



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Biologia
Departamento de Biologia Marinha



Alexandra Paris Toledo

**Sistemática de corais do gênero *Mussismilia*, Ortmann, 1890
(SCLERACTINIA: FAVIIDAE)**



RIO DE JANEIRO

2022

Alexandra Paris Toledo

**Sistemática de corais do gênero *Mussismilia*, Ortmann, 1890
(SCLERACTINIA: MUSSIDAE)**

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia
Marinha para obtenção do Diploma de Bacharel em
Biologia Marinha – Instituto de Biologia – UFRJ

RIO DE JANEIRO

2022

Capa: Coral *Mussismilia harttii* (Foto: Alexandra Paris Toledo), Recife de Fora
(Porto Seguro, Bahia) em setembro de 2018.

Esta monografia foi realizada no Laboratório de Biodiversidade de Cnidária (LaBiCni), NUPEM/UFRJ, Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Orientadora Científica: Prof^a. Dr^a. Carla Zilberberg, Laboratório de Biodiversidade de Cnidária (LaBiCni), NUPEM/UFRJ, Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Coorientadora Científica: Dr^a. Amana Guedes Garrido, Laboratório de Biodiversidade de Cnidária (LaBiCni), NUPEM/UFRJ, Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Orientadora Acadêmica: Prof^a. Dr^a. Helena Passeri Lavrado, Laboratório de Benthos, Departamento de Biologia Marinha Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à minha família, por sempre me incentivarem e apoiarem a estudar e construir uma carreira. Vocês mostraram que é preciso trabalhar muito para evoluir e eu não chegaria até aqui sem este exemplo. Agradeço em especial a minha mãe que sempre foi meu suporte para tudo, sacrificou todo seu tempo para fazer minhas vontades e me ajudar. Eu espero um dia poder te recompensar e ser uma filha tão maravilhosa como você é como mãe, obrigada por tudo, eu te amo muito.

A minha orientadora Carla por ter sido tão paciente, amorosa e amiga todos esses anos, não apenas me ensinando ao longo de toda graduação, mas também por todo cuidado em entender que eu estava em um momento difícil e precisava de mais tempo do que o esperado. Você é uma pessoa maravilhosa e excelente orientadora. Obrigada por ser além de minha orientadora, minha amiga.

A Amana, minha coorientadora que é um lembrete diário de força e determinação. Obrigada por toda ajuda, você sempre esteve do meu lado me dando a mão e me ensinando tudo que podia, com toda paciência e carinho. Obrigada por todas as risadas e os perrengues nas saídas de campo, espero que ainda façamos muitos trabalhos juntas.

À toda a equipe do LaBiCni e LaBiPor, por todo o suporte nas análises e trabalhos de campo. Em especial a Ligia, Márcio, Mariana, Lívia, Katia, Lélis, Michelle e Júlia pelo companheirismo, pelas risadas e pelos ensinamentos, vocês são incríveis.

Aos meus amigos da Bio e da Biof que foram minha dose de alegria diária. Não conseguiria passar por toda graduação sem vocês tornando tudo mais leve. Obrigada Matheus, Brida, Bruno, Noemi, Maria Vitória, Ana Letícia, Bianca e Bruna por todas as conversas, choppadas e festas memoráveis que vivemos juntos. Ainda tem muito ainda por vir, amo muito todos vocês. Agradeço também

a meus amigos da vida por não deixarem essa amizade acabar, mesmo a presença não sendo constante. Obrigada por estarem sempre disponíveis para me ouvir e dar todo suporte necessário, amo muito vocês. Em especial para Rhanna, Laryssa, Matutu, Bias, Gaby, Laís, Raphaela, Gabi, Jéssica, Beatriz, Rafaela, Patrícia, Aline, Eduardo, Gleyson, Thiago e André.

A minha psicóloga Aymeé por ter sido uma luz no fim do túnel. Sem sua ajuda e seu trabalho eu não teria finalizado essa monografia e muito menos recuperado minha vontade de viver novamente, muito obrigada.

À UFRJ e todos os professores e professoras que contribuíram para a minha formação acadêmica/científica e aos órgãos de fomento PIBIC UFRJ, CNPq, FAPERJ e Coral Vivo, pelo apoio financeiro concedido para a realização desse trabalho e de outros trabalhos em nosso laboratório.

“Ninguém nos salva a não ser nós mesmos. Ninguém pode e ninguém vai. Nós mesmos devemos percorrer o caminho”

-Buda

Resumo

Recifes de coral são estruturas complexas, compostas por diversos microambientes que atraem uma grande biodiversidade, sendo, assim, um ecossistema de alta produtividade e importância econômica. Os corais do gênero *Mussismilia* são endêmicos do Brasil e compreendem os principais construtores dos recifes brasileiros, além de apresentarem ampla distribuição pela costa, coocorrem no sul do estado da Bahia. Apesar de serem morfologicamente distintas, algumas estruturas esqueléticas apresentam alta variabilidade intraespecífica, o que constitui um problema para a taxonomia do grupo. Além disso, existe sobreposição dos períodos de desova das espécies de *Mussismilia* no estado da Bahia, possibilitando a hibridização e a troca de material genético entre elas. Neste estudo, buscamos avaliar as relações evolutivas e a variabilidade morfológica entre três espécies do gênero *Mussismilia* (*M. harttii*, *M. hispida* e *M. braziliensis*), coletadas em dois recifes no sul da Bahia (Abrolhos e Recife de Fora). Indivíduos de morfologia intermediária, que não puderam ter a espécie identificada em campo, também foram incluídos nas análises. Os caracteres esqueléticos mensurados foram: a maior e a menor extensão do cálice, a extensão do cenóstio e a menor extensão da columela. Análises discriminantes revelaram que as espécies não formam grupos totalmente distintos, havendo sobreposição morfológica entre elas. *M. harttii* e *M. braziliensis* são mais distintas morfologicamente enquanto *M. hispida* apresenta morfologia intermediária entre as demais. Foram amplificados dois marcadores moleculares, as regiões anônimas do DNA nuclear maSC1 e o maSC12. Entretanto, as análises filogenéticas revelaram que estes marcadores não foram capazes de separar espécies, e todas foram agrupadas em grandes grupos. Estes resultados sugerem que essas espécies podem compartilhar material genético por hibridização/introgressão ou que as espécies ainda não se separaram completamente. Compreender e investigar as relações de parentesco entre as espécies do gênero *Mussismilia* é de extrema relevância para a criação de planos de conservação e sobrevivência para estas espécies. No entanto, mais estudos utilizando marcadores moleculares mais variáveis e investigando a ocorrência de hibridização entre as espécies desse gênero endêmico ainda são necessários.

Abstract

Coral reefs are complex structures composed of a wide range of micro-environments that attract a rich biodiversity, thereby being an ecosystem with high productivity and economic significance. Corals of the genus *Mussismilia* are endemic and represent the main reef-building corals in Brazil. Aside from having a wide distribution along the Brazilian coast, they co-occur in the south of the state of Bahia. Despite being morphologically distinct, some of the skeletal structures display a high intraspecific variation, what constitutes a problem for the taxonomy of the group. Furthermore, the spawning period of *Mussismilia* species overlap in the Bahia state, making hybridization and genetic material exchange possible. In this study, we evaluated the evolutionary relationships and morphological variation of three species of the genus *Mussismilia* (*M. harttii*, *M. hispida*, and *M. braziliensis*) collected from two reefs in the southern region of Bahia (Abrolhos and Recife de Fora). Specimens with intermediate morphology that could not be identified in the field were also included in the analyses. The skeletal characteristics measured were the longest and shortest calyx length, the length of the cenosteo, and the shortest length of the columella. Discriminant analyses revealed that the species do not form totally distinct groups, with morphological overlap between them. *M. harttii* and *M. braziliensis* are more morphologically distinct, while *M. hispida* has an intermediate morphology among the others. Two molecular markers were amplified: the anonymous regions of the nuclear DNA, maSC1 and maSC12. However, phylogenetic analyses indicate that these markers were not capable of differentiating *Mussismilia* species, since they were all grouped into large clusters. The results indicate that these species may share genetic material by hybridization/introgression or that the species have not yet been completely separated. The comprehension and investigation of the phylogenetic relationships among the species in the genus *Mussismilia* are extremely important for the conservation and survival management of these species. Nevertheless, additional research involving more variable molecular markers and further investigation of the existence of hybridization among the species of this endemic genus is still necessary.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Recifes de coral	11
1.2 Sistemática e Taxonomia de Corais	12
1.3 Evolução das análises moleculares	13
1.4 O gênero <i>Mussismilia</i>	14
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Área de estudo	18
3.1.1 Parque Municipal Marinho de Recife de Fora	18
3.1.2 Arco Recifal Costeiro dos Abrolhos	19
3.2 Morfometria	20
3.2.1 Coleta e obtenção de dados	20
3.2.2 Análises dos dados morfológicos	22
3.3 Análises moleculares	22
3.3.1 Coleta e extração do DNA total	22
3.3.2 Análises filogenéticas	23
4. RESULTADOS	26
4.1 Análise de dados morfológicos	26
4.2 Análises filogenéticas	28
5. DISCUSSÃO	34
5.1 Análises morfológicas	34
5.2 Análises Filogenéticas	37
6. Conclusões Finais	40
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1. Introdução

1.1 Recifes de coral

Recifes de coral são estruturas tridimensionais, calcárias e resistentes a ação de ondas, formados por diversos organismos, principalmente por corais. Eles proporcionam uma variedade de microambientes e atraem grande biodiversidade, sendo, assim, um ecossistema de alta produtividade e importância econômica (Paulay, 1997). Os corais construtores desses recifes pertencem à ordem Scleractinia e são denominados “corais verdadeiros”. Eles realizam uma associação simbiótica com dinoflagelados fotossintetizantes pertencentes à família Symbiodiniaceae (LaJeunesse *et al.*, 2018), que são comumente chamados de zooxantelas (Furla *et al.*, 2005). Esta associação é benéfica tanto para os simbiossitos, que recebem abrigo, CO₂ e metabólitos nitrogenados utilizados na fotossíntese, quanto para o coral, que recebe O₂ e nutrientes, o que aceleram suas taxas de calcificação (Stanley, 2006).

Esses ecossistemas, no entanto, estão globalmente ameaçados pela ocorrência de sucessivas anomalias térmicas nos últimos anos, que resultam no branqueamento dos corais e possível morte desses organismos (Baker *et al.*, 2008). Além disso, esses ambientes também sofrem com constantes impactos antropogênicos, como poluição, turismo desordenado, derramamento de rejeitos, sobrepesca, entre outros, que contribuem para a diminuição da cobertura coralínea local (Tedesco *et al.*, 2017).

Os recifes de coral brasileiros são diferentes, possuem um crescimento característico e único no mundo, os chamados chapeirões (formações de coral em forma de cogumelo), além disso, esses recifes apresentam uma baixa diversidade de espécies de corais, mas um alto grau de endemismo (revisado por Zilberberg *et al.*, 2016). Atualmente, existem 18 espécies da ordem Scleractinia no Brasil (Castro & Pires *et al.*, 2001; Neves *et al.*, 2002), quatro são endêmicas e pertencentes ao gênero *Mussismilia* (Ortmann, 1890) (Nunes *et al.*, 2008). Entretanto, a espécie *M. leptophylla* foi mais recentemente incluída neste

gênero e pela falta de estudos complementares sobre sua alocação neste gênero, não aceitamos esta classificação. Esta baixa riqueza de espécies é o resultado provável de uma plataforma continental estreita, que limita o espaço para expansão dos corais, e também da alta sedimentação em alguns locais, oriunda dos rios, que diminui a claridade da água e pode levar à cobertura dos pólipos por sedimento (Leão & Ginsburg, 1997).

1.2 Sistemática e Taxonomia de Corais

Segundo Knowlton & Jackson (1994) uma taxonomia bem definida é fundamental para a compreensão dos processos evolutivos e ecológicos de todos os organismos. Assim como muitas espécies de Scleractinia, as espécies do gênero *Mussismilia* apresentam alta variabilidade morfológica, o que constitui uma problemática para a sistemática e a taxonomia do grupo, que é baseada em aspectos morfológicos do esqueleto (Verrill, 1902; Vaughan & Wells, 1943; Gattuso *et al.*, 1991; Wallace, 1999; Veron, 2000). Este tipo de caracterização de espécies possui diversas facilidades, como as de conservação do material biológico, a fácil comparação com fósseis, precisão de medições morfológicas e a correspondência entre o tecido vivo e o esqueleto (Brakel, 1977).

A variabilidade morfológica encontrada nessas espécies pode ser explicada pela plasticidade fenotípica, quando as alterações morfológicas observadas são respostas a fatores ambientais, como hidrodinamismo, luminosidade, profundidade e temperatura (Todd, 2008). A plasticidade fenotípica é o fenômeno que se refere a como o ambiente vai afetar o fenótipo de um organismo durante sua vida, não abrangendo variação devido à diferenciação genética (Todd, 2008). A plasticidade é uma maneira de um organismo se adaptar a um ambiente que flutua, pois representa uma resposta mais rápida ao meio ambiente do que é possível através da mudança genética (adaptação) (Todd, 2008).

Outras causas frequentes de variabilidade morfológica em corais são a presença de espécies crípticas, a recente separação entre as espécies do gênero ou possíveis eventos de hibridização (Todd, 2008). Esses fatores, assim como a plasticidade, dificultam a distinção entre as espécies, e, para resolver

este problema, é preciso ter um conhecimento amplo dos aspectos morfológicos, moleculares, ecológicos e do ciclo de vida das espécies em questão (Todd, 2008).

Consideramos que duas ou mais espécies são crípticas quando são classificadas como uma única espécie, pois, morfológicamente, elas são indistinguíveis. Como a especiação nem sempre é acompanhada por mudanças morfológicas, é provável que o número real de espécies biológicas seja maior que a contagem atual (Bickford *et al.*, 2007).

A hibridização já foi relatada para algumas espécies de corais escleractíneos (*Montastraea* sp.: Szmant *et al.*, 1997; *Acropora* sp.: Vollmer & Palumbi, 2002; *Madracis* sp.; Frade *et al.*, 2010), e parece ser um fenômeno comum. Ela é caracterizada pela reprodução bem-sucedida entre duas espécies distintas que resulta na geração de indivíduos viáveis e que compartilham seus genes ao longo das gerações. Este processo pode levar ao surgimento de novas características adaptativas, permitindo que as espécies ocupem novos nichos e ampliem seus intervalos de distribuição (Vollmer & Palumbi, 2002; Willis *et al.*, 2006; van Oppen *et al.*, 2015; Hobbs *et al.*, 2021). Entretanto, a hibridização pode se mostrar uma desvantagem evolutiva, através da introgressão (introduzindo características mal-adaptativas ou reduzindo a variação genética) que pode limitar a capacidade adaptativa das espécies progenitoras nos corais (Hobbs *et al.*, 2021). Esses processos de hibridização e introgressão, assim como a separação incompleta de linhagens, podem dificultar ainda mais a identificação de espécies de corais (Flot *et al.*, 2011), dessa forma, unir análises morfológicas e moleculares pode auxiliar a elucidar as relações evolutivas entre as espécies.

1.3 Evolução das análises moleculares

Apesar das espécies de coral serem tradicionalmente reconhecidas com base em caracteres morfológicos, particularmente estruturas esqueléticas, as relações evolutivas implícitas na morfologia nem sempre são refletidas nas filogenias moleculares (Fukami *et al.*, 2004; Van Oppen *et al.*, 2001; Wolstenholme *et al.*, 2003). A sistemática de corais escleractíneos está

passando por uma revolução devido ao progresso na filogenética molecular, nas últimas décadas. Esses estudos têm transformado a nossa compreensão do quão complexas são as relações evolutivas entre as espécies em Scleractinia (Romano & Cairns, 2000; Fukami *et al.*, 2004, 2008; Kitahara *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011). A utilização de marcadores mitocondriais para inferir relações filogenéticas entre metazoários é comum em trabalhos de sistemática molecular (Gissi *et al.*, 2008). Entretanto, em corais escleractíneos, as taxas evolutivas desses marcadores são muito lentas, e dificilmente esclarecem relações entre espécies próximas (Shearer *et al.*, 2002). Por isso, frequentemente são utilizados marcadores nucleares para obter melhores resoluções (Forsman *et al.*, 2009).

Compreender os processos evolutivos que delinearão a formação dos recifes de corais atuais e deram origem à sua biodiversidade tornou-se urgente, à medida em que o número e a intensidade de ameaças à biodiversidade e à resiliência desses ecossistemas crescem cada dia mais em um cenário de mudanças climáticas globais (Willis *et al.*, 2006).

1.4 O gênero *Mussismilia* (Ortamann, 1890)

Os principais construtores dos recifes brasileiros são os corais do gênero endêmico *Mussismilia* (Castro e Pires 2001), que compreende as espécies: *Mussismilia braziliensis* (Verrill, 1868), *Mussismilia hispida* (Verrill, 1902), *Mussismilia harttii* (Verrill, 1868) e *Mussismilia leptophylla* (Verrill, 1868). Esta última anteriormente pertencia ao gênero *Favia* e foi realocada para o gênero *Mussismilia*, com base em dados morfológicos e moleculares (Nunes *et al.*, 2008; Budd *et al.*, 2012). Entretanto, Castro & Zilberberg (2016) sugerem que mais estudos são necessários para esclarecer a classificação de *M. leptophylla*, principalmente devido a diferenças na morfologia dos nematocistos.

As espécies desse gênero apresentam uma distribuição ampla pela costa brasileira. Sendo *M. hispida* a espécie com a maior distribuição, ocorrendo do Maranhão até São Paulo; *M. braziliensis* restrita à Bahia; e *M. harttii* ocorrendo desde o Rio Grande do Norte até o Espírito Santo (Laborel, 1969; Castro & Pires, 2001). Registros fósseis indicam que, no passado, o gênero já foi amplamente

distribuído pelo Caribe e restringiu-se ao Brasil recentemente (Budd *et al.*, 2000). Este gênero pertencia a família Mussidae atribuída por Ortmann (1890), entretanto, recentemente foi realocado com base em análises morfológicas e moleculares, junto com os demais mussídeos do Atlântico, para a família Faviidae (Budd *et al.*, 2019), na subfamília Faviinae (Budd *et al.*, 2012).

A macromorfologia do gênero compreende formas de colônias facelóide ou subplocóide (até três centros); a columela é contínua com ligação trabecular entre os centros; e caso o cenósteo esteja presente, apresenta uma parede dupla distinta (Budd *et al.*, 2012). Suas espécies diferem principalmente na forma de colônia, tamanho do cálice e espessura septal, porém, com alguma sobreposição. *Mussismilia harttii* apresenta diâmetros de cálice de 12-30 mm, 12-14 septos por cm e septos finos. *Mussismilia hispida* tem diâmetro de cálice de 14-15 mm, mais de quatro ciclos septais, septos finos e columela bem desenvolvida. *Mussismilia braziliensis* têm diâmetros de cálice de 8-10 mm, menos de quatro ciclos septais, septos espessos e columela reduzida. Já *Mussismilia leptophylla* possui diâmetro de cálice menor que 6 mm, menos de quatro ciclos septais, septos finos e uma columela bem desenvolvida (Budd *et al.*, 2012).

Exceto por *M. leptophylla*, as espécies de *Mussismilia* são hermafroditas e apresentam ciclo reprodutivo anual diferenciado (Pires *et al.*, 1999). Elas são liberadoras de gametas, e suas larvas são lecitotróficas (Pires *et al.*, 1999). Os períodos reprodutivos de *M. harttii* e *M. braziliensis* são bem definidos, onde a primeira desova entre setembro e novembro e a segunda entre março e maio, tanto em Porto Seguro, BA, como no Arco Costeiro dos Abrolhos, BA, (Pires *et al.*, 1999). Uma particularidade do ciclo reprodutivo de *M. hispida* é a sua sobreposição aos das duas primeiras, com parte das colônias desovando entre agosto e dezembro, junto com *M. harttii*, em Porto Seguro (Zilberberg *et al.*, 2016) e outro grupo entre abril e junho, junto com *M. braziliensis*, em Abrolhos (Pires *et al.*, 1999). No Sudeste, a desova de *M. hispida* ocorre entre fevereiro e abril (Neves & Pires, 2002).

Peluso (2013) e Garrido (2013) tentaram elucidar a possível ocorrência de espécies crípticas em *M. hispida*, através de análises moleculares e morfológicas, respectivamente. A presença de grupos geneticamente distintos

dentro das populações de *M. hispida* em Abrolhos poderia explicar a variabilidade morfológica encontrada na espécie e a diferenciação do ciclo reprodutivo em uma mesma região geográfica. No estudo de Peluso (2013) foram utilizados os marcadores moleculares: Intron da β -tubulina Intron da Pax C (ambos nDNA) e Cox1-trnM (mDNA) , entretanto, as análises filogenéticas com esses marcadores não apresentaram resolução suficiente para separar as três espécies, indicando uma possível separação incompleta de linhagens ou a possibilidade dessas espécies compartilharem material genético (Peluso, 2013). Apesar do baixo tamanho amostral de *M. harttii* e *M. braziliensis* em Abrolhos, o outro estudo de Garrido (2013), utilizando as mesmas amostras de Peluso (2013), foi possível observar que *M. hispida* é a espécie com a maior variabilidade morfológica, se sobrepondo às duas outras (*M. hispida* e *M. braziliensis*), como nas análises filogenéticas (Garrido, 2013). Faz-se então necessário o uso conjunto de análises morfométricas e moleculares, aplicando marcadores mais variáveis para o gênero, que incluam mais indivíduos das três espécies em questão e indivíduos com morfologia intermediária (que não podem ser identificados em nível de espécie em campo) para investigar as relações entre as espécies.

Neste trabalho, buscamos conciliar dados morfológicos e moleculares de colônias das três espécies do gênero *Mussismilia* em questão, para esclarecer as relações evolutivas entre elas e verificar a presença de espécies crípticas em *M. hispida*. A partir de uma filogenia recuperada utilizando novos marcadores, será possível observar as relações de parentesco entre as três espécies em questão e o posicionamento dos indivíduos com morfologia intermediária, que podem se agrupar com uma das três espécies (aumentando sua variabilidade morfológica descrita) ou formar um novo clado (indicando a presença de espécies crípticas). Da mesma forma, após a análise morfométrica, esperamos que os indivíduos da mesma espécie se agrupem de maneira similar à filogenia e que os indivíduos que não puderam ser identificados a nível de espécie formem grupos intermediários entre as espécies já existentes ou que se juntem a uma delas.

2. Objetivos

2.1 Geral

Investigar as relações de parentesco entre três espécies do gênero *Mussismilia* (*Mussismilia harttii*, *Mussismilia hispida* e *Mussismilia braziliensis*) presentes no Arco Recifal Costeiro dos Abrolhos (BA) e no Recife de Fora (Porto Seguro, BA), por meio de análises morfométricas e filogenéticas.

2.2 Específicos

- Testar novos marcadores moleculares para separar as três espécies do gênero *Mussismilia*;
- Verificar se os indivíduos com morfologia intermediária agrupam-se com uma das três espécies estudadas ou se formam um novo clado, através de análises morfométricas e moleculares;
- Buscar possíveis espécies crípticas e/ou indicadores de processos de hibridação em *Mussismilia* spp., que corroborem as variações no ciclo reprodutivo de *M. hispida*;

3. Material & métodos

3.1 Área de Estudo

O presente estudo foi realizado em quatro recifes no sul da Bahia, o Recife de Fora (Parque Municipal Marinho de Recife de Fora), localizado em Porto Seguro, e os recifes de Pedra de Leste, Sebastião Gomes e Coroa Vermelha no Arco Recifal Costeiro dos Abrolhos, próximo ao Parque Nacional Marinho dos Abrolhos.

3.1.1 Parque Municipal Marinho de Recife de Fora

O Parque Municipal Marinho de Recife de Fora foi criado em 1997, possui cerca de 17,5 km de área (Zilberberg *et al.*, 2016) e está localizado entre as coordenadas $16^{\circ} 23' 30'' - 16^{\circ} 25' 06''$ S e $38^{\circ} 58' 30'' - 38^{\circ} 59' 18''$ W. Este recife é um ambiente muito diverso e recebe grande quantidade de turistas, principalmente durante o verão. A criação da unidade de conservação neste parque foi realizada a fim de minimizar o impacto sobre este ambiente, limitando o número de visitantes para cerca de 400 pessoas por dia a partir de 2006 (Zilberberg *et al.*, 2016).

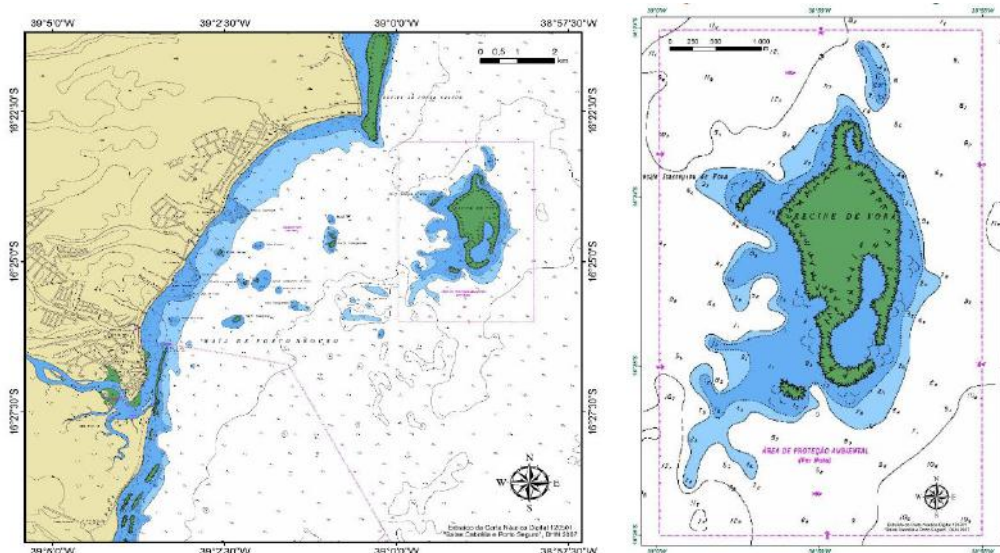


Figura 1. Mapa físico do Recife de Fora em Porto Seguro, BA. (Retirado de Atlas Físico do Parque Municipal Marinho do Recife de Fora do Projeto Coral Vivo).

3.1.2 Arco Recifal Costeiro dos Abrolhos

O Complexo Recifal dos Abrolhos apresenta a maior biodiversidade marinha do Atlântico Sul, está localizado entre as coordenadas 17° 20' - 18° 10' S e 38° 35' - 39° 20' W e possui cerca de 6000 km² de área (Leão, 1982). Essa região possui todas as espécies de corais escleractíneos descritas para o Brasil (Castro & Pires, 2001). Além disso, este recife apresenta uma formação recifal única no mundo, os chamados chapeirões, que são colunas isoladas com a base estreita e o topo expandido lateralmente. Essas formações podem atingir até 20 metros de altura e 50 metros de diâmetro no topo (Leão *et al.*, 2003).

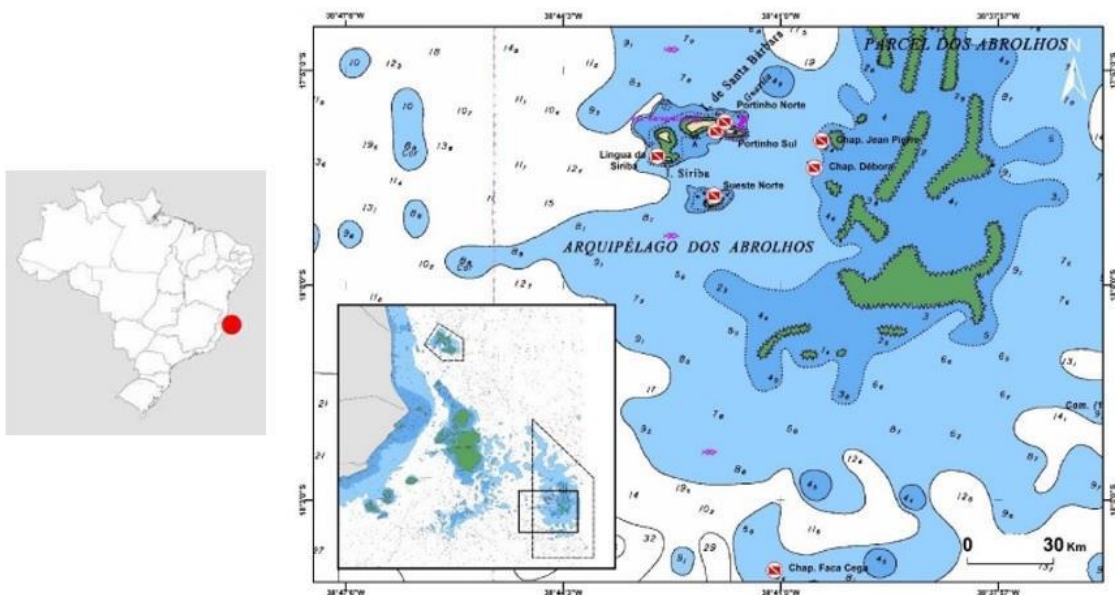


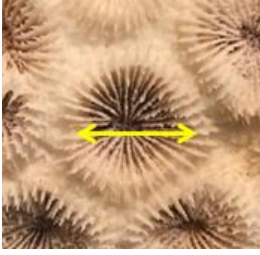
Figura 2. Mapa mostrando o Parque Nacional Marinho dos Abrolhos, BA. (Retirado de ICMbio.gov.br).

3.2 Morfometria

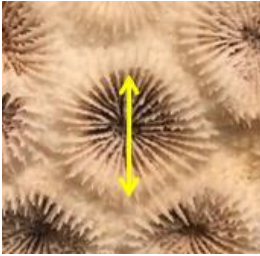
3.2.1 Coleta e obtenção de dados

Foram analisadas 74 colônias das três espécies do gênero *Mussismilia*, sendo 7 de *M. harttii* (5 de Abrolhos e 2 de Porto Seguro), 12 de *M. braziliensis* (10 Abrolhos e 2 Porto seguro), 40 de *M. hispida* (29 de Abrolhos e 11 de Porto Seguro) e 15 indivíduos que não puderam ser identificados em campo no nível de espécie (todos de Abrolhos). Os espécimes identificados como *M. harttii* e *M. braziliensis* e aqueles que não foram identificadas à nível de espécie foram coletados em 2014 para o presente estudo, utilizando martelo e cinzel por meio de mergulho autônomo. Além disso, foram utilizadas colônias de *M. hispida* provenientes do estudo de Garrido (2013), que foram coletadas em 2008 nos mesmos locais, seguindo a mesma metodologia e estão armazenadas no acervo do Museu Nacional (UFRJ). As colônias foram coletadas com martelo e cinzel por meio de mergulho autônomo e tratadas em solução de hipoclorito de sódio a 20%, trocando-se a solução a cada 48h, até que o tecido fosse completamente removido. Após o descarte, os esqueletos foram lavados em água corrente e secos a temperatura ambiente. O coralum (estrutura esquelética da colônia) obtido após este processo foi utilizado na mensuração de caracteres morfológicos.

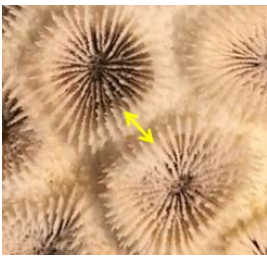
Foram selecionados aleatoriamente cinco coralitos (estrutura esquelética do pólip) de cada coralum, que foram mensurados com o auxílio de um paquímetro digital. Os caracteres utilizados foram escolhidos de acordo com estudos anteriores (Amorim, 2008; Garrido, 2013), pois apresentaram maior variabilidade intercolonial e importância taxonômica para o gênero *Mussismilia*, sendo eles:



- Maior Extensão do Cálice: medida retilínea da maior distância entre dois pontos opostos da margem do cálice. Valor taxonômico para as três espécies do gênero *Mussismilia* (Verrill, 1902);



- Menor Extensão do Cálice: medida retilínea da menor distância entre dois pontos opostos da margem do cálice, passando pela columela. Valor taxonômico para as três espécies do gênero *Mussismilia* (Verrill, 1902);



- Largura do Cenósteo: É medida retilínea entre pontos adjacentes das margens de dois cálices vizinhos. Valor taxonômico para *Mussismilia hispida* (Verrill, 1902);



- Menor Extensão da Columela: medida retilínea da menor distância entre as margens axiais de septos opostos. Valor taxonômico para as três espécies do gênero *Mussismilia* (Verrill, 1902).

3.2.2 Análises dos dados morfológicos

Após a mensuração dos caracteres morfológicos, foi realizada uma Análise Discriminante (AD) para a separação dos possíveis grupos presentes nas amostras, buscando a formação de agrupamentos que indiquem a presença das três espécies descritas e, possivelmente, de possíveis espécies crípticas de *M. hispida*. A Análise Discriminante é uma técnica estatística multivariada utilizada para discriminar e classificar objetos. Ela compara as diferenças entre os grupos e classifica o novo objeto como pertencente ao grupo com perfil mais semelhante (Khattree & Naik, 2000). Esta análise foi realizada com os programas R e Rstudio (www.R-project.org; www.rstudio.com), executando a função *lda* (presente no pacote MASS) para calcular as melhores projeções discriminantes. As variáveis utilizadas foram as citadas anteriormente (maior e menor âodo cálice, largura do cenóstio e menor extensão da columela). Os dados morfométricos foram divididos em dados de treino (70%), utilizados para construir o modelo, e dados de teste (30%), utilizados para verificar a acurácia do modelo em identificar as espécies. Para a visualização do gráfico da discriminante gerada foi utilizado o pacote ggplot2.

3.3 Análises Moleculares

3.3.1 Coleta e extração do DNA total

Foram coletadas 111 amostras de tecido retirando-se um fragmento de 1 cm² de cada colônia, sendo 25 colônias de *M. hispida*, 14 de *M. braziliensis* e 13 de *M. harttii* coletadas no Arco Recifal Costeiro dos Abrolhos e 12 de *M. hispida*, 7 de *M. braziliensis* e 10 de *M. harttii* coletadas no Parque Marinho Recife de Fora. Além dessas, também foram amostrados 22 indivíduos que não puderam ser identificados no nível de espécie, provenientes de Abrolhos. Oito indivíduos de *M. leptophylla* foram incluídos nas análises moleculares e utilizadas como grupo externo, baseado em estudos anteriores (Fukami *et al.*, 2004, Nunes *et al.*, 2008), para o enraizamento das filogenias. Os fragmentos coletados foram armazenados na solução de lise celular CHAOS (Tiocianato de guanidina 4 M, N-laurilsarcosil 0,5%, Tris pH 8,0 25 µM, 2- mercaptoetanol 0,1 M; Fukami *et al.*,

2004) e permaneceram conservados a 4 °C até a realização das análises moleculares.

A extração do DNA genômico total foi realizada utilizando o protocolo adaptado de Fukami e colaboradores (2004). Para isso, foram adicionados 500 µl de uma solução de fenol:clorofórmio:álcool Isoamílico (24:24:1) em uma solução contendo 250 µl de CHAOS com o tecido lisado da amostra e 250 µl de tampão PEB ("Phenol Extraction Buffer"; 1 M TRIS base pH 8,0; 0,5 M ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA, 1% dodecil sulfato de sódio). A solução foi então misturada suavemente com movimentos giratórios, centrifugada a 14.000 rpm por 5 min e o sobrenadante foi recuperado. Este procedimento foi repetido duas vezes. Após este processo para a remoção de proteínas, lipídeos e restos celulares, 500 µL de isopropanol 100% gelado foi adicionado ao sobrenadante final recuperado e esta solução foi mantida a -20 °C por 12 h para a precipitação do DNA extraído. Após as 12 h, a solução foi centrifugada a 14.000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado obtido foi seco em temperatura ambiente. O DNA foi então ressuspendido em 50 µL de água tridestilada (processo de destilação de permuta de íons altamente refinado, em três ocasiões) e autoclavada contendo 0,5 µL de RNase (10 mg/mL) e mantida a -20 °C. Para a verificação da quantidade e integridade do DNA extraído, as amostras foram visualizadas em eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X (4,45 mM Tris base pH 8,0, 4,45 mM ácido bórico, 0,1 mM EDTA) corado com Gel Red (1000x, Biotium) juntamente com um padrão de peso molecular (λ ; 125 ng/µL) sob iluminação UV.

3.3.2 Análises Filogenéticas

Para este estudo procuramos utilizar marcadores mais variáveis para as mesmas amostras utilizadas por Peluso (2013), já que os marcadores moleculares Intron da β -tubulina (Fukami *et al.*, 2004); Intron da Pax C do DNA nuclear (nDNA) (van Oppen *et al.*, 2000; Nunes *et al.*, 2011), e o gene do RNA de transferência da Metionina (Cox1-trnM) (Nunes *et al.*, 2008) não tiveram resolução suficiente para separar as espécies em suas análises filogenéticas. Foram então testados o espaçador interno transcrito do DNA ribossomal (ITS

rDNA,) (Wei *et al.*, 2006) e as regiões anônimas do DNA nuclear maSC01 e maSC12 (Severance *et al.*, 2004). Todos os indivíduos amostrados foram amplificados via reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês “Polimerase Chain Reaction”).

Para a amplificação do marcador maSC01 nDNA foram utilizados os iniciadores senso maSC1F (5'-TCG CGA AAT ACT TCT GCA TT- 3') e anti-senso maSC1R (5'-TCG TTC TTA CCT CTG CCA AGA-3'), e para o maSC12 nDNA foram utilizados os iniciadores senso maSC12F (5'- AGT TAC CGT CCA CGC CTA AA-3') e anti-senso maSC12R (5'- TGG TTG TGA ACT TGG AGG TG-3') (Severance *et al.*, 2004). As reações de PCR para ambos os marcadores incluíram: 5x Buffer (Promega), dNTP (200 uM), BSA (1 mg/ml), MgCl₂ (2,5 mM), iniciador F (0,5 uM), iniciador R (0,5 uM), *Taq* DNA polimerase (0,025 U/uL; Promega), 0,2 ul do DNA extraído e água pura tridestilada para completar o volume final de 20 µL. Na ciclagem da PCR foi feito um ciclo inicial de desnaturação de 95 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 1min, 60 °C por 1min e 72° C por 2min, e um ciclo de extensão final de 72 °C por 7 min. Já para o marcador ITS2, utilizamos os iniciadores senso (5'-GGTACCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCT-3') e anti-senso (5'-GCTTTGGGCGGCAGTCCCAAGCAACCCGACTC-3') (Wei *et al.*, 2006), e as reações de PCR foram compostas por: 5x Buffer (Promega), dNTP (200 uM), BSA (1,0 mg/ml), MgCl₂ (1,0 mM), iniciador F (0,3 uM), iniciador R (0,3 uM), *Taq* DNA polimerase (0,025 U/uL; Promega), 0,2 ul do DNA extraído e água pura tridestilada para completar o volume final de 20 µL. Em sua ciclagem foi feito um ciclo inicial de desnaturação de 95 °C por 4 min, seguido de: 4 ciclos de 94 °C por 30 s, 50 °C por 1 min, 72 °C por 2 min; 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 1 min, 72 °C por 2 min. O sucesso das amplificações foi verificado visualizando o produto da PCR por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com Gel Red (1000x, Biotium) juntamente com um padrão de peso molecular (100 bp DNA Ladder) sob iluminação UV. Os indivíduos que tiveram as regiões com o tamanho desejado amplificadas foram sequenciados pelo método Sanger (Sanger *et al.*, 1977) pela empresa ACTGene Análises Moleculares LTDA (www.actgene.com.br).

Após o sequenciamento, as sequências obtidas foram filtradas por qualidade e editadas no programa Geneious R11 (Biomatters, Auckland, New Zealand <https://www.geneious.com>) para análise das sequências. Primeiramente, as sequências senso e anti-senso foram pareadas e em seguida foram aparadas para retirar fragmentos de baixa qualidade no início e no final da sequência. As sequências de boa qualidade editadas foram submetidas a uma busca por similaridade no GenBank, usando a ferramenta BLAST (do inglês “Basic Local Alignment Search Tool”; www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), para verificar se estas pertenciam às espécies estudadas e não a algum contaminante. Após verificadas e editadas, as sequências foram alinhadas no programa Mega 4 (Tamura *et al.*, 2007).

As reconstruções filogenéticas foram feitas para cada marcador e para os marcadores concatenados utilizando os métodos da Máxima Verossimilhança (ML) e da Inferência Bayesiana. As árvores foram recuperadas utilizando a plataforma PhyML (Guindon *et al.*, 2010) e o programa MrBayes 3.2.6 (Ronquist *et al.*, 2012), respectivamente, para avaliar as relações de parentesco entre as amostras. O programa jModelTest 2.1.7 (Darriba *et al.*, 2012) foi utilizado para a escolha do melhor modelo evolutivo para cada marcador usando Critério de Informação de Akaike (AIC).

Para as análises de Inferência Bayesiana foram conduzidas duas corridas com 4 cadeias de Markov em 500 mil gerações cada, sendo amostrada uma árvore a cada 1.000 gerações. Para a Máxima Verossimilhança foram realizadas buscas heurísticas com 1.000 reamostragens de bootstrap. As melhores árvores obtidas por IB foram utilizadas para visualização incluindo os suportes de ramos obtidos pela ML. As árvores geradas foram editadas no programa FigTree (Rambaut, 2009) para melhor visualização.

4. Resultados

4.1 Análise de dados morfológicos

A análise discriminante com os dados morfológicos das três espécies de *Mussismilia* indicou que as espécies *M. hartii* e *M. braziliensis* foram distinguidas uma da outra, porém, *M. hispida* apresentou sobreposição com os indivíduos das demais espécies. Grande parte dos indivíduos não identificados a nível de espécie (NI) ficaram mais próximos dos indivíduos de *M. braziliensis*, mas também se sobrepuseram aos identificados como *M. hispida* e *M. hartii*.

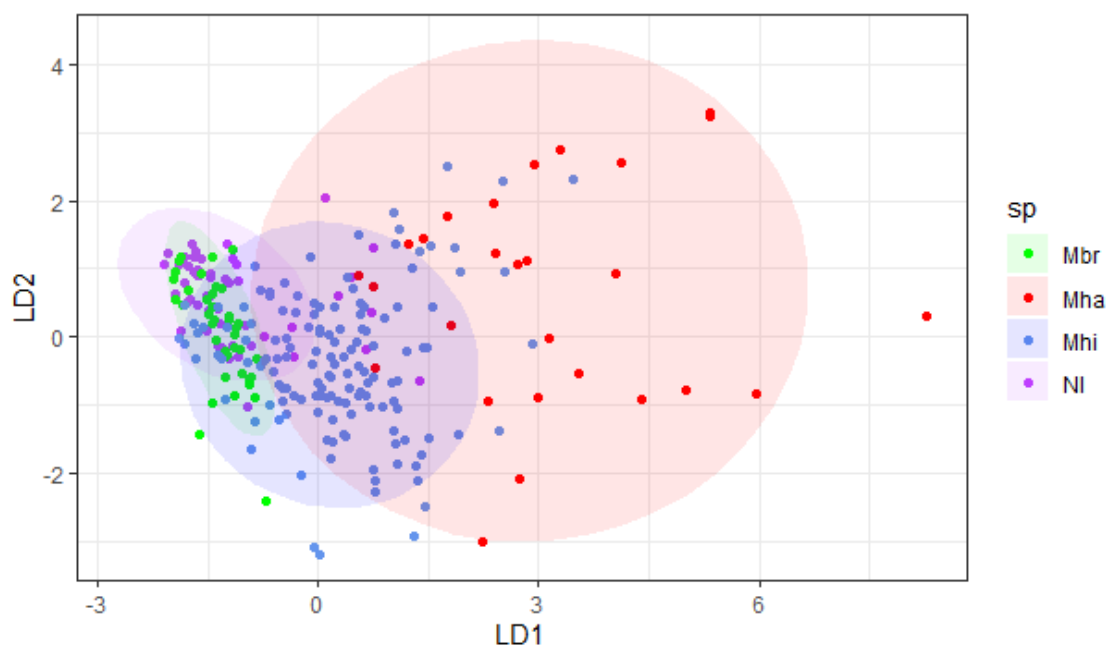


Figura 3. Gráfico de dispersão da primeira e segunda projeções discriminantes lineares das características morfológicas mensuradas. Os pontos representam amostras individuais; *M. braziliensis* (Mbr), *M. hartii* (Mha), *M. hispida* (Mhi) e indivíduos não identificados em nível de espécie (NI). Análise realizada no programa Rstudio.

A acurácia do modelo da análise discriminante linear realizada foi de cerca de 86% para a identificação de espécies.

Média das medidas (mm) \pm desvio padrão por espécie				
	<i>M. braziliensis</i>	<i>M. hartii</i>	<i>M. hispida</i>	Não identificadas
Maior extensão do Cálice	10,755 \pm 1,686	17,763 \pm 3,518	14,306 \pm 4,538	11,264 \pm 2,892
Menor extensão do Cálice	7,545 \pm 1,702	11,045 \pm 2,384	8,352 \pm 3,912	8,853 \pm 2,049
Menor extensão da Columela	1,739 \pm 0,386	3,769 \pm 1,341	2,685 \pm 1,192	1,743 \pm 0,546
Largura do Cenóstio	1,880 \pm 0,332	9,710 \pm 3,158	4,091 \pm 2,301	2,850 \pm 1,540

Tabela 1. Média e desvio padrão dos caracteres mensurados para cada espécie e indivíduos não identificados.

Coeficientes das discriminantes lineares			
	LDA1	LDA2	LDA3
Maior Extensão do Cálice	0.1184757	0.36181924	-0.008491627
Menor Extensão do Cálice	-0.1271184	-0.34895655	-0.416322024
Menor Extensão da Columela	0.4865622	0.03721546	-0.555527545
Cenóstio	0.3976096	-0.25864456	0.326314463

Tabela 2. Coeficiente das discriminantes lineares para cada caractere mensurado. Quanto maior o valor da discriminante, melhor o caráter discrimina as amostras.

Probabilidade de formação de grupo	
<i>M. braziliensis</i>	0.16216216
<i>M. hartii</i>	0.09459459
<i>M. hispida</i>	0.54054054
Não identificadas	0.20270270

Tabela 3. Probabilidade de formação de grupo para cada espécie segundo a análise discriminante.

4.2 Análises Filogenéticas

Todos os marcadores testados foram amplificados com sucesso para as espécies do gênero *Mussismilia*. Entretanto, as sequências obtidas para o espaçador interno transcrito do DNA ribossomal (ITS rDNA) foram descartadas de nossas análises, pois, apesar das amplificações apresentarem aspecto positivo, suas sequências não atingiram 500 bp, dos 1200 bp esperados. Sendo assim, não foi possível alinhar essas sequências para a reconstrução filogenética. Já para as regiões anônimas do DNA nuclear, maSC01 e maSC12 (nDNA), foram amplificadas sequências inteiras e com variações suficientes para serem utilizados em nossas análises.

Das 111 amostras coletadas, apenas 71 foram analisadas devido a resultados malsucedidos durante o processo (falha de PCR e eletroferogramas de sequenciamento confusos).

Os modelos evolutivos aplicados foram Hasegawa-Kishino-Yano com variação gamma (HKY+G) e HKY para os marcadores maSC1 e MaSC12, respectivamente. As reconstruções filogenéticas a partir dos marcadores maSC01 e maSC12 não apresentaram uma separação clara entre as espécies de *Mussismilia* (Fig 4 e 5), além disso, nenhum grupamento formado nas análises apresentou monofilétismo. As amostras também não foram agrupadas por localidade. O maSC01 separou uma das amostras não identificadas e agrupou as demais em dois clados distintos, um contendo amostras das três espécies estudadas e o outro contendo apenas *M. hispida* e *M. harttii* (Fig. 4). Já com o maSC12, todas as amostras foram agrupadas em um único clado, exceto por *M. leptophylla* (Fig. 5).

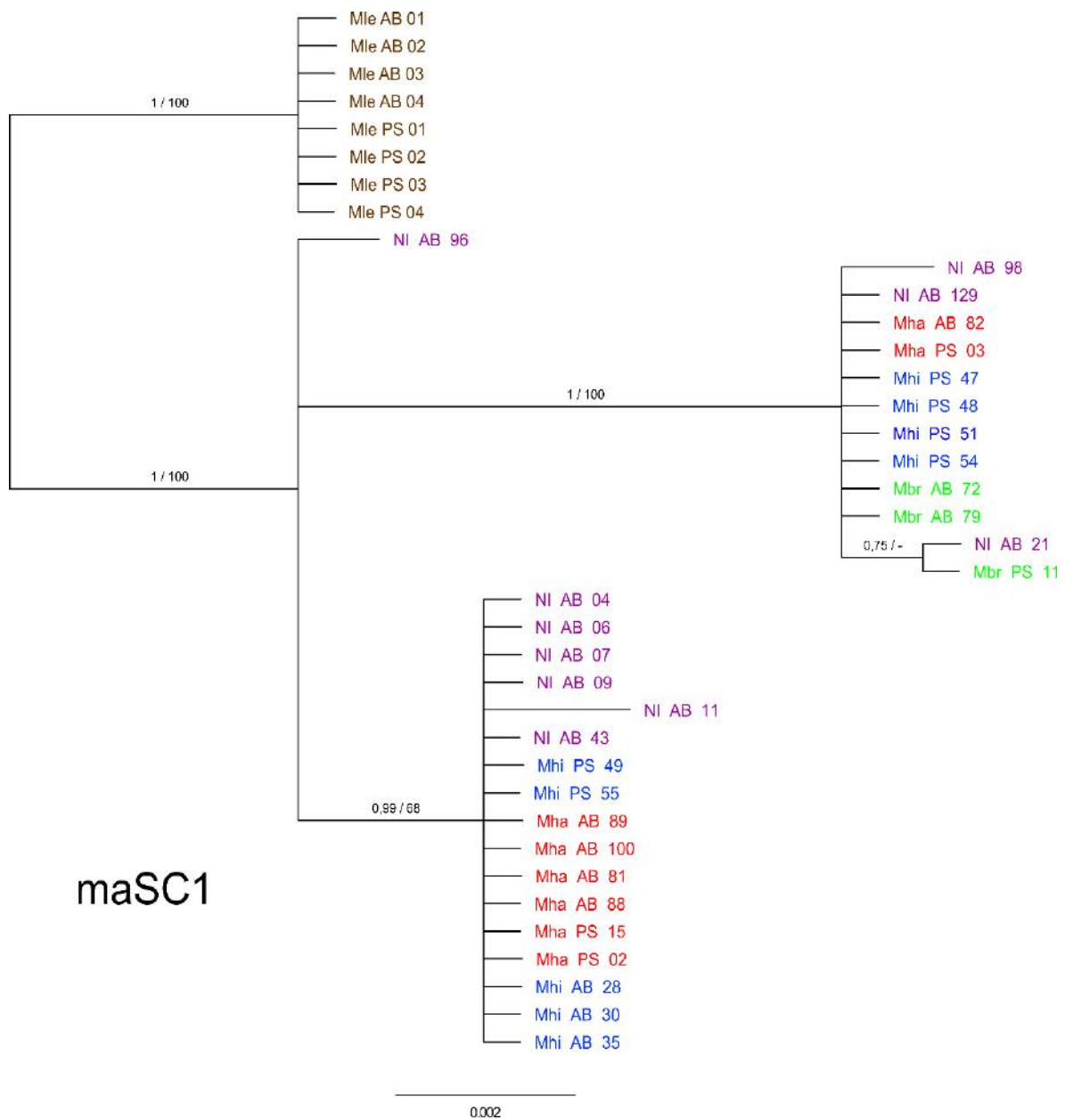


Figura 4. Reconstrução filogenética por Inferência Bayesiana do marcador maSC1 com o modelo evolutivo HKY+G para as espécies do gênero *Mussismilia* de Porto Seguro (PS) e Abrolhos (AB), incluindo indivíduos não identificados a nível de espécie (NI), *M. hispidula* (Mhi), *M. braziliensis* (Mbr), *M. hartii* (Mha), e *M. leptophylla* (Mle) utilizada como grupo externo. Valores dos suportes dos ramos após a barra, são os valores encontrados na análise de máxima verossimilhança.

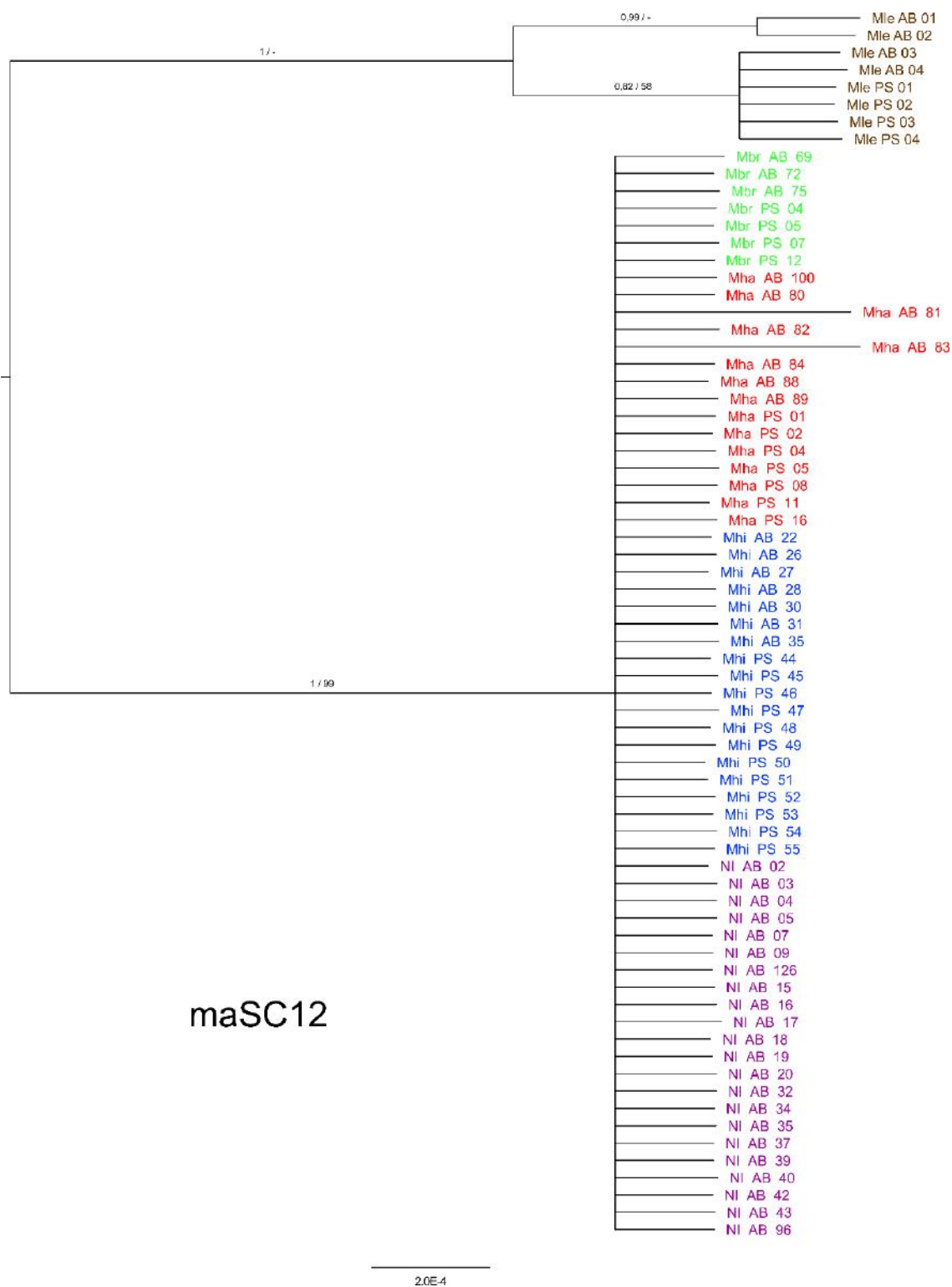


Figura 5. Reconstrução filogenética por Inferência Bayesiana do marcador Masc12 com o modelo HKY para as espécies do gênero *Mussismilia* de Porto Seguro (PS) e Abrolhos (AB), incluindo indivíduos não identificados a nível de espécie (NI), *M. hispida* (Mhi), *M. braziliensis* (Mbr), *M. harttii* (Mha), e *M. leptophyla* (Mle) utilizada como grupo externo. Valores dos suportes dos ramos após a barra, são os valores encontrados na análise de máxima verossimilhança.

Após estes resultados, sem sucesso na separação das espécies, optamos por realizar uma análise concatenada dos marcadores amplificados neste trabalho e no trabalho de Peluso (2013). Dessa forma, juntamos 32 indivíduos amplificados com sucesso tanto para marcador maSC1 quanto para o maSC12, a fim de obter uma árvore concatenada destes. De mesmo modo, juntamos 39 indivíduos amplificados com o marcador Cox1-trnM (Nunes *et al.*, 2008) que é um espaçador entre o gene da Citocromo Oxidase I e o gene do RNA de transferência da Metionina, utilizado por Peluso (2013) com o marcador maSC12 neste trabalho (Fig. 6 e 7). Utilizando maSC01 e maSC12 a reconstrução filogenética foi bastante similar à do maSC01, exceto pelo agrupamento de 4 das 5 amostras de *M. braziliensis* em 2 clados distintos (Fig. 6). A reconstrução com maSC12 e Cox1-trnM não teve resolução para formar grupos com suporte filogenético (Fig. 7). Também como observado nas análises anteriores, nenhum agrupamento por localidade foi observado.

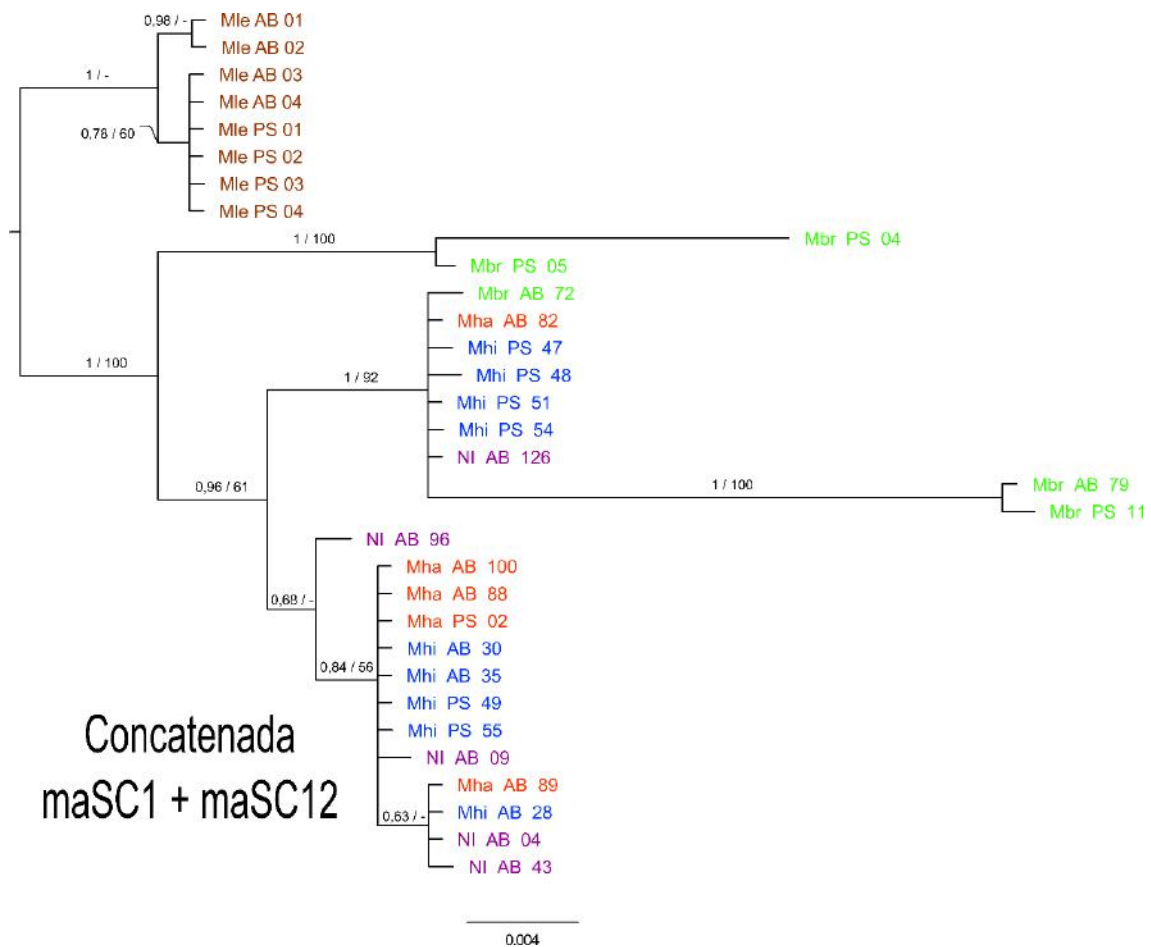


Figura 6. Reconstrução filogenética por Inferência Bayesiana do marcador maSC1 e maSC12 com os modelos evolutivos HKY+G e HKY para as espécies do gênero *Mussismilia* de Porto Seguro (PS) e Abrolhos (AB), incluindo indivíduos não identificados a nível de espécie (NI), *M. hispida* (Mhi), *M. braziliensis* (Mbr), *M. harttii* (Mha), e *M. leptophyla* (Mle) utilizada como grupo externo. Valores dos suportes dos ramos após a barra, são os valores encontrados na análise de máxima verossimilhança.

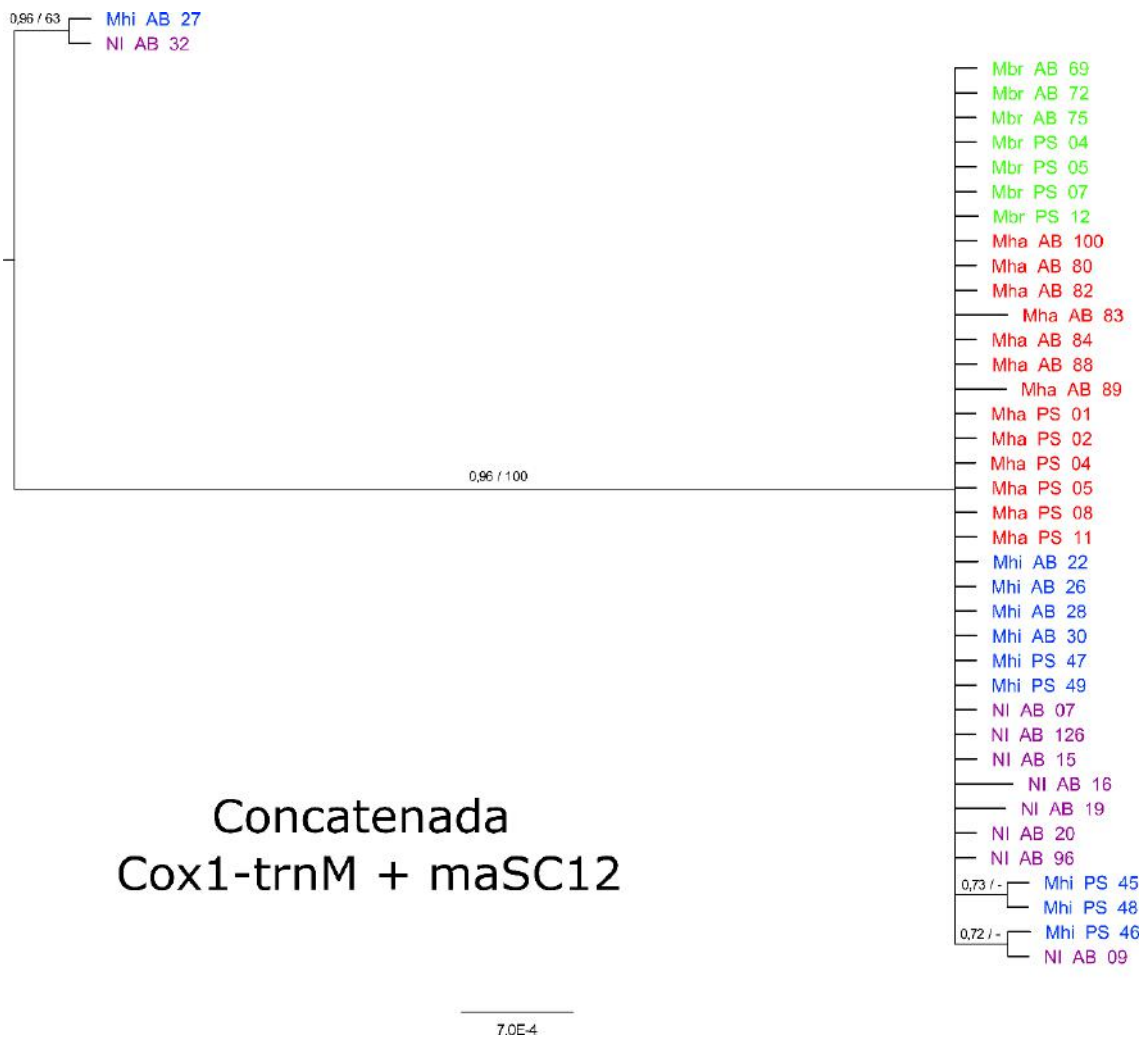


Figura 7. Reconstrução filogenética por Inferência Bayesiana do marcador Cox1-trnM e maSC12 com os modelos evolutivos HKY+I e HKY para as espécies do gênero *Mussismilia* de Porto Seguro (PS) e Abrolhos (AB), incluindo indivíduos não identificados a nível de espécie (NI), *M. hispida* (Mhi), *M. braziliensis* (Mbr), *M. harttii* (Mha), e *M. leptophyla* (Mle) utilizada como grupo externo. Valores dos suportes dos ramos após a barra, são os valores encontrados na análise de máxima verossimilhança.

5. Discussão

No presente estudo, utilizamos abordagens morfológica e molecular para investigar as relações evolutivas entre três espécies de coral do gênero *Mussismilia*. As análises morfológicas indicaram que a maior parte dos indivíduos não identificados têm maior probabilidade de pertencer à espécie *M. braziliensis*, embora exista sobreposição morfológica entre as espécies. Entretanto, não foi possível esclarecer limites entre as espécies através das análises desenvolvidas. Assim como Peluso (2013) os marcadores moleculares utilizados, não mostraram resolução suficiente, sendo necessárias análises complementares futuras para confirmação dos resultados encontrados ou novas técnicas que apresentem uma abordagem diferente na resolução da sistemática destas espécies.

5.1 Análises Morfológicas

A análise discriminante indicou a formação de agrupamentos correspondentes às espécies de *Mussismilia* que se sobrepõem, ou seja, através dos caracteres macro-esqueléticos analisados não foi possível distinguir com clareza todas as três espécies estudadas. Observamos que *M. harttii* e *M. braziliensis* são morfológicamente mais distintas entre si, uma vez que não evidenciamos sobreposição entre estas espécies, sendo *M. harttii* a de morfologia mais variável entre as duas. Por outro lado, *M. hispida* apresenta-se como uma espécie morfológicamente intermediária entre as duas primeiras, sendo também bastante variável morfológicamente. Dificuldades na identificação morfológica de espécies e a sobreposição de macro-caracteres já foi relatada para diversos gêneros de corais, como: *Montastraea* (Szmant *et al.*, 1997), *Porites* (Budd *et al.*, 1994), *Siderastrea* (Wells, 1972) e *Acropora* (Ayre *et al.*, 1991 e Wallace, 1999).

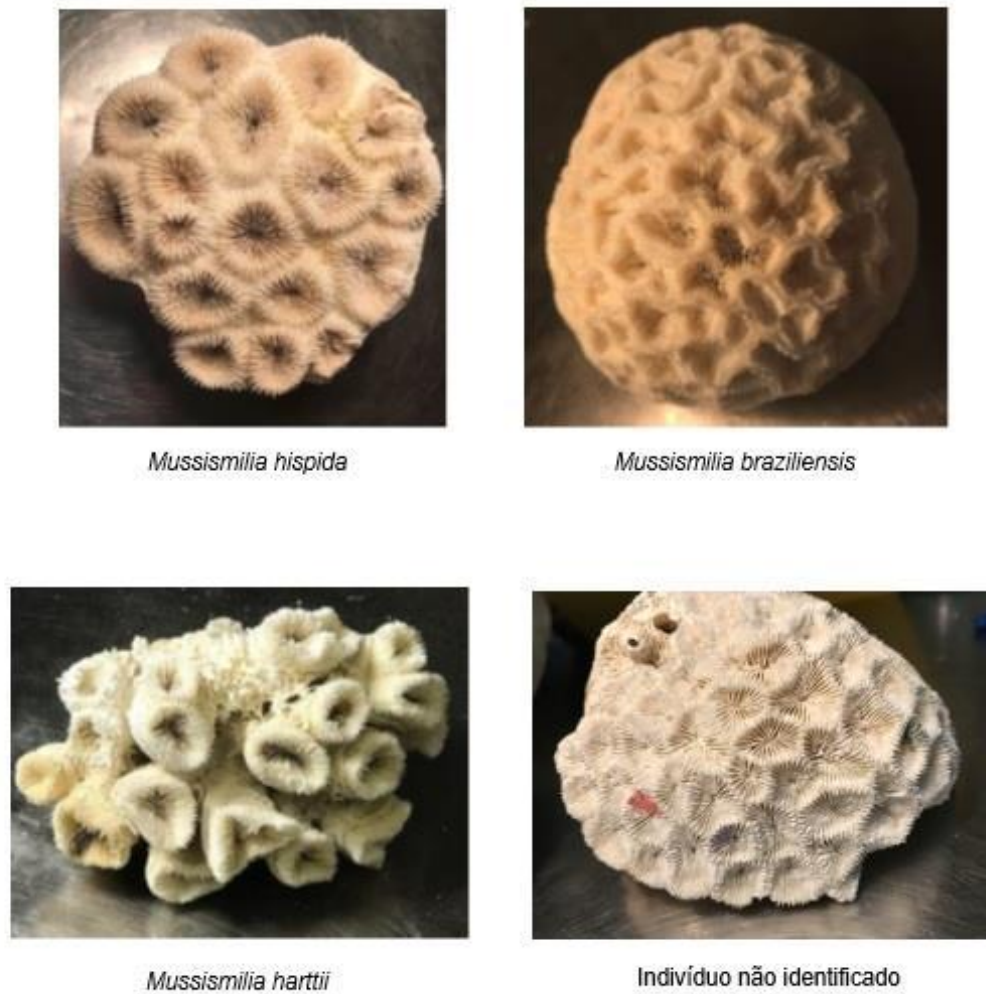


Figura 8. Exemplos de colônias que foram mensuradas neste estudo para cada uma das espécies de *Mussismilia* e de um indivíduo não identificado em nível de espécie.

Os indivíduos não identificados *in situ* (NI) não formaram um novo agrupamento, o que não indica a ocorrência de espécies crípticas, e não agruparam-se apenas com uma das espécies. Parte desses indivíduos foram agrupados com *M. braziliensis*, mas alguns se sobrepuseram a *M. hispida*. Como grande parte dos indivíduos foram agrupados com *M. brasiliensis*, é provável que esta espécie tenha morfologia mais variável do que se tem documentado atualmente, o que pode ter dificultado sua identificação *in situ*. Também é possível que os indivíduos mais dispersos nas análises sejam provenientes de

hibridização, compreendam espécies crípticas ou apenas possuam alta plasticidade fenotípica.

Estes resultados sugerem uma grande ação da plasticidade fenotípica nas espécies de *Mussismilia*. A plasticidade fenotípica é um mecanismo importante na vida dos corais, pois permite que ocupem diversos tipos de habitats, adaptando-se a variações ambientais (Todd, 2008). Alterações morfológicas em função de mudanças ambientais são bastante comuns e já foram relatadas em diversos corais, como *Porites sillimani*, que apresentou mudanças no esqueleto após ser exposto por oito meses a tratamentos com alta e baixa luminosidade (Muko *et al.*, 2000). O mesmo também foi observado para o coral *Oculina patagônica*, que reduziu suas taxas de calcificação, afetando e alterando o crescimento do esqueleto, para suportar o estresse luminoso (Zaquin *et al.*, 2019). Dessa forma, embora sejam classificados como importantes para a taxonomia do grupo (Verrill, 1902), é possível que os caracteres morfológicos utilizados neste estudo sofram maior ação da plasticidade fenotípica e, o que pode mascarar diferenças em nível de espécie (Mangubhai *et al.*, 2007 ; Flot *et al.*, 2008 ; Forsman *et al.*, 2009).

Considerando que houve grande sobreposição de caracteres morfológicos entre as três espécies estudadas, é indicado que em análises futuras, novos caracteres morfológicos, em especial, micro-caracteres, sejam acrescentados. Diversos trabalhos têm utilizado uma abordagem com caracteres micro-morfológicos (Fukami *et al.*, 2004, Kongjandtre *et al.*, 2012 e Terraneo *et al.*, 2019), através de coordenadas cartesianas em 3D, aliado à microscopia tradicional e à microscopia eletrônica de varredura. Budd & Stolarski (2009 e 2011), observaram que os macro-caracteres não foram capazes de distinguir espécies das famílias Mussidae e Favidae do Atlântico e do Pacífico, e uma distinção foi observada apenas quando utilizando micro-caracteres morfológicos. Estes trabalhos obtiveram melhores resultados na distinção das espécies, indicando que, em estudos futuros, é necessário avaliar se diferenças micro-esqueléticas em *Mussismilia* são significativas para diferenciar as espécies do gênero.

A sobreposição dos caracteres morfológicos também pode indicar que essas espécies ainda estão em processo de especiação (Funk e Omland, 2003), de forma que ainda compartilham características ancestrais em comum e as barreiras pré- e pós-zigóticas ainda não estão bem definidas. Outra possibilidade seria que *M. hispida* compartilhe seu material genético com as demais, possivelmente através de hibridização. Esta hipótese é apoiada pelo seu ciclo reprodutivo sobreposto com o de *M. harttii* (setembro-novembro) e com o de *M. braziliensis* (fevereiro-março), no sul da Bahia (Zilberberg *et al.*, 2016). A hibridização não apenas resulta em baixo nível de heterozigosidade genética, mas às vezes também cria limites morfológicos pouco claros (Willis *et al.*, 2006). A espécie de coral *Acropora polifera* é um exemplo de híbrido de coral já conhecido no Caribe, resultante do cruzamento entre *Acropora palmata* e *Acropora cervicornis*, e que possui uma morfologia bastante variável, uma vez que a fertilização ocorre em ambas as direções, dessa forma, a morfologia do híbrido será mais intimamente relacionada com qual espécie (mãe) é a fornecedora do ovulo; tornando difícil a identificação dessas espécies *in situ* (Volmer & Palumbi, 2002).

5.2 Análises Filogenéticas

Apesar de, neste estudo, termos utilizado marcadores moleculares que são considerados variáveis o suficiente para a resolução de espécies de corais (e.g., Severance *et al.*, 2004), não foi possível separar as espécies *M. harttii*, *M. hispida* e *M. braziliensis* em grupos monofiléticos, da mesma forma que em Peluso (2013). Isto pode ser devido a uma identificação incorreta de alguns espécimes, separação incompleta de linhagens ou hibridização (Funk & Omland, 2003).

Primeiramente, a possibilidade de identificação errônea de alguns espécimes, que pode ser causada, por exemplo, por uma grande plasticidade fenotípica (Fukami *et al.*, 2004; Forsman *et al.*, 2009), como já discutido anteriormente para as análises morfológicas. Além disso, os marcadores moleculares utilizados não tiveram resolução suficiente para evidenciar as diferenças entre espécies, provavelmente porque existe uma separação

incompleta de linhagens, ou seja, essas espécies ainda mantêm um polimorfismo ancestral compartilhado. Em Arrigone e colaboradores (2016) foram utilizados dados de sequências de DNA de quatro *loci* de origem mitocondrial e nuclear para a delimitação das espécies, entretanto, todas as análises apresentaram incongruências quanto a diferenciação de espécies nos corais *Echinophyllia* e *Oxypora*.

Ainda, é possível que as espécies do gênero *Mussismilia* estejam hibridizando. Algumas características de sua biologia reprodutiva favorecem esta hipótese, como o fato de serem espécies hermafroditas, liberadoras de gametas e de já ter sido relatado sincronismo nos períodos de desova de espécies diferentes (Pires *et al.*, 1999; Zilberberg *et al.*, 2016; dados do Projeto Coral Vivo). Entretanto, sabemos que apenas *M. hispida* possui períodos de desova que coincidem com *M. harttii* (setembro-novembro) e *M. braziliensis* (fevereiro-março) no sul da Bahia, de forma que *M. hispida* pode estar hibridizando com as demais. Nesse caso, a falta de diferenciação entre as espécies do gênero pode estar relacionada a hibridização de *Mussismilia hispida* com as outras duas espécies, compartilhando material genético entre as três espécies analisadas. A mesma hipótese foi levantada por Richard e colaboradores (2013), que observou que a espécie de coral *Acropora valida* pode estar agindo como um canal, transferindo material genético para outras espécies do gênero, via hibridização introgressiva. A hibridização introgressiva é definida como a troca de genes entre espécies geneticamente diferentes e pode resultar na fusão das espécies (através de múltiplos e extensos cruzamentos) e extinção das espécies parentais (Willis *et al.*, 2006). Entretanto, a introgressão também pode aumentar a diversidade genética, criar novas características e melhorar o desempenho das espécies emergentes (Willis *et al.*, 2006). Frade e colaboradores (2010) investigaram as relações evolutivas entre as espécies do gênero *Madracis* e observaram que a hibridização introgressiva ocorre em todo o gênero, havendo uma mistura de genes que resulta em limites indefinidos entre as espécies do gênero, como pode estar acontecendo em *Mussismilia* spp.

Apesar de termos observado aqui uma grande variabilidade morfológica para o gênero *Mussismilia*, as três espécies analisadas foram agrupadas separadamente, porém com alguma sobreposição, e as análises moleculares

não indicaram o monofiletismo de nenhuma das espécies estudadas. Os resultados indicaram o compartilhamento de material genético entre as três espécies, sugerindo a ocorrência de hibridização introgressiva ou da separação incompleta dessas linhagens, como discutido anteriormente. No entanto, estudos que testem o isolamento reprodutivo, a possibilidade de hibridização dentro do gênero e a viabilidade dos híbridos, através de reprodução *in vitro*, e a aplicação de marcadores moleculares hiper-variáveis (como microssatélites, SNPs e/ou sequenciamento genômico; Richards & van Oppen, 2012; Quattrini *et al.*, 2019; Erikson *et al.*, 2020 e Ramírez-Portilla *et al.*, 2022) são necessários para esclarecer este processo.

Os corais do gênero *Mussismilia* são os principais construtores dos recifes do Atlântico Sul (Castro & Pires, 2001). Compreender os processos evolutivos que moldaram essas espécies é urgente, pois a medida em que aumentam as ameaças à biodiversidade e resiliência dos recifes frente as contínuas mudanças climáticas globais (Willis *et al.*, 2006). Modelos climáticos preveem que a maioria dos recifes de coral do mundo irão experimentar extremas temperaturas anuais, antes mesmo do final do século (van Hooidonk *et al.*, 2016). Uma vez que essas espécies desempenham papel crucial na manutenção dos ecossistemas do Atlântico Sul, a falta de alguma dessas espécies pode ocasionar o colapso de todo este ecossistema. Estudos para a delimitação de espécies são essenciais para uma avaliação precisa da biodiversidade, biogeografia e ecologia de comunidades, bem como para criação de políticas de conservação (Quattrini *et al.*, 2019).

6. Conclusões

- Não foi possível separar as três espécies do gênero *Mussismilia* em nenhuma das análises moleculares realizadas neste estudo;
- A análise discriminante revelou que *M. harttii* e *M. braziliensis* são mais distintas morfologicamente, e que *M. hispida* se apresenta como uma espécie de morfologia intermediária entre as demais;
- *Mussismilia braziliensis* parece ter maior plasticidade fenotípica do que o descrito na literatura;
- Os marcadores utilizados MaSC01 e MaSC12 (Severance *et al.*, 2004) apesar de mais variáveis do que os já testados por Peluso (2013), não mostraram a formação de grupos monofiléticos dentro do gênero *Mussismilia*.
- É necessário que novos estudos sobre as relações evolutivas entre as espécies sejam realizados com urgência, uma vez que essas espécies são as principais construtoras dos recifes de coral do Atlântico Sul.

7. Referências Bibliográficas

- AMORIM, L. C. 2008. Avaliação da variação morfológica dos esqueletos de *Mussismilia hispida* (Verrill, 1902) (Cnidaria, Scleractinia). Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas (Zoologia), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Museu Nacional, 99 pp.
- ARRIGONI, R., BERUMEN, M. L., CHEN, C. A., TERRANEO, T. I., BAIRD, A. H., PAYRI, C., & BENZONI, F. 2016. Species delimitation in the reef coral genera *Echinophyllia* and *Oxypora* (Scleractinia, Lobophylliidae) with a description of two new species. ***Molecular Phylogenetics and Evolution***, 105, 146–159.
- AYRE, D.J.; VERON, J. E. N.; DUFTY, S. L. 1991. The corals *Acropora palifera* and *Acropora cuneata* are genetically and ecologically distinct. ***Coral Reefs***,10:13–1.
- BAKER, A.C.; GLYNN, P.W.; RIEGL, B. 2008. Climate change and coral reef bleaching: An ecological assessment of long-term impacts, recovery trends and future outlook. ***Estuarine, Coastal and Shelf Science***, 80: 435–471.
- BRAKEL, W.H. 1977. Corallite variation in *Porites* and the species problem in corals. Proc. 3rd Intern. ***Coral. Reef. Symp***,1:457-462.
- BICKFORD, D.; LOHMAN, D. J.; SODHI, N. S.; NG, P. K .L.; MEIER, R.; WINKER, K.; INGRAM, K. K.; DAS, I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. ***Trends in Ecology and Evolution***, 22:148–155.
- BLACKALL, L. L.; WILSON, B.; VAN OPPEN, M. J. H. 2015 Coral-the world's most diverse symbiotic ecosystem. ***Molecular Ecology***, 24:5330–5347.
- BUDD, A.F., AND STOLARSKI, J., 2011, Corallite wall and septal microstructure in scleractinian reef corals: Comparison of molecular clades within the family

Faviidae: *Journal of Morphology*, 272:66–88p.

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: 465-529.

BUDD, A. F.; JOHNSON, K.G.; POTTS, D. C. 1994. Recognizing morphospecies in colonial reef corals. I. Landmark-based methods. *Paleobiology* 20:484–505.

BUDD, A. F.; WOODSELL, J. D.; HUANG, D.; & KLAUS, J. S. 2019. Evolution of the Caribbean subfamily Mussinae (Anthozoa: Scleractinia: Faviidae): transitions between solitary and colonial forms. *Journal of Systematic Palaeontology*, 17(18), 1581-1616.

CASTRO, C. B. & PIRES, D. O. 2001. Brazilian coral reefs: what we already know and what is still missing. *Bulletin of Marine Science*, 69(2): 357-371p.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. 2012. JModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9: 772.

FLOT, J.F.; BLANCHOT, J.; CHARPY, L.; CRUAUD, C.; LICUANAN, W.Y.; NAKANO, Y.; PAYRI C.; TILLIER, S. 2011. Incongruence between morphotypes and genetically delimited species in the coral genus *Stylophora*: Phenotypic plasticity, morphological convergence, morphological stasis or interspecific hybridization? *BMC Ecology*, 11: 1–14.

FLOT, J.F.; MAGALON H.; CRUAUD, C.; COULOUX, A.; TILLIER, S. 2008b. Patterns of genetic structure among Hawaiian corals of the genus *Pocillopora* yield clusters of individuals that are compatible with morphology. *Comptes Rendus Biologies*, 331:239–247.

- FORSMAN, Z.; BARSHIS, D.; HUNTER, C.; TOONEN, R. 2009. Shape-shifting corals: molecular markers show morphology is evolutionarily plastic in *Porites*. ***BMC Ecology and Evolution***, 9:45.
- FOSTER, A. B. 1979. Phenotypic plasticity in the reef corals *Montastraea annularis* and *Siderastrea sidereal*. ***Journal of Experimental Marine Biology and Ecology***, 39: 25–54.
- FRADE, P. R.; REYES-NIVIA, M. C.; FARIA, J.; KAANDORP, J. A.; LUTTIKHUIZEN, P. C. & BAK, R. P. M. 2010. Semi-permeable species boundaries in the coral genus *Madracis*: introgression in a brooding coral system. ***Molecular Phylogenetics and Evolution***, 57: 1072-1090.
- FUKAMI, H.; BUDD, A. F.; LEVITAN, D. R.; JARA, J.; KERSANACH, R. & KNOWLTON, N. 2004. Geographic differences in species boundaries among members of the *Montastraea annularis* complex based on molecular and morphological markers. ***Evolution***, 58(2): 324-337p.
- FUKAMI, H. 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:e3222.
- FUNK, D. J. AND OMLAND, K. E. 2003. Species-Level Paraphyly and Polyphyly: Frequency, Causes, and Consequences, with Insights from Animal Mitochondrial DNA. ***Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics***, 34:(1)397-423.
- FURLA, P.; ALLEMAND, D.; SHICK, J. M.; FERRIER-PAGÈS, C.; RICHIER, S.; PLANTIVAUX, A.; MERLE, P. L.; TAMBUTTÉ, S. 2005. The Symbiotic Anthozoan: A Physiological Chimera between Alga and Animal. ***Integrative and Comparative Biology***, 45(4):595-604.

- GARRIDO, A. G. 2013. *Variação morfológica do esqueleto do coral recifal *Mussismilia hispida* (Verrill, 1902) (Cnidaria: Scleractinia: Mussidae) e sua relação com o ciclo reprodutivo*. Monografia em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Marinha, 71 pp.
- GATTUSO, J. P.; PICHON, M. & JOUBERT, J. 1991. Physiology and taxonomy of scleractinian corals: a case study in the genus *Stylophora*. ***Coral Reefs***, 9: 173-182.
- GISSI, C.; IANNELLI, F.; & PESOLE, G. 2008. Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. ***Heredity***, 101(4)301-320.
- HOBBS, JPA., RICHARDS, ZT., POPOVIC, I., LEI, C., STAEUDLE, TM., MONTANARI., SR. & DIBATTISTA, JD. 2021. Hybridisation and the evolution of coral reef biodiversity. ***Coral Reefs***.
- HUANG, D.; LICUANAN, W. Y.; BAIRD, A. H. *et al.* 2011. Cleaning up the 'Bigmessidae': Molecular phylogeny of scleractinian corals from Faviidae, Merulinidae, Pectiniidae and Trachyphylliidae. ***BMC Evolutionary Biology***, 11, 37.
- JOHNSTON, E.C.; FORSMAN, Z.H.; FLOT, JF. *et al.* 2017. A genomic glance through the fog of plasticity and diversification in *Pocillopora*. ***Scientific Reports***, 7:5991.
- KHATTREE, R. & NAIK, DN. 2000. Multivariate data reduction and discrimination with SAS software. Cary, NC, USA: ***Statistical Analysis System Institute Inc.***, 558p.
- KITAHARA, M. V.; CAIRNS, S. D.; STOLARSKI, J.; BLAIR, D.; & MILLER, D. J. 2010. A comprehensive phylogenetic analysis of the Scleractinia (Cnidaria,

Anthozoa) based on mitochondrial CO1 sequence data. ***PloS one***, 5(7), e11490.

KNOWLTON, N. & JACKSON, J. B. C. 1994. New taxonomy and niche partitioning on coral reefs: jack of all trades or master some? ***Trends in Ecology and Evolution***, 9(1): 7-9.

KONGJANDTRE, N.; RIDGWAY, T. COOK, L. G.; *et al.* 2012. Taxonomy and species boundaries in the coral genus *Favia* Milne Edwards and Haime, 1857 (Cnidaria: Scleractinia) from Thailand revealed by morphological and genetic data. ***Coral Reefs***, 31:581-601.

LABOREL, J. 1969. Madreporaires et hydrocoralliaires récifaux des cotes Brasiiliennes: Systématique, écologie, répartition vertical e géographique. ***Annales de l'Institut Océanographique***, 47: 171-229.

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: 2570-2580.

LEÃO, Z. M. A. N.; GINSBURG, R. N. 1997. Living reefs surrounded by siliciclastic sediments: the Abrolhos coastal reefs, Bahia, Brazil. Proc. 8th Intern. ***Coral Reef Symp***, 2:1767-772.

MANGUBHAI, S.; SOUTER, P.; GRAHN, M. 2007b. Phenotypic variation in the coral *Platygyra daedalea* in Kenya: morphometry and genetics. ***Marine Ecology Progress Series***, 345:105–115.

MUKO, S.; KAWASAKI, K.; SAKAI, K.; TASKU, F.; SIGESADA, N. 2000. Plasticidade morfológica no coral *Porites sillimani* e seu significado adaptativo. ***Bulletin of Marine Science***, 66: 225-239.

- NEVES, E. G. & PIRES, D. O. 2002. Sexual reproduction of Brazilian coral *Mussismilia hispida* (Verrill, 1902). **Coral Reefs**, 21: 161-168.
- NUNES, F.; FUKAMI, H.; VOLLMER, S. V.; NORRIS, R. D. & KNOWLTON, N. 2008. Reevaluation of the systematics of the endemic corals of Brazil by molecular data. **Coral Reefs**, 27: 423-432.
- PAULAY, G. 1997. Diversity and Distribution of Reef Organisms. In: Birkeland, C. (ed.) **Life and Death of Coral Reefs**. Chapman & Hall, Nova York. 298-345 pp.
- PELUSO, L. 2013. Avaliação da diversidade genética do coral endêmico *Mussismilia hispida* (Scleractinia: Mussidae) no sul da Bahia. Monografia em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Marinha, 74pp.
- PIRES, D. O.; CASTRO, C. B. & RATTO, C. C., 1999. Reef coral reproduction in the Abrolhos Reef Complex, Brazil: the endemic genus *Mussismilia*. **Marine Biology**, 135:463-471.
- QUATTRINI, A. M.; WU, T.; SOONG, K. *et al.* 2019. A next generation approach to species delimitation reveals the role of hybridization in a cryptic species complex of corals. **BMC Evolutionary Biology**, 19:116.
- RAMBAUT, A. 2009. FigTree v.1.3.1. [computer program]. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- RAMÍREZ-PORTILLA, C; BAIRD, A. H.; COWMAN, P. F.; QUATTRINI, A. M.; SINNIGER, S. H. F.; FLOT, JF. 2022. Solving the Coral Species Delimitation Conundrum, **Systematic Biology**, 71:(2)461– 475.
- R CORE TEAM. 2019. R: A Language and Environment for Statistical Computing; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria.

<https://www.R-project.org>.

- RICHARDS, Z.T.; AND VAN OPPEN, M. J. 2012. Rarity and genetic diversity in Indo-Pacific Acropora corals. ***Ecology and Evolution***. 2(8): 1867–1888.
- RICHARDS, Z.T.; MILLER, D. J.; WALLACE, C. C. 2013. Molecular phylogenetics of geographically restricted Acropora species: Implications for threatened species conservation. ***Molecular Phylogenetics and Evolution***, 69:837–851.
- ROMANO, S. L. & CAIRNS, S. D. 2000. Molecular phylogenetic hypothesis for the evolution of scleractinian corals. ***Bulletin of Marine Science***, 67(3): 1043-1068.
- RONQUIST, F., TESLENKO, M., MARK P VAN DER., AYRES DL., DARLING, A., HÖHNA, S., LARGET, B., LIU, L., SUCHARD, MA., HUELSENBECK JP. 2012. Mrbayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. ***Systematic Biology*** 61: 539–542.
- SANGER, F., AIR, G., BARRELL, B. *et al.* 1977. Sequência de nucleótidos do ADN do bacteriófago ϕ X174. ***Nature*** 265: 687-695.
- SEVERANCE, E.G., SZMANT, A.M. AND KARL, S.A. 2004. Single-copy gene markers isolated from the Caribbean coral, *Montastraea annularis*. ***Molecular Ecology Notes***, 4: 167-169.
- 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(12), 2475-2487.
- STANLEY, G. D. 2006. Photosymbiosis and the evolution of modern coral reefs. ***Science***. 312: 857-858.

- STAT, M.; BAKER, A. C.; BOURNE, D. G.; CORREA, A. M. S.; FORSMAN, Z.; HUGGETT, M. J.; POCHON, X.; SKILLINGS, D.; TOONEN R. J.; VAN OPPEN M. J. H. & GATES, R. D. 2012. Molecular delineation of species in the coral holobiont. *Advances in Marine Biology*, 63: 1-65.
- SZMANT, A. M.; WEIL, E.; MILLER, M. W.; COLON, D. E. 1997. Hybridization within the species complex of *Montastrea annularis*. *Marine Biology*, 129:561–72.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M. & KUMAR, S. 2007. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA), software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599.
- TEDESCO, E. C.; SEGAL, B.; CALDERON, E. N. & SCHIAVETTI, A. 2017. Conservation of Brazilian coral reefs in the Southwest Atlantic Ocean: a change of approach. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 45(2): 228-245.
- TODD, P. A. 2008. Morphological plasticity in scleractinian corals. *Biological Reviews*, 83: 315-337.
- TERRANEO, T. I., BENZONI, F., BAIRD, A. H., ARRIGONI, R., AND BERUMEN, M. L. 2019a. Morphology and molecules reveal two new species of *Porites* (Scleractinia, Poritidae) from the Red Sea and the Gulf of Aden. *Systematics and Biodiversity*, 17:491–508.
- TERRANEO, T. I., BENZONI, F., ARRIGONI, R., & BERUMEN, M. L. 2016. Species delimitation in the coral genus *Goniopora* (Scleractinia, Poritidae) from the Saudi Arabian Red Sea. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 102, 278–294.
- VAN HOOIDONK, R.; MAYNARD, J.; TAMELANDER, J.; GOVE, J.; AHMADIA, G.; RAYMUNDO, L.; ... PLANES, S. 2016. Local-scale projections of coral reef futures and implications of the Paris agreement. *Scientific Reports*, 6,

srep39666.

- VAN OPPEN, M. J. H.; MCDONALD, B. J.; WILLIS, B. & MILLER, D. J., 2001. The Evolutionary history of the coral genus *Acropora* (Scleractinia, Cnidaria) based on mitochondrial and nuclear marker: reticulation, incomplete lineage sorting, or morphological convergence? ***Molecular Biology and Evolution***, 18(7): 1315-1329.
- VAUGHAN T. W.; WELLS J. W. 1943. Revision of the suborders, families and genera of the Scleractinia. ***Geological Society of America***, 44: 1-363.
- VERRIL, A. E. 1902. Variation and nomenclature of Bermudian, West Indian and Brazilian reef corals, with notes on various Indo-pacific corals. ***Transactions of the Connecticut Academy of Arts and Sciences***, 11(1) 3: 63-168.
- VOLLMER, S. V.; PALUMBI, S. R. 2002. Hybridization and the evolution of reef coral diversity. ***Science***, 296:2023–25.
- WALLACE, C. 1999. Staghorn corals of the world: a revision of the genus *Acropora*. Collingwood, VIC: **CSIRO** Publishing.
- WEI, N. V.; WALLACE, C. C.; DAI, C. F.; PILLAY, K. R. M. & CHEN, C. A. 2006. Analyses of the ribosomal internal transcribed spacers (ITS) and the 5.8S gene indicate that extremely high rDNA heterogeneity is a unique feature in the scleractinian coral genus *Acropora* (Scleractinia; Acroporidae). ***Zoological Studies***, 45: 404-418.
- WILLIS, B. L.; VAN OPPEN, M.J.; MILLER, D.J.; VOLLMER, S.V.; AYRE, D. J. 2006. The role of hybridization in the evolution of reef corals. ***Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics***, 37:489–517 .
- WOLSTENHOLME, J. K.; WALLACE, C. C. & CHEN, C. A. 2003. Species boundaries within the *Acropora humilis* species group (Cnidaria; Scleractinia): a morphological and molecular interpretation of evolution.

Coral Reefs, 22: 155-166.

ZAQUIN T, ZASLANSKY P, PINKAS I AND MASS T. 2019. Simulating Bleaching: Long-Term Adaptation to the Dark Reveals Phenotypic Plasticity of the Mediterranean Sea Coral *Oculina patagonica*. ***Frontiers in Marine Science***. 6:662.