de biblioteca, o protocolo sugere 100 ng. Contudo, as bibliotecas #1, #2, #3, #4 e #7 apresentaram baixa concentração na primeira tentativa de preparação de biblioteca. Desse modo, usar massa inicial de 200 ng foi uma alternativa para tentar aumentar essa concentração. Considerando que nenhuma das bibliotecas preparadas com 200 ng foi bem sucedida, a massa inicial ideal para o protocolo parece, de fato, ser 100 ng.

Na etapa de fragmentação do DNA, os parâmetros do teste 1 (Tabela 2.2.1.1) levaram à fragmentação excessiva (maior parte dos fragmentos menores que 200 bp; #1, #3) ou insuficiente (maior parte dos fragmentos em torno de ou maiores que 1 kbp; #4) do DNA (Figura 2.3.1.2). O teste 2, por sua vez, gerou fragmentos com ampla distribuição de tamanho ou dentro do intervalo de 200 a 1 kbp. Esse tamanho mínimo é o ideal para o início do protocolo porque fragmentos menores que ~150 bp são excluídos em purificações com esferas magnéticas quando o volume de esferas adicionado é o mesmo do volume a ser purificado (Beckman Coulter, 2012), o que acontece na maior parte do protocolo. Quanto ao tamanho máximo de 1 kbp, esse é indicado como tamanho máximo ideal para as bibliotecas preparadas com esse kit (Illumina, 2017b), então o fato de a maior

Tabela 2.3.1.2: Purificação de amostras e sua concentração e razões de pureza (260/280 e 260/230) antes e depois do processo, assim como as espécies às quais pertencem, seus códigos antigo e novo, e o método de purificação utilizado.

			Concentração (ng/uL)	
Código novo	**Código antigo**	**Espécie**	**Extração**	**Purificação**
IGS002	Muss_tissue	*Mussismilia*	10.20	3.97
IGS004	Tc2-6_tissue	*Tubastraea coccinea*	13.00	-0.80
IGS008	Cari	*Caryophyllia*	29.70	-0.03
IGS009	CorX	Coral X	307.30	124.17
IGS011	Para	*Paracyathus*	664.00	232.73
IGS020	Dro	*Deltocyathus rotulus*	423.30	305.80
IGS025	Dca	*Deltocyathus cameratus*	201.20	118.43
IGS033	Ero01	*Enallopsammia rostrata*	314.60	113.60
IGS036	Lpe02	*Lophelia pertusa*	205.50	97.90
IGS037	Moc01	*Madrepora oculata*	143.80	28.30
IGS038	Sva01	*Solenosmilia variabilis*	165.70	79.57
IGS040	Ade3785	*Anthemiphyllia dentata*	675.90	295.13
IGS042	Ade3790	*Anthemiphyllia dentata*	234.40	162.40
IGS044	Asp3769	*Anthemiphyllia spinifera*	200.00	146.07
IGS048	Apc3771	*Anthemiphyllia patera costata*	57.00	61.53
IGS051	Dma3810	*Deltocyathus magnificus*	615.70	337.97
IGS056	Afr01	*Agaricia fragilis*	301.80	10.37
IGS057	Fgr01	*Favia gravida*	536.20	47.20
IGS058	Mal01	*Millepora alcicornis*	625.80	146.23
IGS059	Mca01	*Montastraea cavernosa*	199.83	7.97
IGS060	Mha01	*Mussismilia harttii*	429.13	11.07
IGS061	Mhi01	*Mussismilia hispida*	224.63	29.77
IGS062	Pbr01	*Porites branneri*	598.93	129.83
IGS063	Sider03	*Siderastrea* sp	740.00	53.10
IGS059	Mca01	*Montastraea cavernosa*	199.83	161.47
IGS037	Moc01	*Madrepora oculata*	143.80	74.70
IGS020	Dro	*Deltocyathus rotulus*	423.30	339.40
IGS028	Dma	*Deltocyathus magnificus*	70.20	14.13
IGS039	Sva02	*Solenosmilia variabilis*	49.00	24.63
IGS052	Dma3811	*Deltocyathus magnificus*	706.70	314.10
IGS054	Lfr3791	*Letepsammia franki*	565.90	262.63
IGS057	Fgr01	*Favia gravida*	536.20	184.07

Tabela 2.3.1.2 (cont.):

	260/280		260/230		
Código novo	Extração	Purificação	Extração	Purificação	Método de purificação
IGS002	1.86	-0.52	0.73	-0.21	DNA Clean and Concentrator
IGS004	1.97	0.08	1.57	0.04	DNA Clean and Concentrator
IGS008	1.96	0.00	2.98	0.00	DNA Clean and Concentrator
IGS009	1.68	2.11	0.88	2.36	DNA Clean and Concentrator
IGS011	1.65	1.83	0.71	1.29	DNA Clean and Concentrator
IGS020	2.04	2.00	1.68	2.45	DNA Clean and Concentrator
IGS025	1.88	2.24	2.15	2.71	DNA Clean and Concentrator
IGS033	1.59	1.89	0.35	1.80	DNA Clean and Concentrator
IGS036	1.67	1.92	0.31	2.17	DNA Clean and Concentrator
IGS037	1.62	2.05	0.18	1.02	DNA Clean and Concentrator
IGS038	1.73	2.25	0.19	2.28	DNA Clean and Concentrator
IGS040	1.78	1.93	1.03	1.41	DNA Clean and Concentrator
IGS042	1.87	2.12	1.58	2.45	DNA Clean and Concentrator
IGS044	1.85	2.10	1.66	2.99	DNA Clean and Concentrator
IGS048	1.84	2.39	1.36	2.91	DNA Clean and Concentrator
IGS051	1.77	1.95	1.23	2.12	DNA Clean and Concentrator
IGS056	1.50	2.81	0.51	0.89	DNA Clean and Concentrator
IGS057	1.43	2.00	0.58	1.39	DNA Clean and Concentrator
IGS058	1.70	1.88	0.92	1.47	DNA Clean and Concentrator
IGS059	1.25	1.72	0.36	0.28	DNA Clean and Concentrator
IGS060	1.37	5.53	0.45	-35.77	DNA Clean and Concentrator
IGS061	1.31	1.82	0.56	1.28	DNA Clean and Concentrator
IGS062	1.71	1.90	1.00	1.70	DNA Clean and Concentrator
IGS063	1.52	1.93	0.55	1.85	DNA Clean and Concentrator
IGS059	1.25	1.33	0.36	0.42	Beads
IGS037	1.62	1.57	0.18	0.53	Beads
IGS020	2.04	1.90	1.68	2.07	Beads
IGS028	1.79	1.73	1.85	0.64	Beads
IGS039	1.60	1.91	0.18	2.01	Puregene Apêndice C
IGS052	1.66	1.75	0.84	1.04	Puregene Apêndice C
IGS054	1.85	1.87	0.93	1.22	Puregene Apêndice C
IGS057	1.43	1.60	0.58	0.62	Puregene Apêndice C

parte dos fragmentos apresentar tamanho superior a 1 kbp indica que, desde o início do protocolo, a maior parte do DNA da amostra está fora da faixa ideal e pode, inclusive, ser excluída na etapa de seleção de tamanho. No caso da amostra #8, os testes 1 e 2 resultaram em fragmentos muito grandes ou muito pequenos, enquanto o teste 3 indicou uma escala de tamanho aparentemente adequada (Figura 2.3.1.2). Isso indica que os parâmetros presentes no protocolo são adequados mesmo que a amostra não apresente DNA tão íntegro a ponto de formar uma banda de alto peso molecular (Figura 2.3.1.2). Ambas as amostras não fragmentadas (#2 e #7) precisaram ser purificadas ao final do protocolo para

remoção de um pico a ~140 bp e #7 teve o número de ciclos aumentados na etapa de amplificação (Figura 2.3.1.2, Tabela 2.3.1.4). As amostras fragmentadas com o teste 2 apresentaram resultados diversos ao final do protocolo, sendo #4 sequenciada sem amplificação e #17 preparada com 12 ciclos de PCR e uma purificação ao final do protocolo. As amostras #1 e #3 foram deixadas para tentativas posteriores, mas, considerando que #1 apresentou padrão similar a #4 antes da amplificação, é possível que essa amostra também apresente resultados positivos se sequenciada sem amplificação.

Tabela 2.3.1.3: Preparação de biblioteca SureSelect QXT (Agilent). Amostras usadas, sua concentração medida em Qubit antes ("Concentração amostra") e depois ("Concentração biblioteca") do processo, tamanho médio das bibliotecas medido em Bioanalyzer e a molaridade, calculada com base no tamanho médio e concentração da biblioteca. Após uma diluição e uma tentativa de corrigir a concentração, as amostras indicadas com asteriscos apresentaram concentração diferente da ideal, então * foi re-diluída a partir do estoque e ** teve 1 uL adicionado a ela e ambas foram incluídas na preparação sem serem medidas novamente.

Amostra	Concentração amostra (ng/uL)	Concentração biblioteca (ng/uL)	Tamanho médio Bioanalyzer (bp)	Molaridade (nM)
Ero01	16.6	1.06	2507	0.65
Lpe02	16.5	0.59	2554	0.36
Para	17.3	0.27	0	N.A.
Apc3771	18.4	0.31	0	N.A.
Asp3769	22.8	0.27	0	N.A.
CorX	17.2	0.18	2207	0.13
Dma3810	23.8	0.12	0	N.A.
Moc01	25?*	0.27	0	N.A.
Muss	17.6	0.27	2500	0.17
Sva01	17.9	0.13	0	N.A.
Ade3790	18.6	0.14	0	N.A.
Cari	19.7	0.43	3365	0.20
Dca	23.0	0.07	0	N.A.
T1M	18.7	0.61	667	1.41
Mde01	25?**	0.1	0	N.A.
T1T	25?**	1.18	538	3.37

Em algumas bibliotecas, foram observados picos próximos a 140 bp, que foram atribuídos à presença de dímeros de adaptadores (~120 bp; Illumina, 2015) ou de iniciadores (~100 bp; Illumina, comunicação pessoal). Como possível solução, a diluição dos adaptadores (3x) foi introduzida no protocolo em conjunto com o aumento de 8 para 12 ciclos na reação de PCR (comunicação pessoal, equipe de suporte da Illumina). Nos casos em que esses dímeros apresentaram uma concentração menor em relação à concentração da biblioteca (observando os perfis de distribuição de tamanho em Figura 2.3.1.2, "biblioteca"), as bibliotecas foram purificadas após o fim do protocolo. A

biblioteca #42, contudo, apresentou pico muito inferior à concentração da biblioteca, então essa purificação não foi realizada (Figura 2.3.1.2, "biblioteca"). Passaram por esse procedimento as bibliotecas #2, #7, #17, #21, #24, #30 #31, #32, #35, #37, #39, #41, #43, #44 e #46 (Figura 2.3.1.2, Tabela 2.3.1.4), das quais #2, #7, #17, #30, #31, #32, #35, #37, #39, #41, #43 e #44 foram analisadas no Bioanalyzer após a purificação e de fato tiveram seus picos reduzidos (perfis de distribuição de tamanho em Figura 2.3.1.2 "biblioteca purificada"). Dentre as 23 amostras em que as duas alterações foram incluídas, 11 bibliotecas foram preparadas com sucesso e 8 precisaram ser purificadas ao final do protocolo, totalizando 19 amostras para sequenciamento. Apenas o aumento do número de ciclos foi incluído em 16 amostras, e, dessas, 6 bibliotecas foram preparadas com sucesso e 5 passaram por purificação ao final do protocolo, totalizando 11 bibliotecas.

A corrida Nano realizada no sequenciador MiSeq incluiu uma amostra (biblioteca #14) que não foi sequenciada no NextSeq (Tabela 2.3.1.5). A biblioteca #4 foi a com menor quantidade de agrupamentos de fragmentos lidos com sucesso (*clusters*) em ambos os sequenciadores, representando 348 clusters no MiSeq e 40845 no NextSeq, enquanto as outras bibliotecas geraram, em média, $8{,}30 \times 10^4$ (desvio padrão = $4{,}02 \times 10^4$) e $1{,}71 \times 10^7$ (desvio padrão = $3{,}83 \times 10^6$) agrupamentos, respectivamente (Tabela 2.3.1.5).

Tabela 2.3.1.4 (páginas seguintes): Preparação de bibliotecas com o kit *TruSeq DNA Nano*. Amostras usadas, suas concentrações e razões de pureza, modificações feitas no protocolo, perfil de tamanho das bibliotecas finais e de algumas etapas intermediárias, concentração da biblioteca final e se essa biblioteca estava adequada para sequenciamento. Na coluna "Fragmentação", os hífens indicam o teste que funcionou para as amostras que foram fragmentadas com mais de um conjunto de parâmetros. "" indica que o pico era tão inferior à concentração da biblioteca que esta não foi purificada.**

Tabela 2.3.1.4 (cont.):

#	Amostra	Espécie	Conc amostra (ng/uL)	Razão 260/280	Razão 260/230	Data da preparação	Massa inicial (ng)	Fragmentação	Diluição dos adaptadores	Nº ciclos da PCR
1	IGS042	*Anthemiphyllia dentata*	77.90	1.87	1.58	treinamento	100	testes 1 e -2-	não	8
2	IGS050	*Anthemiphyllia patera costata*	12.10	1.84	1.72	treinamento	100	não	não	8
3	IGS075	*Letepsammia formosissima*	112.00	1.86	1.46	treinamento	100	testes 1 e -2-	não	8
4	IGS066	*Letepsammia franksi*	67.90	1.81	1.81	treinamento	100	testes 1 e -2-	não	8
5	IGS081 beads zymo	*Letepsammia* Porous	56.30	1.89	1.50	treinamento	100	não	não	8
6	IGS074 beads zymo	*Letepsammia* Spiny	15.10	2.23	1.86	treinamento	100	não	não	8
7	IGS031	*Trochocyathus caryophillioides*	24.60	1.82	1.79	treinamento	100	não	não	8
8	IGS009 purif	Coral não-identificado ("coral X")	46.80	2.11	2.36	treinamento	100	testes 1, 2 e -3-	não	8
1	IGS042	*Anthemiphyllia dentata*	77.60	1.87	1.58	2018-07-20a24	200	teste 2	não	8
2	IGS050	*Anthemiphyllia patera costata*	11.80	1.84	1.72	2018-07-20a24	200	não	não	8
3	IGS075	*Letepsammia formosissima*	121.00	1.86	1.46	2018-07-20a24	200	teste 2	não	8
4	IGS066	*Letepsammia franki*	80.10	1.81	1.81	2018-07-20a24	200	teste 2	não	12
7	IGS031	*Trochocyathus caryophillioides*	28.20	1.82	1.79	2018-07-20a24	200	não	não	12
8	IGS009 purif	Coral X	52.00	2.11	2.36	2018-07-20a24	100	teste 3	3x	12
12	IGS033 purif	*Enallopsammia rostrata*	87.30	1.89	1.80	2018-07-20a24	100	teste 3	3x	12
13	IGS036 purif	*Lophelia pertusa*	66.00	1.92	2.17	2018-07-20a24	100	teste 3	3x	12
1	IGS042	*Anthemiphyllia dentata*	98.60	1.87	1.58	2018-07-25a27	100	teste 2	não	12
4	IGS066	*Letepsammia franki*	78.60	1.81	1.81	2018-07-25a27	200	teste 2	não	Sem PCR
7	IGS031	*Trochocyathus caryophillioides*	28.20	1.82	1.79	2018-07-25a27	200	não	não	12
14	IGS004	*Tubastraea coccinea*	2.02	1.97	1.57	2018-07-25a27	100	teste 3	não	12
15	DNA 45	*Astrangia*	48.80	1.90	1.61	2018-07-25a27	100	teste 3	não	12
16	IGS008	*Caryophyllia*	2.23	1.96	2.98	2018-07-25a27	100	teste 3	não	12
17	DNA 25 zymo	*Truncatoflabellum vigintifarium*	46.10	2.34	4.38	2018-07-25a27	100	testes -2- e 3	não	12
18	Madracis decactis	*Madracis decactis*	34.70	2.03	1.82	2018-07-25a27	100	teste 3	não	12
21	DNA 32	*Anthemiphyllia dentata*	29.20	2.08	1.24	2018-07-30 a 08-01	100	teste 3	3x	12
22	IGS082	*Letepsammia formosissima*	12.00	3.39	0.50	2018-07-30 a 08-01	100	teste 3	3x	12
23	IGS070	*Letepsammia franki*	62.80	24.37	-0.55	2018-07-30 a 08-01	100	teste 3	3x	12
24	DNA 41	*Letepsammia superstes*	26.90	1.83	1.67	2018-07-30 a 08-01	100	teste 3	3x	12
25	Phyllangia americana	*Phyllangia americana*	15.40	1.97	1.47	2018-07-30 a 08-01	100	teste 3	3x	12
26	IGS071	*Porites branneri*	12.50	2.00	0.94	2018-07-30 a 08-01	100	teste 3	3x	12
27	DNA 28	*Rhombopsammia niphada*	143.00	1.95	1.20	2018-07-30 a 08-01	100	teste 2	3x	12
28	Sva02 purif appendC	*Solenosmilia variabilis*	47.20	1.91	2.01	2018-07-30 a 08-01	100	teste 3	3x	12
29	IGS107a	*Balanophyllia gigas*	26.2	1.94	2.27	2018-11-12a14	100	teste 2	não	12
30	IGS108b	Caryophylliidae gen nov	13.8	1.7	1.06	2018-11-12a14	100	teste 2	não	12
31	IGS109b	*Cyathotrochus pileus*	47.8	1.85	1.76	2018-11-12a14	100	teste 2	não	12
32	IGS110b	*Dendrophyllia* sp (46)	7.69	1.91	-4.79	2018-11-12a14	100	teste 2	não	12
34	IGS114a	*Letepsammia franki*	202	1.84	1.69	2018-11-12a14	100	teste 3	não	12
35	IGS115a	*Rhizotrochus typus*	122	1.84	1.81	2018-11-12a14	100	teste 2	não	12
36	CV8	*Stephanocoenia*	16.5	1.92	1.77	2018-11-12a14	100	teste 3	não	12
37	IGS107a	*Balanophyllia gigas*	25.5	1.94	2.27	2018-11-21a22	100	teste 2	3x	12
38	IGS110b	*Dendrophyllia* sp (46)	6.98	1.91	-4.79	2018-11-21a22	100	teste 2	3x	12
39	IGS113b	*Letepsammia formosissima*	80.1	1.82	1.86	2018-11-21a22	100	teste 3	3x	12
40	IGS114a	*Letepsammia franki*	164	1.84	1.69	2018-11-21a22	100	teste 3	3x	12
41	IGS115a	*Rhizotrochus typus*	118	1.84	1.81	2018-11-21a22	100	teste 2	3x	12
42	Muss	*Mussismilia branqueada*	5.09	1.86	0.73	2018-11-21a22	100	teste 3	3x	12
43	CV10b	*Favia leptophylla*	5.69	2.11	1.19	2018-11-21a22	100	teste 3	3x	12
44	CV16a	*Mussismilia braziliensis*	11.5	1.73	0.86	2018-11-21a22	100	teste 3	3x	12
45	CV13a	*Mussismilia harttii*	6.74	1.82	0.95	2018-11-26a28	100	teste 3	3x	12
46	CV15	*Siderastrea stellata*	14.4	1.95	1.57	2018-11-26a28	100	teste 3	3x	12
47	CV17	*Favia gravida*	19	1.93	1.43	2018-11-26a28	100	teste 3	3x	12
48	IGS011	*Paracyathus*	205	1.65	0.71	2018-11-26a28	100	teste 3	3x	12

Tabela 2.3.1.4 (cont.):

#	Amostra	Perfil de distribuição de tamanho dos fragmentos (Bioanalyzer)		Conc biblioteca (ng/uL)	Funcionou?	Protocolo
		Tamanho médio dos fragmentos em etapa intermediária do protocolo (etapa, tamanho)	Tamanho médio dos fragmentos na biblioteca			
1	IGS042	N.A.	413, pico em 144	0.58	não	350
2	IGS050	N.A.	382, pico em 144; 404 purificada	0.27	sim (purificada)	350
3	IGS075	N.A.	432, pico em 144	0.49	não	350
4	IGS066	N.A.	455, pico em 149	0.61	não	350
5	IGS081 beads zymo	N.A.	395, pico em 149	0.12	não	350
6	IGS074 beads zymo	N.A.	362, pico em 142	0.15	não	350
7	IGS031	N.A.	526, pico em 141	0.31	não	350
8	IGS009 purif	N.A.	549, pico em 143	3.42	não	350
1	IGS042	Pré-PCR, 612	488 (sem curva visível), pico em 141	0.23	não	350
2	IGS050	Pré-PCR, 1172 (mais de uma curva)	361, pico em 141	0.20	não	350
3	IGS075	Pré-PCR, 589	595, pico em 140	0.63	não	350
4	IGS066	Pré-PCR, 715	391	0.23	não	350
7	IGS031	Pré-PCR, 1184, picos em ~75 e ~210	535, pico em 141; 533 purificada	0.98	sim (purificada)	350
8	IGS009 purif	Pré-PCR, 518	574	41.70	sim	350
12	IGS033 purif	Pré-PCR, 641	599	50.00	sim	350
13	IGS036 purif	Pré-PCR, 778	577	45.20	sim	350
1	IGS042	N.A.	~500, pico em ~150	1.42	não	350
4	IGS066	Antes da ligação dos adaptadores, 457	647	0.89	sim	350
7	IGS031	N.A.	487, pico em 141	2.02	não	350
14	IGS004	N.A.	548	62.40	sim	350
15	DNA 45	Antes da ligação dos adaptadores, 438	546	77.00	sim	350
16	IGS008	N.A.	554	13.70	sim	350
17	DNA 25 zymo	N.A.	509, pico em 143; 516 purificada	4.84	sim (purificada)	350
18	Madracis decactis	Antes da ligação dos adaptadores, 427	559	94.60	sim	350
21	DNA 32	N.A.	519, pico em 142; N.A.	1.04	sim (purificada)	350
22	IGS082	N.A.	149	0.42	não	350
23	IGS070	N.A.	478	0.12	não	350
24	DNA 41	N.A.	539, pico em 142; N.A.	0.55	sim (purificada)	350
25	Phyllangia americana	N.A.	470	106.00	sim	350
26	IGS071	N.A.	583	86.80	sim	350
27	DNA 28	N.A.	546	4.74	sim	350
28	Sva02 purif appendC	N.A.	550	3.82	sim	350
29	IGS107a	N.A.	768, pico em 144; N.A.	0.984	não	550
30	IGS108b	N.A.	633, pico em 145: 629 purificada	7.02	sim (purificada)	550
31	IGS109b	N.A.	729, pico em 145; 717 purificada	9.2	sim (purificada)	550
32	IGS110b	N.A.	609, pico em 145; 654 purificada	1.5	sim (purificada)	550
34	IGS114a	N.A.	577, pico em 147; N.A.	0.096	não	550
35	IGS115a	N.A.	540, pico em 144; 538 purificada	2.52	sim (purificada)	350
36	CV8	N.A.	863	78.2	sim	550
37	IGS107a	Antes da ligação dos adaptadores, 522	544, pico em 142; 548 purificada	0.728	sim (purificada)	350
38	IGS110b	Antes da ligação dos adaptadores, 1475	601, pico em 144; N.A.	1.02	não	550
39	IGS113b	Antes da ligação dos adaptadores, 492	551, pico em 142; 552 purificada	0.504	sim (purificada)	350
40	IGS114a	Antes da ligação dos adaptadores, 482	N.A., pico em 144; N.A.	0.089	não	350
41	IGS115a	Antes da ligação dos adaptadores, 499	529, pico em 143; 531 purificada	1.5	sim (purificada)	350
42	Muss	Antes da ligação dos adaptadores, 652	835, pico em 146; N.A. **	1.35	sim	550
43	CV10b	Antes da ligação dos adaptadores, 463	592, pico em 147; 588 purificada	5.04	sim (purificada)	350
44	CV16a	Antes da ligação dos adaptadores, 699	795, pico em 147; 829 purificada	1.42	sim (purificada)	550
45	CV13a	Antes da ligação dos adaptadores, 770; pré-PCR 766	732	0.54	sim	550
46	CV15	Antes da ligação dos adaptadores, 471; pré-PCR 669	550	85.8	sim	350
47	CV17	Antes da ligação dos adaptadores, 452; pré-PCR 491	582	11.5	sim	350
48	IGS011	Antes da ligação dos adaptadores, 744; pré-PCR 1056	747	6.16	sim	550

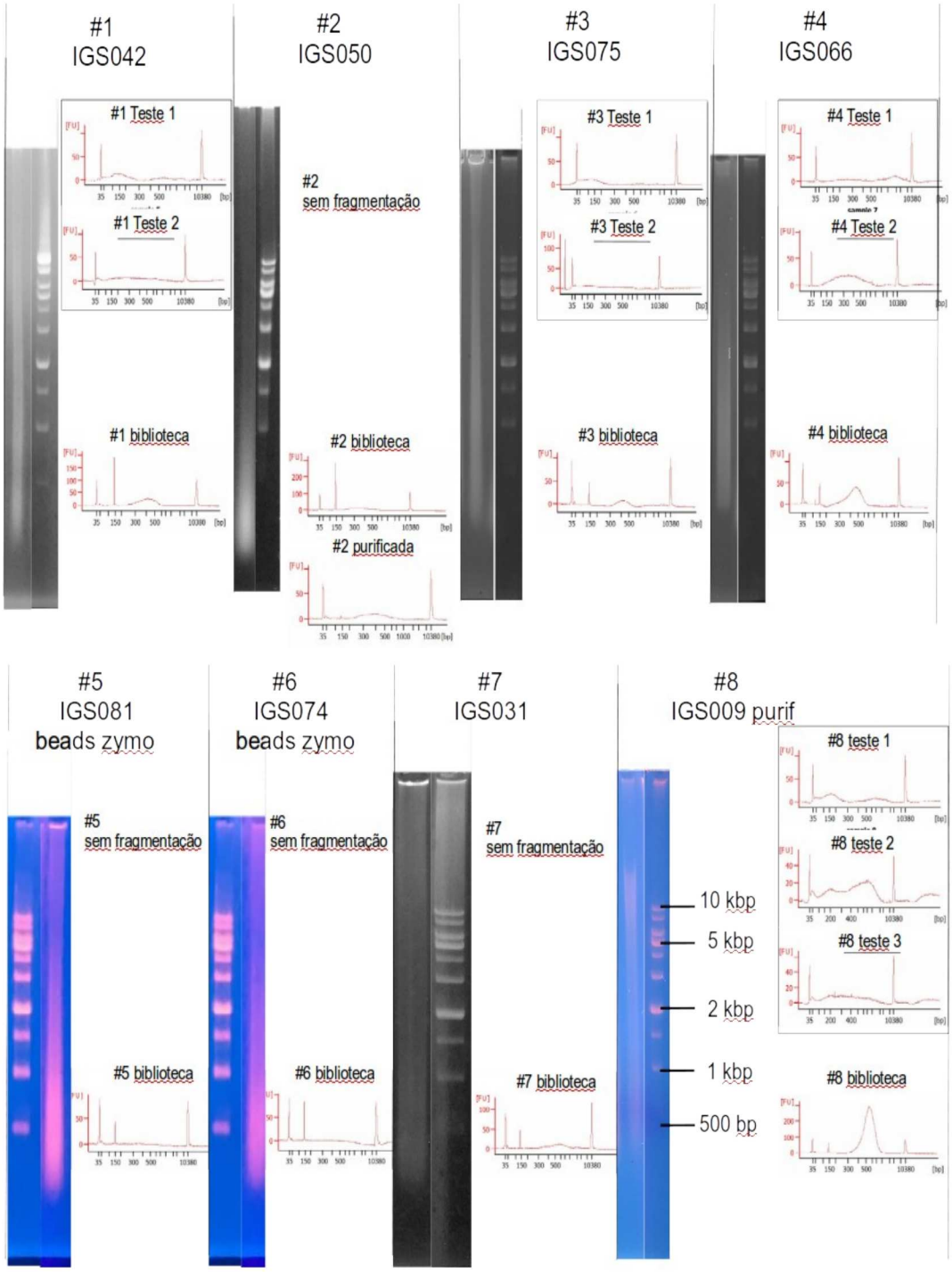

Figura 2.3.1.2: Esquema da preparação de bibliotecas indicando o perfil de tamanho de cada amostra (eletroforese), e das bibliotecas correspondentes, ao final e, em alguns casos, em etapas intermediárias do protocolo (perfis do Bioanalyzer). Os perfis sublinhados dentre os relativos aos testes de fragmentação do DNA (testes 1, 2 e 3) indicam os parâmetros de fragmentação que funcionaram para essas amostras. Os perfis do Bioanalyzer apresentam, na abscissa, o tamanho dos fragmentos (em pares de base, bp) e, na ordenada, a fluorescência deles (FU). O marcador menor ('lower marker") localiza-se em 35 bp e o maior ("upper marker") em 10380 bp. O padrão molecular da eletroforese apresenta como bandas mais brilhantes os tamanhos de 2 kbp e 5 kbp. A biblioteca #25 foi aplicada no Bioanalyzer com concentração superior à máxima, o que gerou o padrão diferente observado e alterou

o ínicio de #26. "*" indica que foi feita purificação na etapa "Purificação do DNA fragmentado" ("Clean Up Fragmented DNA"), após a fragmentação.

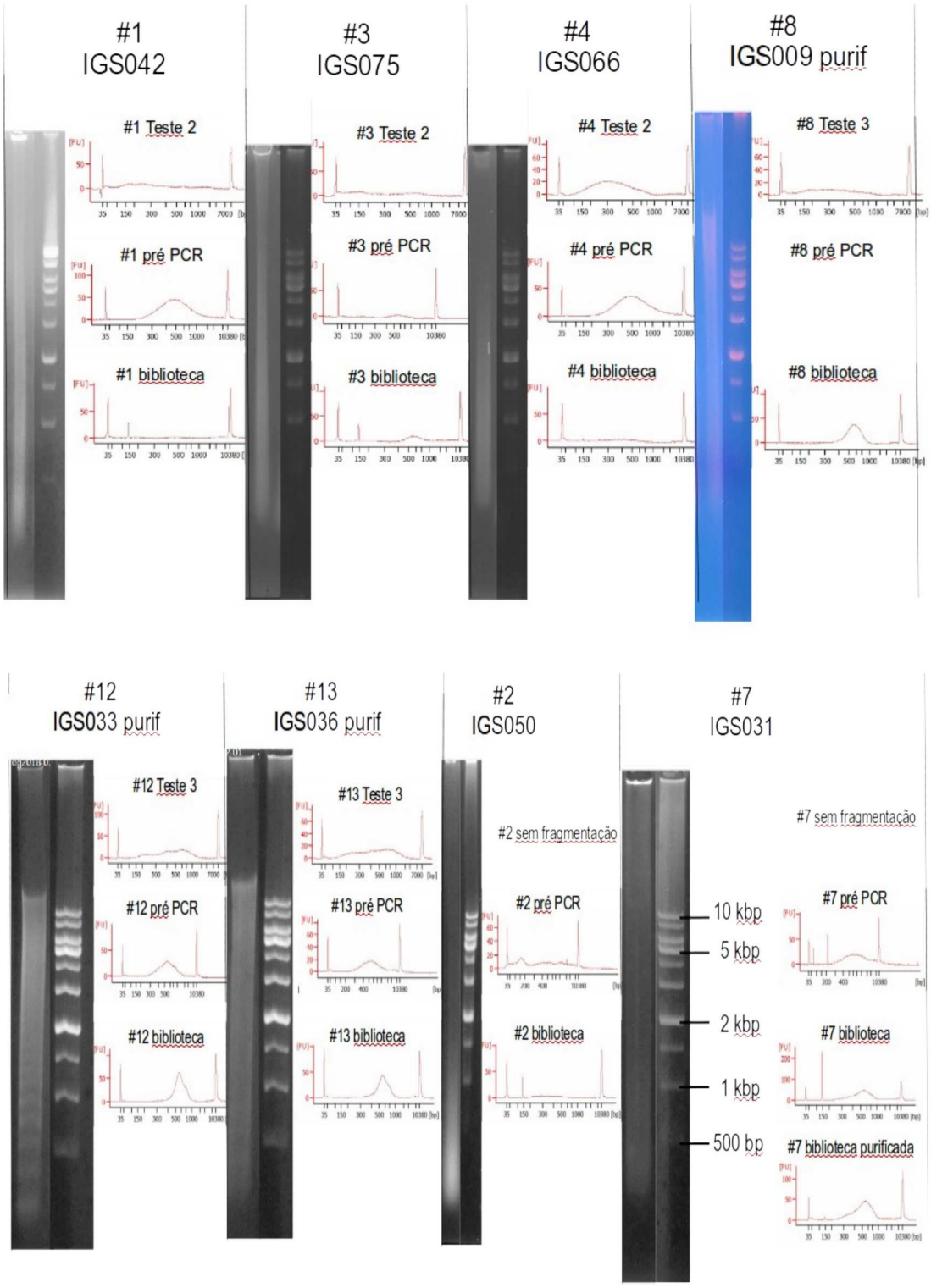

Figura 2.3.1.2 (cont.)

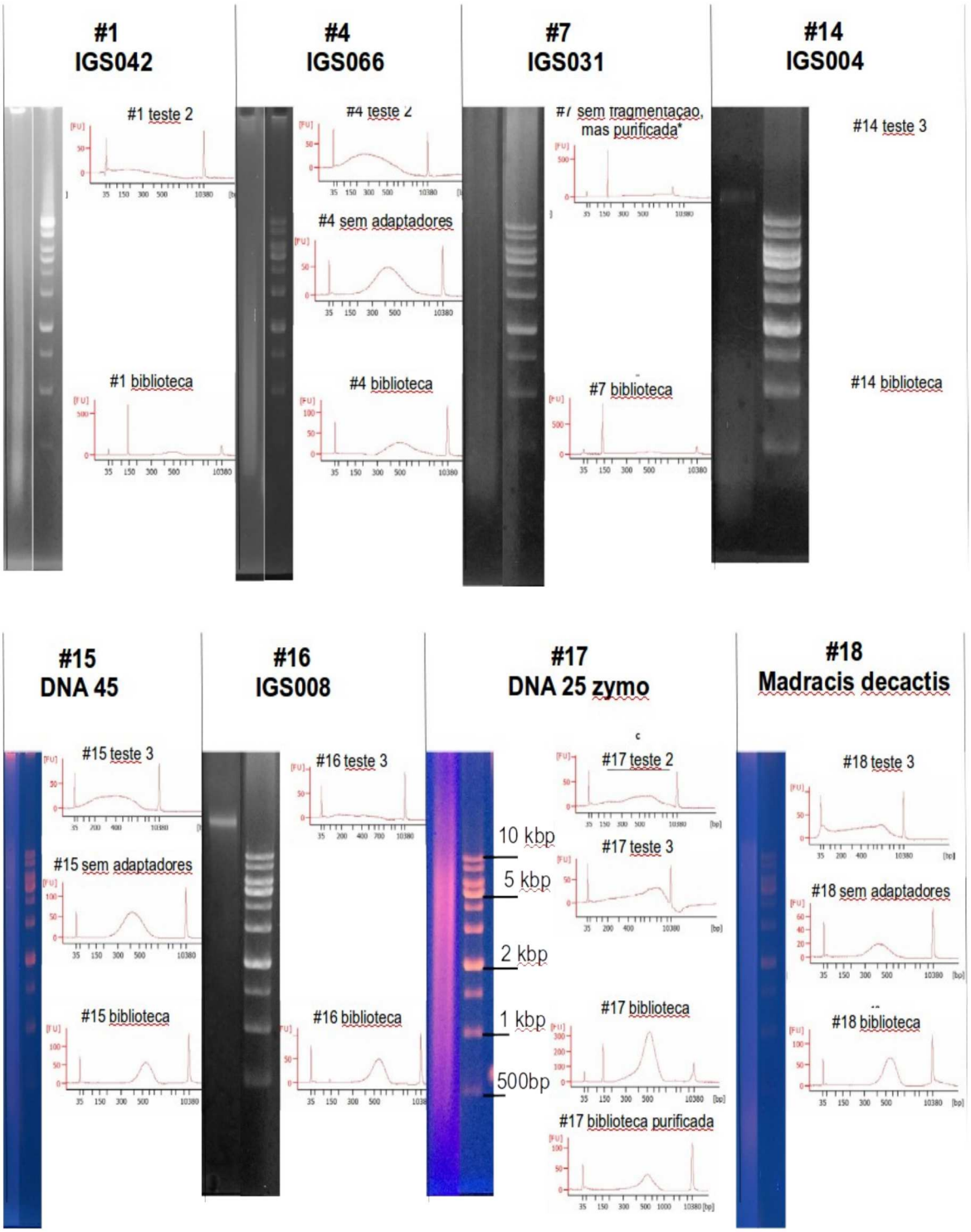

Figura 2.3.1.2 (cont.)

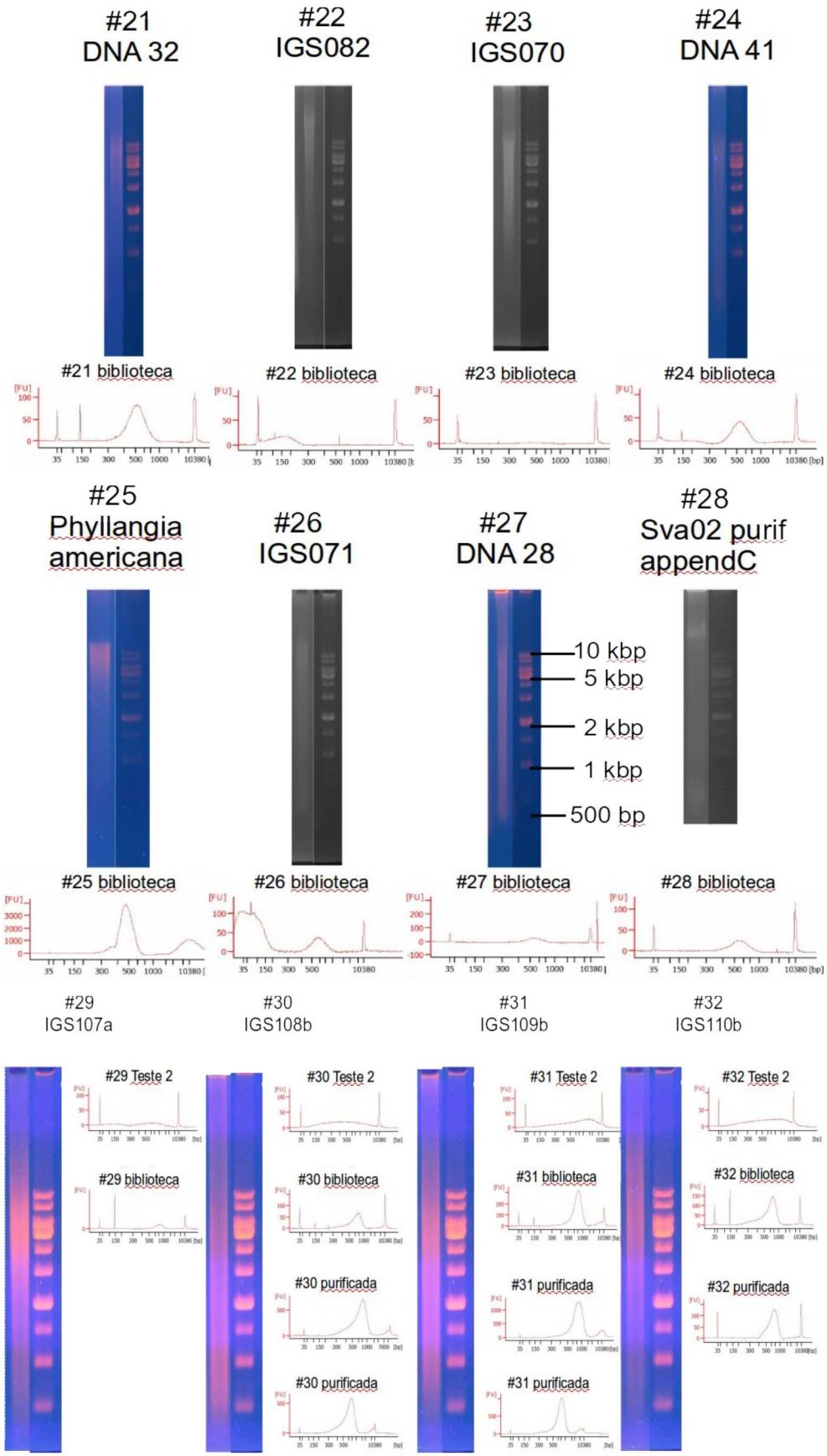

Figura 2.3.1.2 (cont.)

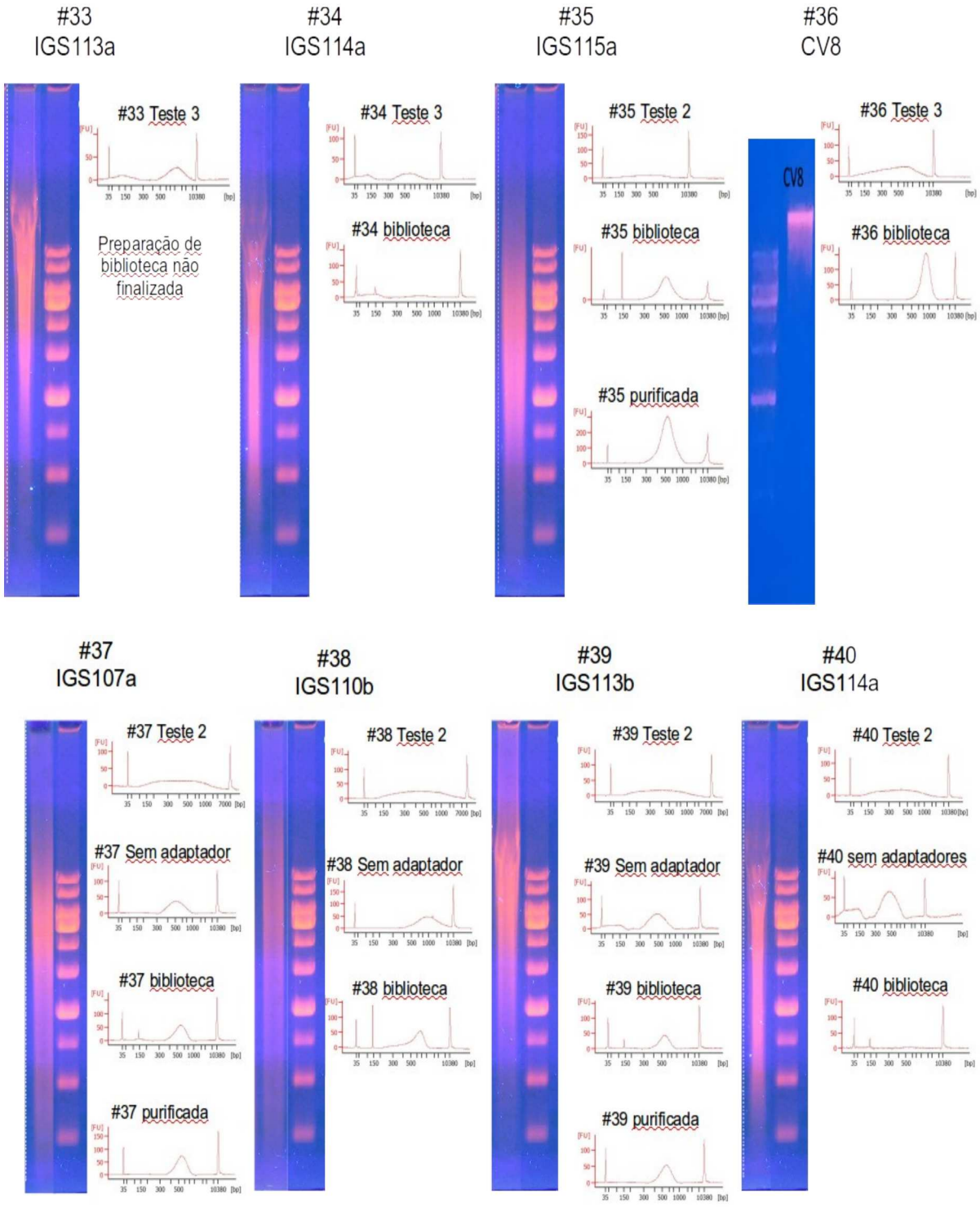

Figura 2.3.1.2 (cont.)

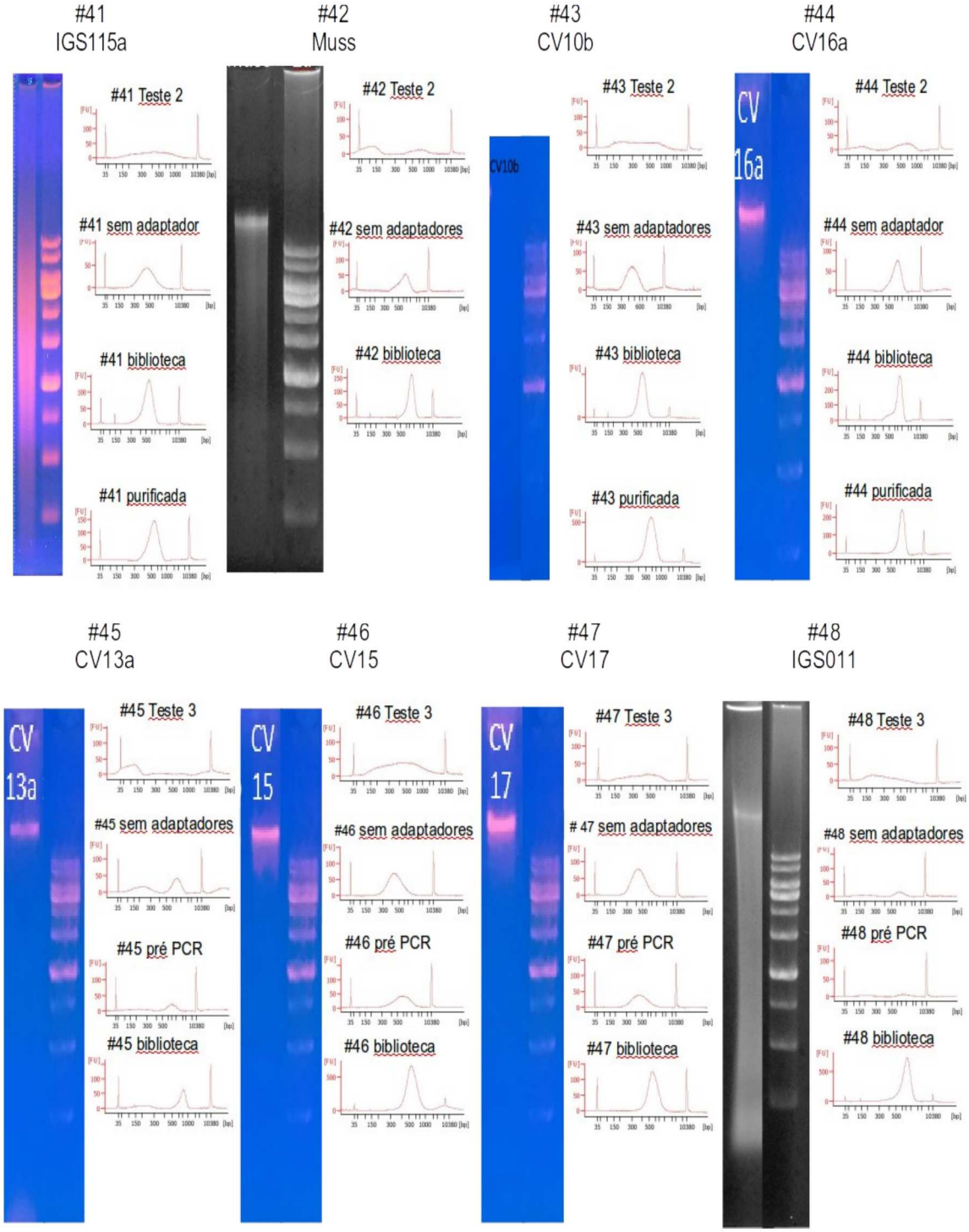

Figura 2.3.1.2 (cont.)

Tabela 2.3.1.5: Bibliotecas sequenciadas, espécies a que pertencem e número de "clusters" (por se tratar de sequenciamento "paired end", refere-se ao número de pares desses agrupamentos). "PF" ou "Passing Filter" refere-se aos "clusters" que passaram pelo filtro de qualidade do sequenciador; Q é uma escala que indica a probabilidade de um par de bases estar errado e varia entre 0 a 40 (Q30 indica probabilidade de 1/1000 de um par de base estar errado). "R1" e R2" correspondem aos componentes do par de reads (o sequenciamento foi do tipo paired-end), "Pares de reads pareados" indica quantos pares R1+R2 permaneceram após a filtragem, enquanto "Reads não pareados" indica o número de reads com qualidade e tamanho ideais mas cujos pares não passaram pela filtragem. As colunas "Q limite" indicam o valor mínimo de qualidade para os pares de bases serem considerados de boa qualidade e "Comprimento limite" indica o tamanho mínimo que um read deveria ter para ser mantido no conjunto de dados. "*" indica amostras que tiveram seu comprimento reduzido no programa SolexaQA++ e, não, no programa Trimmomatic.

Amostra	Biblioteca	Espécie	Corrida	Clusters PF	Pares de reads pareados	Reads não pareados R1	Reads não pareados R2	Q limite R1	Q limite R2	Comprimento limite (bp)
IGS050	2	*Anthemiphyllia patera costata*	NextSeq 2x75	15381889	10064279	4252436	5808	Q12	Q15	10
IGS050	2	*Anthemiphyllia patera costata*	MiSeq Nano 2x250	39923	14339	4899	108	Q20	Q20	30
IGS050	2	*Anthemiphyllia patera costata*	MiSeq 2x300	1260959	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
IGS031	7	*Trochocyathus caryophillioides*	NextSeq 2x75	9206234	3491543	3522721	20831	Q12	Q15	10
IGS031	7	*Trochocyathus caryophillioides*	MiSeq Nano 2x250	23435	4955	5359	154	Q20	Q20	30
IGS031	7	*Trochocyathus caryophillioides*	MiSeq 2x300	898962	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
IGS009purif	8	Coral X	NextSeq 2x75	17678555	11344683	5556924	24432	Q12	Q15	10
IGS009purif	8	Coral X	MiSeq Nano 2x250	74108	30718	5275	222	Q20	Q20	30
IGS009 purif	8	Coral X	MiSeq 2x300	1591826	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
IGS033purif	12	*Enallopsammia rostrata*	NextSeq 2x75	22045587	13675808	7408077	13659	Q12	Q15	10
IGS033purif	12	*Enallopsammia rostrata*	MiSeq Nano 2x250	89220	30399	12894	97	Q20	Q20	30
IGS033 purif	12	*Enallopsammia rostrata*	MiSeq 2x300	2461359	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
IGS036purif	13	*Lophelia pertusa*	NextSeq 2x75	19565021	12189464	6129749	10899	Q12	Q15	10
IGS036purif	13	*Lophelia pertusa*	MiSeq Nano 2x250	93332	31300	13974	148	Q20	Q20	30
DNA45	15	*Astrangia*	NextSeq 2x75	20955572	18996086	179	9227	Q12	Q12	10
DNA45	15	*Astrangia*	MiSeq Nano 2x250	163973	70199	9578	989	Q20	Q20	30
IGS008	16	*Caryophyllia*	NextSeq 2x75	12582435	6837685	4330962	3109	Q12	Q15	10
IGS008	16	*Caryophyllia*	MiSeq Nano 2x250	36628	13342	4393	237	Q20	Q20	30
IGS008	16	*Caryophyllia*	MiSeq 2x300	1540118	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
DNA25zymo	17	*Truncatoflabellum virgintifarium*	NextSeq 2x75	19342264	16926814	324	50942	Q12	Q12	10
DNA25zymo	17	*Truncatoflabellum virgintifarium*	MiSeq Nano 2x250	79868	32707	5958	335	Q20	Q20	30
DNA 25 zymo	17	*Truncatoflabellum virgintifarium*	MiSeq 2x300	2364067	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Mdecactis	18	*Madracis decactis*	NextSeq 2x75	20672035	13511118	6380128	5257	Q12	Q15	10
Mdecactis	18	*Madracis decactis*	MiSeq Nano 2x250	164089	72023	7725	1028	Q20	Q20	30

Tabela 2.3.1.5 (cont.):

Amostra	Biblioteca	Espécie	Corrida	Clusters PF	Pares de reads pareados	Reads não pareados R1	Reads não pareados R2	Q limite R1	Q limite R2	Comprimento limite (bp)
DNA32	21	*Anthemiphyllia dentata*	NextSeq 2x75	16753312	13193627	N.A.	N.A.	Q12	Q12	30
DNA32	21	*Anthemiphyllia dentata*	MiSeq Nano 2x250	53172	19265	6624	264	Q20	Q20	30
DNA 32	21	*Anthemiphyllia dentata*	MiSeq 2x300	1350107	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
DNA41	24	*Letepsammia superstes*	NextSeq 2x75	13292260	5133140	N.A.	N.A.	Q12	Q15	10
DNA41	24	*Letepsammia superstes*	MiSeq Nano 2x250	60261	16597	N.A.	N.A.	Q20	Q20	30*
DNA 41	24	*Letepsammia superstes*	MiSeq 2x300	1518601	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
PhyII	25	*Phyllangia americana*	NextSeq 2x75	19802343	19327800	675	1465	Q12	Q12	10
PhyII	25	*Phyllangia americana*	MiSeq Nano 2x250	96510	44877	2002	675	Q20	Q20	30
IGS071	26	*Porites branneri*	NextSeq 2x75	21695351	20766815	608	6485	Q12	Q12	10
IGS071	26	*Porites branneri*	MiSeq Nano 2x250	132646	60883	3774	828	Q20	Q20	30
DNA28	27	*Rhombopsammia niphada*	NextSeq 2x75	14955209	12286910	N.A.	N.A.	Q10	Q10	30
DNA28	27	*Rhombopsammia niphada*	MiSeq Nano 2x250	86102	32446	N.A.	N.A.	Q20	Q20	30*
DNA 28	27	*Rhombopsammia niphada*	MiSeq 2x300	2802817	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Sva02purif	28	*Solenosmilia variabilis*	NextSeq 2x75	12304052	5255722	4815518	3598	Q12	Q15	10
Sva02purif	28	*Solenosmilia variabilis*	MiSeq Nano 2x250	52778	16208	9337	311	Q20	Q20	30
IGS108b	30	Caryophyllidae gen nov	MiSeq 2x300	2968592	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
IGS109b	31	*Cyathotrochus pileus*	MiSeq 2x300	2546333	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
IGS110b	32	*Dendrophyllia* sp *(46)*	MiSeq 2x300	2917490	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
CV8	36	*Stephanocoenia*	MiSeq 2x300	2390986	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Muss	42	*Mussismilia branqueada*	MiSeq 2x300	1757980	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
CV16a	44	*Mussismilia braziliensis*	MiSeq 2x300	1757744	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
CV13a	45	*Mussismilia hartii*	MiSeq 2x300	1699611	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
IGS011	48	*Paracyathus*	MiSeq 2x300	2636328	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.

2.3.2 Testes de enriquecimento de mitocôndrias

Das metodologias até então comparadas durante os testes de enriquecimento de DNA mitocondrial, miniprep parece ser o único a aumentar a proporção de DNA mitocondrial em relação a amostras que não tiveram suas fases separadas (marcador *cox2*, Figura 2.3.2.1). Embora françoso já tenha sido extraída, ainda não foi totalmente validada via PCR, uma vez que a amplificação realizada com essas amostras não teve concentrações iniciais padronizadas (dados não mostrados). Desse modo, não foi possível comparar concentrações relativas de DNA mitocondrial.

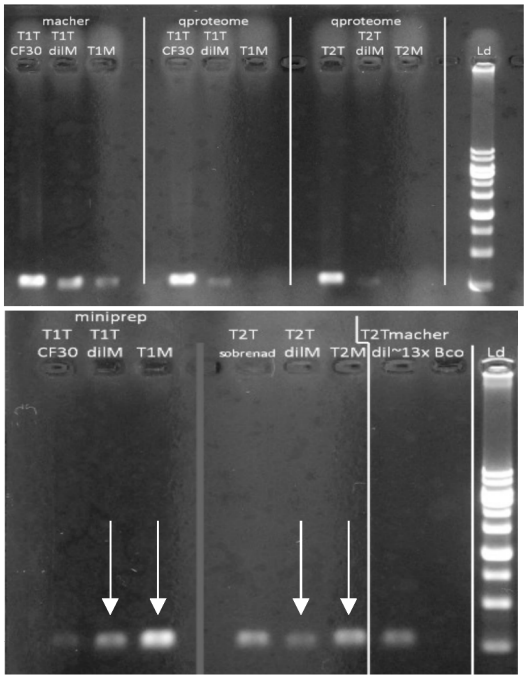

Figura 2.3.2.1: Validação dos testes de enriquecimento em amostras de *Tubastraea* com o marcador *cox2* para as metodologias macher e qproteome (A) e miniprep (B). Amostras "dilM" estão na mesma concentração das amostras "M" ao lado delas (e.g. T1TdilM tem concentração igual a T1M). Amostras "CF30" estão diluídas a 30 ng/uL, "T2Tmacher dil ~13x" é um controle positivo, "Bco" refere-se ao branco da PCR e "Ld", aos padrões de peso molecular (a banda inferior tem 500 bp e a superior 10 kbp). As setas mostram as bandas referentes à metodologia miniprep apresentando maior intensidade na amostra enriquecida ("M") do que no controle ("T").

Quanto à tentativa de amplificação de *Aiptasia* (*cox2* Anthozoa; Tabela 2.2.2.2), o uso de 30 ciclos resultou em intensidades iguais para todas as amostras (Figura 2.3.2.2a) e a PCR com 22 ciclos não funcionou (Figura 2.3.2.2b). Para as amostras de *Cassiopea* (CT e CM macher), foram testados os iniciadores de *Aiptasia* (COII0a e COII1r; Tabela 2.2.2.2), inclusive com um teste de gradiente (dados não mostrados), mas não foi possível amplificá-las.

Os outros dois marcadores testados para Scleractinia, 28S rDNA e *nad5*, foram amplificados com sucesso para duas amostras previamente extraídas (controles positivos),

mas não para as amostras dos testes de enriquecimento. Em adição, foram realizados testes de amplificação com outra polimerase (*PuRe Taq ready-to-go PCR beads*, GE Healthcare Life Sciences), mas também sem sucesso.

Um par de amostras controle e enriquecida foi sequenciado em conjunto com mais seis bibliotecas em uma corrida realizada em um sequenciador MiSeq (Illumina) com kit de reagentes v3 600 ciclos e configuração 2x300 bp. Isso permitirá a comparação da quantidade de *reads* nucleares e mitocondriais nas amostras de forma mais precisa e acurada (e.g. Macher et al., 2017).

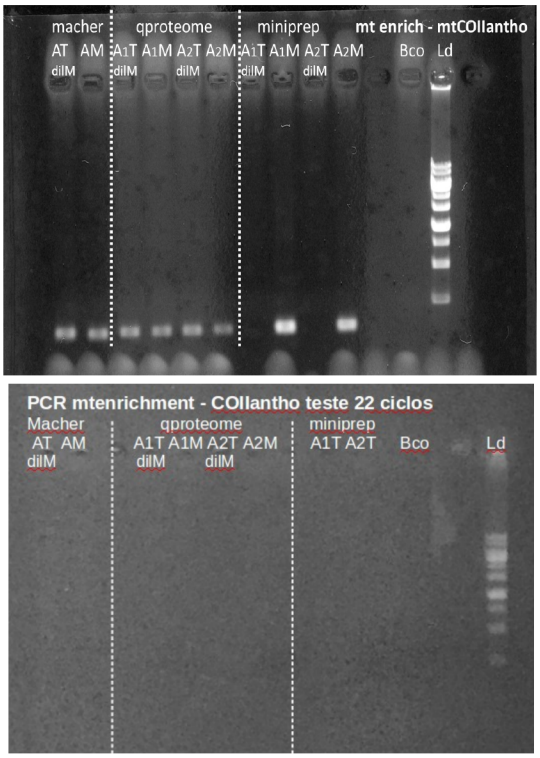

Figura 2.3.2.2: Validação dos testes de enriquecimento em amostras de *Aiptasia* com o marcador *cox1* para as metodologias macher, qproteome e miniprep com 30 ciclos (a, acima) e 22 ciclos (b, abaixo). Amostras "dilM" estão na mesma concentração das amostras "M" ao lado delas (e.g. ATdilM tem concentração igual a AM). "Bco" refere-se ao branco da PCR e "Ld", ao padrão de peso molecular (a banda inferior tem 500 bp e a superior 10 kbp).

2.3.3 Teste de separação de Symbiodiniaceae

Nos primeiros dois testes, foi utilizada incubação em NaOH como forma de retirar o tecido e os simbiontes. Contudo, o DNA de espécimes recentemente coletados não apresentou DNA tão íntegro quanto esperado (Figura 2.3.3.1). Com isso, foi feito um terceiro teste, no qual algumas amostras foram incubadas em TE (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA pH 7.4) em vez de NaOH.

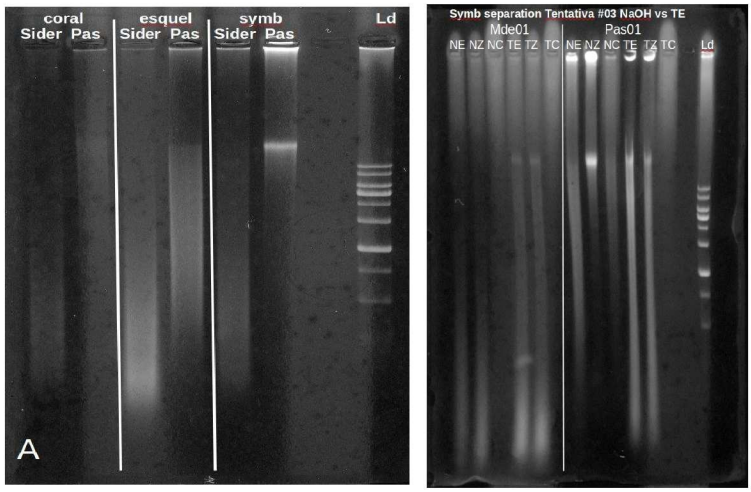

Figura 2.3.3.1: Eletroforese das extrações de DNA dos testes de separação de Symbiodiniaceae, tentativas 1 (à esquerda) e 3 (à direita). "Sider" refere-se a *Siderastrea* sp, "Pas" ou "Pas01" a *Porites astreoides* e "Mde" a *Madracis decactis*. "E" ou "esquel" representa extrações do fragmento de coral, "Z" ou "symb", a fração que deveria conter os simbiontes (precipitado) e "C" ou "coral", o sobrenadante da etapa de centrifugação. Em B, "T" refere-se à incubação com TE e "N" à com NaOH. "Ld" é o peso molecular, cuja banda menor indica 500 bp e a maior, 10 kbp.

Porites astreoides parece ter mais DNA mitocondrial em "coral" do que em "symb" na 1ª tentativa (Figura 2.3.3.2a), enquanto *Siderastraea* sp. apresentou padrão oposto. Contudo, o mesmo pode ser observado para ITS2 de Symbiodiniaceae, indicando que as diferenças observadas podem representar um erro no ajuste da concentração das amostras. Na 3ª tentativa, ambas as espécies apresentaram banda de DNA íntegro para os tubos "symb" e "esquel" em TE. Para NaOH, apenas o tubo "symb" de *Porites* apresentou banda evidente de DNA íntegro. Quanto à validação dessa tentativa (Figura 2.3.3.2b), não houve diferenças evidentes de intensidade nas bandas. Além disso, as PCRs de ITS2 zooxantela em *Madracis decactis* "coral" e todas as PCRs do marcador mitocondrial não funcionaram para essa espécie. Talvez *Porites astreoides* apresente enriquecimento de DNA mitocondrial no tubo "coral" com NaOH, mas trata-se de uma diferença sutil de intensidade (Figura 2.3.3.2b). Como apresentou DNA degradado como a tentativa 1, a tentativa 2 não foi amplificada.

Pela observação das amostras em microscópio óptico, a quantidade de zooxantelas não apresentou diferenças evidentes entre os tubos "coral", "symb" e "esquel". Um detalhe curioso foi o fato das zooxantelas referentes às amostras tratadas com NaOH se apresentarem verdes, enquanto as com TE foram observadas amareladas.

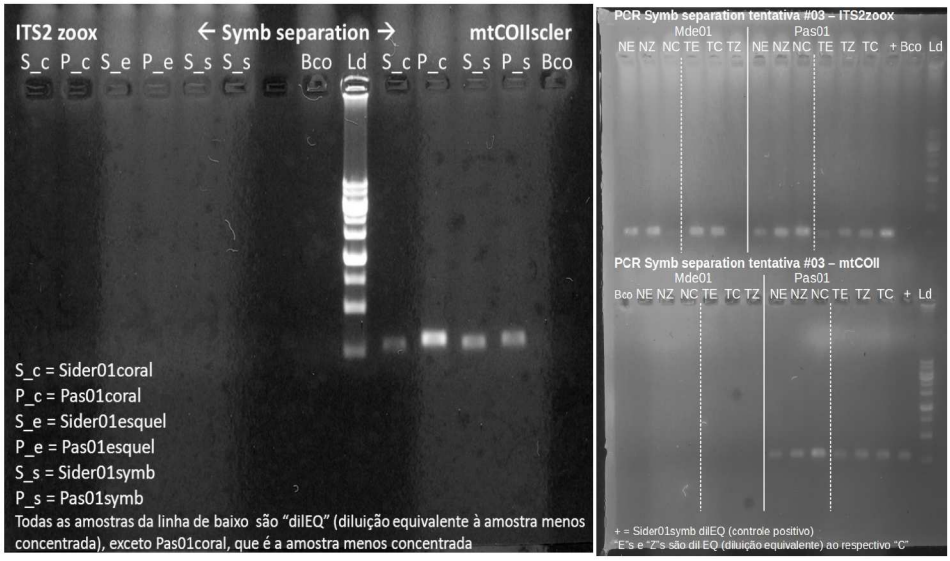

Figura 2.3.3.2: Eletroforese das PCRs dos testes de separação de Symbiodiniaceae, tentativas 1 (à esquerda) e 3 (à direita), sendo "mtCOIIscler" referente ao marcador mitocondrial e "ITS2 zoox" ao do simbionte. "Sider01" refere-se a *Siderastrea* sp, "Pas01" a *Porites astreoides* e "Mde01" a *Madracis decactis*. "E" ou "esquel" representa extrações do fragmento de coral, "Z" ou "symb", a fração que deveria conter os simbiontes (precipitado) e "C" ou "coral", o sobrenadante da etapa de centrifugação. Em B, "T" refere-se à incubação com TE e "N" à com NaOH. "Ld" é o peso molecular, cuja banda menor indica 500 bp e a maior, 10 kbp, "Bco" indica o branco de cada PCR e "+", um controle positivo.

2.4 DISCUSSÃO

2.4.1 Extração de DNA, montagem de bibliotecas e sequenciamento

Os fatores associados às dificuldades da preparação de bibliotecas com o *SureSelect QXT Whole Genome library preparation kit* podem ter sido a pureza e o conteúdo GC das amostras, já que corais escleractíneos apresentam conteúdo GC entre 30 e 40% em seu genoma nuclear (Voolstra et al., 2017) e mitocondrial (Kitahara et al., 2014) e os protocolos Nextera (Illumina) igualmente usam fragmentação enzimática do DNA e apresentam baixa eficiência em amostras impuras e com conteúdo GC baixo (<20%; Lamble et al., 2013).

Quanto à massa inicial de 100 ng ter desempenho melhor do que a de 200 ng no protocolo de preparação de bibliotecas, uma possível explicação seria todas as reações do protocolo serem otimizadas para 100 ng de massa inicial. Tanto reações enzimáticas (e.g. PCR e ligação de adaptadores), quanto purificações com esferas magnéticas, têm eficiência dependente da relação entre a quantidade de substrato (DNA) e de enzima (Robinson, 2015) ou esferas (Beckman Coulter, 2012). No que tange enzimas, uma redução na sua concentração tem aumento proporcional na velocidade da reação (Robinson, 2015). Uma possibilidade ainda não testada seria o aumento da duração das

reações enzimáticas, uma vez que, mesmo com menor concentração de substrato, quanto maior a duração da reação, mais substrato é consumido (Robinson, 2015).

O aumento no número de ciclos da reação de PCR durante a preparação de biblioteca pode auxiliar na identificação da origem dos picos presentes nas amostras. Curiosamente, exceto na biblioteca #7, os picos não estavam presentes logo antes da PCR (Figura 2.3.1.2; Tabela 2.3.1.4), quando as amostras já estavam ligadas aos adaptadores. Desse modo, é mais provável que se trate de dímeros formados por iniciadores, ainda que esses dímeros sejam caracterizados por tamanho de ~100 bp (Illumina comunicação pessoal), mais distante do tamanho observado (~140 bp) do que os dímeros de iniciadores (~120 bp; Illumina, 2015). O fato de os picos serem formados por iniciadores poderia também explicar porque o aumento no número de ciclos da PCR funcionou, estando ou não acompanhada da diluição dos adaptadores.

A quantidade de agrupamentos inferior às demais observada na biblioteca #4 pode indicar que nem todos os fragmentos possuíam adaptadores ligados a eles, já que todas as bibliotecas foram normalizadas para uma mesma molaridade antes de sua combinação para sequenciamento. O fato de essa biblioteca ter sido a única que não passou pela etapa de amplificação indica que a amplificação não é imprescindível, mas pode aumentar a proporção de fragmentos ligados a adaptadores (Quail et al., 2008). Caso seja necessário sequenciar bibliotecas futuras sem amplificação, sua molaridade deve ser calculada com base em métodos de quantificação que identifiquem a ligação dos adaptadores aos fragmentos (e.g. PCR em tempo real; Quail et al., 2008).

Embora as modificações mencionadas possam não ter sido eficientes em todas as amostras nas quais foram testadas, elas permitiram esclarecer alguns fatos a respeito dessas amostras. Primeiramente, amostras íntegras apresentam maior probabilidade de sucesso, mas essa integridade não necessariamente significa uma banda clara de DNA acima de 10 kbp, e, sim, apenas uma maior concentração de DNA acima de 10 kbp (Figura 2.3.1.2). Além disso, caso sejam utilizados os parâmetros de fragmentação do teste 2, distribuição aproximadamente uniforme do DNA entre 1 kbp e 10 kbp. Em segundo lugar, percebe-se que, para esse conjunto de amostras, o melhor número de ciclos na reação de PCR parece ser 12, mas é possível sequenciar bibliotecas sem amplificá-las, sendo altamente recomendada, nesse caso, a quantificação por PCR em tempo real. Ainda é necessário esclarecer, por meio de testes estatísticos, se as modificações feitas têm impacto significativo no sucesso da preparação de bibliotecas, mas o uso de todas as

bibliotecas sequenciadas poderá auxiliar nesse sentido, aumentando o N amostral. Considerando que mesmo amostras com razões de pureza inicialmente tidas como não ideais foram sequenciadas com sucesso e que DNA menos degradado parece estar mais adequado aos protocolos de fragmentação disponíveis (Teste 2 e Teste 3), a prioridade do presente estudo, em certo momento, passou a ser a integridade do DNA em vez de sua pureza. Para tal, o kit *DNeasy* (Qiagen) passou a ser utilizado no lugar do kit *Puregene* e essa abordagem foi aplicada às amostras correspondentes às bibliotecas #29 a #48, acima mencionadas. Foram realizadas novas tentativas com amostras degradadas ou cuja pureza ou concentração não era ótima e esses dados serão futuramente incluídos aos já apresentados.

2.4.2 Testes de enriquecimento de mitocôndrias

Dentre os protocolos testados, miniprep foi o único bem sucedido. Uma possível explicação poderia estar associada ao uso de purificação por coluna (ver manual do *QIAprep miniprep kit*, Qiagen) em vez de apenas centrifugações e reagentes com diferentes propriedades (Françoso et al., 2015; Macher et al., 2017; manual do *Qproteome mitochondria isolation kit*). Comparando as extrações do presente estudo, foi possível notar que um protocolo de extração de DNA por coluna (*Qiagen DNeasy kit)* produziu DNA mais íntegro do que um protocolo de extração salina (*Qiagen Puregene kit*), o que poderia indicar que a coluna tende a ser menos danosa à estrutura do DNA. Além disso, há indicativos de que a presença de fragmentos de esqueleto carbonático do coral tenha efeito negativo no protocolo macher (Dr Jan Macher, comunicação pessoal) e esses fragmentos poderiam também prejudicar a eficiência de qproteome, protocolo de isolamento da mitocôndria inteira (ver manual do *Qproteome mitochondria isolation kit*, Qiagen), rompendo a membrana da organela em processo similar ao de esferas de vidro em protocolos de lise celular bacteriana (Ramanan et al., 2008). Portanto, testes futuros devem ser feitos minimizando a quantidade de esqueleto associada ao tecido.

Um ponto relevante quanto aos testes de enriquecimento de mitocôndria é a necessidade de quantidade de tecido possivelmente superior à disponível. As amostras "mitocondriais" apresentaram concentração de DNA na mesma ordem de grandeza (próxima de ou inferior a 10 ng/uL) em todos os protocolos. Considerando que a massa de DNA foi insuficiente para a preparação de biblioteca, é possível que seja necessária maior quantidade de tecido para que amostras enriquecidas possam ser sequenciadas, o que pode

ser um fator limitante no caso de espécies de difícil coleta e/ou tamanho reduzido (e.g. corais de mar profundo). Além disso, a montagem de mitogenomas de Cnidaria a partir de dados de sequenciamento de genoma completo (WGS, "Whole Genome Sequencing"; e.g. Celis et al., 2016; Emblem et al., 2012) tem sido bem sucedida. No presente estudo (capítulos 3 e 4), foi possível obter mitogenomas completos da maioria das amostras unindo oito bibliotecas por corrida no sequenciador MiSeq (Illumina) ou 50 em um sequenciador HiSeq (Illumina). Em outros trabalhos, já foram reportados valores de cobertura excessivamente alta nesse tipo de sequenciamentos (1400x e 21000x para *D. pertusum*; Emblem et al., 2012) ou entre 10 e 40 vezes maior do que a cobertura do genoma nuclear (em anêmonas; Bellis et al., 2016). Isso reforça que é possível combinar mais de uma amostra em uma mesma corrida de sequenciamento e obter mitogenomas com sucesso. Por esse motivo, os sequenciamentos do presente estudo incluíram não amostras enriquecidas, mas, sim, DNA total extraído diretamente das amostras de coral e puderam ser conduzidos mesmo sem um resultado definitivo dos experimentos de enriquecimento.

2.4.3 Teste de separação de Symbiodiniaceae

Dentre as causas que poderiam levar a um não funcionamento do protocolo, o rompimento de células de Symbiodiniaceae por abrasão poderia ser uma delas. Há protocolos para lise celular de bactérias por abrasão com esferas de vidro e homogeneização em vortex (e.g. Ramanan et al., 2008) e era recorrente a presença de pedaços de esqueleto em suspensão ou depositados no fundo (observação pessoal). Desse modo, é possível que esses fragmentos tenham rompido células de Symbiodiniaceae, fazendo com que a centrifugação não fosse suficiente para retirar o DNA do simbionte do sobrenadante.

É importante mencionar que *Porites branneri*, coral zooxantelado, teve seu genoma mitocondrial montado com cobertura média maior que *D. pertusum*, coral azooxantelado (dados não mostrados). Com isso, embora a separação de zooxantelas possa aumentar a cobertura e consequentemente a quantidade de amostras que podem ser sequenciadas em uma mesma corrida, os sequenciamentos de espécies zooxanteladas foram conduzidos mesmo sem o sucesso do enriquecimento.

3 CAPÍTULO 3: MITOGENOMAS DE MICRABACIIDAE

Title: Do Basal corals exist? Micrabaciidae (Cnidaria: Anthozoa: Hexacorallia: Scleractinia) may have the answer

Authors: Seiblitz, I.G.L., Capel, K. C. C., Stolarski, J.; Quek, Z. B. R., Huang, D., Kitahara, M. V.

Submit to: Genome Biology and Evolution

Max 10 000 words except references (including acknowledgements and captions but excluding abstract, currently 2127 words)

3.1 ABSTRACT

(250 words max, currently 236 words)

Evolutionary reconstructions of scleractinian corals frequently have a much smaller proportion of azooxanthellate deep-sea than zooxanthellate reef-building coral species. In terms of genomic data, the earliest diverging lineage, which includes micrabaciids and gardineriids, remains poorly explored if compared to "Robust" and "Complex" corals. In addition, the lack of data from corals other than reef building species seems to be a stumbling block of a broader understanding of scleractinian evolutionary history. Therefore, based on complete mitochondrial genomes, here we improve the knowledge on the evolutionary history of the earliest diverging lineages of scleractinian corals. Determined using Illumina platform or Sanger sequencing, the complete mitochondrial genomes from *Letepsammia formosissima*, *Letepsammia franki, Letepsammia superstes,* and *Rhombopsammia niphada* range in size from 19048 to 19542 bp and have gene content and order similar to that from the majority of scleractinian corals. Using corallimorpharians as outgroup, scleractinian phylogenetic inferences containing all mitochondrial genes confirm the monophyly of and recovered the family Micrabaciidae as a sister group to Gardineriidae+Complex+Robust clades. Such topology not only corroborates the hypothesis of a solitary and azooxanthellate ancestor for the order, but also agrees with the unique skeletal microstructure previously found in the family. Moreover, the early diverging position of micrabaciids followed by gardineriids reconciliate the *kilbuchophyllids* previously thought macromorphological discrepancies to those families (septal insertion pattern as in micrabaciids and well-developed theca as in gardineriids) and ultimately points towards a Middle Ordovician origin for the order.

3.2 INTRODUCTION

Belonging to the phylum Cnidaria, the order Scleractinia can be divided into two ecological groups comprising about the same number of extant representatives (Cairns, 2007): the zooxanthellate corals that establish a symbiotic relationship with dinoflagellates of the family Symbiodiniaceae (Trench, 1993; LaJeunesse et al., 2018); and those that do not display such symbiosis an are denominated azooxanthellate corals. The monophyly of this order has been in debate for approximately a decade, since the order Corallimorpharia has been recovered as a clade inside Scleractinia ("naked coral" hypothesis; Medina et al., 2006). Nevertheless, such hypothesis was shown to be an artifact of the use of amino acid sequences in phylogenetic analyses (Kitahara et al., 2014). In addition, the evolutionary history of the order has also attracted great attention since the "molecular revolution", which challenged the long established morphological systematics especially from the higher taxonomical ranks.

Previously, the order Scleractinia was morphologically divided into five suborders (Vaughan and Wells, 1943) while molecular data pointed to three clades: "Basal"; "Complex"; and "Robust" (Romano and Palumbi, 1996; Fukami et al., 2008; Kitahara et al., 2010a; Kitahara et al., 2014; Stolarski et al., 2011). In this sense, the "Basal" clade was the first to diverge around 425 million years ago (mya; Stolarski et al., 2011) and is formed by the azooxanthellate families Micrabaciidae and Gardineriidae (Kitahara et al., 2010a; Stolarski et al., 2011). These families have been shown to have morphological similarities to fossils from the Ordovician (~460 mya; *Kilbuchophyllia*) in the case of Micrabaciidae and the Triassic (~230 mya; *Margarophyllia*) and Devonian (~380 mya; *Ptychophyllum* [representing rugose corals]) in the case of *Gardineria* (Stolarski et al., 2011). Micrabaciids are characterized by having free-living, solitary polyps that display a unique porous type of skeletal wall and microstructure (Janiszewska et al., 2011; 2013), and nowadays are reported from 15 to over 1000 m depth (Squires, 1967; Cairns, 2009). It is suggested that first micrabaciids lived in shallow-waters and there was a trend towards skeleton lightening as their occurrence depth increased (Squires, 1967). Moreover, this feature seems to have appeared in association to mobility in shallow-waters and pre-adapted these organisms to deep-sea calcium-limited conditions (Owens, 1984). However, up to date, the testing of micrabaciids evolutionary position has been limited to data from a few partial genes (*cox1*, 16S and 28S).

Scleractinian mitogenomes have peculiar features, such as few transfer RNA genes

(trnW, which is duplicated in *Seriatopora* and *Stylophora*, and trnM; Chen et al., 2008a; Chen et al., 2008b; Kitahara et al., 2014; Lin et al., 2014) as well as the occurrence of introns in two genes. In *nad5*, this feature is present in all scleractinians (Addamo et al., 2016; Medina et al., 2006; Lin et al., 2014), while the *cox1* intron is absent in some species and seems to have been regained at least five times in the "Robust" clade (Chuang et at., 2017; Celis et al., 2017). Regarding gene order, a pattern seems to be shared among the majority of species (Lin et al, 2014), except *Madrepora* (Lin et al., 2012a; Lin et al, 2014) and *Desmophyllum* (Emblem et al., 2011; Flot et al., 2013; Addamo et al., 2016; Lin et al, 2014; Figure 3.1). Moreover, in terms of evolutionary rate, mitochondrial genomes of anthozoans are considered slow in comparison to other metazoans (Huang et al., 2008; Shearer et al., 2002), which enables it to be used as a marker to investigate relationships deeper than the level of species. At the same time, mitogenomes may be substitution saturated when used to study deeper levels of relationship inside Cnidaria (e.g. class level; Pratlong et al., 2017). For relationships inside orders of Cnidaria, these data have never been pointed out to be either too conserved or too saturated.

To date, the majority of data used in molecular phylogenies of Scleractinia is from reef building/zooxanthellate species, which prevent a broader understanding of scleractinian evolution (Kitahara et al., 2010a). Such pattern has been reproduced for genomic and transcriptomic data, with 64 mitogenomes and 46 nuclear genomes/transcriptomes from colonial, zooxanthellate and shallow-water species compared to 13 and five, respectively, from solitary, azooxanthellate or deep-sea species (mitochondrial data: search on Nucleotide database on January, 2019; NCBI, 2019; nuclear data: organism list at Reefgenomics.org database on July, 2019; Liew et al., 2016). Considering the three main Scleractinia clades, there are genomic data from both mitochondrial and nuclear DNA of "Robust" and "Complex" (e.g. Kitahara et al., 2014; Ying et al., 2018), but "Basal" remains with only one mitogenome sequenced (*Gardineria hawaiiensis*, Gardineriidae; Kitahara et al., 2014). Given the position of this clade within scleractinian evolutionary history, herein we refined the understanding of the relationships of these early diverging lineages determining the mitogenomes from four "Basal" clade representatives, which together shed light into the Early Paleozoic origin of the order.

3.3 MATERIAL AND METHODS

Specimens belonging to three species of family Micrabaciidae (*Letepsammia formosissima* (Moseley, 1876): IK-2012-3802; *L. superstes* (Ortmann, 1888): IK-2012-3754; and *Rhombopsammia niphada* Owens, 1986: IK-2012-3832) were obtained from the *Muséum national d'Histoire naturelle*, Paris. Genomic DNA extraction was performed using Dneasy Blood and Tissue kit (Qiagen). Libraries for Next Generation Sequencing (NGS) were prepared using TruSeq DNA Nano library preparation kit (Illumina). Since DNA from *R. niphada* was particularly degraded, Covaris shearing parameters were changed (duty cycle: 5%; duration: 70 s) for this sample according to manufacturer suggestions. Moreover, in order to avoid adapter dimer formation, adapters were diluted (3x) and the number of cycles at the PCR step was set to 12 cycles, following Illumina recommendation. Library concentration was quantified on a Qubit fluorimeter and size distribution was assessed on a Bioanalyzer (Agilent). These samples were pooled with other libraries and sequenced on a MiSeq v3 2x300 bp run. In the case of *L. superstes* and *R. niphada*, they were also included on a NextSeq v2 High Output 2x75 bp pooled run . Illumina sequencing was performed at the Genome Investigation and Analysis Laboratory in CEFAP-USP (Centro de Facilidades para a Pesquisa da Universidade de São Paulo). Sequences were filtered for quality and size using Trimmomatic (Bolger et al., 2014) with default settings, followed by assembly with MITObim (Hahn et al., 2013) and annotation with MITOS2 (Bernt et al., 2013). Data from previous attempts to sequence Micrabaciidae mitogenomes by primer walking (primer sequences and PCR settings from Lin et al., 2011) were used to refine *R. niphada* and *L. formosissima* assemblies. In the case of *L. franki* (IK-2012-3748), the totality of data for this species were generated by Sanger sequencing followed by trimming and assembly in Sequencher (Gene Codes Corporation, 2017).

A selection of published mitogenomes was annotated on MITOS2 and nucleotide sequences for mitochondrial genes were aligned in MAFFT (Katoh et al., 2002) separately using default settings (MAFFT used LINSI algorithm in all cases). Alignments were tested for substitution saturation on DAMBE (Xia, 2018). Non-saturated regions were concatenated using catsequences (available at https://github.com/ChrisCreevey/catsequences). Phylogenetic reconstruction was carried out in RAxML (Stamatakis, 2014) running 1000 bootstrap replicates. Each gene was considered a partition and multiexon genes had a different partition assigned to each exon.

RAxML was run on the computer cluster from the National Supercomputing Centre, Singapore.

3.4 RESULTS

The three mitogenomes were assembled in one contig, all above 19 kbp (*R. niphada*: 19542 bp; *L. formosissima*: 19048 bp; *L. superstes*: 19073 bp), but *R. niphada* and *L. superstes* are circular while *L. formosissima* lacks part of 16S ribosomal gene. Sanger data from *L. franki* was assembled into five contigs with 18206 bp in total and the only completely absent gene was the trnW. Number, location and order of genes are similar to the pattern observed in the majority of scleractinian corals (13 protein coding genes, 2 ribosomal RNA genes and 2 transfer RNA genes; Figure 3.1).

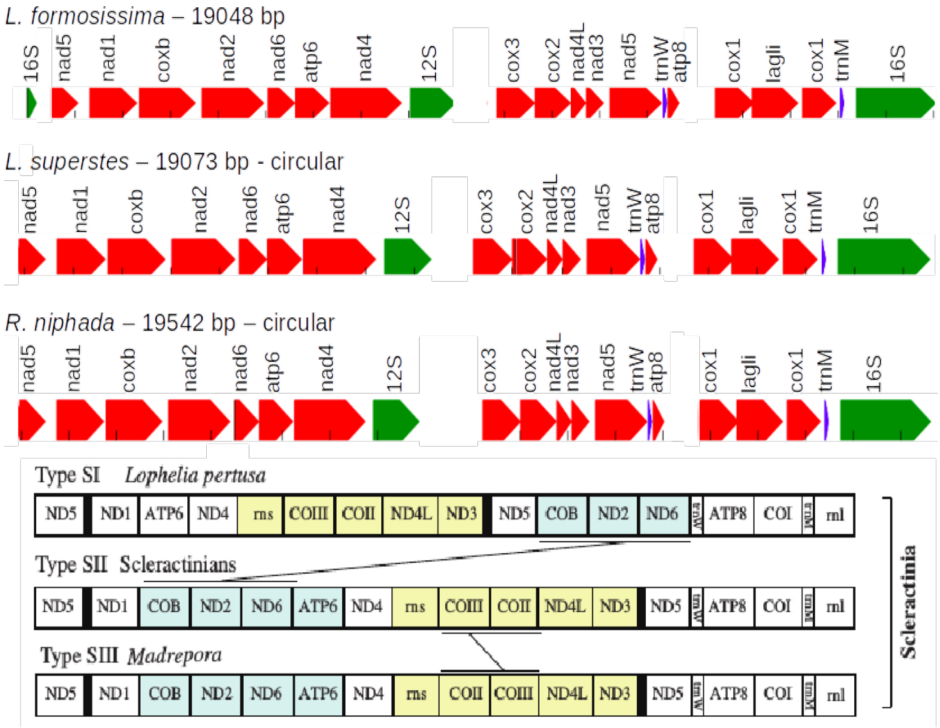

Figure 3.1: Micrabaciidae mitogenomes gene content, order and size compared to gene order patterns present in Scleractinia. Scleractinian gene order patterns were obtained from Addamo et al., 2016; Emblem et al., 2011; Flot et al., 2013; Lin et al., 2012a; Lin et al, 2014. Figure showing scleractinian gene patterns was modified from Lin et al., 2014.

Regarding the evolutionary reconstruction using mitogenome data (Figure 3.2), the family Micrabaciidae was recovered as monophyletic with high statistical support (100%), and placed as a sister to all other scleractinians (Gardineriidae+Robust+Complex) with moderate to high support (81%). Inside Micrabaciidae, genera were not clearly separated but this topology exhibited high support values.

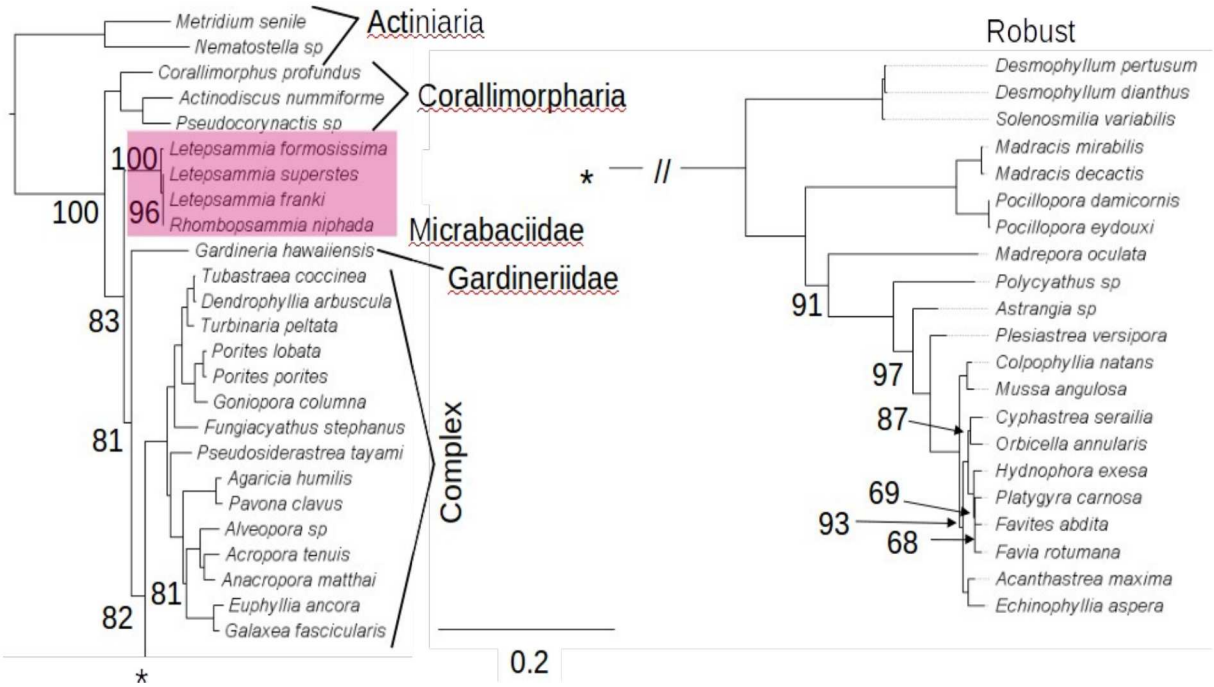

Figure 3.2: Partitioned phylogeny run on RaxML using GTR model with gamma distributionand 1000 bootstrap replicates. Support values are in percentage and the ones that are not shown are 100%.

3.5 DISCUSSION

The assembly of the mitogenome of *R. niphada* (Figure 3.1) indicates that this species has the longest Scleractinia mitogenome known to date, followed by two species of *Pseudosiderastrea* with 19475 bp (Chuang and Chen, 2016). It was expected that these micrabaciid mitogenomes would be longer than 19 kbp since *Gardineria hawaiiensis*' was 19429 bp long (Kitahara et al., 2014). In fact, the overall size of scleractinian mitogenomes appears to be shrinking in relation to their sister group (i.e. Corallimorpharia) and also within the order (i.e. "Robust" corals have 2-3 kbp shorter mitogenomes in relation to "Complex" corals). While octocorals seem to present a narrower range of variation in regards to mitogenome sizes (18 to 19,8 kbp; e.g. Brockman e McFadden, 2012; Hogan et al., 2019), hexacorals comprise a broader overall range. Actiniarian mitogenomes vary between 16 kbp and 20 kbp, which is close to Scleractinia (Beagley et al., 1998; Emblem et al., 2014), Antipatharia ranges from 18 kbp to 20 kbp (Brugler e France, 2007; Kayal et al., 2013; Sinniger e Pawlowski, 2009) and Zoantharia includes 20 kbp long mitogenomes, similar to Corallimorpharia (Chi e Johansen, 2017; Sinniger et al., 2007).

The recovered topology of the "Basal" lineages (Figure 3.2) has a pattern that does not match the previous phylogenies (Stolarski et al., 2011), separating micrabaciids and

gardineriids into two distinct lineages of which the formers appear to be older. Anatomical features in common among corallimorpharians and micrabaciids have already been observed, including the presence of a thick mesoglea (Hartog, 1980) and knobbed tentacles positioned around and above the corallite (Moseley, 1877). Moreover, Gardineriidae and Micrabaciidae have also been shown to have differences, such as the general appearance of their corallum, which is more robust in the former and more delicate in the latter (Stolarski et al., 2011), as well as unique features of each family. For example Micrabaciidae's skeleton and septa bifurcation pattern (Janiszewska et al., 2011; Stolarski et al., 2011) and the presence of a thick wall in Gardineriidae (Stolarski, 1996). It is important to mention that fossil record is likely to be incomplete, but an interesting observation is that fossils similar to Micrabaciids (*Kilbuchophyllia*) are older (Ordovician; ~460 mya) than those similar to Gardineriids (*Margarophyllia*, ~230 mya; *Ptychophyllum*, ~380 mya). Taken together, these considerations may reinforce that Micrabaciidae lineage could be independent from Gardineriidae and placed in the transition from corallimopharians to gardineriids and other scleractinians.

The topology obtained for genera inside Micrabaciidae may reinforce the observation made by Owens (1986) that *R. niphada* may be an intermediate species between *Rhombopsammia* and *Letepsammia*. She noticed that the number of septa in *R. niphada* (144) is closer to the number of septa in *L. formosissima* (120, but *L. formosissima* may attain 144 septa) than to that from *R. squiresi* (96). Although the closest species to *R. niphada* in our phylogeny is *L. franki*, it may still be a consequence of *R. niphada* not being completely separated from *Letepsammia*. Comparing this phylogeny with data from nuclear genes (e.g. 18S rDNA) and possibly adding other species of *Rhombopsammia* may help to clarify relationships inside Micrabaciidae.

In conclusion, our results indicate that first scleractinians were more similar to first micrabaciids rather than a common ancestor to Micrabaciidae and Gardineriidae. Future work includes estimating divergence times for these organisms using molecular clock techniques.

3.6 ACKNOWLEDGEMENTS

In this project, funds were received from FAPESP (São Paulo Research Foundation; Masters scholaship # 2017/11615-7 and Research Internship Abroad scholarship # 2018/19661-0, both associated to Young Investigator Award 2014/01332-0)

as well as from Capes (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel). Analyses took place at Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (Cebimar - USP) and support was also received from the Reef Ecology Laboratory (National University of Singapore), especially regarding computer power to run our phylogenetic tree in a cluster at the National Supercomputing Centre Singapore (NSCC). The authors would also like to thank the Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN, France) for borrowing us the specimens, as well as the Genome Investigation and Analysis Laboratory at Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa da Universidade de São Paulo (Genial CEFAP - USP), where library preparation and sequencing runs took place.

4 CAPÍTULO 4: MITOGENOMAS DE "COMPLEX" E "ROBUST"

Como mencionado na Introdução Geral, a taxonomia da ordem Scleractinia apresenta divergências grandes entre as famílias designadas a partir de dados morfológicos e as observadas com dados moleculares. Durante a última década, famílias de corais zooxantelados como a atual Faviidae têm passado por constantes revisões taxonômicas (Budd et al., 2012) e alguns gêneros zooxantelados passaram a designar famílias (e.g. Plesiastreidae; Dai e Horng, 2009, Benzoni et al., 2014). Contudo, apenas uma pequena proporção de marcadores moleculares tem sido utilizada, sendo que, na maioria das vezes, para esse tipo de análise, os mais utilizados foram *cox1*, *cob,* 16S e 28S (Benzoni et al., 2012; Fukami et al., 2008; Kitahara et al., 2010a; Romano e Cairns, 2000; Stolarski et al., 2011). Isso torna a geração de dados de mitogenoma uma forma interessante de se fornecer mais informações a futuras revisões taxonômicas. Com relação a corais azooxantelados, algumas famílias permanecem, ainda, polifiléticas, como Anthemiphylliidae e Caryophylliidae (Kitahara et al., 2010a; Stolarski et al., 2011; Kitahara et al., 2016). Nesse caso, além do uso recorrente dos mesmos marcadores, esses táxons tendem a apresentar uma menor quantidade de dados em comparação com outros grupos de corais zooxantelados, o que já foi apontado como um obstáculo à compreensão da história evolutiva de Scleractinia em Kitahara e colaboradores (2010a). Desse modo, o presente capítulo aumentará a quantidade de sequências de mitogenomas disponíveis para os grupos "Complex" e "Robust" e contrastará esse novo conjunto de dados com as informações obtidas anteriormente a respeito da evolução de Scleractinia.

4.1 OBJETIVOS

- Identificar, montar e descrever genomas mitocondriais de espécies de corais escleractíneos, especialmente de espécies azooxanteladas de mar profundo;
- Reconstruir as relações evolutivas entre as espécies dessa ordem.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Extração de DNA, montagem de bibliotecas e sequenciamento

Para o presente estudo, foram utilizadas amostras provenientes de coleções de diferentes instituições (Tabela 4.2.1.1), sendo elas: MNHN (*Muséum national d'histoire naturelle*, França), NIWA (*National Institute of Water and Atmospheric Research*, Nova

Zelândia), Cebimar-USP (Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo, Brasil) e NUS (*National University of Singapore,* Cingapura). Os passos envolvidos em sua análise serão detalhados a seguir.

4.2.2 Amostras sequenciadas na Universidade de São Paulo

Para extração de DNA genômico total, foram utilizados os protocolos *Gentra Puregene Tissue kit* (Qiagen) e *DNeasy Blood and Tissue kit* (Qiagen), sendo que o primeiro apresentou modificações especificadas no capítulo 2. Algumas amostras foram também purificadas após a extração de DNA conforme a metodologia detalhada no capítulo 2 (Tabela 4.2.1.1). Após a extração, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro de microvolumes (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific) e em fluorímetro (Qubit, Thermo Fisher Scientific) além de terem sua integridade avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% m/v com TAE 0,5X. As amostras foram coradas com o corante *Blue Juice* (Thermo Fisher Scientific) e observadas sob iluminação ultravioleta.

Para preparação das bibliotecas para NGS foi utilizado o *TruSeq DNA Nano kit* (Illumina) com modificações detalhadas no capítulo 2**,** seguido de sua quantificação com o *Qubit dsDNA HS Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific) em um fluorímetro Qubit v2.0 (Thermo Fisher Scientific) e a avaliação de sua distribuição de tamanho no Bioanalyzer (Agilent Technologies) utilizando *High Sensitivity DNA chips*. Exceto quando mencionado na Tabela 4.2.1.1, o protocolo de preparação de bibliotecas foi executado com adaptadores diluídos 3x, tendo como objetivo sequências inseridas de 350 bp (*insert size*) e com 12 ciclos na reação de PCR. Oito corridas de sequenciamento foram feitas: (1) corrida nano com um kit de 500 ciclos no sequenciador MiSeq (*paired-end*), sendo injetados 12 pM da combinação equimolar de 17 amostras no sequenciador e 10% da biblioteca controle PhiX; (2) corrida de 150 ciclos (*paired-end*) em um sequenciador NextSeq 500 com o kit *High Output* v2 150 ciclos e injetando 2 pM da combinação de 16 amostras e 5% de PhiX; (3) corrida destinada ao sequenciamento de amostras cujos mitogenomas não foram montados com sucesso a partir dos dados das corridas anteriores, em um sequenciador MiSeq com um kit v3 600 ciclos, injetando 12 pM da combinação equimolar de nove amostras e 5% de PhiX; (4 a 8) corridas em sequenciador MiSeq, com kit v3 600 ciclos (*paired-end*), injetando 12 pM da combinação equimolar de oito amostras (em uma delas,

Tabela 4.2.1.1: Amostras preparadas para sequenciamento na Universidade de São Paulo (USP) e na National University of Singapore (NUS) e informações sobre sua origem, extração de DNA, preparação de bibliotecas e sequenciamento. Quanto aos parâmetros de fragmentação, "Teste2" e "Teste3" referem-se ao ultrassonicador Covaris (ver capítulo 2) enquanto os parâmetros utilizados no sonicador Bioruptor são indicados por concentração do DNA; volume em uL; número de ciclos; duração. [1] indica bibliotecas cujos adaptadores não foram diluídos, [2] indica que o tamanho alvo do protocolo TruSeq DNA Nano seguido foi 550 bp, e, não 350 bp (outras amostras), [3] indica que a PCR do protocolo TruSeq DNA Nano foi feito com 8 ciclos. "Corridas" indica as corridas de sequenciamento nas quais as amostras foram incluídas, sendo que "Hi" refere-se à corrida de sequeciamento realizada pela empresa Macrogen; "Mi", às corridas MiSeq 2x300; "MiN", à realizada em modo nano 2x250; e "N", à corrida NextSeq 2x75, explicadas com maior grau de detalhamento no corpo da dissertação. Nenhuma amostra foi colocada em mais de uma corrida "Mi".

Espécie	Amostra	Local de sequen-ciamento	Instituição	Número de tombo ou local de coleta	Protocolo de extração de DNA	Parâmetros fragmentação do DNA	Corridas
Anthemiphyllia patera costata	IGS050	USP	MNHN	IK-2012-3773	Puregene	Nenhum [1 3]	N+ MiN+ Mi
Anthemiphyllia spinifera	IGS118	USP	MNHN	IK-2012-3769	Dneasy	Nenhum	Mi
Astrangia sp.	DNA45	USP	Coleção Cebimar-USP	Arquipélago de Alcatrazes	Dneasy	Teste 3 [1]	N+ MiN
Balanophyllia gigas	IGS107	USP	MNHN	IK-2012-3816	Dneasy	Teste 2	Mi
Bernardpora stutchburyi	REL029	NUS	Coleção REL-NUS	Cingapura	Customizado	10; 20; 3; 15 s on, 30 s off	HiSeq
Caryophyllia scobinosa	IGS119	USP	MNHN	IK-2012-3795	Dneasy	Nenhum	Mi
Caulastraea echinulata	REL077	NUS	Coleção REL-NUS	Cingapura	Customizado	10; 20; 3; 30 s on, 30 s off	Hi
Cladocora sp.	IGS009	USP	Coleção Cebimar-USP	Arquipélago de Alcatrazes	Puregene+ Zymo	Teste 3	N+ MiN+ Mi
Coelastrea aspera	REL122	NUS	Coleção REL-NUS	Cingapura	Customizado	10; 20; 3; 15 s on, 30 s off	Hi
Coscinaraea columna	REL160	NUS	Coleção REL-NUS	Cingapura	Dneasy	2; 72; 12; 30 s on, 30 s off	Hi
Cyathotrochus pileus	IGS109	USP	MNHN	IK-2012-3825	Dneasy	Teste 2 [1 2]	Mi
Cyphastrea chalcidicum	REL162	NUS	Coleção REL-NUS	Cingapura	Customizado	10; 20; 2; 15 s on, 30 s off	Hi
Dendrophyllia sp.	IGS110	USP	MNHN	IK-2012-3817	Dneasy	Teste 2 [1 2]	Mi
Diploastrea heliopora	REL418	NUS	Coleção REL-NUS	Cingapura	Dneasy	2; 72; 12; 30 s on, 30 s off	Hi
Dipsastraea maxima	REL242	NUS	Coleção REL-NUS	Cingapura	Dneasy	10; 20; 3; 30 s on, 30 s off	Hi
Dipsastraea mirabilis	REL378	NUS	Coleção REL-NUS	Cingapura	Customizado	10; 20; 3; 15 s on, 30 s off	Hi
Dipsastraea speciosa	REL141	NUS	Coleção REL-NUS	Cingapura	Customizado	10; 20; 3; 15 s on, 30 s off	Hi
Distolotrochus sp.	IGS108	USP	MNHN	IK-2012-3836	Dneasy	Teste 2 [1 2]	Mi
Echinopora gemmacea	REL243	NUS	Coleção REL-NUS	Cingapura	Customizado	10; 20; 3; 15 s on, 30 s off	Hi
Echinopora horrida	REL072	NUS	Coleção REL-NUS	Cingapura	Dneasy	2; 72; 12; 30 s on, 30 s off	Hi

Tabela 4.2.1.1 (cont.):

Espécie	Amostra	Local de sequen-ciamento	Instituição	Número de tombo ou local de coleta	Protocolo de extração de DNA	Parâmetros fragmenta-ção do DNA	Corridas
Enallopsammia rostrata	IGS033	USP	Coleção Cebimar-USP	Bacia de Campos	Puregene+ Zymo	Teste 3	N+ MiN+ Mi
Favia gravida	CV17	USP	Coleção Cebimar-USP	Fernando de Noronha	Dneasy	Teste 3	Mi
Flabellum aotearoa	IGS112	USP	MNHN	IK-2012-3760	Dneasy	Nenhum	Mi
Flabellum messum	IGS121	USP	NIWA	NIWA91134	Dneasy	Nenhum	Mi
Fungia fungites	REL067	NUS	Coleção REL-NUS	Cingapura	Customizado	10; 20; 3; 30 s on, 30 s off	Hi
Goniastrea edwardsi	REL260	NUS	Coleção REL-NUS	Cingapura	Customizado	10; 20; 2; 15 s on, 30 s off	Hi
Heliofungia actiniformis	REL130	NUS	Coleção REL-NUS	Cingapura	Customizado	10; 20; 2; 15 s on, 30 s off	Hi
Herpolitha limax	REL298	NUS	Coleção REL-NUS	Cingapura	Dneasy	2; 72; 12; 30 s on, 30 s off	Hi
Hydnophora microconos	REL116	NUS	Coleção REL-NUS	Cingapura	Customizado	10; 20; 3; 15 s on, 30 s off	Hi
Hydnophora rigida	REL134	NUS	Coleção REL-NUS	Cingapura	Customizado	10; 20; 3; 15 s on, 30 s off	Hi
Leptastrea pruinosa	REL324	NUS	Coleção REL-NUS	Cingapura	Customizado	10; 20; 2; 15 s on, 30 s off	Hi
Leptoria phrygia	REL276	NUS	Coleção REL-NUS	Cingapura	Customizado	10; 20; 3; 15 s on, 30 s off	Hi
Lithophyllon undulatum	REL304	NUS	Coleção REL-NUS	Cingapura	Dneasy	2; 72; 12; 30 s on, 30 s off	Hi
Merulina scabricula	REL079	NUS	Coleção REL-NUS	Cingapura	Customizado	10; 20; 3; 30 s on, 30 s off	Hi
Mussismilia braziliensis	CV16	USP	Coleção Cebimar-USP	Arquipélago dos Abrolhos	Dneasy	Teste 3 [2]	Mi
Mussismilia leptophylla	CV10	USP	Coleção Cebimar-USP	Arquipélago dos Abrolhos	Dneasy	Teste 3	Mi
Mycedium elephantotus	REL165	NUS	Coleção REL-NUS	Cingapura	Customizado	10; 20; 3; 15 s on, 30 s off	Hi
Oulastrea crispata	REL426	NUS	Coleção REL-NUS	Cingapura	Dneasy	10; 20; 3; 30 s on, 30 s off	Hi
Oulophyllia crispa	REL194	NUS	Coleção REL-NUS	Cingapura	Customizado	10; 20; 3; 15 s on, 30 s off	Hi
Pachyseris rugosa	REL311	NUS	Coleção REL-NUS	Cingapura	Dneasy	2; 72; 12; 30 s on, 30 s off	Hi

Tabela 4.2.1.1 (cont.):

Espécie	Amostra	Local de sequen-ciamento	Instituição	Número de tombo ou local de coleta	Protocolo de extração de DNA	Parâmetros fragmentação do DNA	Corridas
Paracyathus pulchellus	IGS011	USP	Coleção Cebimar-USP	Arquipélago de Alcatrazes	Puregene+ Zymo	Teste 3 [2]	Mi
Paragoniastrea australensis	REL275	NUS	Coleção REL-NUS	Cingapura	Customizado	10; 20; 2; 15 s on, 30 s off	Hi
Pectinia lactuca	REL202	NUS	Coleção REL-NUS	Cingapura	Customizado	10; 20; 3; 15 s on, 30 s off	Hi
Phyllangia americana	Phyll	USP	Coleção Cebimar-USP	Arquipélago de Alcatrazes	Dneasy	Teste 3	N+ MiN+ Mi
Plerogyra sinuosa	REL170	NUS	Coleção REL-NUS	Cingapura	Customizado	10; 20; 3; 15 s on, 30 s off	HiSeq
Plesiastrea versipora	REL315	NUS	Coleção REL-NUS	Cingapura	Customizado	10; 20; 3; 15 s on, 30 s off	Hi
Podabacia crustacea	REL206	NUS	Coleção REL-NUS	Cingapura	Customizado	10; 20; 3; 15 s on, 30 s off	Hi
Polyphylia talpina	REL167	NUS	Coleção REL-NUS	Cingapura	Customizado	10; 20; 3; 15 s on, 30 s off	Hi
Porites branneri	IGS071	USP	Coleção Cebimar-USP	Arquipélago dos Abrolhos	Dneasy	Teste 3	N+MiN
Premocyathus sp.	IGS008	USP	Coleção Cebimar-USP	Arquipélago de Alcatrazes	Puregene+ Zymo	Teste 3 [1]	N+ MiN+ Mi
Psammocora contigua	REL180	NUS	Coleção REL-NUS	Cingapura	Customizado	10; 20; 3; 15 s on, 30 s off	Hi
Rhizotrochus typus	IGS115	USP	MNHN	IK-2012-3837	Dneasy	Teste 2 [1]	Mi
Scapophyllia cylindrica	REL261	NUS	Coleção REL-NUS	Cingapura	Customizado	10; 20; 3; 15 s on, 30 s off	Hi
Siderastrea stellata	CV15	USP	Coleção Cebimar-USP	Arquipélago dos Abrolhos	Dneasy	Teste 3	Mi
Stephanocoenia intersepta	CV8	USP	Coleção Cebimar-USP	Fernando de Noronha	Dneasy	Teste 3 [2]	Mi
Trachyphyllia geoffroyi	REL425	NUS	Coleção REL-NUS	Cingapura	Customizado	10; 20; 3; 15 s on, 30 s off	Hi
Trochocyathus caryophillioides	IGS031	USP	MNHN	IK-2012-3820	Puregene	Nenhum [1]	N+ MiN+ Mi
Truncatoflabellum virgintifarium	DNA25	USP	MNHN	IK-2012-3835	Dneasy+ Zymo	Teste 2 [1]	N+ MiN+ Mi

nove) e 1% de PhiX. A preparação das bibliotecas e seus sequenciamentos foram realizados no laboratório de sequenciamento Genial, no Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa da Universidade de São Paulo (CEFAP - USP).

A espécie *Stephanocoenia intersepta*, que apresentou um rearranjo de genes em seu mitogenoma (ver Resultados), teve algumas regiões sequenciadas por meio do método de Sanger (Sanger et al., 1977) para confirmação da ocorrência dessa modificação. Foram utilizados os pares de iniciadores Cs10F+Cs09R, Cs10F+Rs18R, Cs18F+Cs19R e Cs20F+Cs20R (Lin et al., 2011), sendo que Cs10F+Rs18R passou apenas pela etapa de amplificação por PCR.

4.2.3 Amostras sequenciadas por meio da National University of Singapore

DNA genômico total foi extraído de 50 amostras presentes na coleção do Reef Ecology Laboratory na National University of Singapore utilizando o *Dneasy Blood and Tissue kit* (Qiagen) ou um protocolo customizado combinando os kits *E.Z.N.A Mollusc DNA* (Omega Bio-tek) e *Genomic DNA Clean & Concentrator-10* (Zymo; Tabela 4.2.1.1). A concentração do DNA foi avaliada em um fluorímetro Qubit (Thermo Scientific) usando um kit de quantificação *Broad Range dsDNA* (Thermo Scientific) e a integridade do DNA foi analisada por meio de eletroforese em gel de agarose (1 % m/v utilizando tampão TAE 1x e 1 a 2 uL de GelRed aplicado diretamente à matriz do gel). Bibliotecas também foram preparadas usando o kit de preparação de bibliotecas *TruSeq DNA Nano* (Illumina), mas a fragmentação do DNA foi feita em um banho sonicador Bioruptor (Diagenode) em vez de em um ultrassonicador Covaris (Covaris). Foi necessário otimizar os parâmetros de fragmentação para esse objetivo, mas todas as amostras foram fragmentadas em microtubos de 0,2 mL e diluídas em Tris HCl pH 8,0. Géis de eletroforese foram utilizados para avaliar se o tamanho dos fragmentos de DNA estavam dentro do intervalo esperado depois da etapa de fragmentação e ao final do protocolo de preparação de biblioteca, assim como para estimar o tamanho médio das bibliotecas. A qualidade das bibliotecas foi avaliada ao final do protocolo em um fluorímetro Qubit (Thermo Scientific) utilizando o kit de quantificação *High Sensitivity dsDNA* (Thermo Scientific). As bibliotecas foram combinadas com proporções equimolares em dois conjuntos e enviadas à empresa Macrogen da Coréia do Sul para sequenciamento em uma corrida *rapid* 2x150 bp, utilizando um sequenciador HiSeq 2500. A empresa efetuou uma reação de qPCR (reação em cadeia da polimerase quantitativa) de cada uma das combinações equimolares para

quantificação e confirmação de sua ligação aos indexes.

4.2.4 Controle de qualidade, montagem e anotação de mitogenomas

Os fragmentos sequenciados (*reads*) foram filtrados para qualidade e comprimento utilizando o programa Trimmomatic (Bolger et al., 2014) com parâmetros padrão e intercalados com a rotina interleave-fastqgz-MITOBIM.py (modificada para funcionar com o programa Mitobim; Hahn et al., 2013). Ao final de cada etapa, a qualidade dos dados foi analisada por meio do programa FASTQC (Brabraham Bioinformatics). Como os dados de NextSeq apresentaram sequências repetitivas de G ("poliG") em proporção considerável dos dados (entre <1% e ~30% dos *reads*, dependendo da amostra), os *reads* com pelo menos seis G seguidos foram retirados com a ferramenta fastq-grep (Jones, 2012). As sequências restantes foram reordenadas utilizando a ferramenta fastq-sort (Jones, 2012) e tiveram seus cabeçalhos comparados para assegurar que os *reads* seriam corretamente intercalados. No caso de amostras que foram incluídas em mais de uma corrida de sequenciamento (Tabela 4.2.1.1), os arquivos intercalados das corridas foram concatenados.

Para a montagem dos mitogenomas foram utilizados: o programa Mitobim (Hahn et al., 2013) no caso de espécies ou gêneros que já apresentavam algum gene mitocondrial disponível publicamente para ser utilizado como referência; ou o programa Spades (Bankevich et al., 2012) para as demais espécies. Como esse montador pode utilizar quantidade considerável de memória RAM, apenas dados obtidos com MiSeq foram analisados pelo Spades. Parte das montagens foi conduzida no supercomputador do *National Supercomputing Centre* (NSCC, Cingapura) com auxílio da equipe do Reef Ecology Laboratory da National University of Singapore. Em alguns casos, a sequência mitocondrial obtida (*contig*) com o programa Spades foi anotada e um gene de anotação confiável (alta qualidade e similar a sequências de Scleractinia publicamente disponíveis) localizado no meio do *contig* utilizado como referência para uma montagem com o programa Mitobim. Para obtenção da sequência final, no caso programa Mitobim, o arquivo em formato ".maf" gerado foi convertido para ".sam" utilizando a ferramenta miraconvert (Chevreux et al., 1999) e o programa Geneious v 11.1.5 (Kearse et al., 2012) foi utilizado para extração de uma sequência consenso. Como critério foi utilizada *majority rule*, na qual o nucleotídeo que estivesse presente em mais de 50% dos reads mapeados em determinado sítio seria atribuído a ele. Quanto ao programa Spades, a

ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul et al., 1990) foi utilizada para comparar os maiores *contigs* (iniciando-se pelos dez maiores) à coleção não redundante de nucleotídeos (nr/nt) do NCBI (*National Center for Biotechnology Information;* NCBI, 2019) com o objetivo de encontrar qual daqueles *contigs* corresponderia ao DNA mitocondrial. As amostras cujas montagens foram realizadas em colaboração com o Reef Ecology Laboratory (NUS) passaram por processo similar de busca, mas utilizando uma base de dados de mitogenomas de corais. Com o objetivo de avaliar se os mitogenomas montados poderiam ser circulares, os *contigs* mitocondriais foram submetidos à ferramenta circules.py (parte das rotinas associadas ao programa Mitobim; Hahn et a., 2013) e, caso fossem identificados como tal, sua sequência era cortada para o tamanho recomendado pelo programa.

A anotação de todas as sequências incluídas na filogenia (mitogenomas do presente estudo e publicamente disponíveis) foi conduzida por meio do programa MITOS (Bernt et al., 2013), utilizando o código genético de fungos ("mold") e parâmetros padrão, exceto com relação à anotação de origens de replicação das fitas pesada (OH) e leve (OL). Por apresentarem, em geral, baixa qualidade e tenderem a mascarar a ocorrência de genes esperados (observação pessoal), esse tipo de característica foi desmarcada nos parâmetros da anotação. Os gráficos de qualidade disponibilizados pelo programa, assim como o comprimento das sequências (priorizadas as mais longas) foram critérios utilizados para decidir se determinada anotação poderia ser errônea. Nos gráficos de qualidade, um valor maior que 10^{4} ou um E-value menor que 10^{-4} foram considerados como qualidade satisfatória para, respectivamente, genes codificantes de proteínas e genes ribossimais ou de RNA transferidor (sugerido por Bernt e colaboradores, 2013). No caso do gene *atp8*, foram priorizadas sequências iniciando com os aminoácidos MPQ (Chen et al., 2008a). Em caso de dúvidas sobre qual seria a sequência correta para um gene ou caso houvesse suspeita de uma duplicação, ambas as sequências foram mantidas até a etapa do alinhamento.

4.2.5 Análises filogenômicas

Os genes mitocondriais foram alinhados separadamente na forma de nucleotídeo utilizando o programa MAFFT (Katoh et al., 2002), sendo que as extremidades dos alinhamentos foram cortadas até as sequências mais curtas e sítios com *gaps* em mais de 50% das amostras foram removidos. Para avaliar se algum dos genes mitocondriais estaria

saturado por substituições, os alinhamentos foram submetidos ao programa DAMBE v 7.0.20 (Xia, 2018), seguindo-se o concatenamento dos alinhamentos não saturados, sendo cada gene correspondente a uma partição. A reconstrução filogenética foi realizada por meio dos métodos de Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (IB) rodadas localmente e no servidor CIPRES (Miller et al., 2010), respectivamente. As análises de Máxima Verossimilhança foram feitas no programa RAxML v 8.2.12 (Stamatakis, 2014) utilizando modelo de substituição GTR com distribuição gamma (+G) e estimando a proporção de sítios invariáveis (+I) para cada partição, seguida de 1000 reamostragens de *rapid bootstrap*. Quanto às análises de Inferência Bayesiana, foram realizadas no programa MrBayes v3.2.7a (Ronquist e Huelsenbeck, 2003) com modelo GTR+G+I utilizando duas corridas com quatro cadeias em cada por 10 milhões de gerações, amostrando uma árvore a cada 1000 e descartando os primeiros 25% delas como *burn in*.

4.3 RESULTADOS

Um total de 103 bibliotecas foram sequenciadas, das quais duas serão utilizadas para confirmação dos testes de enriquecimento de DNA mitocondrial (capítulo 2) e outras 62 já tiveram seus mitogenomas montados e anotados, sendo incluídas no presente capítulo. As 63 bibliotecas utilizadas na filogenia compreendem amostras sequenciadas no CEFAP-USP (item 2.1.1) e na *National University of Singapore* (item 2.1.2), além do mitogenoma de *Paraconotrochus antarticus*, cuja sequência foi cedida pela Profª Andrea Quattrini (*Smithsonian National Museum of Natural History*, Estados Unidos).

Os mitogenomas montados (Tabela 4.3.1) apresentam comprimento entre 14855 bp (*Cladocora* sp., IGS009) e 20581 bp (*Cyathotrochus pileus*, IGS109), possuem conteúdo GC variando de 29,28 % (*Oulastrea crispata*) a 45,84 % (*Anthemiphyllia spinifera*) e, em sua maioria, a ordem de seus genes é similar, com exceção de três padrões observados: (1) em *Caryophyllia scobinosa* (IGS119) e *Premocyathus* sp. (IGS008), os genes *cob, nad2* e *nad6* estão posicionados entre o exon 5' do nad5 e o trnW; (2) em *Stephanocoenia intersepta*, o gene trnM e parte de 16S localizam-se entre 12S e cox3; e (3) em *Paraconotrochus antarticus*, o gene trnM está posicionado entre os genes nad4 e 12S (Figura 4.3.1). As sequências obtidas por sequenciamento Sanger referentes às regiões de rearranjo em *S. intersepta* não apresentam diferenças em relação às do mitogenoma obtido com NGS, confirmando sua ocorrência. Considerando que alguns dos códons de iniciação e término encontrados não sejam corretos para o código genético de fungos (código 4,

"mold"), as extremidades dos genes ainda serão avaliadas com maior grau de detalhamento.

Quanto ao teste de saturação por substituição, apenas o gene *atp8* foi considerado saturado e, consequentemente, não foi utilizado na filogenia. Portanto, foram utilizados na reconstrução evolutiva da ordem 103 táxons com um total de 12392 bp divididos em 16 partições (12S, 16S, *atp6*, *cob, cox1, cox2, cox3, nad1, nad2, nad3, nad4L, nad4, nad5-5', nad5-3', nad6, trnM e trnW*). Em ambas as filogenias geradas, as três sequências da ordem Corallimorpharia (Figura 4.3.2) incluídas como grupo externo foram recuperadas como um grupo monofilético com bom suporte estatístico (100 %). Ademais, ambas as filogenias apresentaram duas linhagens basais (Micrabaciidae e Gardineriidae) seguidas de dois grandes grupos ("Complex" e "Robust").

Quanto ao grupo "Complex" (Figura 4.3.2), esse se divide em duas linhagens. Em uma delas, estão presentes as famílias Flabellidae, Turbinoliidae, Fungiacyathidae, Dendrophylliidae, Poritidae e um espécime de *Distolotrochus* sp. O clado formado por Flabellidae e *Cyathotrochus pileus* (Turbinoliidae) apresenta baixo suporte (MV: 51%, IB: 0,8472) e, como seu grupo irmão, a espécie *Distolotrochus* sp. foi agrupada a *Fungiacyathus stephanus* (Fungiacyathidae) com suporte alto (MV: 87%, IB: 1). Esse grande clado, por sua vez, é grupo irmão de Dendrophylliidae + Poritidae. Na outra linhagem principal do grupo "Complex", as famílias Acroporidae, Euphylliidae e Agariciidae mostraram-se monofiléticas com suporte estatístico elevado, exceto, na filogenia por Máxima Verossimilhança, pelo nó que une Agariciidae a Acroporidae + Euphylliidae (MV: 41 %; IB: 1). *Stephanocoenia intersepta* foi recuperada como grupo irmão de Siderastreidae com suporte médio na reconstrução por Máxima Verossimilhança e alto pela Inferência Bayesiana (MV: 70 %; IB: 0,9997), mas seu agrupamento com Agariciidae + Acroporidae + Euphylliidae como grupo irmão dos outros "Complex" foi altamente suportado por ambas as metodologias.

Tabela 4.3.1: Amostras preparadas para sequenciamento na Universidade de São Paulo (USP) e na National University of singapore (NUS) e informações sobre seus mitogenomas, tais como o programa utilizado para sua montagem, seu comprimento e conteúdo GC. "Spades+Mitobim" indica amostras nas quais o programa Spades foi utilizado para obtenção de um gene que pudesse ser uma referência para uma montagem no programa Mitobim. '>' indica mitogenoma não circularizados e, portanto, mais longos do que o tamanho encontrado.

Espécie	Amostra	Programa montagem	Compri-mento (bp)	Conteúdo GC (%)	Observações
Anthemiphyllia patera costata	IGS050	Mitobim	15685	40,2	N.A.
Anthemiphyllia spinifera	IGS118	Mitobim	15432	45,84	N.A.
Astrangia sp.	DNA45	Mitobim	14857	31,86	N.A.
Balanophyllia gigas	IGS107	Mitobim	18938	37,41	N.A.
Bernardpora stutchburyi	REL029	Mitobim	18738	36,63	N.A.
Caryophyllia scobinosa	IGS119	Mitobim	16105	36,63	N.A.
Caulastraea echinulata	REL077	Mitobim	18335	33,51	N.A.
Cladocora sp.	IGS009	Spades+ Mitobim	14855	31,79	N.A.
Coelastrea aspera	REL122	Mitobim	16752	33,27	N.A.
Coscinaraea columna	REL160	Mitobim	16435	30,18	N.A.
Cyathotrochus pileus	IGS109	Mitobim	20581	38,38	N.A.
Cyphastrea chalcidicum	REL162	Mitobim	18136	33,7	N.A.
Dendrophyllia sp.	IGS110	Spades	> 15108	36,85	Faltam 3 genes (*nad5, nad1, cob*)
Diploastrea heliopora	REL418	Mitobim	18210	33,35	N.A.
Dipsastraea maxima	REL242	Mitobim	16752	33,24	N.A.
Dipsastraea mirabilis	REL378	Spades	16440	33,19	N.A.

Tabela 4.3.1 (cont.):

Espécie	Amostra	Programa montagem	Compri-mento (bp)	Conteúdo GC (%)	Observações
Dipsastraea speciosa	REL141	Mitobim	16441	33,2	N.A.
Distolotrochus sp.	IGS108	Spades+ Mitobim	> 19722	37,72	Todos os genes esperados presentes
Echinopora gemmacea	REL243	Mitobim	17862	32,93	N.A.
Echinopora horrida	REL072	Mitobim	> 15692	33,34	Faltam 2 genes (*nad6* e *atp6*)
Enallopsammia rostrata	IGS033	Mitobim	18815	37,43	N.A.
Favia gravida	CV17	Mitobim	16975	33,63	N.A.
Flabellum aotearoa	IGS112	Mitobim	19848	37,98	N.A.
Flabellum messum	IGS121	Mitobim	19550	37,73	N.A.
Fungia fungites	REL067	Mitobim	16680	29,91	N.A.
Goniastrea edwardsi	REL260	Mitobim	17218	33,73	N.A.
Heliofungia actiniformis	REL130	Mitobim	16814	29,9	N.A.
Herpolitha limax	REL298	Mitobim	> 15249	29,67	Faltam 2 genes *(trnW* e *atp8*)
Hydnophora microconos	REL116	Mitobim	17789	33,37	N.A.
Hydnophora rigida	REL134	Mitobim	> 14586	33,24	Faltam 2 genes (*trnM* e 16S)
Leptastrea pruinosa	REL324	Mitobim	16495	29,62	N.A.
Leptoria phrygia	REL276	Mitobim	16763	33,58	N.A.
Lithophyllon undulatum	REL304	Mitobim	16925	29,83	N.A.
Merulina scabricula	REL079	Mitobim	17102	33,72	N.A.
Mussismilia braziliensis	CV16	Mitobim	17061	33,52	N.A.
Mussismilia leptophylla	CV10	Mitobim	16978	33,5	N.A.
Mycedium elephantotus	REL165	Mitobim	17964	33,39	N.A.
Oulastrea crispata	REL426	Mitobim	15411	29,18	N.A.

Tabela 4.3.1 (cont.):

Espécie	Amostra	Programa montagem	Compri-mento (bp)	Conteúdo GC (%)	Observações
Oulophyllia crispa	REL194	Mitobim	18638	33,9	N.A.
Pachyseris rugosa	REL311	Spades	18647	39,18	N.A.
Paraconotrochus antarticus	N.A.	N.A.	17562	37,2	N.A.
Paracyathus pulchellus	IGS011	Mitobim	14856	31,76	N.A.
Paragoniastrea australensis	REL275	Mitobim	17150	33,74	N.A.
Pectinia lactuca	REL202	Mitobim	17954	33,4	N.A.
Phyllangia americana	Phyll	Mitobim	15744	31,82	N.A.
Plerogyra sinuosa	REL170	Mitobim	17398	35,29	N.A.
Plesiastrea versipora	REL315	Mitobim	15320	32,01	N.A.
Podabacia crustacea	REL206	Mitobim	16911	30,06	N.A.
Polyphylia talpina	REL167	Mitobim	16653	29,61	N.A.
Porites branneri	IGS071	Mitobim	18642	36,27	N.A.
Premocyathus sp.	IGS008	Mitobim	15816	34,97	N.A.
Psammocora contigua	REL180	Mitobim	16253	30,11	N.A.
Rhizotrochus typus	IGS115	Mitobim	> 19804	37,28	Todos os genes esperados presentes
Scapophyllia cylindrica	REL261	Mitobim	17124	33,73	N.A.
Siderastrea stellata	CV15	Mitobim	19387	36,93	N.A.
Stephanocoenia	CV8	Mitobim	19461	36,82	N.A.
Trachyphyllia geoffroyi	REL425	Mitobim	16599	33,3	N.A.
Trochocyathus caryophillioides	IGS031	Mitobim	16240	34,87	N.A.
Truncatoflabellum virgintifarium	DNA25	Mitobim	19343	38,04	N.A.

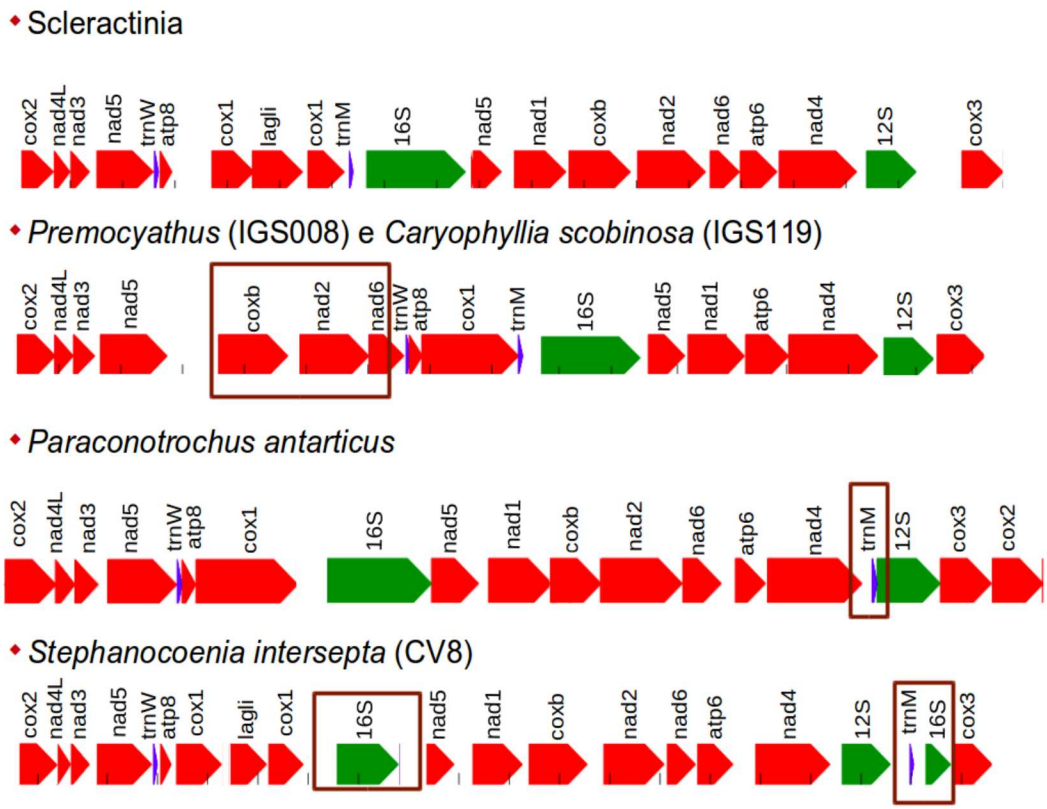

Figura 4.3.1: Diagrama ilustrando a ordem dos genes mitocondriais e principais padrões de organização encontrados em Scleractinia no presente estudo.

O grupo "Robust" apresenta topologia mais assimétrica do que a observada em "Complex", sendo que as duas espécies do gênero *Anthemiphyllia* formam um clado monofilético e grupo irmão de todos os outros "Robust" (Anthemiphylliidae; Figura 4.3.2). Essa é seguida por *Paraconotrochus antarticus* em uma linhagem monotípica e, então, por um clado formado exclusivamente por espécies pertencentes à família Caryophylliidae (*Premocyathus* sp., *Caryophyllia scobinosa*, *Desmophyllum pertusum* e *D. dianthus* e *Solenosmilia variabilis*). Essa linhagem é sucedida por Pocilloporidae e, por sua vez, por *Madrepora oculata* em uma linhagem monotípica com baixo suporte na filogenia por Máxima Verossimilhança (MV: 57 %; IB: 1). Após *M. oculata*, diverge um grande clado que apresenta duas ramificações principais. Em uma delas, estão presentes os membros das famílias Oulastreidae (representado por *Oulastrea crispata*), Caryophylliidae (*Polycyathus* sp.), Coscinaraeidae (*Coscinaraea columna*), Psammocoridae (*Psammocora contigua*), Fungiidae e um gênero de posicionamento incerto (*incertae sedis*), *Leptastrea* (*L. pruinosa*). Na outra, um clado inclui membros de Caryophylliidae (*Phyllangia americana* e *Paracyathus pulchellus*), Rhizangiidae (*Astrangia*) e de posicionamento incerto (*Plerogyra sinuosa* e *Cladocora* sp.) e outro apresenta *Trochocyathus*

caryophyllioides (Caryophylliidae), seguido por Plesiastreidae (*Plesiastraea versipora*), Diploastreidae (*Diploastrea heliopora*), Faviidae e, então, Lobophylliidae e Merulinidae como grupos irmãos. Essa região da filogenia apresenta alguns grupos com suporte baixo, sendo eles: (1) o clado formado por *Cladocora* sp. e Rhizangiidae (MV: 61 %, IB: 0,9431); (2) parte dos ramos dentro de Merulinidae; e (3) em Faviidae, o clado *Mussa angulosa* + *Mussismilia (M. leptophylla* e *M. braziliensis)* na filogenia por MV (50%), assim como o a linhagem que inclui os Faviídeos exceto *Mussa angulosa* na reconstrução por IB (0,5469) .

4.4 DISCUSSÃO

Os mitogenomas sequenciados apresentam conteúdo GC entre 30 e 40%, circularidade e, em sua maioria, a ordem canônica esperada para a ordem Scleractinia (Kitahara et al., 2014; Lin et al., 2011; Medina et al., 2006). Embora a presença de um menor conteúdo GC em "Robust" tenha sido observada e já fosse esperada (Kitahara et al., 2014), algumas espécies de "Robust" posicionadas próximo a "Complex" (*Caryophyllia scobinosa*, *Paraconotrochus antarticus*, *Anthemiphyllia patera costata*, *Anthemiphyllia spinifera*) apresentam conteúdo GC também similar a "Complex", podendo refletir uma transição entre os dois grandes grupos de Scleractinia. Quanto ao comprimento, nenhuma das espécies sequenciadas possui mitogenoma menor que 14853 bp (*Astrangia* sp., Lin et al., 2011), mas algumas apresentam genoma maior que 19429 bp (*Gardineria hawaiensis*, Kitahara et al., 2014; Tabela 4.3.1). No caso particular de *Rhizotrochus typus* e *Distolotrochus lozoueti,* não foi possível circularizar o genoma, mas todos os genes esperados foram anotados com sucesso, o que indica que, ainda que o comprimento real seja maior, deve ser próximo do obtido. Rearranjos nos genomas mitocondriais de Scleractinia mostraram-se menos recorrentes do que na subclasse Octocorallia, podendo indicar que a ordem dos genes possa ser alvo de seleção natural. Embora tenha sido discutido que transposições de genes de RNA transportador em insetos da ordem Hymenoptera sejam seletivamente neutros (Dowton et al., 2009), o hábito de vida e a taxa evolutiva do DNA mitocondrial de insetos em comparação com corais é diferente, reforçando que se faz necessária investigação mais aprofundada da evolução de rearranjos em Scleractinia.

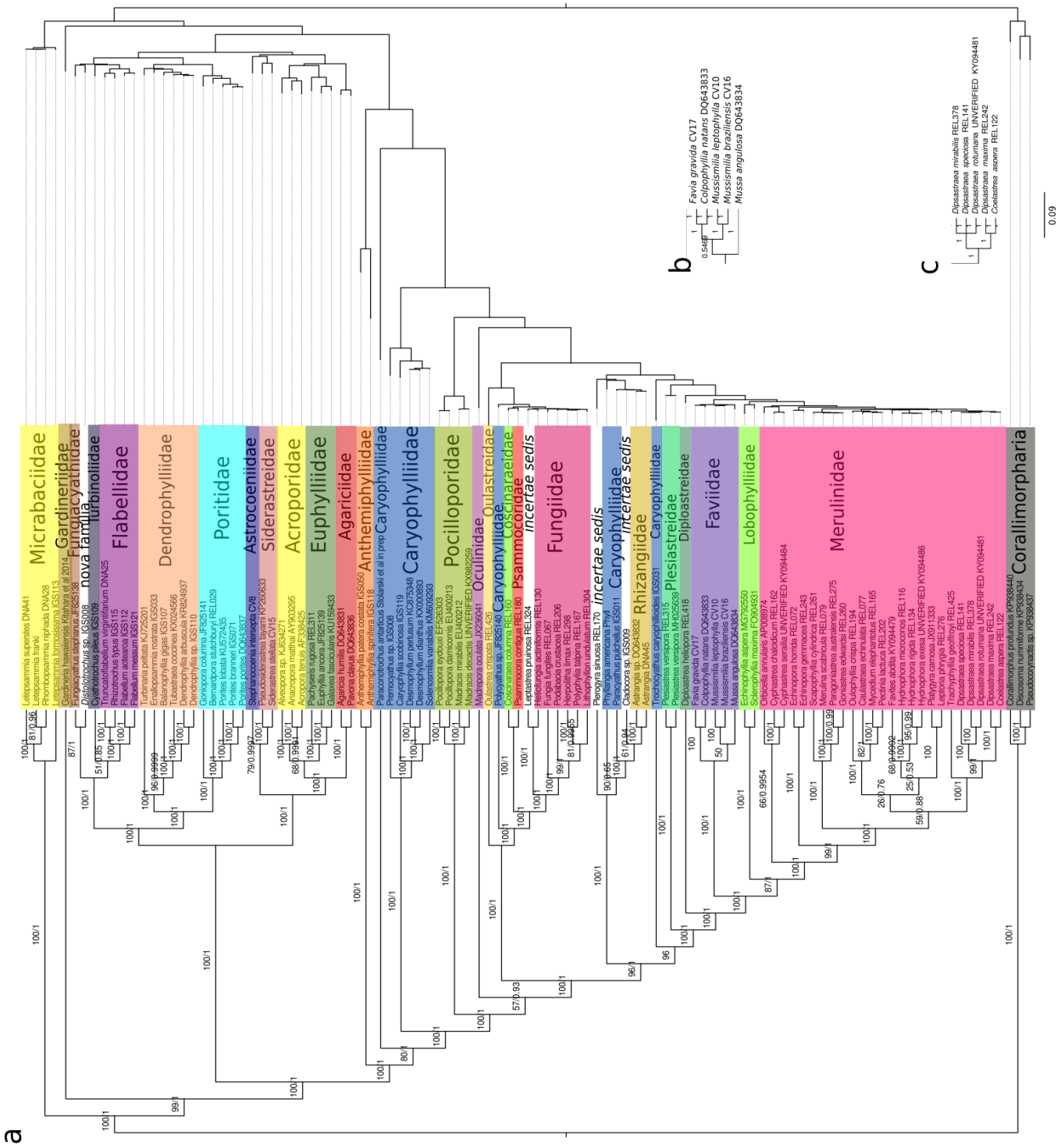

Figura 4.3.2: Filogenia particionada de genes mitocondriais (12S, 16S, atp6, ***cob, cox1, cox2, cox3, nad1, nad2, nad3, nad4L, nad4, nad5-5', nad5-3', nad6, trnM e trnW*) obtida a partir de Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (IB). (a) Árvore obtida por MV tem sua topologia evidenciada de duas formas: à esquerda possibilita a visualização dos valores de suporte, enquanto à direita prioriza a visualização dos comprimentos relativos dos ramos. Os valores acima de cada ramo indicam o suporte calculado por reamostragens de *bootstrap* e probabilidades posteriores, respectivamente. (b) e (c) são subconjuntos da filogenia obtida por IB indicando duas regiões nas**

quais a topologia das filogenias foi diferente entre as metodologias (família Faviidae e gênero *Dipsastrea*, respectivamente).

Considerando as reconstruções evolutivas recuperadas utilizando os mitogenomas sequenciados e aqueles previamente publicados (Figura 4.3.2), os valores de suporte são altos na maioria dos nós e, dentre os clados com suporte estatístico moderado, a maioria localiza-se dentro de famílias, as quais serão apenas discutidas com relação ao seu posicionamento e, não, quanto à sua topologia interna. Além disso, a divisão entre os grupos "Complex" e "Robust" foi recuperada (Fukami et al., 2008; Le Goff-Vitry et al., 2004; Kitahara et al., 2010a; Kitahara et al., 2014; Kitahara et al., 2016; Romano e Cairns, 2000), mas o grupo "Basal", corroborando com os resultados previamente obtidos (ver Capítulo 2), mostrou-se parafilético.

As famílias de corais escleractíneos incluídas na presente reconstrução filogenética foram recuperadas, em sua maioria, como monofiléticas e de acordo com a topologia esperada, sendo elas: Dendrophylliidae, Poritidae, Siderastreidae, Acroporidae, Euphylliidae, Agariciidae, Pocilloporidae, Psammocoridae e Coscinaraeidae, Oulastraeidae, Plesiastreidae e Diploastreidae (Fukami et al., 2008; Le Goff-Vitry et al., 2004; Huang et al., 2011; Huang et al., 2014; Kitahara et al., 2010a; Kitahara et al., 2014; Kitahara et al., 2016). Contudo, alguns grupos apresentaram posicionamento incomum ou características pouco usuais em seus mitogenomas, sendo discutidas abaixo.

4.4.1 *Distolotrochus* + *Fungiacyathus*

Embora as características macromorfológicas de *Distolotrochus* sugiram que esse gênero pertence à família Caryophylliidae (Kitahara et al., *em preparação* b), a reconstrução evolutiva recuperada no presente estudo o posiciona como grupo irmão de *Fungiacyathus* (Fungiacyathidae). Contudo, aspectos macromorfológicos de *Fungiacyathus* e *Distolotrochus* são, em geral, díspares, sendo no geral o *corallum* do primeiro descrito como delicado, com formato discoide e livre (Moseley, 1881), enquanto o segundo é robusto, variando de trocóide e ceratóide e apresentando um pedicelo reforçado que o fixa ao substrato (Kitahara et al., *em preparação* b). Dessa forma, análises utilizando marcadores nucleares, como 28S rDNA, podem auxiliar a verificar ou contestar esse clado, sendo no momento mais parcimonioso a designação de *Distolotrochus* a uma nova família.

4.4.2 *Cyathotrochus pileus* + Flabellidae

Diferente de estudos anteriores (Kitahara et al., 2010a; Stolarski et al., 2011; Kitahara et al., 2016), a família Turbinoliidae, representada no presente trabalho por *Cyathotrochus pileus,* foi recuperada como grupo irmão de Fungiacyathidae e esse clado, por sua vez, como grupo irmão de Flabellidae. Contudo, em filogenias utilizando apenas marcadores mitocondriais, esse clado apresenta suporte baixo (< 55% por *bootstrap* e < 80% de probabilidade posterior em Stolarski et al., 2011), o que sugere que o DNA mitocondrial seja conservado demais para resolver essa parte da história evolutiva de Scleractinia. Dessa forma, seria interessante a inclusão de outros turbinolídeos (e.g. *Tropidocyathus labidus*, cujo DNA já foi sequenciado durante a execução do presente trabalho), assim como a utilização de marcadores mais variáveis. Embora o uso de sequências espaçadoras do DNA mitocondrial represente uma alternativa com as sequências já obtidas, estabelecer se essas regiões são ou não ortólogas é um desafio. O espaçador considerado como região controle varia entre gêneros (Chen et al., 2008a; Lin et al., 2011), e outros espaçadores parecem ser adequados para investigar relações dentro de famílias e, não, entre elas (Huang et al., 2011; Luck et al., 2013). Outra alternativa seria o uso de sequências nucleares, como por exemplo o uso de sondas de DNA biotinilado para captura seletiva de marcadores nucleares de cópia única.

4.4.3 *Stephanocoenia intersepta*

O gênero *Stephanocoenia,* atualmente reconhecido como pertencente à família Astrocoeniidae, é recorrentemente recuperado em filogenias moleculares próximo às famílias Guyniidae e Siderastreidae no grande grupo dos corais “Complex” (Fukami et al., 2008; Kitahara et al., 2010a; Kitahara et al., 2016). Entretanto, esses mesmos estudos indicam que outros gêneros morfologicamente designados a essa família, como *Stylocoeniella*, possuem afinidade genética com a família Pocilloporidae no grupo dos corais “Robust”. Por esse motivo, o posicionamento recuperado no presente trabalho já era esperado. Entretanto, de forma singular neste grupo, *S. intersepta* possui um rearranjo do gene trnM e parte do 16S (Figura 4.3.1). Embora os representantes de Siderastreidae que tiveram o genoma mitocondrial sequenciado no presente trabalho não apresentem essa reorganização, e que *Guynia* e *Stylocoeniella* não tenham sido analisadas, *Stephanocoenia* é reconhecida por ser uma das primeiras linhagens de corais formadores de recifes de corais de águas rasas a divergir (Löser, 2019). Assim, conforme pode ser observado na

presente reconstrução e também em reconstruções pretéritas, esse gênero localiza-se em um ramo distinto (Figura 4.3.2; Fukami et al., 2008; Kitahara et al., 2010a; Kitahara et al., 2016), o que diminui a probabilidade desse rearranjo ser compartilhado com outro gênero do clado. Nesse contexto, os próximos passos envolvem a análise da estrutura tridimensional associada a cada parte da sequência do gene 16S para tentar determinar qual seria funcional.

4.4.4 *Anthemiphyllia*

O gênero *Anthemiphyllia* (família Anthemiphylliidae) foi recuperado como grupo irmão de todos os outros corais do grupo "Robust" e, pela primeira vez, como monofilético. Em Stolarski e colaboradores (2011), *A. patera costata* divergiu como grupo irmão de todos os "Complex" enquanto *A. spinifera* mostrou-se grupo irmão de “Robust”. Já em Kitahara e colaboradores (2010a), ambas as espécies incluídas foram posicionadas dentre os corais “Robust”, mas *A. dentata* formou um clado com *Conotrochus*, enquanto *A. patera costata* divergiu como grupo irmão de *Deltocyathus*. Em Kitahara e colaboradores (2016), as três espécies foram recuperadas dentro de “Robust”, mas *A. spinifera* como grupo irmão de *Deltocyathus*, *A. dentata* em um clado com *Conotrochus* e *Ceratotrochus* e *A. patera costata* separada como grupo irmão de “Robust”. Embora *Anthemiphyllia* tenda a ser recuperada como grupo irmão de “Robust”, ainda não foi possível observar se a topologia do presente estudo é mantida ao serem incluídos outros gêneros próximos às espécies de *Anthemiphyllia*. Para tal, uma biblioteca de *Deltocyathus rotulus* foi sequenciada e deve possibilitar observar se *A. spinifera* permanecerá como grupo irmão de *A. patera costata*. Além disso, seria importante incluir *A. dentata* antes de concluir a respeito do monofiletismo do gênero, já que o clado onde se espera recuperar essa espécie seria o mesmo de *Conotrochus* e *Paraconotrochus antarticus* (Kitahara et al., 2010a; ver item 4.4.5).

4.4.5. Caryophylliidae

No presente estudo, *Desmophyllum dianthus, D. pertusum*, *Solenosmilia variabilis*, *Caryophyllia scobinosa* e *Premocyathus* sp. formaram um clado, enquanto outras espécies atribuídas a Caryophylliidae por suas características morfológicas, foram posicionadas em outras partes da filogenia (*Distolotrochus* sp., *Paraconotrochus antarticus, Trochocyathus caryophyllioides*, *Phyllangia americana* e *Polycyathus* sp.). De forma geral, esse padrão é

recorrente em reconstruções moleculares, indicando que diferentes marcadores convergem para um consenso da necessidade de uma extensa revisão de Caryophylliidae. Assim, uma vez que esse grupo é apontado como a família composta exclusivamente por corais azooxantelados com maior grau de polifiletismo (Kitahara et al., 2010a), ela será discutida em maior grau de detalhamento. Em adição, é importante mencionar que genomas mitocondriais de outras espécies de Caryophylliidae (*Bourneotrochus stellullatus*, *Stephanocyathus coronatus* e *Heterocyathus sulcatus*) foram sequenciados e serão incluídos futuramente na análise.

Como observado para *Stephanocoenia,* algumas espécies de Caryophylliidae possuem rearranjo da ordem canônica dos genes mitocondriais se comparados com a vasta maioria das espécies com genoma mitocondrial já determinado (Figura 4.3.1). O mesmo rearranjo dos genes *cob, nad2* e *nad6* já havia sido documentado para *Desmophyllum* (Emblem et al., 2011; Addamo et al., 2016) e *S. variabilis* (Zeng et al., 2014), sendo que, no presente estudo, também foi detectado em *C. scobinosa* e *Premocyathus* sp. Entretanto, essa diferença está ausente nos Caryophylliidae recuperados em outros clados (*Distolotrochus* sp., *Paraconotrochus antarticus*, *Trochocyathus caryophyllioides*, *Phyllangia americana* e *Polycyathus* sp.). Embora filogenias incluindo dados nucleares tenham recuperado topologias similares (Barbeitos et al., 2010; Stolarski et al., 2011; Kitahara et al., 2016), estes se basearam em dados mitocondriais e nucleares concatenados (Stolarski et al., 2011; Kitahara et al., 2016), ou com amostragem pequena de representantes da família (Barbeitos et al., 2010). Consequentemente, se reconstruções evolutivas utilizando apenas dados nucleares de um maior número de espécies e, possivelmente, *loci*, recuperarem topologia similar, o rearranjo no genoma mitocondrial pode representar mais uma ferramenta para auxiliar na taxonomia no maior clado de Caryophylliidae.

Uma outra espécie classicamente designada como Caryophylliidae, *Phyllangia americana* foi recuperada próxima de *Cladocora* sp. (*incertae sedis*), em um clado com *Astrangia* (Rhizangiidae) e *Paracyathus* (Caryophylliidae). Embora os gêneros *Phyllangia* e *Cladocora* tenham sido recuperados como parafiléticos em estudos que incluem mais de um congênere (Stolarski et al., 2011; Kitahara et al., 2016; presente estudo), as espécies estudadas têm sido recuperadas em um mesmo clado. Apesar da identificação do espécime de *Cladocora* sp. sequenciado no presente estudo não estar a nível de espécie (podendo representar uma espécie ainda não conhecida para a ciência), o posicionamento do gênero próximo a *Astrangia* segue aquele sugerido por estudos

anteriores (Kitahara et al., 2010a; Stolarski et al., 2011). Quanto a *P. americana*, foi hipotetizado que seu posicionamento na filogenia de Kitahara e colaboradores (2010a), a qual foi baseada exclusivamente em sequência parcial do gene *cox1*, poderia indicar a existência de um ancestral azooxantelado raso para os corais zooxantelados do grande grupo dos corais "Robust". Contudo, em análises que incluem outros genes além de *cox1*, a família Fungiidae (zooxantelada) diverge antes do clado onde se encontra *Phyllangia* (16S rDNA em Le Goff-Vitry et al., 2004; 12S, 16S, *atp6, cox1*, região controle, *cob, nad5*, 18S rDNA, 28S rDNA, histona H3, espaçadores internos transcritos ribossimais e íntron do gene *PaxC* em Kitahara et al., 2016; 12S e 28S rDNA em Barbeitos et al., 2010), sendo que análises de reconstrução de estado ancestral indicam que esse grupo parece ter um ancestral comum colonial e zooxantelado (Barbeitos et al., 2010). Portanto, a condição azooxantelada nesse grupo seria secundária e o presente estudo reforça a múltipla aquisição de relação de simbiose com dinoflagelados fotossintetizantes.

Embora o mitogenoma de *Polycyathus* incluído na filogenia esteja indicado no NCBI como *Polycyathus* sp., trata-se de *Polycyathus chaishanensis* (Lin et al., 2012b). Nas filogenias em que essa espécie foi incluída, seu posicionamento foi similar ao recuperado no presente trabalho (próximo a Coscinareidae, Psammocoridae e Fungiidae; Lin et al., 2012b), mas em outros estudos em que a única espécie representando o gênero foi *P. muellerae* (Le Goff-Vitry et al., 2004; Barbeitos et al., 2010; Kitahara et al., 2016), essa diverge junto a *Paracyathus* e *Cladocora*. Assim, conforme já mencionado em Lin e colaboradores (2012b), *Polycyathus* aparentemente não é monofilético, mas faz-se necessária a inclusão do mitogenoma de *P. muellerae* ou de outros congêneres na filogenia para confirmação definitiva.

Assim como para os gêneros de Caryophylliidae discutidos acima, a sistemática baseada apenas em caracteres morfológicos ainda não possui a robustez para detectar o polifiletismo do gênero *Trochocyathus,* atualmente composto por 30 espécies Recentes (Cairns, 2009). Dados moleculares indicam que *T. efateensis* pertence ao clado "Robust" enquanto *T. rhombocolumna* parece ser mais próximo de Turbinoliidae e Fungiacyathidae, divergindo em "Complex" (Kitahara et al., 2010a, 2010b; Stolarski et al., 2011; Kitahara et al., 2016). A espécie incluída no presente estudo, *Trochocyathus caryophyllioides,* parece ser mais próxima de *T. efateensis*, divergindo próximo a *Plesiastrea versipora*. Contudo, em Kitahara e colaboradores (2016), *T. efateensis* foi recuperado em um mesmo clado que *P. versipora* e *Cyathelia axillaris,* enquanto o presente estudo recuperou-o como

uma linhagem divergindo antes de *P. versipora*. A proximidade desses três gêneros tem sido discutida com estranhamento ao se considerar o hábito de vida (*P. versipora* sendo a única zooxantelada e de águas rasas) e morfologia geral deles (Kitahara et al., 2010a; Benzoni et al., 2011), mas características morfológicas já foram apontadas como indicativo de possível suporte para esse clado (Benzoni et al., 2011). Consequentemente faz-se necessária a inclusão de mais espécimes de *Trochocyathus,* além de *T. efateensis* e *Cyathelia axillaris* para observar como *T. caryophyllioides* seria recuperada em relação a esse clado. Para confirnar se a característica apontada por Benzoni e colaboradores (2011) de fato definiria o clado *Cyathelia* + *P. versipora* + *T. efateensis*, seria interessante buscar se ela está presente em *T. caryophyllioides* e *T. rhombocolumna*.

Outro representante de Caryophylliidae com genoma mitocondrial determinado no presente estudo de forma seminal foi *Paraconotrochus antarticus,* o qual figura como uma das primeiras linhagens a divergirem dentro dos corais "Robust". Até onde foi possível pesquisar, este parece ser o primeiro trabalho a incluir dados moleculares dessa espécie (consulta à base de dados de nucleotídeos do NCBI em 29/12/2019). Considerando que *P. antarticus* parece fazer parte do mesmo clado onde se encontram *Conotrochus*, *Vaughanella* e *Stephanocyathus* (Kitahara et al., 2010a), seu posicionamento no presente estudo parece condizente com o esperado (Kitahara et al., 2016; Le Goff-Vitry et al., 2004; Stolarski et al., 2011). De qualquer modo, será incluído o mitogenoma de ao menos mais uma espécie desse clado, *Stephanocyathus coronatus* (outra espécie morfologicamente reconhecida como pertencente a Caryophylliidae), com o objetivo de confirmar se esses organismos serão recuperados, de fato, em um grupo monofilético. Entretanto, ao contrário do posicionamento dessa espécie na filogenia, a localização do gene *trnM* em seu mitogenoma difere daquela observada para a vasta maioria dos Scleractinia (entre *cox1* e 16S; Figura 4.3.1; Lin et al., 2014), sendo encontrado entre os genes *nad4* e 12S. Consequentemente, assim como no caso de *Stephanocoenia intersepta*, ainda se faz necessário verificar se há essa alteração em outras espécies próximas (e.g. *Stephanocyathus coronatus*).

4.4.6. *Madrepora*

A espécie *Madrepora oculata* (família Oculinidae) diverge logo após o clado formado pela família Pocilloporidae em uma linhagem distinta. Embora a topologia das filogenias publicadas varie na posição específica de *M. oculata*, esta espécie sempre foi recuperada

junto aos corais do grupo “Robust”, presente em uma linhagem monotípica e distante de outro gênero morfologicamente classificado como Oculinidae, *Oculina* (Le Goff-Vitry et al., 2004; Kitahara et al., 2010a; Kitahara et al., 2014; Kitahara et al., 2016). Com isso, a validade de Oculinidae foi anteriormente questionada, sendo sugerido que *M. oculata* e demais congêneres provavelmente compõem uma nova família (Le Goff-Vitry et al., 2004; Kitahara et al., 2016). A inclusão de uma biblioteca já sequenciada de *Oculina diffusa* permitirá investigar seu posicionamento em relação a *Madrepora* a nível mitogenômico e observar se *Oculina* também apresenta o rearranjo encontrado em *Madrepora* (ordem dos genes *cox3* e *cox2* invertida; Lin et al., 2012a). Ademais, a designação de uma família para essa espécie deve incluir dados moleculares de outras espécies de *Madrepora*, uma vez que as sequências publicamente disponíveis englobam apenas *M. oculata*, com exceção de um registro identificado como *Madrepora* sp. (número de acesso LT631286, banco de dados NCBI consultado em 02/01/2020).

4.4.7. *Plerogyra*

No presente estudo, *Plerogyra sinuosa* foi recuperada com alto suporte estatístico como grupo irmão de *Phyllangia americana*+*Paracyathus pulchellus*+*Cladocora* sp. +*Astrangia*. Entretando, em outros trabalhos, *P. sinuosa* é posicionada como grupo irmão da linhagem que inclui *Plesiatraea*, *Trochocyathus efateensis* e *Cyathella*, entre outros (Benzoni et al., 2014; Kitahara et al., 2010a; Kitahara et al., 2016). Características morfológicas dos pólipos somadas a dados moleculares indicam que o clado formado por *Plerogyra*, *Blastomussa*, *Nemenzophylla* e *Physogyra* corresponde a uma família distinta (Benzoni et al., 2014), mas não foram incluídos na análise espécimes do clado formado por *Cladocora*, *Phyllangia americana*, *Astrangia*, *Paracyathus*, etc. Dessa forma, torna-se relevante comparar a morfologia desses gêneros à de *Plerogyra* assim como incluir pelo menos mais uma espécie do clado *Plerogyra*+*Blastomussa*+*Nemenzophylla*+*Physogyra* na filogenia do presente estudo.

4.4.8. *Leptastrea* + Fungiidae

O gênero *Leptastrea* é comumente recuperado como uma linhagem próxima a Fungiidae (Romano e Cairns, 2000; Fukami et al., 2008; Kitahara et al., 2010a; Benzoni et al., 2012; Kitahara et al., 2016) e, no presente estudo, *Leptastrea pruinosa* foi recuperada como grupo irmão de *Heliofungia actiniformes,* o que indica que *L. pruinosa* pode

pertencer a Fungiidae. *Leptastrea* atualmente apresenta posicionamento incerto (*incertae sedis*), mas a revisão taxonômica que a excluiu da família Faviidae com base em características macromorfológicas e microestruturais (Budd et al., 2012) não parece ter incluído membros da família Fungiidae. Portanto, a presente reconstrução filogenética reforça a necessidade de se comparar características morfologicas de *Leptastrea* a Fungiidae.

4.4.9. Lobophylliidae e Faviidae

As famílias Lobophylliidae, Faviidae e Merulinidae formaram clados monofiléticos, mas Lobophylliidae foi recuperada como grupo irmão de Merulinidae. Embora essa topologia contradiga a encontrada em alguns estudos (e.g. Kitahara et al., 2016), nos quais Lobophylliidae seria grupo irmão de Faviidae, é suportada por outros (Huang et al., 2011, 2014). Considerando que Faviidae inclui corais ocorrentes no Oceano Atlântico enquanto Lobophylliidae e Merulinidae, corais do Pacífico, a topologia do presente estudo reflete a separação geográfica entre essas famílias, padrão que tem sido discutido e utilizado em estudos taxonômicos (Budd et al., 2012; Fukami et al., 2004; Fukami et al., 2008; Huang et al., 2011, 2014). Com isso, embora haja filogenias que não seguem a topologia observada no presente estudo, é possível que se trate de um padrão biológico/evolutivo significativo.

Quanto aos suportes dentro dessas três famílias, Merulinidae e Faviidae apresentaram alguns ramos com valores baixos, assim como houve divergências entre as topologias recuperadas utilizando Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana. Isso indica que, embora o DNA mitocondrial tenha se mostrado adequado para elucidação das relações entre famílias, aparentemente é conservado para analisar as linhagens dentro delas, o que confirma o discutido em Shearer e colaboradores (2002) e Huang e colaboradores (2008).

4.4.10 Outros corais e observações gerais

A topologia obtida para a presente reconstrução filogenética condiz, de modo geral, com a literatura. Parte dos clados que apresentaram alguma divergência pode ser justificada diretamente por características morfológicas ou geográficas (e.g. Lobophylliidae, Merulinidae e Faviidae) e há grupos (e.g. Plerogyra e *Leptastrea* + Fungiidae) nos quais mesmo que essa discussão não tenha sido possível, indicam linhagens com posicionamento incerto ou pouco estudadas de forma comparativa. Além

disso, a topologia foi associada à possível restrita resolução do marcador em certos clados (e.g. *Cyathotrochus pileus* + Flabellidae). Desse modo, é possível concluir que o uso de mitogenomas para reconstrução filogenética da ordem Scleractinia é robusto principalmente para linhagens mais antigas.

Ainda não foi possível formular hipóteses a respeito do futuro dessa ordem, mas os próximos passos incluem calibração da filogenia, mapeamento de dados paleoclimáticos e, possivelmente, testes de seleção para características das diferentes espécies (e.g. zooxantelada ou azooxantelada, presença ou ausência de íntron do gene *cox1*, presença e tipo de rearranjo, etc.). Além disso, a inclusão de determinadas espécies e comparação com uma filogenia apenas composta por marcadores nucleares auxiliarão na compreensão da história evolutiva de Scleractinia.

5 CAPÍTULO 5: CONCLUSÃO GERAL

Com relação ao objetivo geral do trabalho, ou seja, a reconstrução da história evolutiva de Scleractinia utilizando genomas mitocondriais:

- 103 bibliotecas foram sequenciadas e 62 mitogenomas foram montados até o momento. Para algumas espécies, trata-se do primeiro conjunto de dados moleculares (e.g. *Paraconotrochus antarticus*);
- Três tipos de rearranjos de genes mitocondriais foram observados, sendo dois até então desconhecidos;
- O grupo "Basal" não se mostrou monofilético, contradizendo filogenias moleculares anteriores e fortalecendo as grandes diferenças morfológicas entre as espécie das famílias que compõem esse grupo;
- O gênero *Anthemiphyllia* foi recuperado pela primeira vez como um clado monofilético;
- Um espécime de *Distolotrochus* indica que esse gênero pertença a uma nova família;

Portanto, esse objetivo foi concluído com sucesso e seus resultados podem vir a contrapor resultados anteriormente obtidos, consequentemente contribuindo para a elucidação da história evolutiva da ordem Scleractinia

Quanto à otimização da metodologia para obtenção de mitogenomas em Scleractinia:

- Apenas o protocolo miniprep parece ter funcionado, mas seu sucesso ainda será confirmado;
- A quantidade grande de tecido inicial necessária para que protocolos de enriquecimento de DNA mitocondrial gerem quantidade de produto adequada dificulta seu uso para grupos de tamanho pequeno e corais azooxantelados de mar profundo
- Mesmo sem o uso de técnicas de enriquecimento, é possível obter mitogenomas a partir de WGS
- Tentativas de separar Symbiodiniaceae do tecido não foram bem sucedidas
- O protolo TruSeq DNA Nano mostrou-se robusto a uma menor integridade do DNA e

parâmetros alternativos de fragmentação viabilizam o uso de amostras com diferentes graus de integridade do DNA

- Quanto ao aparecimento frequente de picos de dímeros em bibliotecas, a diluição de adaptadores não parece ser fundamental na redução de sua ocorrência, mas o aumento do número de ciclos na reação de PCR é.

Alterações no protocolo de preparação de bibliotecas mostraram-se fundamentais para o seu sucesso. Com relação a protocolos de enriquecimento de DNA mitocondrial, ainda que essas técnicas seja possível em corais, esses mostraram ser não ser triviais para a montagem de mitogenomas, tanto em corais zooxantelados quanto azooxantelados.

6 REFERÊNCIAS

Addamo, A. A.; Vertino, A.; Stolarski, J.; García-Jiménez, R.; Taviani, M. & Machordom, A. 2016. Merging scleractinian genera: the overwhelming genetic similarity between solitary *Desmophyllum* and colonial *Lophelia*. BMC Evolutionary Biology, 16(1): 108.

Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W. & Lipman, D. J. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, 215 (1): 403-410.

Anthony, K. R. N.; Kline, D. I.; Diaz-Pulido, G.; Dove, S. & Hoegh-Guldberg, O. 2008. Ocean acidification causes bleaching and productivity loss in coral reef builders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 105(45): 17442-17446.

Bankevich, A.; Nurk, S.; Antipov, D.; Gurevich, A.A.; Dvorkin, M.; Kulikov, A.S.; Lesin, V.M.; Nikolenko, S.I.; Pham, S.; Prjibelski, A.D.; Pyshkin, A.V.; Sirotkin, A.V.; Vyahhi, N.; Tesler, G.; Alekseyev, M.A. & Pevzner, P.A. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5), 455–477.

Barbeitos, M. S.; Romano, S. L. & Lasker, H. R. 2010. Repeated loss of coloniality and symbiosis in scleractinian corals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(26): 11877–11882.

Beagley, C. T.; Okimoto, R. & Wolstenholme, R. 1998. The mitochondrial genome of the sea anemone *Metridium senile* (Cnidaria): introns, a paucity of tRNA genes, and a near-standard genetic code. *Genetics*, 148(1): 1091-1108.

Beckman Coulter, 2012. *SPRIselect User Guide: SPRI Based Size Selection*. Disponível em: https://research.fhcrc.org/content/dam/stripe/hahn/methods/mol_biol/SPRIselect%20User%20Guide.pdf (Acesso: Ago-2018).

Bellis, E. S.; Howe, D. K. & Denver, D. R. 2016. Genome-wide polymorphism and signatures of selection in the symbiotic sea anemone *Aiptasia*. BMC Genomics, 17(1):160.

Benzoni, F.; Arrigoni, R.; Stefani, F. & Pichon, M. 2011. Phylogeny of the coral genus *Plesiastrea* (Cnidaria, Scleractinia). *Contributions to Zoology*, 80 (4): 231-249.

Benzoni, F.; Arrigoni, R.; Stefani, F.; Reijnen, B. T.; Montano, S. & Hoeksema, B. W. 2012. Phylogenetic position and taxonomy of *Cycloseris explanulata* and *C. wellsi*(Scleractinia: Fungiidae): lost mushroom corals find their way home. *Contributions to Zoology*, 81 (3): 125-146.

Benzoni, F.; Arrigoni, R.; Waheed, Z.; ; Stefani, F. & Hoeksema, B. W. 2014. Phylogenetic relationships and revision of the genus *Blastomussa* (Cnidaria: Anthozoa: Scleractinia) with description of a new species. *Raffles Bulletin of Zoology*, 62(1): 358–378.

Bernt, M.; Donath, A.; Jühling, F. Externbrink, F.; Florentz, C.; Fritzsch, G.; Pütz, J.; Middendorf, M.; Stadler, P. F. 2013. MITOS: improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69(2): 313-319.

Besnard, G.; Bertrand, J. A. M.; Delahaie, B.; Bourgeois Y. X. C.; Lhuillier, E. & Théaud, C. 2016. Valuing museum specimens: high-hroughput DNA sequencing on historical collections of New Guinea crowned pigeons (*Goura*). *Biological Journal of the Linnean Society,* 117(1): 71-82.

Bolger, A.M.; Lohse, M. & Usadel, B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15): 2114–2120.

Botelho, M. L. L. A.; Ávila-da-Silva, A. O. & Bastos, G. C. C. 2009. A evolução da pesca paulista de *Lophius gastrophysus* (Miranda-Ribeiro, 1915) na margem continental da costa brasileira entre 22° e 28°S. *Boletim do Instituto de Pesca*, 35(3): 413-427.

Brockman, S. A. & McFadden, C. S. 2012. The mitochondrial genome of *Paraminabea aldersladei* (Cnidaria: Anthozoa: Octocorallia) supports intramolecular recombination as the primary mechanism of gene rearrangement in octocoral mitochondrial genomes. *Genome Biology and Evolution*, 4(9): 994-1006.

Brown, B. E. 1997. Coral bleaching: causes and consequences. *Coral Reefs,* 16(Suplemento 1): S129-S138.

Brugler, M. R. & France, S. C. 2007. The complete mitochondrial genome of the black coral *Chrysopathes formosa* (Cnidaria:Anthozoa:Antipatharia) supports classification of antipatharians within the subclass Hexacorallia. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42(1): 776-788.

Brusca, R. C. & Brusca, G. J. 2007. *Invertebrados*. Traduzido por: Silveira, F.L. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Budd, A.F.; Fukami, H.; Smith, N. D. & Knowlton, N. 2012. Taxonomic classification of the reef coral family Mussidae (Cnidaria: Anthozoa: Scleractinia). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 166(1): 465–529.

Cairns, S. D. 1982. Antarctic and subantarctic Scleractinia. *Antarctic Research Series,* 34(1): 1-74.

Cairns, S. D. 2007. Deep-water corals: an overview with special reference to diversity and distribution of deep-water scleractinian corals. *Bulletin of Marine Science,* 81(3): 311-322.

Cairns, S.D. 2009. Phylogenetic list of 722 valid recent azooxanthellate scleractinian species, with their junior synonyms and depth ranges. *In:* Roberts, J.M.; Wheeler, A.; Freiwald, A.; Cairns, S.D. (eds) *Cold-water corals: the biology and geology of deep-sea coral habitats*. Cambridge University Press, Cambridge, Online appendix.

Caldwell, R. 2008. *Introduction to Cnidaria*. Museum of Paleontology - University of California. Disponível em: http://www.ucmp.berkeley.edu/cnidaria/cnidaria.html (Acesso: 28-Mai-2017).

Canadell, J. G.; Le Quéré, C.; Raupach, M. R.; Field, C. B.; Buitenhuis, E. T.; Ciais, P.; Conway, T. J.; Gillett, N. P.; Houghton, R. A. & Marland, G. 2007. Contributions to accelerating atmospheric CO2 growth from economic activity, carbon intensity, and efficiency of natural sinks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(47): 18866-18870.

Celis, J. S.; Wibberg, D.; Winkler, A.; Wilke, T. & Kalinowski, J. 2016. Complete mitochondrial genome of the scleractinian coral *Porites rus*. *Mitochondrial DNA Part A*, 1(1): 1-2.

Celis, J. S.; Edgell, D. R.; Stelbrink, B.; Wibberg, D.; Hauffe, T.; Blom, J.; Kalinowski, J. & Wilke, T. 2017. Evolutionary and biogeographical implications of degraded LAGLIDADG endonuclease functionality and group I intron occurrence in stony corals (Scleractinia) and mushroom corals (Corallimorpharia). *PloS One*, 12(3): e0173734.

Chen, C.; Chiou, C.-Y.; Dai, C.-F. & Chen, C. A. 2008a. Unique mitogenomic features in the Scleractinian family Pocilloporidae (Scleractinia: Astrocoeniina). *Marine Biotechnology,* 10(1): 538-553.

Chen, C.; Dai, C. F.; Plathong, S.; Chiou, C. Y. & Chen, C. A. 2008b. The complete mitochondrial genomes of needle corals, *Seriatopora* spp. (Scleractinia: Pocilloporidae): An idiosyncratic *atp8,* duplicated trnW gene, and hypervariable regions used to determine species phylogenies and recently diverged populations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46(1): 19-33.

Chevreux, B.; Wetter, T. & Suhai, S. 1999. Genome Sequence Assembly Using Trace Signals and Additional Sequence Information. *Computer Science and Biology: Proceedings of the German Conference on Bioinformatics (GCB),* 99 (1): 45-56.

Chi, S. I. & Johansen, S. D. 2017. Zoantharian mitochondrial genomes contain unique complex group I introns and highly conserved intergenic regions. *Gene*, 628(1): 24-31.

Chuang, Y.; Kitahara, M. V.; Fukami, H.; Tracey, D.; Miller, D. J. & Chen, C. A. 2017. Loss and Gain of Group I Introns in the Mitochondrial Cox1 Gene of the Scleractinia (Cnidaria; Anthozoa). *Zoological Studies*, 56(1): 9.

Chuang, Y. & Chen, C.A. 2016. The complete mitochondrial genomes of Pseudosiderastrea spp (Cnidaria, Scleractinia, Siderastreidae). *Mitochondrial DNA Part A*, 27(6): 4065-4066.

Coleman, A. W.; Suarez, A. & Goff, L. J. 1994. Molecular delineation of species and syngens in volvocacean green algae (Chlorophyta). *Journal of Phycology,* 30(1): 80-90.

Dai, C.F. & Horng, S. 2009. *Scleractinia fauna of Taiwan II. The Robust group*. Taipei: National Taiwan University.

Daly, M.; Brugler, M. R.; Cartwright, P.; Collins, A. G.; Dawson, M. N.; Fautin, D. G.; France, S. C.; McFadden, C. S.; Opresko, D. M.; Rodriguez, E.; Romano, S. L. & Stake, J. L. 2007. The phylum Cnidaria: a review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. *Zootaxa*, 1668(1): 127-182.

Don, R. H.; Cox, P. T.; Wainwright, B. J.; Baker, K. & Mattick, J. S. 1991. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research,* 19(14): 4008.

Dowton, M.; Cameron, S. L.; Dowavic, J. I.; Austin, A. D. & Whiting, M. F. 2009. Characterization of 67 mitochondrial tRNA gene rearrangements in the Hymenoptera suggests that mitochondrial tRNA gene position is selectively neutral. *Molecular Biology and Evolution*, 26(7): 1607-1617.

Emblem, A.; Karlsen, B. O.; Evertsen, J. & Johansen, S. D. 2011. Mitogenome rearrangement in the cold-water scleractinian coral *Lophelia pertusa* (Cnidaria, Anthozoa) involves a long-term evolving group I intron. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61(1): 495-503.

Emblem, A.; Karlsen, B. O.; Evertsen, J.; Miller, D. J.; Moum, T. & Johansen, S. D. 2012. Mitogenome polymorphism in a single branch sample revealed by SOLiD deep sequencing of the *Lophelia pertusa* coral genome. *Gene*, 506(1): 344-349.

Emblem, A.; Okkenhaug, S.; Weiss, E. S.; Denver, D. R.; Karlsen, B. O.; Moum, T. & Johansen, S. D. 2014. Sea anemones possess dynamic mitogenome structures. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 75(1): 184-193.

Fine, M. & Tchernov, D. 2007. Scleractinian coral species survive and recover from decalcification. *Science,* 315(5820): 1811.

Flot, J. F.; Dahl, M. & André, C. 2013. *Lophelia pertusa* corals from the Ionian and Barents seas share identical nuclear ITS2 and near-identical mitochondrial genome sequences. *BMC Research Notes*,

6(1):144.

Françoso, E.; Gomes, F. & Arias, M. C. 2015. A protocol for isolating insect mitochondrial genomes: a case study of NUMT in *Melipona flavolineata* (Hymenoptera: Apidae). *Mitochondrial DNA Part A,* 27(4): 2401-2404.

Fukami, H.; Budd, A.F.; Paulay, G.; Solé-Cava, A.; Chen, C.A.; Iwao, K. & Knowlton, N. 2004. Conventional taxonomy obscures deep divergence between Pacific and Atlantic corals. *Nature*, 427(1): 832-835.

Fukami, H.; Chen, C. A.; Budd, A. F.; Collins, A.; Wallace, C.; Chuang, Y. Y.; Chen, C.; Dai, C. F.; Iwao, K.; Sheppard, C. & Knowlton, N. 2008. Mitochondrial and nuclear genes suggest that stony corals are monophyletic but most families of stony corals are not (Order Scleractinia, Class Anthozoa, Phylum Cnidaria). *PLoS One*, 3(9): e3222.

Garber, R. C. & Yoder, O. C. 1983. Isolation of DNA from filamentous Fungi and separation into nuclear, mitochondrial, ribosomal, and plasmid components. *Analyical Biochemistry*, 135(1), 416-422.

Gene Codes Corporation, 2017. *Sequencher: DNA Sequencing Software*. Disponível em: http://www.genecodes.com/sequencher (Acesso: 09-Mai-2017).

Glynn, P. W. 1993. Coral reef bleaching: ecological perspectives. *Coral Reefs*, 12 (1): 1-17.

Goddard, M. R.; Leigh, J.; Roger, A. J. & Pemberton. A. J. 2006. Invasion and Persistence of a Selfish Gene in the Cnidaria. *PloS One*, 1(1): e3.

Le Goff-Vitry, M.C.; Rogers, A.D. & Baglow, D. 2004. A deep-sea slant on the molecular phylogeny of the Scleractinia. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30(1): 167–177.

Gordon, B. R. & Leggat, W. 2010. *Symbiodinium*: invertebrate symbioses and the role of metabolomics. *Marine Drugs*, 8(1): 2546-2568.

Guinotte, J. M. & Fabry, V. J. 2008. Ocean acidification and its potential effects on marine ecosystems. *Annals of the New York Academy of Sciences,* 1134 (1): 320-342.

Hahn, C.; Bachmann, L. & Chevreux, B. 2013. Reconstructing mitochondrial genomes directly from genomic next-generation sequencing reads - a baiting and iterative mapping approach. *Nucleic Acids Research*, 41(13): e129.

Hartog, J.C.1980. Caribbean shallow water Corallimorpharia. *Zoologische Verhandelingen*, 176(1): 1-83.

Hoegh-Guldberg, O.; Mumby, P. J.; Hooten, A. J.; Steneck, R. S.; Greenfield, P.; Gomez, E.; Harvell, C. D.; Sale, P. F.; Edwards, A. J.; Caldeira, K.; Knowlton, N.; Eakin, C. M.; Iglesias-Prieto, R.; Muthiga, N.; Bradbury, R. H.; Dubi, A. & Hatziolos, M. E. 2007. Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Science,* 318(5857): 1737-1742.

Hogan, R. I.; Hopkins, K.; Wheeler, A. J.; Allcock, A. L. & Yesson, C. 2019. Novel diversity in mitochondrial genomes of deep-sea Pennatulacea (Cnidaria: Anthozoa: Octocorallia). *Mitochondrial DNA Part A*, 30(6), 764-777.

Hönisch, B.; Ridgwell, A.; Schmidt, D. N.; Thomas, E.; Gibbs, S. J.; Sluijs, A.; Zeebe, R.; Kump, L.; Martindale, R. C.; Greene, S. E.; Kiessling, W.; Ries, J.; Zachos, J. C.; Royer, D. L.; Barker, S.; Marchitto, T. M.; Moyer, R.; Pelejero, C.; Ziveri, P.; Foster, G. L. & Williams, B. 2012. The geological record of ocean acidification. *Science*, 335(6072): 1058-1063.

Huang, D.; Meier, R.; Todd, P. A.; Chou, L. M. 2008. Slow mitochondrial COI sequence evolution at the base of the metazoan tree and its implications for DNA barcoding. *Journal of Molecular Evolution*, 66: 167-174.

Huang, D.; Licuanan, W.Y., Baird, A.H. & Fukami, H. 2011. Cleaning up the 'Bigmessidae': molecular phylogeny of scleractinian corals from Faviidae, Merulinidae, Pectiniidae and Trachyphylliidae. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1): 37.

Huang, D.; Benzoni, F.; Fukami, H.; Knowlton, N.; Smith, N.D. & Budd, A.F. 2014. Taxonomic classification of the reef coral families Merulinidae, Montastraeidae, and Diploastraeidae (Cnidaria: Anthozoa: Scleractinia). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 171 (1): 277–355.

Hughes, T. P.; Kerry, J. T.; Álvarez-Noriega, M.; Álvarez-Romero, J. G.; Anderson, K. D.; Baird, A. H.; Babcock, R. C.; Beger, M.; Bellwood, D. R.; Berkelmans, R.; Bridge, T. C.; Butler, I. R.; Byrne, M.; Cantin, N. E.; Comeau, S.; Connolly, S. R.; Cumming, G. S.; Dalton, S. J.; Diaz-Pulido, G.; Eakin, C. M.; Figueira, W. F.; Gilmour, J. P.; Harrison, H. B.; Heron, S. F.; Hoey, A. S.; Hobbs, J. P. A.; Hoogenboom, M. O.; Kennedy, E. V.; Kuo, C.; Lough, J. M.; Lowe, R. J.; Liu, G.; McCulloch, M. T.; Malcolm, H. A.; McWilliam, M. J.; Pandolfi, J. M.; Pears, R. J.; Pratchett, M. S.; Schoepf, V.; Simpson, T.; Skirving, W. J.; Sommer, B.; Torda, G.; Wachenfeld, D. R.; Willis, B. L. & Wilson, S. K. 2017. Global warming and recurrent mass bleaching of corals. *Nature,* 543(1): 373-377.

Illumina, 2013. *MiSeq System Guide Part # 15027617 Rev. H*. Illumina. Disponível em: http://application.sb-roscoff.fr/download/fr2424/abims/corre/ngs/1_illumina/MiSeq%20System

%20User%20Guide%20(15027617).pdf (Acesso: Ago-2018).

Illumina, 2015. *Library QC and Troubleshooting with the BioAnalyzer* . Bento, R. S.; Illumina Technical Support. Disponível em: http://www.science.smith.edu/wp-content/uploads/sites/36/2015/09/LibraryQC_andTroubleshooting_June-2015.pdf (Acesso: Ago-2018).

Illumina, 2017a. *Cluster density guidelines for Illumina sequencing platforms*. Illumina. Disponível em: https://www.illumina.com/search.html?q=cluster%20density&filter=support&p=1 (Acesso: Ago-2018).

Illumina, 2017b. *TruSeq DNA Nano Reference Guide (1000000040135)*. Illumina. Disponível em: https://www.illumina.com/search.html?q=truseq%20nano&filter=manuals&p=1 (Acesso: Jul-2018).

IPCC, 2013. Summary for Policymakers. *In:* Stocker, T. F.; Qin, D.; Plattner, G.-K.; Tignor, M.; Allen, S. K.; Boschung, J.; Nauels, A.; Xia, Y.; Bex, V. & Midgley, P. M. (eds.). *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

Janiszewska K.; Stolarski, J.; Benzerara, K.; Meibom, A.; Mazur, M.; Kitahara, M.V. & Cairns, S.D. 2011. A Unique Skeletal Microstructure of the Deep-Sea Micrabaciid Scleractinian Corals. *Journal of Morphology*, 272(1): 191-203.

Janiszewska, K.; Jaroszewicz, J. & Stolarski J. 2013. Skeletal Ontogeny in Basal Scleractinian Micrabaciid Corals. *Journal of Morphology*, 274(1):243–257.

Jones, C. 2012. *fastq-tools*. Disponível em https://homes.cs.washington.edu/~dcjones/fastq-tools/ (Acesso Dez-2018).

Kaniewska, P.; Magnúson, S.; Anthony, K.; Reef, R.; Kül, M. & Hoegh-Guldberg, O. 2011. Importance of macro- versus microstructure in modulating light levels inside coral colonies. *Journal of Phycology,* 47(1): 846-860.

Katoh, K.; Misawa, K.; Kuma, K. & Miyata, T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30 (14): 3059-3066.

Kayal, E.; Roure, B.; Philippe, H.; Collins, A. G. & Lavrov, D. V. 2013. Cnidarian phylogenetic relationships as revealed by mitogenomics. *BMC Evolutionary Biology*, 13(1): 5.

Kearse, M.; Moir, R.; Wilson, A.; Stones-Havas, S.; Cheung, M.; Sturrock, S.; Buxton, S.; Cooper, A.; Markowitz, S.; Duran, C.; Thierer, T.; Ashton, B.; Meintjes, P. & Drummond, A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics,* 28(12): 1647-1649.

Kitahara, M. V. 2007. Species richness and distribution of azooxanthellate Scleractinia in Brazil. *Bulletin of Marine Science,* 81(3): 497-518.

Kitahara, M. V. 2009. A pesca demersal de profundidade e os bancos de corais azooxantelados do sul do Brasil. *Biota Neotropica,* 9(2): 35-43.

Kitahara, M. V.; Cairns, S. D.; Stolarski, J.; Blair, D. & Miller, D. 2010a. A comprehensive phylogenetic analysis of the Scleractinia (Cnidaria, Anthozoa) based on mitochondrial CO1 sequence data. *PLoS One,* 5(7): e11490.

Kitahara, M.V.; Cairns, S.D. & Miller, D.J. 2010b. Monophyletic origin of Caryophyllia (Scleractinia, Caryophylliidae), with descriptions of six new species. *Systematics and Biodiversity,* 8(1): 91–118.

Kitahara, M. V.; Lin, M. F.; Forêt, S.; Huttley, G.; Miller, D. J. & Chen, C. A. 2014. The "Naked coral" hypothesis revisited: evidence for and against scleractinian monophyly. *PLoS One,* 9(4): e94774.

Kitahara, M.V.; Fukami, H.; Benzoni, F. & Huang D. 2016. The New Systematics of Scleractinia: Integrating Molecular and Morphological Evidence. *In:* Goffredo, S.; Dubinsky, Z. (eds.) *The Cnidaria, Past, Present and Future*, Springer International Publishing, Switzerland.

Kitahara, M. V.; Cairns, S. D.; Stolarski, J.; Wallace, C. W.; Chen, C. A. & Miller, D. J. *Em preparação* a. The deep-sea migration by scleractinian corals: roles of competition and climate change.

LaJeunesse,T. C.; Parkinson, J. E.; Gabrielson, P. W.; Jeong, H. J.; Reimer, J. D.; Voolstra, C. R. & Santos, S. R. 2018. Systematic Revision of Symbiodiniaceae Highlights the Antiquity and Diversity of Coral Endosymbionts. *Current Biology*, 28(16): 2570-2580.

LaJeunesse, T. C. & Trench, R. K. 2000. Biogeography of two species of *Symbiodinium* (Freudenthal) inhabiting the intertidal sea anemone *Anthopleura elegantissima* (Brandt). *Biological Bulletin*, 199(1): 126-134.

Lamble, S.; Batty, E.; Attar, M.; Buck, D.; Bowden, R.; Lunter, G.; Crook, D.; El-Fahmawi, B. & Piazza, P. 2013. Improved workflows for high throughput library preparation using the transposome-based

nextera system. *BMC Biotechnology,* 13(1):104.
Lavrov, D. V. & Pett, W. 2016. Animal mitochondrial DNA as we do not know it: mt-genome organization and evolution in nonbilaterian lineages. *Genome Biology and Evolution*, 8(9): 2896-2913.
Liew, Y. J.; Aranda, M. & Voolstra, C. R. 2016. Reefgenomics.Org: a repository for marine genomics data. *Database*, 2016(1): baw152.
Lin, M. F.; Luzon, K. S.; Licuanan, W. Y.; Ablan-Lagman, M. C. & Chen, C. A. 2011. Seventy-four universal primers for characterizing the complete mitochondrial genomes of scleractinian corals (Cnidaria: Anthozoa). *Zoological Studies*, 50(4): 513-524.
Lin, M. F.; Kitahara, M. V.; Tachikawa, H.; Fukami, H.; Miller, D. J. & Chen, C. A. 2012a. Novel organization of the mitochondrial genome in the deep-sea coral, *Madrepora oculata* (Hexacorallia, Scleractinia, Oculinidae) and its taxonomic implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 65(1): 323-328.
Lin, M.F.; Kitahara, M.V.; Tachikawa, H.; Keshavmurthy, S. & Chen, C.A. 2012b. A New Shallow-Water Species, *Polycyathus chaishanensis* sp. nov. (Scleractinia: Caryophylliidae), from Chaishan, Kaohsiung, Taiwan. *Zoological Studies*, 51(2): 213-221.
Lin, M. F.; Kitahara, M. V.; Luo, H.; Tracey, D.; Geller, J.; Fukami, H.; Miller, D. J. & Chen, C. A. 2014. Mitochondrial genome rearrangements in the Scleractinia/Corallimorpharia complex: implications for coral phylogeny. *Genome Biology and Evolution*, 6(5): 1086-1095.
Lin, M. F.; Chou, W. H.; Kitahara, M. V.; Chen, C. L.; Miller, D. J. & Foret, S. 2016. Corallimorpharians are not "Naked corals": insights into relationships between Scleractinia and Corallimorpharia from phylogenomic analyses. *PeerJ*, 4(1): e2463.
Löser, H. (2019). Regional persistence of the extant coral genus *Stephanocoenia* since the Early Cretaceous in the Western Atlantic. *Paläontologische Zeitschrift*, 93: 1-23. https://doi.org/10.1007/s12542-019-00457-y
Luck, D.G.; Forsman, Z.H.; Toonen, R.J.; Leicht, S.J. & Kahng S.E. 2013. Polyphyly and hidden species among Hawai'i's dominant mesophotic coral genera, *Leptoseris* and *Pavona* (Scleractinia: Agariciidae). *Peer J*, 1: e132.
Luz, B. L. P. 2015. História evolutiva da família Dendrophylliidae (Cnidaria, Anthozoa) e sua correlação com variáveis paleoambientais, Programa de Pós-graduação em Sistemas Costeiros e Oceânicos, Universidade Federal do Paraná, Pontal do Paraná, Brasil.
Macher, J. N.; Zizka, V.; Weigand, A. M. & Leese, F. 2017. A simple centrifugation protocol leads to a 55-fold mitochondrial DNA enrichment and paves the way for future mitogenomic research. *bioRxiv*.
Maddison, W. P. 1997. Gene trees in species trees. *Systematic Biology,* 46(3): 523-536.
Martin, M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, 17(1): 10-12.
Medina, M.; Collins, A. G.; Silberman, J. D. & Sogin, M. L. 2001. Evaluating hypotheses of basal animal phylogeny using complete sequences of large and small subunit rRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(17): 9707-9712.
Medina, M.; Collins, A. G.; Takaoka, T. L.; Kuehl, J. V. & Boore, J. L. 2006. Naked corals: Skeleton loss in Scleractinia. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 103(24): 9096-9100.
Miller, M.A., Pfeiffer, W. & Schwartz, T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 1 – 8.
Miller, K.J.; Rowden, A.A.; Williams, A. & Haüssermann, V. 2011. Out of their depth? Isolated deep populations of the cosmopolitan coral desmophyllum dianthus may be highly vulnerable to environmental change. *PloS One*, 6(5): e19004.
Moseley, H.N. 1877. XV. On new Forms of Actiniaria dredged in the Deep Sea; with a Description of certain Pelagic Surface-swimming Species. *Transactions of the Linnean Society of London. 2nd Series: Zoology*, 1(1): 295-305.
Moseley, H.N. 1881. Report on certain hydroid, alcyonarian, and madreporarian corals procured during the voyage of H.M.S. Challenger, in the years 1873–1876. Report on the Scientific Results of the Voyage of H.M.S. Challenger during the years 1873–76. *Zoology*, 2 (part 7): 1-248.
NCBI (National Center for Biotechnology Information) 2019. *Nucleotide*. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/ (Acesso: 31-Dez-2019).
van Oppen, M. J. H.; Catmull, J.; McDonald, B. J.; Hislop, N. R.; Hagerman, P. J.; Miller, D. J. 2000. The mitochondrial genome of Acropora tenuis (Cnidaria; Scleractinia) contains a large group I intron and a candidate control region. *Journal of Molecular Evolution*, 55(1): 1-13.
Owens, J.M. 1984. Evolutionary trends in the Micrabaciidae: an argument in favor of preadaptation. *Geologos,* 11(1): 87-93.

Owens, J. M. 1986. *Rhombopsammia*, a new genus of the family Micrabaciidae (Coelenterata: Scleractinia). *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 99(2): 248-256.

Palva, T. K. & Palva, E. T. 1985. Rapid isolation of animal mitochondrial by alkaline extraction DNA. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 192(2): 267-270.

Pandolfi, J. M.; Bradbury, R. H.; Sala, E.; Hughes, T. P.; Bjorndal, K. A.; Cooke, R. G.; McArdle, D.; McClenachan, L.; Newman, M. J. H.; Paredes, G.; Warner, R. R. & Jackson, J. B. C. 2003. Global trajectories of the long-term decline of coral reef ecosystems. *Science*, 301(5635): 955-958.

Paz-García, D. A.; Galván-Tirado, C.; Alvarado, J. J.; Cortés, J.; García-de-León, F. J.; Hellberg, M. E. & Balart, E. F. 2016. Variation in the whole mitogenome of reef-building *Porites* corals. *Conservation Genetics Resources*, 8(1): 123-127.

Pratlong, M.; Rancurel, C.; Pontarotti, P.; Aurelle, D. 2017. Monophyly of Anthozoa (Cnidaria): why do nuclear and mitochondrial phylogenies disagree? *Zoologica Scripta*, 46(3): 363-371.

Qiagen 2018. *Purification of archive-quality DNA from marine invertebrate tissue using the Gentra Puregene Tissue Kit.* Qiagen. Disponível em: https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=48786031-f38e-412f-a24b-3fa5cbaf5409&lang=en (Acesso: 03-Jun-2018).

Quail, M. A.; Kozarewa, I.; Smith, F.; Scally, A.; Stephens, P. J.; Durbin, R.; Swerdlow, H. & Turner, D. J. 2008. A large genome center's improvements to the Illumina sequencing system. *Nature Methods*, 5(12): 1005-1010.

Quispe-Tintaya, W.; White, R. R.; Popov, V. N.; Vijg, J. & Maslov, A. Y. 2013. Fast mitochondrial DNA isolation from mammalian cells for next-generation sequencing. *BioTechniques,* 55(3): 133-136.

Rädecker, N.; Pogoreutz, C.; Ziegler, M.; Ashok, A.; Barreto, M. M.; Chaidez, V.; Grupstra, C. G. B.; Ng, Y. M.; Perna, G.; Aranda, M. & Voolstra, C. R. 2017. Assessing the effects of iron enrichment across holobiont compartments reveals reduced microbial nitrogen fixation in the Red Sea coral *Pocillopora verrucosa*. *Ecology and Evolution,* 7(16): 6614-6621.

Ramanan, R. N.; Ling, T. C. & Ariff, A. B. 2008. The performance of a glass bead shaking technique for the disruption of *Escherichia coli* cells. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13(1): 613-623.

Reed, J. K. 2002. Deep-water *Oculina* coral reefs of Florida: biology, impacts and management. *Hydrobiologia*, 471(1): 43-55.

Robinson, P. K. 2015. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*, 59(1): 1-41.

Rogers, A. D. 1999. The biology of *Lophelia pertusa* (Linnaeus, 1758) and other deep-water reef-forming corals and impacts from human activities. *International Review of Hydrobiology,* 84(4): 315-406.

Romano, S. & Palumbi, S. R. 1996. Evolution of scleractinian corals inferred from molecular systematics. *Science,* 271(5249): 640-642.

Romano, S.L. & Cairns, S.D. 2000. Molecular phylogenetic hypotheses for the evolution of scleractinian corals. *Bulletin of Marine Science*, 67(3): 1043-1068.

Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics,* 19(12): 1572-1574.

Sanger, F.; Nicklen, S. & Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Procedures of the National Academy of Science USA, Biochemistry*, 74 (12): 5463-5467.

Shearer, T. L.; van Oppen, M. J. H.; Romano, S. L. & Wörheide, G. 2002. Slow mitochondrial DNA sequence evolution in the Anthozoa (Cnidaria). *Molecular Ecology*, 11(1), 2475-2487.

Sinniger, F. & Pawlowski, J. 2009. The partial mitochondrial genome of *Leiopathes glaberrima* (Hexacorallia: Antipatharia) and the first report of the presence of an intron in COI in black corals. *Galaxea Journal of Reef Studies*, 11(1): 21-26.

Sinniger, F.; Chevaldonné, P. & Pawlowski, J. 2007. Mitochondrial genome of *Savalia savaglia* (Cnidaria, Hexacorallia) and early metazoan phylogeny . *Journal of Molecular Evolution*, 64(1): 196-203.

Smith, E. G.; d'Angelo, C.; Salih, A. & Wiedenmann, J. 2013. Screening by coral green fluorescent protein (GFP)-like chromoproteins supports a role in photoprotection of zooxanthellae. *Coral Reefs,* 32(1): 463-474.

Squires, D. F. 1967. The evolution of the deep-sea coral family Micrabaciidae. *Studies in Tropical Oceanography*, 5(1): 502-510.

Stamatakis, A. 2014. RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9): 1312-1313.

Stampar, S. N.; Broe, M. B.; Macrander, J.; Reitzel, A. M.; Brugler, M. R. & Daly, M. 2019. Linear mitochondrial genome in Anthozoa (Cnidaria): a case study in Ceriantharia. *Scientific Reports*, 9(1): 6094.

Stanley, G. D.; Jr. & Fautin, D. G. 2001. The origins of modern corals. *Science*, 291(5510): 1913-1914.

Stolarski, J. 1996. *Gardineria*: a scleractinian living fossil. *Acta Palaeontologica Polonica*, 41(4): 339-367.

Stolarski, J.; Kitahara, M. V.; Miller, D. J.; Cairns, S. D.; Mazur, M. & Meibom, A. 2011. The ancient evolutionary origins of Scleractinia revealed by azooxanthellate corals. *BMC Evolutionary Biology,* 11(1): 316.

Terraneo, T. I.; Arrigoni, R.; Benzoni, F.; Forsman, Z. H. & Berumen, M. L. 2018a. The complete mitochondrial genome of *Porites harrisoni* (Cnidaria: Scleractinia) obtained using next-generation sequencing. *Mitochondrial DNA Part B*, 3(1): 286-287.

Terraneo, T. I.; Arrigoni, R.; Benzoni, F.; Forsman, Z. H. & Berumen, M. L. 2018b. Using ezRAD to reconstruct the complete mitochondrial genome of *Porites fontanesii* (Cnidaria: Scleractinia). *Mitochondrial DNA Part B*, 3(1): 173-174.

Tisthammer, K. H.; Forsman, Z. H.; Sindorf, V. L.; Massey, T. L.; Bielecki, C. R. & Toonen, R. J. 2016. The complete mitochondrial genome of the lobe coral *Porites lobata* (Anthozoa: Scleractinia) sequenced using ezRAD. *Mitochondrial DNA Part B*, 1(1): 247-249.

Trench, R. K. 1993. Microalgal-invertebrate symbioses: a review. *Endocytobiosis and Cell Research,* 9(2-3): 135-175.

Vaughan, T. W. & Wells, J. W. 1943. Revision of the suborders, families and genera of the Scleractinia. *Geological Society of America Special Papers*, 44(1): 1-394.

Xia, X. 2018. DAMBE7: New and improved tools for data analysis in molecular biology and evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6):1550-1552.

Ying, H.; Cooke, I.; Sprungala, S.; Wang, W.; Hayward, D.C.; Tang, Y. & Huttley, G.; Ball, E.E.; Forêt, S. & Miller, D.J. 2018. Comparative genomics reveals the distinct evolutionary trajectories of the robust and complex coral lineages. *Genome Biology*, 19(1): 175.

Zamoum, T. & Furla, P. 2012. *Symbiodinium* isolation by NaOH treatment. *The Journal of Experimental Biology,* 215(22): 3875-3880.

Zeng, C.; Tracey, D.M.; Clark, M.R.; Rowden, A.A.; Thomas, L.J. & Gardner, J.P.A. 2016. The complete mitochondrial genome of the deep-sea stony coral *Solenosmilia variabilis* (Scleractinia, Caryophylliidae) and its inter-individual variation. *Mitochondrial DNA Part A*, 27(3): 1959-1960.