

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

WANDERSON VALENTE DOS SANTOS

ORGANIZAÇÃO MORFOLÓGICA E AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DO
PACOTE E GAMETAS DO CORAL *Mussismilia harttii*

Porto Alegre/RS – Brasil

Dezembro 2020

WANDERSON VALENTE DOS SANTOS

Biólogo/UFV

ORGANIZAÇÃO MORFOLÓGICA E AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DO
PACOTE E GAMETAS DO CORAL *Mussismilia harttii*

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do Grau de Mestre em Zootecnia, na
Faculdade de Agronomia da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia

Orientador: Leandro Cesar de Godoy

Porto Alegre/RS – Brasil

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

SANTOS, WANDERSON VALENTE DOS
ORGANIZAÇÃO MORFOLÓGICA E AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL
DO PACOTE E GAMETAS DO CORAL *Mussismilia harttii* /
WANDERSON VALENTE DOS SANTOS. -- 2020.
102 f.
Orientador: LEANDRO CESAR DE GODOY.

Coorientador: JENER ALEXANDRE SAMPAIO ZUANON.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Ultraestrutura. 2. Gametas. 3. Reprodução
Sexuada. 4. Pacotes. I. GODOY, LEANDRO CESAR DE,
orient. II. ZUANON, JENER ALEXANDRE SAMPAIO,
coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Wanderson Valente dos Santos
Bacharel em Ciências Biológicas

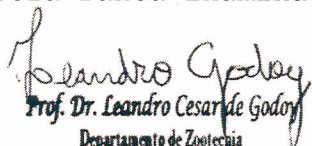
DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM ZOOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

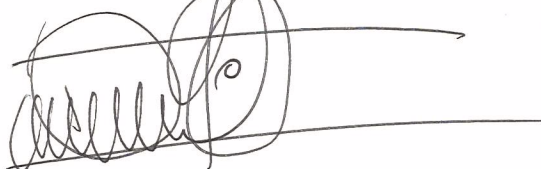
Aprovada em: 17.12.2020
Pela Banca Examinadora



Prof. Dr. Leandro Cesar de Godoy

Departamento de Zootecnia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
LEANDRO CESAR DE GODOY
PPG Zootecnia/UFRGS
Orientador

Homologado em: 17/02/2021
Por



DANILO PEDRO STREIT JR.
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia



Leonardo José Gil Barcellos
UPF




Dra. Andrea Giannotti Galuppo

Andrea Giannotti Galuppo
UFRGS



Danilo Pedro Streit Jr.
UFRGS



CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de Agronomia

ORGANIZAÇÃO MORFOLÓGICA E AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DO PACOTE E GAMETAS DO CORAL *Mussismilia harttii*¹

Autor: Wanderson Valente dos Santos

Orientador: Leandro Cesar de Godoy

RESUMO: O declínio crescente das espécies construtoras de recifes em todo o mundo reforça a urgência de mais informações sobre a biologia reprodutiva em corais. Levando em consideração que metade das espécies de corais existentes na natureza nunca tiveram sua biologia reprodutiva investigada, a lacuna no conhecimento acerca do tema é realmente preocupante. Nesse estudo nós investigamos a ultraestrutura dos pacotes, oócitos e espermatozoides do coral endêmico do Atlântico Sul *Mussismilia harttii*. Nossos resultados mostraram que os pacotes são compostos por muco amorfo, sem constituição estrutural e com densidade de elétrons semelhante aos grânulos presentes no citoplasma dos oócitos. Não existe um padrão de distribuição de espermatozoides e oócitos no pacote. Os espermatozoides estão localizados em estruturas de formato hexagonal. Os oócitos são arredondados, recobertos por muco e apresentam microvilosidades por toda a sua superfície. Eles apresentam vesículas corticais próximas ou fundidas à membrana oocitária. Grânulos de lipídios esféricos, corpos de vitelo, um material fino granular disperso no citoplasma e inúmeras mitocôndrias foram identificadas no citoplasma. A presença das células *Symbiodinium-like*. Os espermatozoides possuem comprimento total de $6,25 \pm 1,34$ μm , apresentam cabeça oval ($0,40 \pm 0,11$ μm) e um longo flagelo ($5,53 \pm 1,25$ μm). O núcleo está localizado na região central da cabeça e os axonemas exibem o arranjo dos microtúbulos (9+2). Vesículas elétron densas (semelhantes às do complexo de Golgi) foram observadas próximas à membrana plasmática. Abaixo de cada complexo de Golgi há uma única e grande mitocôndria, que parece ter se formado a partir da fusão de outras menores. Os achados aqui detalhados darão suporte para futuros e necessários estudos que buscam compreender melhor a gametogênese, a formação do pacote de gametas e a fecundação em corais escleractíneos.

Palavras-chave: Reprodução sexuada, Pacotes, Gametas e Ultraestrutura.

¹ Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (102p.) Dezembro, 2020.

MORPHOLOGICAL ORGANIZATION AND ULTRASTRUCTURAL EVALUATION OF THE BUNDLES AND CORAL GAMETES *Mussismilia harttii*¹

Author: Wanderson Valente dos Santos

Advisor: Leandro Cesar de Godoy

ABSTRACT: The growing decline in reef-building species worldwide reinforces the urgency for more information on coral reproductive biology. Taking into account that half of the species of coral existing in nature have never had their reproductive biology investigated, the gap in knowledge on the subject is worrying. In this study, we investigated the ultrastructure of the bundles, oocytes and spermatozoa of the South Atlantic endemic coral *Mussismilia harttii*. Our results showed that the bundles are composed of amorphous mucus, without structural constitution and with an electron density similar to the granules present in the cytoplasm of oocytes. There is no pattern of distribution of sperm and oocytes in the bundle. Sperm are located in hexagonal shaped structures. Oocytes are rounded, covered with mucus and have microvilli throughout their surface. They have cortical vesicles close to or fused to the oocyte membrane. Spherical lipid granules, yolk bodies, a fine granular material dispersed in the cytoplasm and numerous mitochondria have been identified in the cytoplasm. There is a presence of *Symbiodinium-like* cells. The spermatozoa have a total length of $6.25 \pm 1.34 \mu\text{m}$, have an oval head ($0.40 \pm 0.11 \mu\text{m}$) and a long flagellum ($5.53 \pm 1.25 \mu\text{m}$). The nucleus is located in the central region of the head and the axonemes exhibit the arrangement of the microtubules (9 + 2). Dense electron vesicles (similar to those of the Golgi complex) were observed close to the plasma membrane. Below each Golgi complex is a single and large mitochondria, which appears to have formed from the merger of smaller ones. The findings detailed here will support future and necessary studies that seek to better understand gametogenesis, the formation of the gamete package and fertilization in scleractine corals.

Keywords: Sexual reproduction, Bundles, Gametes and Ultrastructure.

¹ Master of Science dissertation in Animal Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (102p.) Dezembro, 2020.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo I

Figura 1. Ciclo de vida dos corais liberadores de gametas (Projeto Coral Vivo). 19

Capítulo II

Figura 1. Sequência de liberação do pacote oócitos-espermatozoides durante a desova de *Mussismilia harttii*. **(a)** Pólipos com tentáculos encurtados e disco oral aumentado. **(b)** Pólipos de com o pacote de gametas visível no disco oral. **(c)** Pacote lançado na água..... 30

Figura 2. Organização e morfologia dos oócitos de *M. harttii*. **(a)** Estereomicroscopia (Stm) do agrupamento de oócitos com morfologia irregular quando contido dentro do pacote. **(b)** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando o arranjo dos oócitos e sua forma irregular dentro do pacote. **(c)** Stm mostrando a morfologia arredondada dos oócitos após a dissociação do pacote. **(d)** MEV mostrando a forma arredondada do oócito após a dissociação do pacote. **(e)** Stm destacando a presença de oócitos de morfologia ovóide mesmo após a dissociação do pacote (seta branca). **(f)** Stm ampliado para destacar a presença de um oócito ovóide após a dissociação do pacote (seta branca). 31

Figura 3. Disposição dos gametas nos fpacotes de *M. harttii*. **(a)** Microscopia de luz destacando as áreas cheias de muco onde os espermatozóides podem ser encontrados (triângulo branco). **(b)** Microscopia de luz do pacote mostrando a disposição dos gametas. Os espermatozóides (triângulo branco) estão localizados nas áreas mais densamente coradas. Os elementos menos corados e arredondados são os oócitos (triângulo preto). 32

Figura 4. Análise morfológica dos pacotes de gametas de *M. harttii* mostrando a localização da mucosa. **(a)** Microscopia de luz (ML) mostrando a presença de muco (mc) na área periférica do pacote e próximo aos espermatozóides (spz). **(b)** ML destacando a camada de muco ao redor dos oócitos no pacote. **(c-d)** Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) da mucosa. Também é possível observar dentro dos oócitos a presença de células semelhantes a *Symbiodinium* (sym), vesículas corticais (va), corpos vitelinos (yb) e, próximo ao oócito, estão os espermatozóides. 33

Figura 5. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão mostrando os diferentes arranjos de espermatozóides e oócitos no pacote. **(a)** Pequena quantidade de muco (mc) delimitando os oócitos e espermatozóides (spz). **(b)** Grande quantidade de muco separando os espermatozóides dos oócitos. 34

Figura 6. Morfologia das microvilosidades superficiais nos oócitos de *M. harttii* antes **(a)** e após **(b)** a dissociação do pacote de gametas..... 35

Figura 7. Distribuição e organização dos espermatozoides de *M. harttii* no pacote. **(a-b)** Microscopia de luz (ML) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) mostrando espermatozoides organizados em arquivos dentro dos pacotes. **(c-d)** ML e MET mostrando espermatozoides desorganizados no pacote.36

Figura 8. Localização e orientação dos espermatozoides no pacote de *M. harttii*. **(a)** Microscopia de luz (ML) do pacote mostrando espermatozoides desorganizados na mucosa. **(b)** Detalhe (ML) dos espermatozoides em arquivo na mucosa com seus flagelos estendidos lateralmente, promovendo organização em arquivos. **(c-f)** Regiões em formato hexagonal que contêm os espermatozoides.37

Figura 9. Detalhe dos espermatozoides de *M. harttii* observados por **(a)** microscopia de luz e por **(b)** microscopia eletrônica de varredura.38

Capítulo III

Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura dos oócitos de *M. harttii* **(a)** Oócito arredondado com uma densa camada de muco aderida à sua superfície. **(b)** Oócito arredondado com uma fina camada de muco sobre sua superfície. **(c)** Micovilosidades distribuídas por todo o oócito e a presença de muco aderido à elas. **(d)** Detalhe dos microvilos por toda a superfície do oócito. **(e)** Presença de estrutura similar à escamas na superfície do oócito. **(f)** Detalhe das estruturas similares à escamas.57

Figura 2. Microscopia eletrônica de transmissão mostrando os constituintes internos dos oócitos de *M. harttii*. **(a)** Visão geral: Observe a presença de micovilosidades (mic), mitocôndrias (mit), vesículas corticais (vc), células *Symbiodinium-like* (sym), corpos de vitelo (cv), grânulos lipídicos (gl) e material fino granular (mfg). **(b)** Micovilosidades em formato de pontos devido ao ângulo do corte histológico. **(c)** Grânulos lipídicos (gl) com faixas claras. **(d)** Detalhe dos corpos de vitelo (cv) variando em tamanho, forma e densidade eletrônica.58

Figura 3. Microscopia eletrônica de transmissão detalhando os constituintes do interior dos oócitos de *M. harttii*. **(a)** Vesículas corticais (vc) homogêneas e ovóides próximas à membrana plasmática do oócito (setas pretas). **(b)** Vesícula cortical (vc) fundida à membrana e possivelmente liberando material extracelular (seta preta). **(c)** Presença de mitocôndrias (mit) distribuídas no citoplasma do oócito. **(d)** Célula *Symbiodinium-like* (sym) próxima a periferia do oócito.59

Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura dos espermatozoides de *M. harttii* **(a)** Espermatozoide com flagelo estendido e com muco aderido à sua cabeça. **(b)** Detalhe da cabeça ovoide dos espermatozoides.60

Figura 5. Microscopia eletrônica de transmissão dos espermatozoides de *M. harttii*. **(a)** Visão geral: Observe o núcleo (n), conectados a ele os centríolos (ct), as vesículas elétricas densas (v), duas regiões com complexos de Golgi (gc), abaixo de cada Golgi existe uma única mitocôndria (mit), e o flagelo (fg). **(b)** Detalhe do núcleo (n) exibindo

regiões mais elétrons densas que outras. **(c)** Os centríolos (ct) penetram no fundo do núcleo (n). **(d)** Os centríolos (ct) distais dão origem a matriz microtubular do flagelo (fg).....61

Figura 6. Microscopia eletrônica de transmissão dos espermatozoides de *M. harttii* mostrando **(a)** Os axonemas (ax) dos microtubulos 9+2 do flagelo (fg). **(b)** Detalhes da posição dos centríolos (ct) e a matriz flagelar (fm). **(c)** Vesículas (v) na região periférica. **(d)** Detalhes das vesículas (v) mostrando uma borda semelhante as encontradas nos complexos de Golgi (gc).62

Figura 7. Microscopia eletrônica de transmissão dos espermatozoides de *M. harttii*. **(a)** Complexo de Golgi (gc) paralelos e empilhados. **(b)** Detalhes do complexo de Golgi (gc) mostrando as lamelas semelhantes às encontradas nas vesículas (v). **(c)** Mitocôndria (mit) única abaixo de cada Golgi (gc). **(d)** Detalhes da mitocôndria (mit) mostrando as cristas e a dupla membrana.....63

Figura 8. Representação esquemática do espermatozoide de *M. harttii* com suas organelas. Vesículas elétrons densas (v), núcleo (n), complexos de Golgi (gc), duas mitocôndrias (mit), centríolos (ct), flagelo (fg) e matriz flagelar (fm).....64

Figura 9. Microscopia eletrônica de transmissão dos espermatozoides de *M. harttii*. **(a)** Espermatozoides com mitocôndrias fundidas (mf). **(b)** Detalhes das mitocôndrias fundidas formando uma única organela (mf). **(c)** Espermatozoide com mitocôndrias unidas e cromatina descondensada (seta preta), próximos a espermatozoides com mitocôndrias individualizadas e cromatina condensada (seta branca).....65

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

L – litro

mL – mililitro

M – molar

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MO – Microscopia Óptica

ML – Microscopia de Luz

Stm – Esteriomicroscopia

OsO₄ – Tetróxido de ósmio

h – horas

min – minutos

s – segundos

mm – milímetro

µm – micrómetro

nm – nanômetro

mc – muco

sym – Symbiodinium-Like

vc – vesícula cortical

yb – corpos de vitelo

mic – microvilosidade

mit – mitocôndria

gl – grânulo de lipídeo

mfg – material fino granular

vc – corpo de vitelo

spz – espermatozoide

n – núcleo

ct – centríolo

v – vesícula elétron-densa

gc – complexo de Golgi

fg – flagelo

ax – axonema

fm – matriz flagelar

mu – mitocôndria unida

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1. 2.1. BIOLOGIA E MORFOLOGIA	16
2. 2.2. RECIFES BRASILEIROS.....	17
3. 2.3. INFLUÊNCIAS ANTRÓPICAS NOS RECIFES DE CORAL DO MUNDO.....	19
4. 2.4. INFLUÊNCIAS ANTRÓPICAS NOS RECIFES DE CORAL DO BRASIL	20
5. 2.5. ULTRAESTRUTURA DE GAMETAS E PADRÕES REPRODUTIVOS EM CORAIS.....	20
3. HIPOTHESES E OBJETIVOS	22
CAPÍTULO II	23
1. INTRODUÇÃO	26
2. MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1. COLETA DAS COLÔNIAS E AUTORIZAÇÕES LEGAIS	28
2.2. COLETA E SEPARAÇÃO DOS GAMETAS.....	28
2.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	28
2.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	29
2.5. MICROSCOPIA ÓPTICA (MO).....	29
3. RESULTADOS	30
4. DISCUSSÃO	39
5. REFERÊNCIAS	44
CAPÍTULO III	50
1. INTRODUÇÃO	53
2. MATERIAL E MÉTODOS	54
2.1. COLETA DAS COLÔNIAS E AUTORIZAÇÕES LEGAIS.....	54
2.2. COLETA E SEPARAÇÃO DOS GAMETAS.....	54
2.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	55
2.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	55
2.5. MICROSCOPIA ÓPTICA (MO).....	55

2.6. ANÁLISES PRELIMINARES	56
3. RESULTADOS	56
3.1. ULTRAESTRUTURA DO OÓCITO.....	56
3.2. ULTRAESTRUTURA DO ESPERMATOZOIDE	59
4. DISCUSSÃO	66
4.1. ULTRAESTRUTURA DO OÓCITO.....	66
4.2. ULTRAESTRUTURA DO ESPERMATOZOIDE	69
5. REFERÊNCIAS	72
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
APÊNDICES	84

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Os recifes de coral estão entre os ecossistemas de maior biodiversidade e produtividade do planeta. Ainda que ocupe uma área inferior a 1% do oceano, estima-se que pelo menos um quarto de toda a vida marinha depende diretamente deste ambiente para sobrevivência (Mulhall, 2007; Wilkinson, 2008). Portanto, os recifes de coral exercem um importante papel na renovação dos estoques pesqueiros, gerando alimento e fonte de renda para milhares de comunidades em todo o mundo. Além disso, os corais têm grande potencial farmacológico e servem como barreiras de proteção para as regiões costeiras (Hoegh-Guldberg, 2007).

Os corais são metazoários e possuem uma estreita relação simbiótica com organismos unicelulares chamados de zooxantelas. As zooxantelas são dinoflagelados do gênero *Symbiodinium*, apresentam forma esférica das suas células, exibindo com frequência a coloração dourada (Rohwer et al., 2002). Vivem livres e dispersas no interior da gastroderme onde estão protegidas e recebem suprimentos e nutrientes fundamentais para a realização da fotossíntese (Costa et al., 2005; Cairns, 2007). Em contrapartida, as zooxantelas fornecem ao seu hospedeiro substratos provenientes da fotossíntese como oxigênio, glicose, glicerol e aminoácidos.

Os corais apresentam um ciclo de vida simples que compreende duas fases: a fase larval (vida livre) e a de pólipos, que se fixa ao substrato (Ventura e Pires, 2009), e sua reprodução pode ocorrer de forma assexuada ou sexuada. A forma mais comum de reprodução assexuada ocorre através do brotamento de um pólipos que se desprende do pólipos parental ou através da fragmentação da colônia (Rohwer et al., 2002). Esse processo continua durante toda a vida do animal, sendo que os novos corais são clones da colônia parental. A reprodução sexuada consiste na produção de gametas (espermatozoides e oócitos), promovendo a diversidade genética por meio da fecundação cruzada entre indivíduos (Harrison, 2011; Huang, 2012). Os corais podem desenvolver colônias ou pólipos de um único sexo (masculino ou feminino), ou hermafroditas. Nos hermafroditas, o animal desenvolve ambos os sexos, podendo ocorrer colônias de pólipos hermafroditas, ou colônias de pólipos machos e fêmeas (Pires et al., 2016). Os gametas masculinos e femininos são formados no mesmo pólipos, dentro de regiões do mesentério. Desse modo, quando maduros, a parede do mesentério se rompe, liberando oócitos e espermatozoides para o interior da cavidade gastrovascular, onde são envolvidos por uma camada de muco formando um pacote compacto. No período da desova os pacotes com os gametas são liberados pelas

bocas dos pólipos. Quando eliminados na água, os pacotes boiam até atingir a superfície do mar. Na superfície eles se rompem e os espermatozoides e oócitos se dissociam uns dos outros. A fecundação cruzada, onde o oócito de uma colônia é fecundado pelo espermatozoide de outra colônia ocorre livremente na água, formando embriões que ficam à deriva no mar. Em poucos dias esses embriões se desenvolvem em larvas. Essas larvas se fixam ao substrato, sofrem metamorfose, tornando-se pólipos juvenis, que irão começar a produzir em sua base o esqueleto de calcário. Esses pólipos juvenis então se multiplicam de forma assexuada por divisão, e assim se dá o crescimento das colônias (Pires et al., 2016).

Atualmente, o ecossistema recifal vem sofrendo grande ameaça decorrente dos impactos provocados pelo homem, como o lançamento de resíduos urbanos e industriais nos corpos d'água (Muñoz, 2008), a superexploração dos recursos pesqueiros (Bender, 2014), a acidificação das águas (Hoegh-Guldberg, 2007) e o uso de substâncias químicas nocivas presentes em protetores solares (Danovaro, 2008), além da mudança do clima do planeta (Baker et al., 2008). O estresse térmico provocado pelo aumento da temperatura do oceano faz com que a simbiose entre as microalgas (zooxantelas) e os corais se desfça, levando ao desenvolvimento de um fenômeno chamado branqueamento. Dependendo da intensidade do branqueamento, os corais não conseguem se recuperar e acabam morrendo. Dados de monitoramento no ano de 2016 mostraram que a mortalidade média foi de 22% para toda Grande Barreira de Corais na Austrália (Cressey, 2016). Estima-se que cerca de 40% dos recifes de coral do planeta já morreram, e as previsões apontam que esses eventos se tornarão ainda mais frequentes, limitando sua recuperação e podendo levar ao colapso de todo esse ecossistema (Godoy, 2018).

O Oceano Atlântico Sul abriga 16 espécies de corais pétreos (verdadeiros) de águas rasas, sendo cinco delas endêmicas do Brasil (Castro e Zilberberg, 2016). O coral-couve-flor (*Mussismilia harttii*) está entre as principais espécies responsáveis pela construção dos recifes brasileiros, porém já está sofrendo com eventos constantes de branqueamento, decorrente do aumento da temperatura do oceano nos últimos anos, doenças (Castro e Pires, 1999; Leão et al., 2016) e encontra-se sob ameaça de extinção (ICMBIO, 2018). Anomalias térmicas potencializadas pelo El Niño ocorreram no primeiro semestre de 2019 e causaram o branqueamento de cerca de 80% das colônias de *M. harttii* no Parque Marinho do Recife de Fora (Porto Seguro, BA), sendo que a extensão desse dano ainda é desconhecida.

A preservação *in situ*, como unidades de conservação marinha, pode colaborar na redução dos impactos locais, mas a influência antrópica na mudança do clima no planeta ainda continuará provocando o decréscimo da biodiversidade do ecossistema coralíneo. Com o desaparecimento dos corais, a diminuição drástica dessa biodiversidade afetará a pesca e poderá deixar 275 milhões de pessoas em situação de fome extrema (FAO, 2018), acarretando em um prejuízo econômico de quase U\$ 7 bilhões de dólares (Bruno e Valdivia, 2016). Somado a isso, têm os impactos ecossistêmicos decorrentes do avanço de tempestades vindas diretamente do mar aberto, e eventos de erosão e sedimentação nas regiões costeiras.

Algumas técnicas seguras para preservar a existência dos corais estão relacionadas ao conhecimento básico da biologia dos seus gametas (espermatozoides e oócitos) e de como ocorre a fertilização. Conhecer os gametas em nível ultraestrutural dá subsídios para sua manipulação adequada a fim de garantir o sucesso em técnicas de reprodução *in vitro* e de estocagem em baixa temperatura (criopreservação). Estudos detalhados sobre a ultraestrutura dos gametas de corais se limitam à poucos relatos na literatura. Alguns trabalhos avaliaram a ultraestrutura para identificar os processos de gametogênese em duas espécies (*Pocillopora darnicornis* e *Pocillopora elegans*) do Pacífico - Oriental (Glynn et al., 1991) e comparação filogenética em 35 espécies de Anthozoários do Oceano Atlântico – Mediterrâneo (Schmidt et al., 1979). Nosso grupo de pesquisa tem desenvolvido diversos estudos voltados à conservação do coral *M. harttii*, no entanto, nos deparamos com uma lacuna no conhecimento básico acerca da biologia dos seus gametas. A avaliação ultraestrutural nunca foi realizada para qualquer espécie de coral brasileiro.

Essa proposta traz uma abordagem inédita. A caracterização ultraestrutural permitirá conhecer a morfologia dos gametas de forma detalhada e dará subsídios para entender as estruturas que podem estar relacionadas ao processo de fecundação e manutenção da sua viabilidade. Além de, gerar um conhecimento básico, sólido e crucial que servirá de referência para futuros estudos de reprodução *in vitro*, fisiologia e congelamento de gametas. A associação desses conhecimentos somará esforços para a conservação dessa espécie endêmica da costa Brasileira.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Biologia e Morfologia

Os recifes de coral são formados por estruturas rochosas e rígidas, resistentes a choques provocados pela ação mecânica das ondas e correntes marítimas. São compostos por organismos marinhos (vegetais e animais) constituídos de esqueleto de calcário. Sua constituição envolve um conjunto de organismos, formando uma teia de associações e eventos em constante progressão (Castro e Zilberberg, 2016).

Os corais são animais cnidários da classe Anthozoa, formam esqueletos hematípicos da ordem Scleractinia (construtores de recifes) e são responsáveis pela deposição de carbonato de cálcio, dando um aspecto firme a sua estrutura (Vilaça, 2002). Outra particularidade importante sobre os corais está na sua relação simbiótica, associação que surgiu na era mesozoica logo após uma quase extinção (Stanley, 1988). Fato curioso foi que após o período triássico, as microalgas se diferenciaram, próximo aos corais simbióticos (Wells, 1954; Frankowiak *et al.*, 2016; Marcelino e Verbruggen, 2016). A associação simbiótica com os corais ocorre com uma microalga denominada zooxantela. As zooxantelas são um conjunto de organismos unicelulares que vivem em endossimbiose com os corais. São responsáveis pela fotossíntese possibilitando o desenvolvimento dos recifes. Além de dar coloração ao animal, as zooxantelas vivem no interior de células específicas chamados de simbiossoma, onde estão protegidas e recebem suprimentos e nutrientes fundamentais para a realização da fotossíntese. Em contrapartida, elas fornecem ao seu hospedeiro substratos provenientes da fotossíntese que são utilizados pelos corais para nutrição e crescimento (Fonseca *et al.*, 2017).

2.2. Recifes Brasileiros

O Brasil é o único país onde se encontram os recifes de coral verdadeiros do Oceano Atlântico Sul. Sendo esse denominado scleractínios, ou seja, construtores de recifes. A reprodução e renovação dos recifes de coral são processos necessários para que essas comunidades sejam mantidas. Dados sobre a biologia e métodos reprodutivos são importantes para o desenvolvimento de práticas de manejo, conservação desses ambientes e recuperação de áreas degradadas (Castro & Zilberberg, 2016).

Entre as espécies construtoras de recifes está a *Mussismilia harttii* da família Mussidae, esse gênero apresenta cálices separados com aspecto dicotômico, sem disposição de ramos laterais. Apresentam três diferentes tipos de alterações morfológicas descritas, as formas laxas com os cálices muito separados são

encontradas em águas lentas, a forma confertifolia com os cálices pouco separados são encontrados em águas mais agitadas e a forma intermediária, que envolve todas as outras formas que não apresentam características semelhantes as dos outros dois tipos. A colônia exibe coloração heterogênea em tons de marrom, cinza, amarelo e verde e apresentam traços primitivos que remetem o período terciário da bacia sedimentar do Atlântico.

A *M. harttii* é encontrada naturalmente no ambiente marinho, desde o Norte do Espírito Santo, Pernambuco e até o Rio Grande do Norte. Encontra-se em águas rasas de 2 a 3 m de profundidade, turbidez intermediária e também encontrada em águas mais profundas de 15 a 30 m e eventualmente a 80 m de profundidade. É considerada construtora primária nos recifes no estado de Pernambuco. Sua reprodução ocorre todos os anos ditada pelas fases da lua, especificamente na lua nova, sendo assim bem previsível o período de desova (Castro & Zilberberg, 2016).

De acordo com Pires et al., (2016) os dois gametas, masculino e feminino se formam no mesmo mesentério, no entanto sua formação ocorre em épocas distintas. Os cistos espermáticos que englobam os espermatozoides aparecem no oitavo mês do desenvolvimento dos oócitos e, logo, seu desenvolvimento tem um período de aproximadamente três meses (Pires et al., 2016). Deste modo, os dois gametas adquirem maturidade no mesmo período de tempo, podendo acontecer a desova no mesmo período. Ao alcançar a maturidade, as paredes do mesentério se rompem e os gametas são expelidos para a cavidade gastrovascular dos pólipos, onde são revestidos por muco ficando oócitos e espermatozoides próximos no mesmo pacote. No período da desova, os pacotes são liberados pelos pólipos que migram para a superfície da água. Espermatozoides e oócitos se separam com a movimentação da água e depois de um tempo inicia a fecundação cruzada, onde o espermatozoide de uma colônia fecunda o oócito de outra colônia (Godoy et al., 2018).

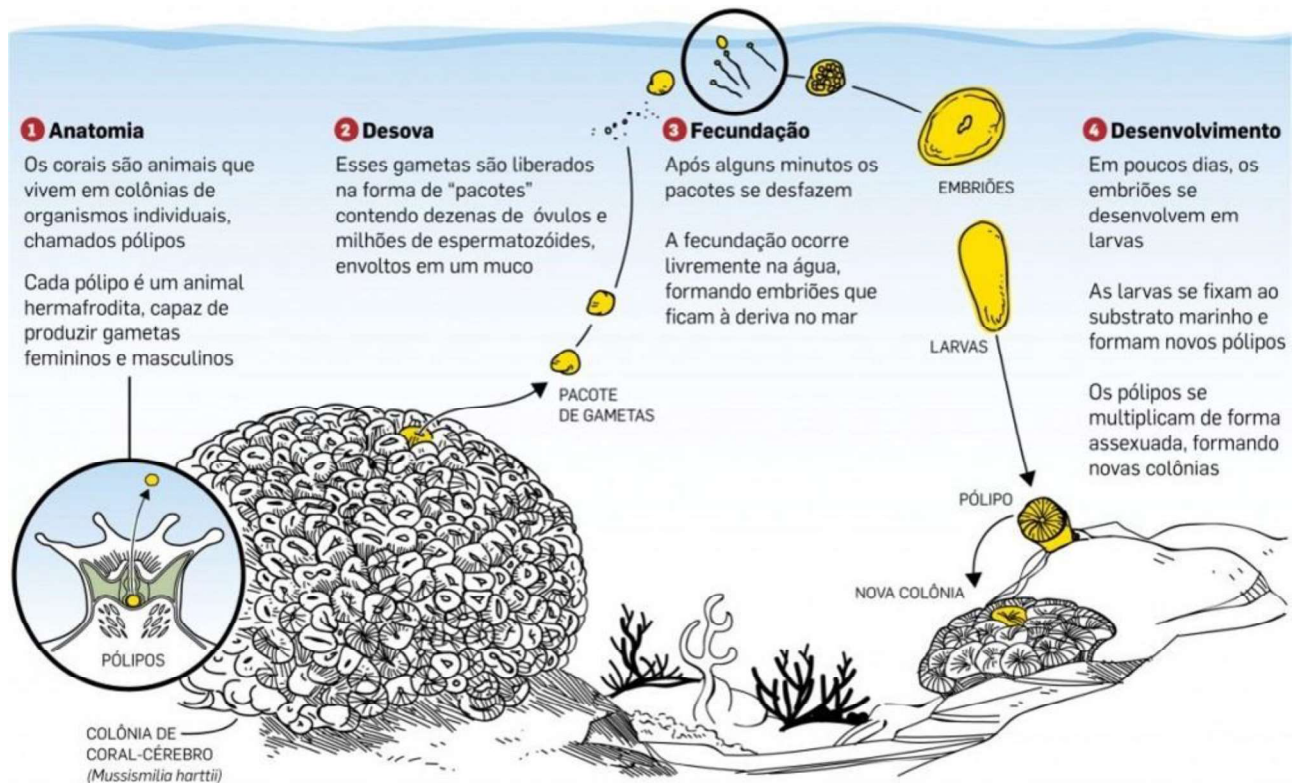


Figura 1. Ciclo de vida dos corais liberadores de gametas (Projeto Coral Vivo).

2.3. Influências Antrópicas Nos Recifes De Coral do Mundo

Os recifes de coral estão correndo sérios riscos de desaparecimento, atualmente o planeta já perdeu 50% dos corais em um período de 30 anos. Por influência das atividades antrópicas em 2014, 59 espécies de peixes que utilizam o recife para a sobrevivência desapareceram na costa da Filipinas e o mesmo está ocorrendo no Quênia, registrado no ano de 2019 (Baker et al., 2008; Veron et al., 2009; Cressey, 2016;). Esses impactos podem trazer sérias consequências para muitos organismos marinhos, que vão desde os próprios corais até grandes mamíferos que dependem deste ecossistema para sobrevivência.

O estresse térmico provocado pelo aumento da temperatura da superfície do oceano rompe a simbiose entre os corais e microalgas (zooxantelas), tornando-os brancos – fenômeno denominado de branqueamento. Conforme a intensidade do estresse, os corais não conseguem se recuperar e acabam morrendo. Previsões indicam que os eventos de branqueamento se tornarão mais frequentes (Heron et al., 2016), reduzindo a resistência dos corais e ameaçando os ecossistemas recifais em todo o mundo.

1. 2.4. *Influências Antrópicas Nos Recifes De Coral do Brasil*

No Brasil, já existem casos de branqueamento em corais da espécie zoantídeos em diferentes localidades ao longo do litoral brasileiro analisados desde o ano de 1990, onde foi observado o primeiro registro de branqueamento (Castro e Pires, 1999). Atividades antrópicas estão cada vez mais prejudicando as espécies de corais brasileiros, em especial a *M. harttii*, espécie endêmica que já se encontra em ameaça de extinção por ocupar áreas de águas rasas, na qual a interferência humana pelo turismo marinho, exploração dos recursos naturais e poluição costeira estão entre os principais agentes responsáveis pelo desaparecimento dessa espécie, mostrando um decréscimo de 50% de sua população em um período de 30 anos (Pires et al., 2016). Altas taxas de mortalidade sem recuperação aumentam a níveis alarmantes, levando a redução da variabilidade genética das comunidades de corais e a possível extinção, uma vez que a constância de uma espécie ou população depende da sua diversidade genética (Laikre et al., 2010).

Uma maneira de assegurar a existência e conservação dos corais está ligada a compreensão da biologia reprodutiva dos seus gametas (espermatozoides e oócitos) e de como ocorre a fertilização. Compreender a ultraestrutura dos gametas irá auxiliar na utilização correta a fim de conseguir o êxito nas técnicas de reprodução *in vitro* e de armazenamento dos gametas em baixas temperaturas (criopreservação) (Godoy et al., 2013; Ohki et al., 2014 Hagedorn et al., 2018; 2012; 2006).

2. 2.5. *Ultraestrutura de Gametas e Padrões Reprodutivos em Corais*

Estudos detalhados sobre a ultraestrutura dos gametas dos corais se limitam à poucos relatos na literatura, decorrente da falta de técnicas e equipamentos que auxiliam esse tipo de trabalho. Apesar do conhecimento atual a respeito da utilização da microscopia eletrônica, as análises das ultraestruturas podem proporcionar dados sobre a formação e maturação dos gametas, e auxiliar na descoberta da fisiologia relacionada a adaptações ambientais (Glynn et al., 1991; Fautin, 1991). Relatos mostram a utilização da ultraestrutura para inferir relações filogenéticas entre espécies de corais (Schmidt et al., 1979). De acordo com Stanley et al., (1988) ao verificar a ultraestrutura nos processos de gametogênese de duas espécies diferentes *Pocillopora damicornis* e *Pocillopora elegans* pertencentes a família Pocilloporidae pode verificar inúmeras características semelhantes na disposição estrutural das células. Do mesmo modo, foi utilizado a comparação filogenética em 35 espécies de

Anthozoários do Oceano Atlântico – Mediterrâneo (Schmidt et al., 1979). Pesquisas também têm utilizado a ultraestrutura dos pacotes de oócitos-espermatozoides liberados durante reprodução (Richmond et al., 1997). Essa técnica pode inferir o tempo necessário para abertura dos pacotes, o que tem consequências para o êxito durante a reprodução (Wolstenholme et al., 2004).

A ultraestrutura é avaliada com o auxílio da microscopia eletrônica que permite a obtenção de informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos (Fautin, 1991). A microscopia eletrônica proporciona a observação do material de estudo com alta resolução. Existem algumas técnicas de microscopia eletrônica onde se destacam a microscopia eletrônica de varredura e a microscopia eletrônica de transmissão como as mais importantes (Fautin, 1991). Feixes de elétrons são emitidos na amostra e ao atingir o material ocorre uma interação entre elas gerando padrões excitatórios. Na microscopia eletrônica de varredura o contato entre os elétrons com a amostra tem como resultado elétrons secundários retroespalhados que será coletado pelo detector de sinais. Além do que, esse processo provocará na ionização do átomo atingido pelos elétrons primários. Essa instabilidade de carga produzirá raios X na amostra.

Na microscopia eletrônica de varredura ocorre a desaceleração total dos elétrons, possibilitando somente a visualização da superfície do material. Já na microscopia eletrônica de transmissão, pelo fato das amostras sofrerem cortes ultrafinos, os elétrons conseguem atravessar com maior facilidade, gerando imagens mais detalhadas. A ultraestrutura mostra-se como uma importante ferramenta para o conhecimento da biologia dos gametas do coral *M. harttii* possibilitando o conhecimento que será utilizado na reprodução *in vitro*, fisiologia e congelamento dos gametas. Essas técnicas permitirão estabelecer protocolos que ajudarão na conservação dessa espécie.

3. HIPÓTESES E OBJETIVOS

Hipótese:

O conhecimento da ultraestrutura dos espermatozoides e oócitos do coral *Mussismilia harttii* permite entender sobre a viabilidade e fecundação dos gametas, e assim estabelecer técnicas para conservação da espécie.

Objetivo geral:

Caracterizar a ultraestrutura dos pacotes e gametas do coral *Mussismilia harttii* e dar subsídios para o estabelecimento de técnicas para conservação da espécie.

Objetivos específicos:

- Caracterizar a ultraestrutura dos espermatozoides de *M. harttii* utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET);
- Caracterizar a ultraestrutura dos oócitos de *M. harttii* utilizando MEV e MET;
- Identificar e localizar as organelas presentes nos oócitos e espermatozoides de *M. harttii*;
- Caracterizar a ultraestrutura dos pacotes de *M. harttii* utilizando MEV e MET.

CAPÍTULO II*

Organização morfológica e avaliação ultraestrutural dos pacotes de oócitos-espermatozoides do coral pétreo *Mussismilia harttii*

*Artigo elaborado seguindo modelo de estrutura e formatação do periódico *Coral Reefs*.

Organização morfológica e avaliação ultraestrutural dos pacotes de oócitos-espermatozoides do coral pétreo *Mussismilia harttii*

Wanderson Valente¹, Andrea Giannotti Galuppo¹, Jener Alexandre Sampaio Zuanon², Leandro Godoy^{1,3*}

¹Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (RS) Brasil.

²Laboratório de Fisiologia Aplicada à Piscicultura, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil.

³ Instituto Coral Vivo, Santa Cruz Cabrália, Brasil.

Corresponding author: L. Godoy.

E-mail address: leandro.godoy@ufrgs.br

Resumo

Embora os corais escleractinianos possam se reproduzir sexuadamente e assexuadamente, a maioria das espécies com características reprodutivas conhecidas são liberadoras de gametas, com cerca de 65% sendo predominantemente hermafroditas. Esses corais envolvem seus gametas em uma espécie de muco e os expõem em um pequeno pacote flutuante, que é chamado de pacotes de oócitos-espermatozoides. Embora esses pacotes sejam cruciais para a dispersão de gametas permitindo uma fertilização cruzada bem-sucedida, pesquisas que avaliem em detalhes sua estrutura são extremamente raras na literatura. No presente estudo, investigamos a composição do pacote e o arranjo e organização dos gametas dentro, antes e depois da dissociação, usando análises histológicas e ultraestruturais. Foi utilizado o coral endêmico *Mussismilia harttii*, por ser um dos principais construtores de recifes do Brasil e listado como espécie em extinção. Nossos resultados mostraram que os pacotes são compostos por muco amorfo, sem constituição estrutural e com densidade de elétrons semelhante aos grânulos presentes no citoplasma dos oócitos. Não existe um padrão de distribuição de espermatozoides e oócitos no pacote, embora existam regiões de altas concentrações que podem chegar a 91 espermatozoides por mm^2 . A dissociação do pacote promove importantes diferenças morfológicas para os oócitos. Os espermatozoides estão localizados em estruturas de formato hexagonal, semelhantes aos alvéolos de uma colmeia de abelhas. Dada a complexidade estrutural observada, acreditamos que a liberação de espermatozoides em *M. harttii* ocorre por meio da ruptura completa das paredes dos cistos espermáticos, e que a estrutura hexagonal é um componente dos espermátocitos. Uma vez liberados na cavidade gastrovascular, os espermátocitos são envolvidos por muco, mantendo os espermatozoides na mesma organização. Este relatório inicial lança luz sobre uma área pouco explorada que pode auxiliar em um melhor entendimento da fertilização de corais de transmissão hermafrodita e fornecer suporte para estudos futuros sobre biotecnologias reprodutivas para a conservação de corais.

Palavras-chave: Reprodução sexuada, Hermafrodita, Pacotes, Gametas, Morfologia e Ultraestrutura.

1. Introdução

Embora os corais escleractinianos possam se reproduzir sexuadamente e assexuadamente (Wallace 1985; Ayre e Resing 1986; Baird et al. 2009), cerca de 86% das espécies com características reprodutivas conhecidas são liberadoras de gametas (Baird et al. 2009). Esta estratégia é ancestral dos métodos de fertilização interna (Gallego et al. 2014), é prevalente em muitas espécies aquáticas de vários filos (Levitan 1998) e envolve a liberação de gametas na coluna de água, onde ocorre fertilização externa e embriogênese (Szmant 1986; Giese e Kanatani 1987; Wray 1995).

Os corais podem ser gonocóricos, apresentando colônias ou pólipos de um único sexo (masculino ou feminino), ou hermafroditas. Neste último caso, uma única colônia apresenta ambos os sexos, que podem ocorrer pólipos hermafroditas em uma colônia inteira ou em colônias com uma mistura de pólipos masculinos e femininos (Richmond 1997; Harrison e Wallace 1990; Harrison, 2011). Estudos mostram que cerca de 65% das espécies conhecidas de corais escleractíneos são predominantemente hermafroditas (Guest et al. 2008; Baird et al. 2009). A maioria das espécies envolve seus gametas com um tipo de muco e os expõe como pequenos pacotes flutuantes (Kinzie 1996). Esses pacotes de oócitos-espermatozoides têm um papel importante no transporte de gametas para a superfície do oceano, o que minimiza a diluição do esperma e aumenta a chance de espermatozóides e oócitos de diferentes colônias se encontrarem. Como resultado, a estratégia permite a fertilização cruzada com sucesso e promove a diversidade genética para a prole de coral (Harrison e Wallace 1990, Richmond 1997; Baird et al. 2009; Harrison, 2011).

Existem poucos estudos publicados que descrevem a morfologia dos gametas para corais escleractinianos (Wallace 1985; Richmond 1997; Steiner 1991, 1993; Goffredo et al. 2000; Wolstenholme 2004; Vargas-Ángel et al. 2006; Kawaroe et al. 2007; Padilla-Gamiño et al. 2011; Tsai et al. 2016; Lin et al. 2018). No entanto, apenas cinco deles apresentaram detalhes sobre os pacotes de oócitos-espermatozoides e apenas um estudo (Padilla-Gamiño et al. 2011) avaliou especificamente a morfologia dos pacotes por meio de análises histológicas e ultraestruturais. Assim, nos deparamos com uma lacuna no conhecimento básico sobre a morfologia e a ultraestrutura dos pacotes de oócitos-espermatozoides de corais escleractíneos.

O Brasil é o único país onde se encontram os recifes de coral verdadeiros do Oceano Atlântico Sul. Abrigam 16 espécies de corais pétreos de águas rasas, sendo

cinco delas endêmicas a costa brasileira (Castro e Zilberberg, 2016). Os corais do gênero *Mussismilia* são encontrados desde o norte do Espírito Santo até o Rio Grande do Norte. Os principais construtores de recifes pertencem ao gênero *Mussismilia* Ortmann 1890, endêmico do Brasil (Leão et al. 2016) e teve suas características de reprodução descritas pelos estudos pioneiros de Pires et al. (1999). O coral-couve-flor (*Mussismilia harttii*) é uma espécie hermafrodita simultânea, liberando ambos os gametas juntos em pacotes de oócitos-espermatozoides flutuantes durante as noites de lua nova entre setembro e novembro (Pires et al. 1999; Neves e Pires 2002; Pires et al. 2016). A espécie já está na lista vermelha de espécies ameaçadas de extinção no Brasil (ICMBio 2018).

Com o avanço das alterações climáticas no planeta, eventos de branqueamento e mortalidade estão se tornando cada vez mais extremos, ameaçando o futuro dos recifes de coral (Hughes et al. 2018, 2019). Assim, a reprodução sexuada terá um papel fundamental, pois a prole de indivíduos mais resistentes terá características genéticas inerentes que podem auxiliar na adaptação do coral a um ambiente em mudança. Uma maior compreensão deste complexo chamado de pacotes de oócitos-espermatozoides e suas possíveis relações com fertilização cruzada pode ser vantajoso em programas de conservação, uma vez que o recrutamento bem-sucedido da reprodução sexual é o principal responsável pela manutenção da cobertura de coral (Cameron e Harrison 2020).

Neste estudo inédito no Oceano Atlântico Sul, avaliamos a composição dos pacotes de oócitos-espermatozoides de *M. harttii* e o arranjo e organização dos gametas, antes e após a dissociação, usando análises histológicas e ultraestruturais.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta das colônias e autorizações legais

Quarenta colônias do coral *Mussismilia harttii* foram coletadas no entorno do Parque Municipal Marinho do Recife de Fora (16°24'31"S; 038°58'39"W) cerca de três semanas antes do período de desova previsto para a espécie (Pires et al. 1999; 2016). As colônias foram levadas para a Base de Pesquisa do Projeto Coral Vivo, identificadas e acondicionadas em viveiros (1000 L), com renovação periódica da água captada do mar. A execução dessa pesquisa foi aprovada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio - SISBIO Nº 63368-1) e pela Secretaria Municipal de Meio Ambiente da Prefeitura de Porto Seguro (Autorização Nº 01/2019).

2.2. Coleta e separação dos gametas

No momento da desova, os pacotes contendo oócitos e espermatozóides foram coletados da superfície da água dos tanques. Três pacotes foram coletados de cada colônia (n = 6) e imediatamente transferidos para tubos de 10 mL contendo soluções fixadoras (n = 18). Outros 15 pacotes foram coletados em tubos de 50 mL (três pacotes por tubo) contendo água do mar, onde permaneceram até sua completa dissociação com a separação dos oócitos e espermatozóides. Os oócitos flutuaram e ocuparam a superfície do tubo, enquanto o sêmen denso permaneceu no fundo. Os oócitos foram então removidos do tubo com uma pipeta Pasteur, lavados em água do mar filtrada para remover qualquer vestígio de sêmen e transferidos para uma solução fixadora. Alíquotas (± 1 mL) de sêmen contendo espermatozóides foram coletadas do fundo do tubo e transferidas para a solução fixadora.

2.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a microscopia eletrônica de varredura as amostras foram fixadas em glutaraldeído 25% com solução tampão fosfato 0,2 M, de acordo com a metodologia descrita por Morris (1965). Os materiais fixados foram lavados 3 vezes (30 minutos cada) no mesmo tampão. A desidratação foi realizada em séries crescentes de acetona (30% a 100%) por 10 minutos e a dessecação dos materiais ocorreu em aparelho de Ponto Crítico (Critical Point Dryer, Leica EM CPD030, Alemanha). Para a metalização o material recebeu a condução por meio de ouro e platina, utilizando Super Cool Sputter Coater, (Leica EM SCD050, Alemanha) e em seguida levado para

observação em microscópio eletrônico de varredura (Joel JSM 6060, EUA e Zeiss Evo 50, Alemanha).

2.4. *Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)*

Para as análises de microscopia eletrônica de transmissão, as amostras foram fixadas em solução contendo glutaraldeído 25%, paraformaldeído 8% e tampão fosfato 0,2 M (Morris 1965). O material pré-fixado foi lavado 3 vezes (30 minutos cada) no mesmo tampão. A pós-fixação foi realizada em 2% de OsO₄ em tampão fosfato 0,2 M (45 minutos) seguida por 3 banhos no mesmo tampão (15 minutos cada). A desidratação foi realizada em séries crescentes de acetona (30% a 100%) por 10 minutos e a pré-embrição realizada em banhos, misturando o desidratante com resina (Kit Epoxy Embedding) em proporções gradativas e crescentes, com tempo mínimo de 2 horas em cada banho. A embrição foi realizada com banho de resina (100%) durante 24 horas e a inclusão foi realizada em moldes de silicone com resina pura, em estufa (60°C) por 72 horas. Cortes ultrafinos (80 nm) foram depositados em grids e contrastados com solução aquosa de acetato de uranila 2% e citrato de chumbo, e observados em microscópio eletrônico de transmissão (FEI COMPANY, Tecnai G² 20 S-TWIN, USA).

2.5. *Microscopia Óptica (MO)*

Para as análises histológicas, as amostras foram fixadas e desidratadas da mesma maneira descrita nas amostras para MET. Após a desidratação as amostras foram incluídas em glicol metacrilato (Historesin, Leica, Alemanha) e realizados cortes de 3 µm de espessura, com o auxílio de um micrótomo rotativo (Leica, RM2255, Alemanha), utilizando-se navalhas de vidro. Os cortes foram aderidos em lâminas de vidro e corados com azul de toluidina e Hematoxilina-eosina (HE). As amostras foram montadas com Entellan (Merck, Frankfurt, Alemanha), fotodocumentadas em fotomicroscópio Olympus BX53 (Tóquio, Japão) com câmera Olympus DP73 acoplada.

2.6. *Análises preliminares*

As imagens obtidas por MEV, MET e MO foram avaliadas por meio do software de análise digital ImageJ (Microsoft Java 1.1.4.).

3. Resultados

3.1. Desova e dissociação dos pacotes de oócitos-espermatozoides

A desova de *Mussismilia harttii* ocorreu entre 17:30h e 19:30h ao longo de três dias (28-30 de setembro de 2019) durante a lua nova. Aproximadamente 5 minutos antes do início da desova, foi possível observar um aumento no tamanho do disco oral e encurtamento dos tentáculos dos pólipos desovadores (Fig. 1a). Cerca de 30s antes da desova, o pacote de oócitos-espermatozoides tornou-se visível sob o disco oral (Fig. 1b) e foi então liberado na água (Fig. 1c).

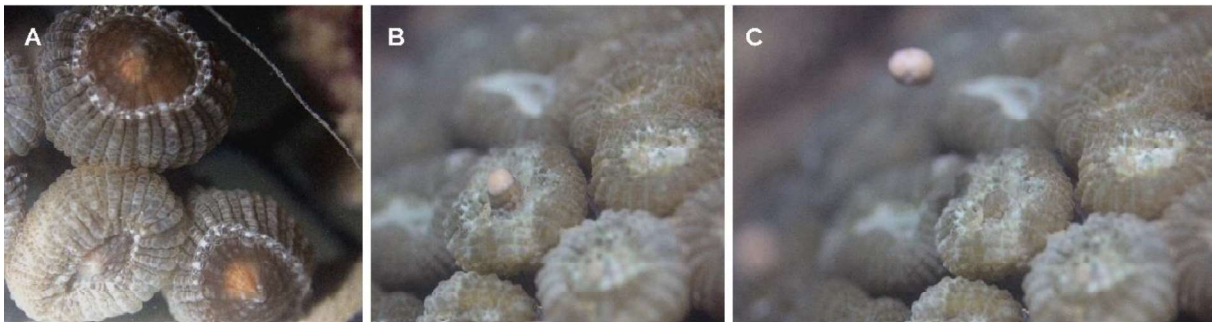


Figura 1. Sequência de liberação do pacote oócitos-espermatozoides durante a desova de *Mussismilia harttii*. (a) Pólipos com tentáculos encurtados e disco oral aumentado. (b) Pólipos de com o pacote de gametas visível no disco oral. (c) Pacote lançado na água.

Depois de serem liberados, os pacotes flutuaram para a superfície. A dissociação total dos pacotes ocorreu após cerca de 10 min, marcada inicialmente pela presença de oócitos visivelmente isolados e positivamente flutuantes. Quando dentro dos pacotes, os oócitos eram de forma irregular e mediam $90,5 \pm 0,02 \mu\text{m}$ de diâmetro (Fig. 2a - b). Após a dissociação do pacote, os oócitos tornaram-se arredondados e mediram $155,8 \pm 0,02 \mu\text{m}$ de diâmetro (Fig. 2c - d). Porém, mesmo

após a dissociação do pacote foi possível observar que alguns oócitos apresentavam morfologia ovoide, medindo $260 \pm 1,21 \mu\text{m}$ de diâmetro (fig. 2e-f).

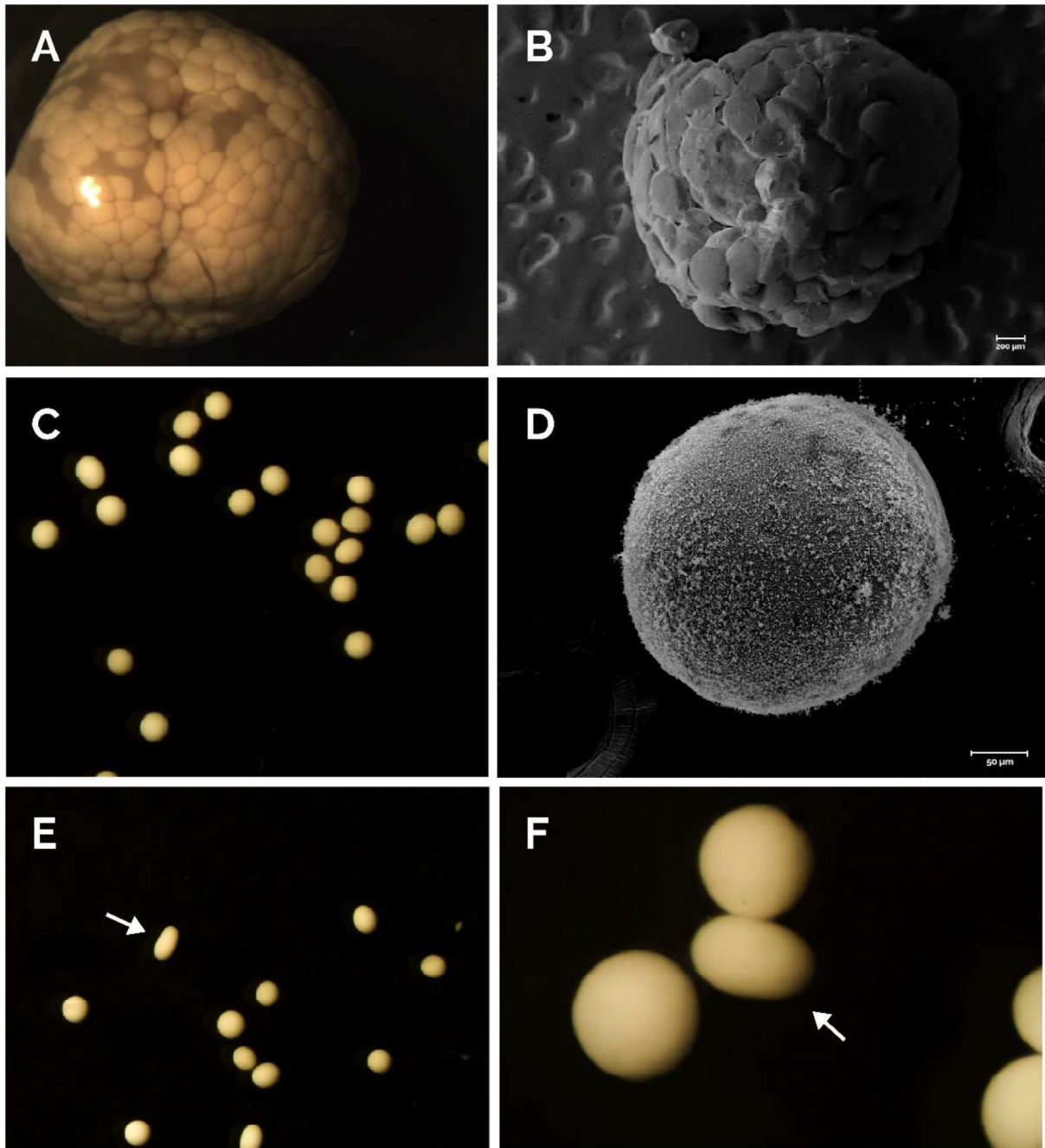


Figura 2. Organização e morfologia dos oócitos de *M. hartii*. **(a)** Estereomicroscopia (Stm) do agrupamento de oócitos com morfologia irregular quando contido dentro do pacote. **(b)** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando o arranjo dos oócitos e sua forma irregular dentro do pacote. **(c)** Stm mostrando a morfologia arredondada dos oócitos após a dissociação do pacote. **(d)** MEV mostrando a forma arredondada do oócito após a dissociação do pacote. **(e)** Stm destacando a presença de oócitos de morfologia ovóide mesmo após a dissociação do pacote (seta branca). **(f)** Stm ampliado para destacar a presença de um oócito ovóide após a dissociação do pacote (seta branca).

3.2. Morfologia e ultraestrutura dos pacotes de oócitos-espermatozoides

Os pacotes de gametas liberados por *Mussismilia hartii* mediam 3 mm e continham 296 ± 264 oócitos. Não houve padrão de distribuição observado para espermatozóides e oócitos nos pacotes (fig. 3).

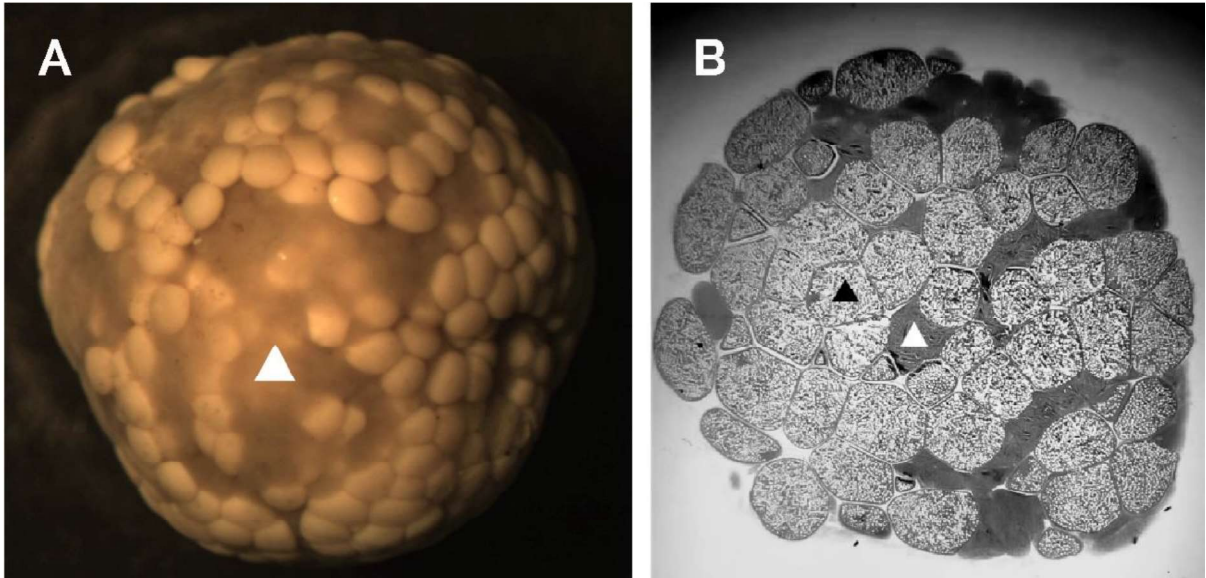


Figura 3. Disposição dos gametas nos pacotes de *M. hartii*. **(a)** Microscopia de luz destacando as áreas cheias de muco onde os espermatozóides podem ser encontrados (triângulo branco). **(b)** Microscopia de luz do pacote mostrando a disposição dos gametas. Os espermatozóides (triângulo branco) estão localizados nas áreas mais densamente coradas. Os elementos menos corados e arredondados são os oócitos (triângulo preto).

As observações de microscopia de luz indicam que as regiões periféricas do pacote, bem como os espaços entre os oócitos, estão envolvidos por muco (Fig. 4a, b). Este muco é amorfo e não apresenta composição estrutural. As análises de microscopia eletrônica de transmissão indicaram que o muco (Fig. 4c, d) apresenta densidade eletrônica semelhante à dos grânulos presentes no citoplasma dos oócitos.

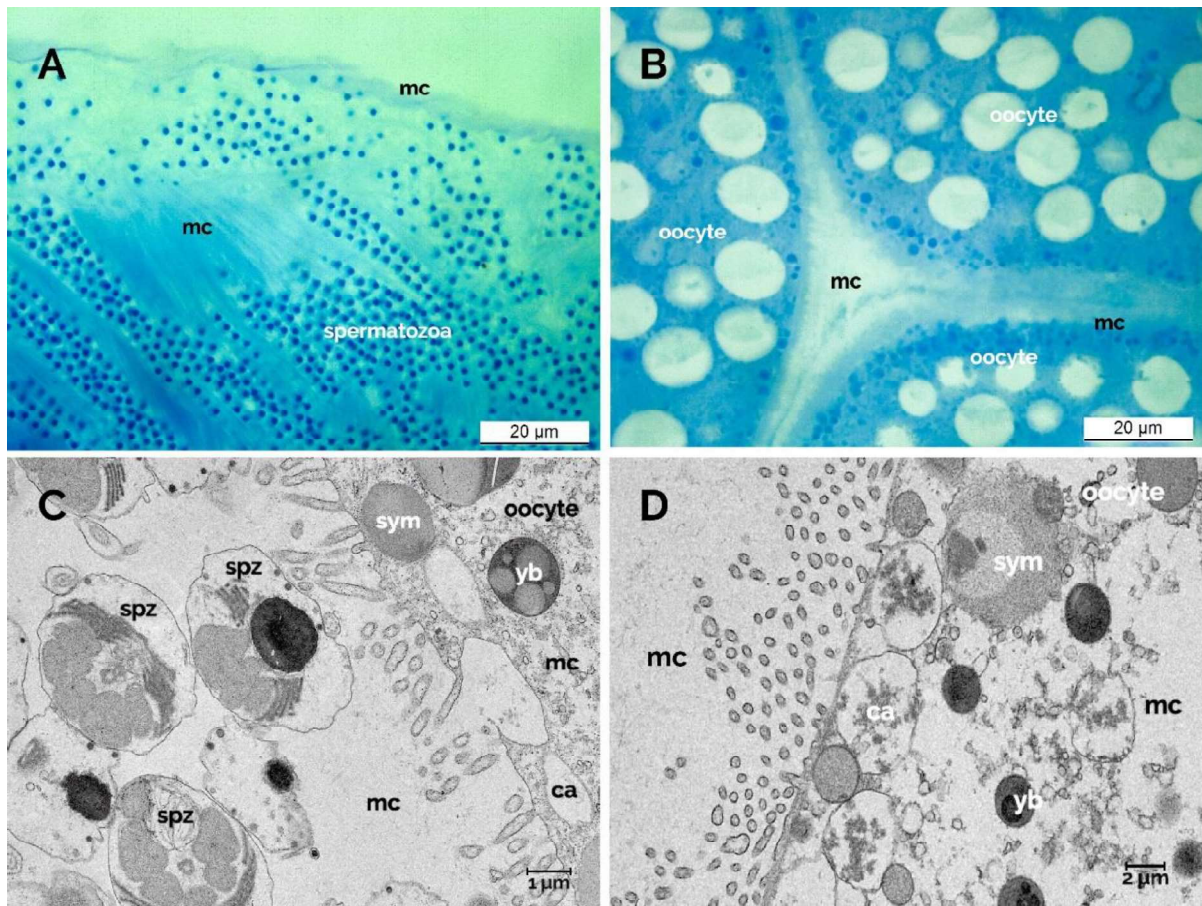


Figura 4. Análise morfológica dos pacotes de gametas de *M. harttii* mostrando a localização da mucosa. **(a)** Microscopia de luz (ML) mostrando a presença de muco (mc) na área periférica do pacote e próximo aos espermatozoides (spz). **(b)** ML destacando a camada de muco ao redor dos oócitos no pacote. **(c-d)** Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) da mucosa. Também é possível observar dentro dos oócitos a presença de células semelhantes a Symbiodinium (sym), vesículas corticais (va), corpos vitelinos (yb) e, próximo ao oócito, estão os espermatozoides.

A área de interação entre os espermatozoides e oócitos no pacote apresentou-se variável. Eram visíveis regiões em que espermatozoides e oócitos eram vistos bem próximos sem qualquer aparato delimitador entre eles (Fig. 5a), e regiões em que uma grande quantidade de muco isolava os gametas (Fig. 5b).

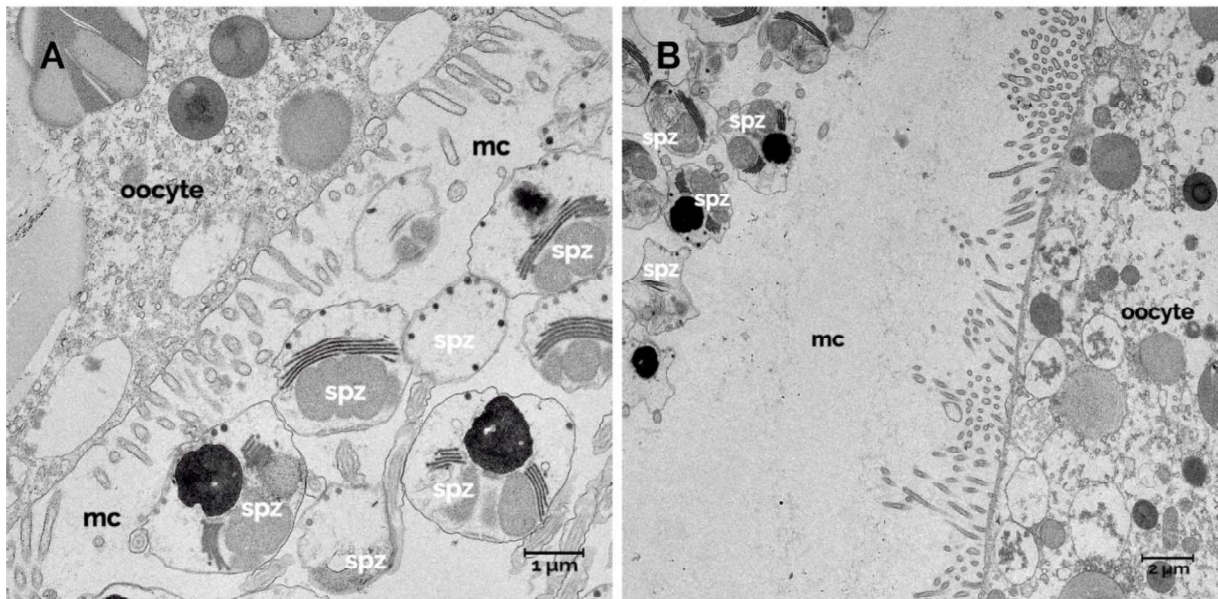


Figura 5. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão mostrando os diferentes arranjos de espermatozóides e oócitos no pacote. **(a)** Pequena quantidade de muco (mc) delimitando os oócitos e espermatozóides (spz). **(b)** Grande quantidade de muco separando os espermatozóides dos oócitos.

Observamos diferenças morfológicas nas microvilosidades superficiais dos oócitos antes e depois de sua dissociação do pacote (Fig. 6). Enquanto os oócitos estavam associados ao pacote, as microvilosidades estavam próximas umas das outras e eram espessas (Fig. 6a). Uma vez dissociados do pacote, os oócitos apresentam microvilosidades menos densas e finas (Fig. 6b).

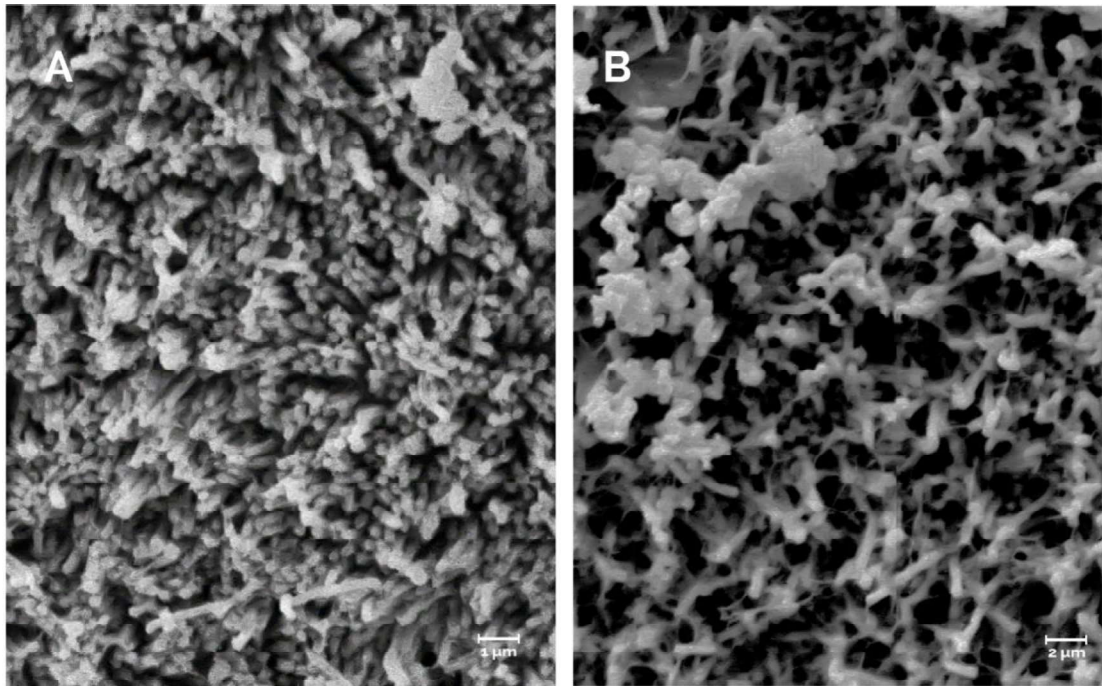


Figura 6. Morfologia das microvilosidades superficiais nos oócitos de *M. hartii* antes (a) e após (b) a dissociação do pacote de gametas.

Os espermatozoides estavam distribuídos por todo o pacote, porém de maneira desuniforme. Em algumas regiões com altas concentrações de espermatozoides organizados em fileiras era possível encontrar até 91 espermatozoides/mm² (Fig. 7 a-b), enquanto que em regiões de menor concentração (38 células/mm²) estavam dispersos e desorganizados (Fig. 7 c-d).

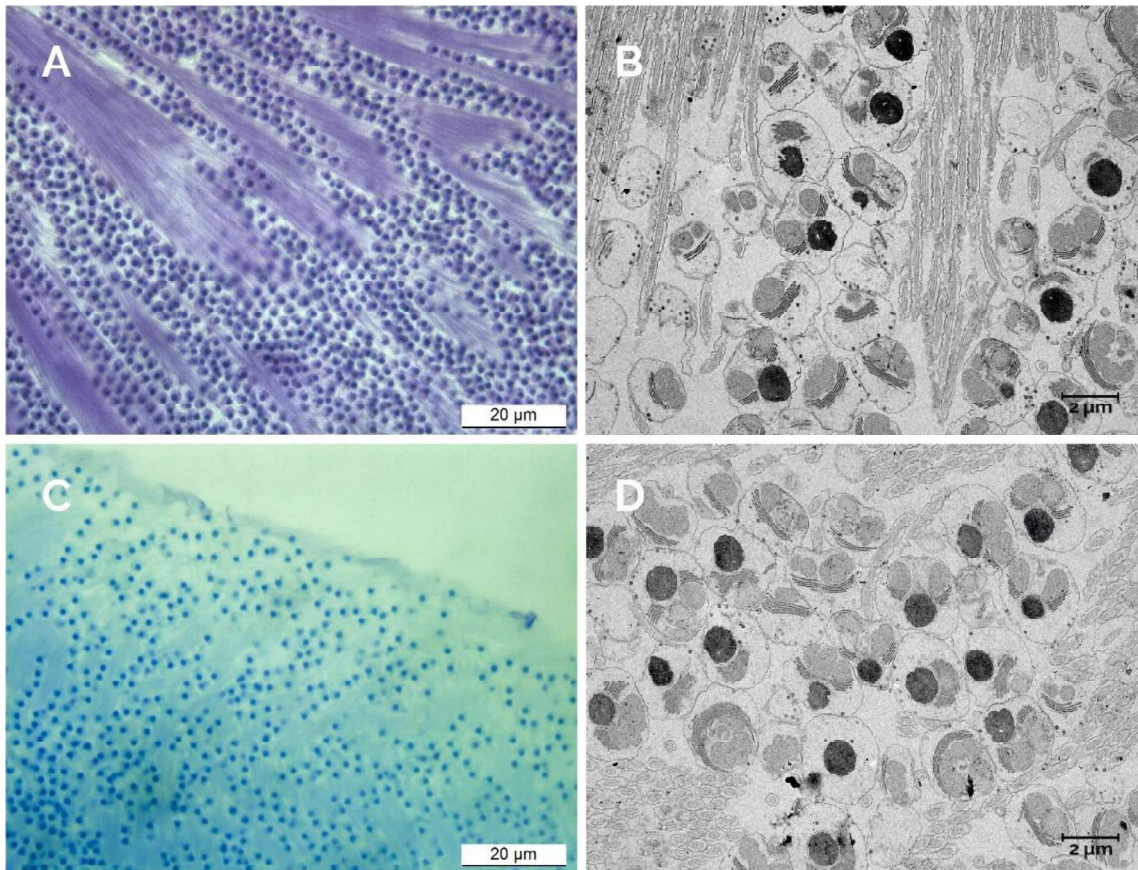


Figura 7. Distribuição e organização dos espermatozoides de *M. hartii* no pacote. **(a-b)** Microscopia de luz (ML) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) mostrando espermatozoides organizados em arquivos dentro dos pacotes. **(c-d)** ML e MET mostrando espermatozoides desorganizados no pacote.

Os espermatozoides são encontrados unidos e cobertos por muco semelhante ao que reveste todo o pacote (Fig. 8), as vezes distribuídos próximos dos oócitos (Fig. 8a) e às vezes isolados (Fig. 8b). Os espermatozoides estão localizados dentro de estruturas em formato hexagonal similares a alvéolos de uma colmeia de abelha (Fig. 8c – f).

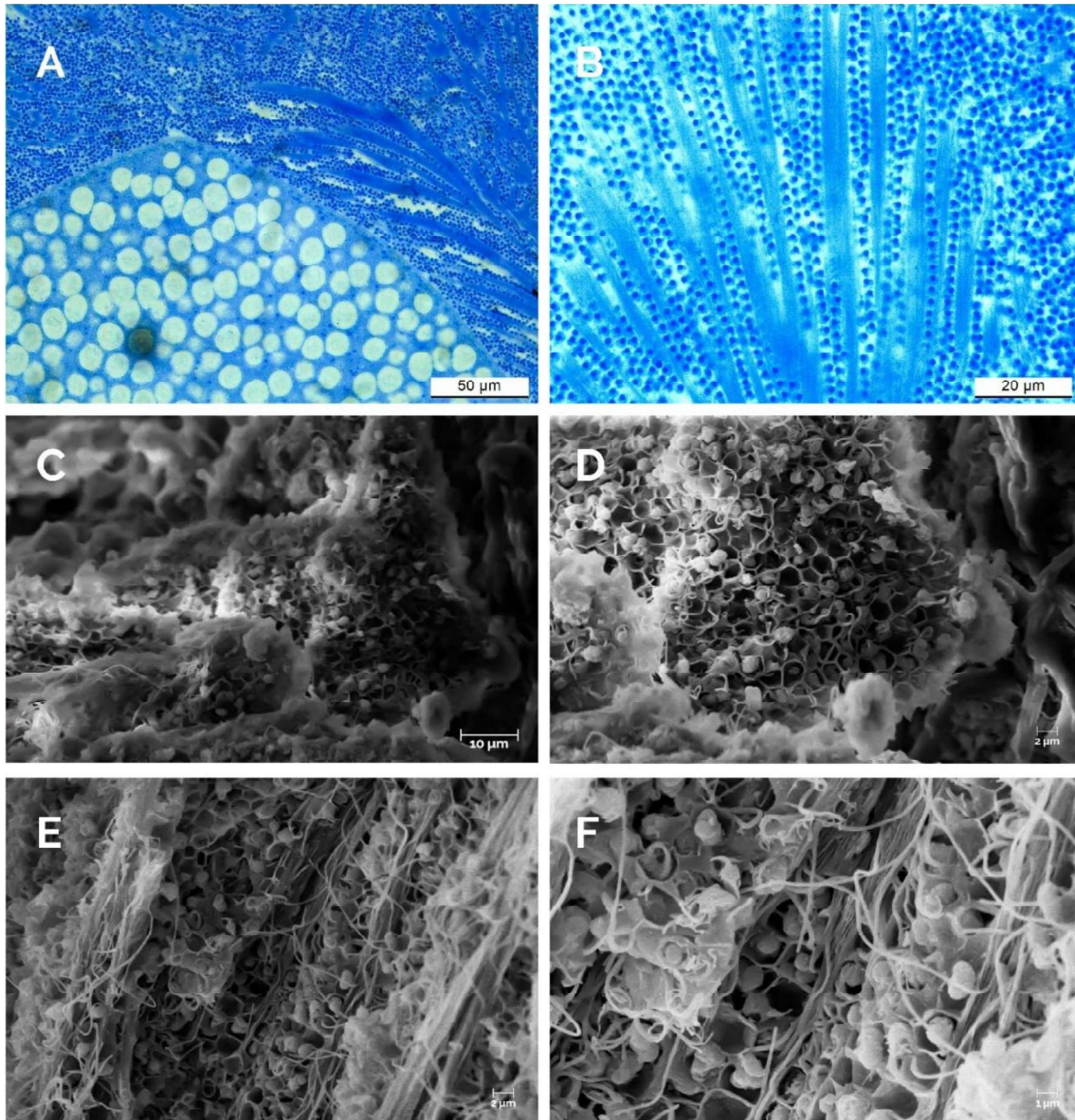


Figura 8. Localização e orientação dos espermatozoides no pacote de *M. hartii*. **(a)** Microscopia de luz (ML) do pacote mostrando espermatozoides desorganizados na mucosa. **(b)** Detalhe (ML) dos espermatozoides em arquivo na mucosa com seus flagelos estendidos lateralmente, promovendo organização em arquivos. **(c-f)** Regiões em formato hexagonal que contêm os espermatozoides.

Os espermatozoides de *M. hartii* têm comprimento total de $6,25 \pm 1,34 \mu\text{m}$, apresentando uma cabeça oval ($0,40 \pm 0,11 \mu\text{m}$) e um longo flagelo ($5,53 \pm 1,25 \mu\text{m}$), que representa 88,38% do seu comprimento total (Fig. 9a - b).

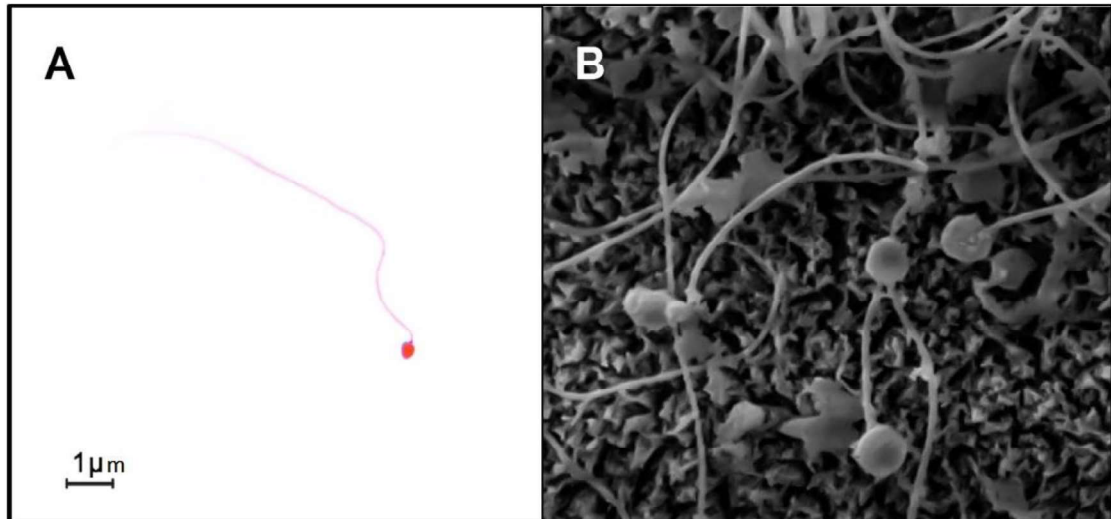


Figura 9. Detalhe dos espermatozóides de *M. hartii* observados por (a) microscopia de luz e por (b) microscopia eletrônica de varredura.

4. Discussão

O presente estudo traz novas informações sobre a morfologia dos pacotes de espermatozoides do coral *Mussismilia harttii*. Avaliamos a composição desses pacotes, o arranjo e a organização dos gametas, antes e depois de sua dissociação, usando análises histológicas e ultraestruturais. Os pacotes desempenham um papel importante no transporte de gametas para a superfície do oceano, o que minimiza a diluição dos espermatozoides e aumenta as chances de espermatozoides e oócitos de diferentes colônias se encontrarem. Esse fenômeno permite a fertilização cruzada (Richmond, 1997; Harrison, 2011), na qual espermatozoides de uma colônia fertilizam oócitos de outras colônias (Harrison e Wallace, 1990). O tempo de pré-dissociação de um pacote de oócitos-espermatozoides é geralmente curto, com a dissociação ocorrendo minutos depois que os pacotes são liberados na água (Padilla-Gamiño et al. 2011). Segundo Wolstenholme (2004), para os corais *Acropora samoensis* e *Acropora digitifera* o tempo máximo de dissociação dos pacotes foi de aproximadamente 30 min após o contato com a água do mar.

Os presentes achados mostram que os oócitos de *M. harttii* apresentam formas irregulares quando dentro dos pacotes, provavelmente devido à força de compressão exercida pelos pólipos durante a liberação do mesentério e na formação dos pacotes em suas cavidades gastrovasculares. A liberação de oócitos irregulares também foi observada para a poliqueta marinha *Sabellaria vulgaris*, em que oócitos recém-liberados apresentavam formas irregulares devido à pressão exercida pelas cavidades celomáticas das fêmeas (Waterman, 1934). Após a dissociação do pacote e contato com a água do mar, os oócitos de *M. harttii* apresentaram formato arredondado.

Observamos oócitos irregulares em menor quantidade, provenientes de diferentes colônias, após a dissociação dos pacotes. Essa observação pode estar associada ao estresse ambiental de origem humana, como o aumento da temperatura do mar. No primeiro semestre de 2019, aproximadamente 80% das colônias de *M. harttii* sofreram intenso branqueamento no Parque Marinho do Recife de Fora (Lacerda et al. Em prep.), que durou seis meses. Ao estudar os potenciais efeitos do branqueamento na reprodução dos corais *Fungia scutaria* e *Montipora capitata*, Hagedorn et al. (2016) observaram que 5,2% dos oócitos de *F. scutaria* apresentavam formato irregular, podendo chegar a 50% em algumas situações. Estudos sobre o efeito do branqueamento em massa na Grande Barreira de Corais australiana em 1998 (Ward et al. 2000) mostraram que as colônias das espécies *Acropora aspera*, *A. palifera*, *A. pulchra* e *Montipora digitata* que sofreram branqueamento tiveram uma

diminuição significativa em seu número de oócitos. Estes eram menores em tamanho quando comparados aos oócitos de colônias saudáveis. Além disso, também foi observada uma diminuição no número de mesentérios masculinos para essas espécies.

As análises histológicas do muco mostraram que ela desempenha um importante papel estrutural na manutenção do pacote, protegendo os gametas até que sejam liberados na água. O muco envolve completamente os gametas, mantendo um padrão desorganizado nos pacotes, com oócitos intercalados com agrupamentos de espermatozoides. As observações do MET revelaram que as vesículas corticais nos oócitos parecem liberar grânulos do citoplasma para a região extracelular, uma vez que era possível ver as vesículas fusionados à membrana plasmática dos oócitos ou próximo à membrana. Outra característica que reforça essa informação está associada à semelhança da densidade eletrônica nos grânulos presentes no citoplasma, na região interna das vesículas corticais e na camada mucosa (extracelular). Dessa forma, acreditamos que a formação do pacote pode consistir em parte na liberação de grânulos dos oócitos através das vesículas corticais. A liberação de grânulos corticais foi observada em oócitos de crustáceos marinhos. Para os camarões *Penaeus monodon* (Pongtippatee-Taweepreda et al. 2004) e *Penaeus aztecus* (Clark et al. 1980), as secreções corticais produzidas dentro dos oócitos são liberadas para a região extracelular assim que o oócito entra em contato com a água do mar.

Observações de MET das áreas de interação entre gametas mostraram regiões de proximidade e regiões de distância entre espermatozoides e oócitos, que foram separadas por uma espessa camada de muco. Testes preliminares realizados por nosso grupo de pesquisa mostraram até agora que os gametas contidos no pacote permanecem inativos, sugerindo que bloqueios bioquímicos podem estar envolvidos e mantidos pelo microambiente criado dentro do pacote. Segundo Oliver e Babcock (1992), os espermatozoides dos corais hermafroditas *Montipora digitata*, *Favites pentagona* e *Platygyra sinensis* permanecem inativos quando ainda estão concentrados dentro dos pacotes, incapazes de realizar qualquer movimento nos estágios iniciais após a dissociação dos pacotes. Investigações sobre a desova síncrona de 13 espécies de corais rochosos conduzidas por Babcock et al. (1986), mostrou que nenhum sinal de fertilização foi observado antes da dissociação dos pacotes de oócitos-espermatozoides. Os primeiros sinais de fertilização só foram

observados 2,5 h após a dissociação total. Esta informação reforça nossa descoberta anterior de inatividade do gameta quando contido dentro do pacote.

Observações por MEV na superfície dos oócitos (livres ou contidos nos pacotes) revelaram diferenças morfológicas nas microvilosidades. Essas diferenças podem estar associadas à ativação dos filamentos de actina presentes nas microvilosidades. As características de extensão nas microvilosidades de ovos do ouriço-do-mar *Strongylocentrotus purpuratus* (Burgess e Schroeder, 1977) foram controladas por filamentos de actina presentes em sua estrutura. Estudos também mostraram que as actinas estão envolvidas no processo de fertilização das estrelas do mar. De acordo com observações feitas com os ovos da estrela do mar *Astropecten scoparius*, os microvilosidades se estendem após a actina auxiliar na sustentação dos blastômeros (Matsunaga et al. 2002). No presente estudo, as microvilosidades de oócitos dentro do pacote eram próximas e espessas. É provável que as actinas estivessem inativas e os oócitos não emitissem estímulos intracelulares para gerar alterações na conformação das microvilosidades. Por sua vez, os oócitos que ficam livres na água apresentam microvilosidades longas e finas, sugerindo que as actinas sofreram alterações em sua conformação devido aos sinais bioquímicos ativados pelos oócitos. Compreender o papel das actinas presentes nas microvilosidades de oócitos pode fornecer informações importantes para compreender a dinâmica da fertilização de corais.

Em um estudo sobre os padrões reprodutivos de três espécies hermafroditas do gênero *Mussismilia*, Pires et al. (1999) mostraram que os espermatozoides imaturos estavam concentrados na área periférica dos cistos espermáticos, enquanto os espermatozoides maduros estavam localizados nas regiões centrais, organizados em fileiras com seus flagelos estendidos em direção à extremidade estreita dos cistos espermáticos, formando arranjos em forma de buquê. Dados semelhantes foram apresentados em estudos considerando os corais negros *Cupressopathes pumila* e *Antipathella subpinnata*, nos quais espermatozoides maduros foram encontrados nas regiões centrais dos espermatocistos, organizados em fileiras, enquanto os espermatozoides imaturos estavam nas áreas periféricas em uma distribuição desordenada (Gaino e Scoccia 2009; Gaino e Scoccia 2010). Além da posição dos espermatozoides nos cistos espermáticos, foi descrita a identificação do seu grau de maturidade em relação à organização das organelas. Espermatozoides imaturos apresentavam axonemas livres, seu citoplasma era rico em pequenas mitocôndrias e o núcleo apresentava cromatina descondensada (Gaino et al. 2008; Gaino e Scoccia

2009). As análises histológicas e ultraestruturais do interior dos pacotes de gametas de *M. harttii* permitiram a identificação de regiões com alta concentração de espermatozóides organizados em arquivos e regiões com espermatozóides dispersos e desorganizados, demonstrando padrões semelhantes aos descritos anteriormente. A análise dos aspectos ultraestruturais mostrou, nos espermatozóides localizados nas áreas mais periféricas, a presença de mais de duas mitocôndrias, possivelmente indicando imaturidade celular. Por sua vez, os espermatozóides de regiões mais centrais apresentavam duas mitocôndrias separadas, o que poderia indicar maturidade (Fig. 7 d - detalhe). Portanto, com base na organização das organelas e na posição das células semelhante ao anteriormente encontrado para os espermatócitos do gênero *Mussismilia* e em corais negros, acreditamos que essa distribuição dos espermatozóides nos pacotes esteja relacionada à maturidade celular. Isso implica que os pacotes liberados por *M. harttii* podem apresentar espermatozóides em diferentes estágios de maturação. Entretanto, futuros estudos histológicos e ultraestruturais do mesentério masculino da espécie podem trazer informações sobre a organização e maturidade dos espermatozóides nos cistos espermáticos.

A avaliação dos padrões de desova dos corais negros *Cirrhopathes* sp. e *Cupressopathes pumila* demonstraram que os cistos espermáticos foram liberados para a cavidade da gastroderme através da ruptura das paredes do mesentério, com células mesentéricas identificadas nos cistos espermáticos presentes na gastroderme (Gaino et al. 2008; Gaino e Scoccia 2009). Esta informação pode justificar as observações feitas usando MEV nos pacotes de *M. harttii*. Os espermatozóides foram identificados no presente estudo dentro das estruturas hexagonais, que são semelhantes aos alvéolos de uma colmeia. Dada a complexidade estrutural observada, acreditamos que a liberação de espermatozóides em *M. harttii* ocorre por meio da ruptura completa das paredes dos cistos espermáticos, sendo a estrutura hexagonal um componente dos cistos espermáticos. Quando liberados na cavidade gastrovascular, os cistos espermáticos são envolvidos por muco, mantendo os espermatozóides nessa organização. Segundo Wallace (1985), a formação de pacotes oócitos-espermatozoides ocorre poucas horas antes do período de desova. Com base nessas informações, acreditamos que a liberação de cistos espermáticos pode ser uma estratégia adaptativa que permite reduzir o tempo gasto na formação dos pacotes oócito-espermatozoides nas cavidades gastrovasculares.

Aqui, investigamos a composição dos pacotes de *M. harttii* avaliando seu arranjo e organização dos gametas usando análises histológicas e ultraestruturais de uma maneira muito detalhada. Este relatório inicial lança luz sobre uma área pouco explorada que pode auxiliar em um melhor entendimento da fertilização de corais por transmissão hermafrodita, bem como fornecer suporte para estudos futuros sobre biotecnologias reprodutivas para a conservação de corais.

Agradecimentos

O Projeto Coral Vivo e seus patrocinadores, a Petrobras, por meio do Programa Petrobras Socioambiental, e o Arraial d'Ajuda Eco Parque, são reconhecidos por financiar pesquisas de campo e utilização de instalações de estação de pesquisa. WV recebeu bolsa de pesquisa de campo do Fundo Brasileiro para a Biodiversidade (Funbio) e do Instituto Humanize (N ° 121/2019). Agradecemos o apoio financeiro da Fundação Grupo Boticário de Proteção à Natureza. LG é bolsista de pesquisa do CNPq-Brasil (310463 / 2018-1).

5. Referências

- Ayre DJ, Resing JM (1986) Sexual and asexual production of planulae in reef corals. *Mar Biol* 90:187-190
- Babcock RC, Bull G, Harrison PL, Heyward AJ, Oliver JK, Wallace CC, Willis BL (1986) Synchronous spawnings of 105 scleractinian coral species on the Great Barrier Reef. *Mar Biol* 90(3):379-394 [doi.org/10.1007/BF00428562]
- Baird AH, Guest JR, Willis BL (2009) Systematic and biogeographical patterns in the reproductive biology of scleractinian corals. *Ann Rev Ecol Evol, and Syst* (40):551-571 [doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.110308.120220]
- Brown BE, Bythell JC (2005) Perspectives on mucus secretion in reef corals. *Mar Ecol Prog Ser* 296, 291-309 [doi.org/10.3354/meps296291]
- Burgess DR, Schroeder TE (1977) Polarized bundles of actin filaments within microvilli of fertilized sea *Urchin* eggs. *J Cell Biol* 74(3):1032-1037 [doi.org/10.1083/jcb.74.3.1032]
- Cameron KA, Harrison PL (2020) Density of coral larvae can influence settlement, post-settlement colony abundance and coral cover in larval restoration. *Sci Rep* 10:5488 [doi.org/10.1038/s41598-020-62366-4]
- Castro CB, Zilberberg C (2016) Recifes brasileiros, sua importância e conservação. *Conhecendo os recifes brasileiros* (eds Zilberberg, C. et al.) 17-26
- Castro CB, Pires DO (2001) Brazilian coral reefs: what we already know and what is still missing. *Bulletin of Marine Science* 69:357-371
- Castro CB, Pires DO (1999) A bleaching event on a Brazilian coral reef. *Braz J Oceanogr* 47(1):87-90 [doi.org/10.1590/S1413-77391999000100008]
- Clark Jr WH, Lynn JW, Yudin, AI, Persyn HO (1980) Morphology of the cortical reaction in the eggs of *Penaeus aztecus*. *Biol Bull* 158(2):175-186 [doi.org/10.2307/1540929]
- Coffroth MA (1990) Mucous sheet formation on poritid corals: an evaluation of coral mucus as a nutrient source on reefs. *Mar Biol* 105(1):39-49 [doi.org/10.1007/BF01344269]
- Gaino E, Scoccia F (2010) Gamete spawning in *Antipathella subpinnata* (Anthozoa, Antipatharia): a structural and ultrastructural investigation. *Zoomorphology* 129(4):213-219 [doi.org/10.1007/s00435-010-0112-x]

- Gaino E, Scoccia F (2009) Release of sperm clusters in spheres by the black coral *Cupressopathes pumila* (Anthozoa, Antipatharia). *Coral Reefs* 28(4):851-857 [doi.org/10.1007/s00338-009-0525-5]
- Gaino E, Bo M, Boyer M, Scoccia F (2008) Sperm morphology in the black coral *Cirrhopathes* sp. (Anthozoa, Antipatharia). *Invertebrate Bio* 127(3):249-258 [doi.org/10.1111/j.1744-7410.2008.00132.x]
- Gallego V, Pérez L, Asturiano JF, Yoshida M (2014) Sperm motility parameters and spermatozoa morphometric characterization in marine species: A study of swimmer and sessile species. *Theriogenology* 82:668-676 [doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.05.026]
- Giese, AC, Kanatani H (1987) Maturation and spawning. In: Giese AC, Pearse JS, Pearse VB (eds) *Reproduction of marine invertebrates*. Volume 9. General aspects: seeking unity in diversity. Boxwood Press, California, pp 252-329
- Goldberg WM (2002) Feeding behavior, epidermal structure and mucus cytochemistry of the scleractinian *Mycetophyllia reesi*, a coral without tentacles. *Tissue Cell* 34(4):232-245. [doi.org/10.1016/S0040-8166(02)00009-5]
- Guest JR, Baird AH, Clifton KE, Heyward AJ (2008) From molecules to moonbeams: spawning synchrony in coral reef organisms. *Invertebr Reprod Dev* 51(3):145-149 [doi.org/10.1080/07924259.2008.9652264]
- Goffredo S, Telò T, Scanabissi F (2000) Ultrastructural observations of the spermatogenesis of the hermaphroditic solitary coral *Balanophyllia europaea* (Anthozoa, Scleractinia). *Zoomorphology* 119:231–240
- Hagedorn M, Carter VL, Lager C, Ciani JFC, Dygert AN, Schleiger RD, Henley E M (2016) Potential bleaching effects on coral reproduction. *Reprod Fertil Dev* 28(8):1061-1071 [doi.org/ 10.1071/RD15526]
- Harrison PL (2011) Sexual reproduction of scleractinian corals. In *Coral reefs: an ecosystem in transition*. Springer, Dordrecht pp. 59-85 [doi.org/10.1007/978-94-007-0114-4_6]
- Harrison PL, Wallace CC (1990) Reproduction, dispersal and recruitment of scleractinian corals. In: Dubinsky Z (ed) *Ecosystems of the world: coral reefs*, vol 25. Elsevier, New York, pp 133–207
- Hughes TP, Anderson KD, Connolly SR, Heron SF, Kerry JT, Lough JM, Baird AH, Baum JK, Berumen ML, Bridge TC, Claar DC, Eakin CM, Gilmour JP, Graham

- NAJ, Harrison H, Hobbs J-PA, Hoey AS, Hoogenboom M, Lowe RJ, McCulloch MT, Pandolfi JM, Pratchett M, Schoepf V, Torda G, Wilson SK (2018) Spatial and temporal patterns of mass bleaching of corals in the Anthropocene. *Science* 359:80–83
- Hughes TP, Kerry JT, Baird AH, Connolly SR, Chase TJ, Dietzel A, Hill T, Hoey AS, Hoogenboom MO, Jacobson M, Kerswell A, Madin JS, Mieog A, Paley AS, Pratchett MS, Torda G, Woods RM (2019) Global warming impairs stock–recruitment dynamics of corals. *Nature* 568:387–390
- ICMBio. 2018. *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção – Invertebrados*. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, v.7, p.657-660.
- Kawaroe, M, Soedharma, D (2007) Oogenesis Karang Sclerectinia *Caulastrea furcata* dan *Lobophyllia corymbosa*. HAYATI J Biosci 14(1):31-35 [doi.org/10.4308/hjb.14.1.31]
- Kinzie RA (1996) Modes of speciation and reproduction in Archaeocoeniid corals. *Galaxea* (13):47–64
- LVFBAE - Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção:Volume VII – Invertebrados --1.ed.--Brasília,DF:ICMBio/MMA,2018. 7 v.:il.
- Leão ZM, Kikuchi RK, Ferreira BP, Neves EG, Sovierzoski HH, Oliveira MD, Johnsson R (2016) Brazilian coral reefs in a period of global change: A synthesis. *Braz J Oceanogr* 64 (SPE2):97-116 [doi.org/10.1590/S1679-875920160916064sp2]
- Levitan DR (1998) Sperm limitation, sperm competition and sexual selection in external fertilizers. In: Birkhead T, Møller A (eds.) *Sperm competition and sexual selection*, Academic Press, San Diego, pp. 173–215
- Lin C, Zhuo JM., Chong G, Wang LH, Meng P, Tsai S (2018) The effects of aquarium culture on coral oocyte ultrastructure. *Sci Rep* 8(1):1-13 [doi.org/10.1038/s41598-018-33341-x]
- Marshall AT, Wright OP (1993) Confocal laser scanning light microscopy of the extra-thecal epithelia of undecalcified scleractinian corals. *Cell Tissue Res* 272(3):533-543 [doi.org/10.1007/BF00318560]
- Matsunaga M, Uemura I, Tamura M, Nemoto SI (2002) Role of specialized microvilli and the fertilization envelope in the spatial positioning of blastomeres in early development of embryos of the starfish *Astropecten scoparius*. *Biol Bull* 202(3):213-222 [doi.org/10.2307/1543471]

- Mendes JM, Woodley JD (2002) Effect of the 1995-1996 bleaching event on polyp tissue depth, growth, reproduction and skeletal band formation in *Montastraea annularis*. *Mar Ecol Prog Ser* (235):93-102 [doi.org/10.3354/meps235093]
- Morris JK (1965) A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27:1A-149A
- Oliver J, Babcock R (1992) Aspects of the fertilization ecology of broadcast spawning corals: sperm dilution effects and in situ measurements of fertilization. *Biol Bull* 183(3):409-417 [doi.org/10.2307/1542017]
- Padilla-Gamiño JL, Weatherby TM, Waller RG, Gates, RD (2011). Formation and structural organization of the egg–sperm bundle of the scleractinian coral *Montipora capitata*. *Coral Reefs* 30(2):371-380 [doi.org/10.1007/s00338-010-0700-8]
- Pereira-Filho GH, Shintate GSI, Kitahara MV, Moura RL, Amado-Filho GM, Bahia RG, Moraes FC, Neves LM, Francini CLB, Gibran FZ, Motta FS (2019) The southernmost Atlantic coral reef is off the subtropical island of Queimada Grande (24° S), Brazil. *Bulletin of Marine Science* 95:277-287
- Pires DO, Castro CB, Segal B, Pereira CM, Carmo EC, Silva RG, Calderon EN (2016) Reprodução de corais de águas rasas do Brasil. In: Zilberberg C, Abrantes DP, Marques JÁ, Machado LF, Marangoni LFB(eds) *Conhecendo os recifes brasileiros*. Museu Nacional, Rio de Janeiro, pp 111-128
- Pires DO, Castro CB, Ratto CC (1999) Reef coral reproduction in the Abrolhos Reef Complex, Brazil: the endemic genus *Mussismilia*. *Mar Biol* 135:463-471 [doi.org/10.1007/s002270050646]
- Pongtippatee-Taweepreda P, Chavadej J, Plodpai P, Pratoomchart B, Sobhon P, Weerachatanukul W, Withyachumnarnkul (2004) Egg activation in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquac* 234(1-4):183-198 [doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.10.036]
- Richmond, RH (1997) Reproduction and recruitment in corals: critical links in the persistence of reefs. *Life and death of coral reefs*. Chapman Hall 175-197 [doi.org/10.1007/978-1-4615-5995-5_8]
- Steiner, SCC (1991) Sperm morphology of scleractinians from the Caribbean. In *Hydrobiologia* (216):131-135 [doi.org/10.1007/BF00026453]
- Steiner SC (1993) Comparative ultrastructural studies on scleractinian spermatozoa (Cnidaria, Anthozoa). *Zoomorphology* 113(2):129-136 [doi.org/10.1007/BF00403090]

- Szmant AM (1986) Reproductive ecology of Caribbean reef corals. *Coral Reefs* 5:43-54.
- Tsai S, Chang WC, Chavanich S, Viyakarn V, Lin C (2016) Ultrastructural observation of oocytes in six types of stony corals. *Tissue Cell* 48(4):349-355 [doi.org/10.1016/j.tice.2016.05.005]
- Twan WH, Hwang JS, Lee YH, Wu HF, Tung YH, Chang CF (2006) Hormones and reproduction in scleractinian corals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Mol Integr Physiol* 144(3):247-253 [doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.01.011]
- Vargas-Ángel B, Colley SB, Hoke SM, Thomas JD (2006) The reproductive seasonality and gametogenic cycle of *Acropora cervicornis* off Broward County, Florida, USA. *Coral Reefs* 25(1):110-122 [doi.org/10.1007/s00338-005-0070-9]
- Ventura CRR, Pires DO, Soares-Gomes A and Pereira RC (2002) Ciclo de vida de invertebrados marinhos. *Biologia Marinha Interciência* 50-67
- Veron JEN (2000) *Corals of the World*. Volumes 1-3. AIMS, Townsville, Australia.
- Veron, JEN 2002. Appendix 1: Checklist of corals of eastern Indonesia and the Raja Ampat Islands. McKenna, SA, G. A. Allen, and S. Suryadi S.(eds.). A marine rapid assessment of the Raja Ampat Islands, Papua Province, Indonesia. *Bull of Biol Asses* (22):90-103
- Wallace CC (1985) Reproduction, recruitment and fragmentation in nine sympatric species of the coral genus *Acropora*. *Mar Biol* (88):217-233 [doi.org/10.1007/BF00392585]
- Waller RG, Tyler PA and Gage JD (2005) Sexual reproduction in three hermaphroditic deep-sea Caryophyllia species (Anthozoa: Scleractinia) from the NE Atlantic Ocean. *Coral reefs* 24(4):594 [doi.org/10.1007/s00338-005-0031-3]
- Ward S, Harrison P and Hoegh-Guldberg O (2002) Coral bleaching reduces reproduction of scleractinian corals and increases susceptibility to future stress. In *Proceedings of the Ninth International Coral Reef Symposium* (2):1123-1128
- Waterman AJ (1934) Observations on reproduction, prematuration, and fertilization in *Sabellaria vulgaris*. *The Biological Bulletin*, 67(1):97-114 [doi.org/10.2307/1537485]
- Wild C, Huettel M, Klueter A, Kremb SG, Rasheed MY, Jørgensen B.B (2004) Coral mucus functions as an energy carrier and particle trap in the reef ecosystem. *Nature* 428(6978):66-70 [doi.org/10.1038/nature02344]
- Wild C, Woyt H, Huettel M (2005) Influence of coral mucus on nutrient fluxes in carbonate sands. *Mar Ecol Prog Ser* 287:87-98 [doi.org/10.3354/meps287087]

- Wolstenholme JK (2004) Temporal reproductive isolation and gametic compatibility are evolutionary mechanisms in the *Acropora humilis* species group (Cnidaria; Scleractinia). *Marine Biology* 144(3):567-582 [doi.org/10.1007/s00227-003-1209-2]
- Wray GA (1995) Evolution of larvae and developmental modes. In: McEdward L (ed) *Ecology of marine invertebrate larvae*. CRC Press, Boca Raton, pp 413–448

CAPÍTULO III*

**Avaliação ultraestrutural dos espermatozóides e oócitos do coral pétreo
*Mussismilia harttii***

*Artigo elaborado seguindo modelo de estrutura e formatação do periódico *Coral Reefs*.

**Avaliação ultraestrutural dos espermatozoides e oócitos do coral pétreo
*Mussismilia harttii***

Wanderson Valente¹, Cláudia Kelly Fernandes da Cruz¹, Jener Alexandre Sampaio Zuanon², Débora Oliveira Pires^{3,4}, Leandro Godoy^{1,4*}

¹Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (RS) Brasil.

²Laboratório de Fisiologia Aplicada à Piscicultura, Departamento de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil.

³Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

⁴ Instituto Coral Vivo, Santa Cruz Cabrália, Brasil.

Corresponding author: L. Godoy.

E-mail address: leandro.godoy@ufrgs.br

Resumo

O declínio crescente das espécies construtoras de recifes em todo o mundo reforça a urgência de mais informações sobre a biologia reprodutiva em corais. Levando em consideração que metade das espécies de corais existentes na natureza nunca tiveram sua biologia reprodutiva investigada, a lacuna no conhecimento acerca do tema é realmente preocupante. Nesse estudo nós investigamos a ultraestrutura dos oócitos e espermatozoides do coral endêmico e ameaçado do Atlântico Sul *Mussismilia harttii*. Os oócitos são arredondados, recobertos por muco e apresentam microvilosidades por toda a sua superfície. Eles apresentam vesículas corticais próximas ou fundidas à membrana oocitária que aparentam liberar grânulos para a região extracelular, os quais podem auxiliar na formação do pacote de gametas. Grânulos de lipídios esféricos, corpos de vitelo, um material fino granular disperso no citoplasma e inúmeras mitocôndrias foram identificadas no citoplasma. A presença das células *Symbiodinium-like* atesta que os simbiossitos são transferidos verticalmente do coral “parent” para o oócito. Os espermatozoides possuem comprimento total de $6,25 \pm 1,34 \mu\text{m}$, apresentam cabeça oval ($0,40 \pm 0,11 \mu\text{m}$) e um longo flagelo ($5,53 \pm 1,25 \mu\text{m}$). O núcleo está localizado na região central da cabeça e os axonemas exibem o arranjo dos microtúbulos (9+2). Vesículas elétricas densas (semelhantes às do complexo de Golgi) foram observadas próximas à membrana plasmática. A ausência de um poro germinativo (micrópila) nos oócitos nos faz acreditar que tais vesículas desempenham uma função acrossômica no espermatozoide. Abaixo de cada complexo de Golgi há uma única e grande mitocôndria, que parece ter se formado a partir da fusão de outras menores. Os achados aqui detalhados darão suporte para futuros e necessários estudos que buscam compreender melhor a gametogênese, a formação do pacote de gametas e a fecundação em corais escleractíneos. Além disso, biotecnologias reprodutivas como criopreservação de gametas e fecundação *in vitro* farão bom uso das informações aqui contidas.

Palavras-chave: Reprodução sexuada, Gametas, Fecundação, Microscopia eletrônica.

1. Introdução

Apesar da reprodução sexuada em corais escleractíneos ser estudada por mais de 200 anos, desde Cavolini (1790, citado em De Lacaze-Duthiers 1873) e informações substanciais tornaram-se disponíveis a partir dos estudos de Fadlallah (1983), Harrison e Wallace (1990), Richmond e Hunter (1990), Richmond (1997), Harrison e Jamieson (1999), Kolinski e Cox (2003), Guest et al. (2005), Harrison e Booth (2007) e Baird et al. (2009), ainda há informações muito limitadas na literatura, levando-se em consideração que praticamente metade das espécies de corais existentes na natureza nunca tiveram sua biologia reprodutiva investigada (Harrison, 2011).

A reprodução sexuada consiste na produção de gametas (espermatozoides e oócitos), permitindo a recombinação genética e a produção de novos genótipos que podem melhorar a resiliência e a sobrevivência das espécies (Harrison e Wallace 1990; Harrison 2011). O declínio crescente das espécies construtoras de recifes em todo o mundo (Hughes et al. 2018, 2019) reforça a necessidade de mais informações sobre sua biologia reprodutiva e ecologia. As pesquisas em andamento fornecem evidências crescentes de que os processos reprodutivos sexuados em corais são altamente sensíveis a uma ampla gama de estressores naturais e antropogênicos que causam estresse subletal, reduzem a fecundidade e prejudicam o sucesso reprodutivo (Loya e Rinkevich 1980; Harrison e Wallace 1990; Richmond 1993, 1997; Fabricius 2005; Drury et al. 2019).

Embora a morfologia dos gametas de 31 espécies de corais escleractíneos tenha sido descrita (Wallace 1985; Steiner 1991, 1993; Goffredo et al. 2000; Vargas-Ángel et al. 2006; Kawaroe et al. 2007; Padilla-Gamiño et al. 2011; Tsai et al. 2016; Lin et al. 2018), somente cinco desses estudos apresentaram detalhes ultraestruturais para os espermatozoides e oócitos (Steiner 1991, 1993; Goffredo et al. 2000; Padilla-Gamiño et al. 2011; Tsai et al. 2016), evidenciando que existe uma lacuna no conhecimento básico acerca da biologia dos gametas de corais por meio de análises ultraestruturais.

O Oceano Atlântico Sul abriga 16 espécies de corais escleractíneos de águas rasas, sendo cinco delas endêmicas do Brasil (Castro e Zilberberg, 2016). O coral-couve-flor (*Mussismilia harttii*) está entre as principais espécies construtoras dos recifes brasileiros, porém os frequentes e intensos eventos de branqueamento decorrentes do aumento da temperatura do oceano nos últimos anos (Castro e Pires 1999; Leão et al. 2016), além da ocorrência de doenças (Francini-Filho et al. 2008) colocaram a espécie sob ameaça de extinção (IBAMA, 2018). O conhecimento a respeito da reprodução sexuada dos corais escleractíneos do Atlântico Sul se limita

aos estudos pioneiros conduzidos por Pires et al. (1999, 2016) e Neves e Pires (2002), os quais descreveram o padrão reprodutivo, a gametogênese e a desova para os corais do gênero *Mussismilia* usando técnicas histológicas e microscopia de luz.

Algumas técnicas seguras para a conservação dos corais estão relacionadas ao conhecimento da biologia dos seus gametas (Tsai et al. 2016). Conhecer os gametas em nível ultraestrutural por meio da microscopia eletrônica possibilita compreender sua morfologia de forma detalhada, entender sobre as organelas envolvidas no seu desenvolvimento, atração, fecundação e manutenção da sua viabilidade (Harrison, 2011; Tsai et al. 2016). Nesse estudo nós trazemos uma visão minuciosa dos gametas do coral *M. harttii* em nível ultraestrutural, dando subsídios para melhor compreender a gametogênese, a formação do pacote de gametas e a fecundação em corais escleractíneos.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta das colônias e autorizações legais

Quarenta colônias do coral *Mussismilia harttii* foram coletadas no entorno do Parque Municipal Marinho do Recife de Fora (16°24'31"S; 038°58'39"W) cerca de três semanas antes do período de desova previsto para a espécie (Pires et al. 1999; 2016). As colônias foram levadas para a Base de Pesquisa do Projeto Coral Vivo, identificadas e acondicionadas em viveiros (1000 L), com renovação periódica da água captada do mar. A execução dessa pesquisa foi aprovada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio - SISBIO Nº 63368-1) e pela Secretaria Municipal de Meio Ambiente da Prefeitura de Porto Seguro (Autorização Nº 01/2019).

2.2. Coleta e separação dos gametas

No momento da desova, os pacotes contendo oócitos e espermatozóides foram coletados da superfície da água dos tanques. Três pacotes foram coletados de cada colônia (n = 6) e imediatamente transferidos para tubos de 10 mL contendo soluções fixadoras (n = 18). Outros 15 pacotes foram coletados em tubos de 50 mL (três pacotes por tubo) contendo água do mar, onde permaneceram até sua completa dissociação com a separação dos oócitos e espermatozóides. Os oócitos flutuaram e ocuparam a superfície do tubo, enquanto o sêmen denso permaneceu no fundo. Os oócitos foram então removidos do tubo com uma pipeta Pasteur, lavados em água do mar filtrada

para remover qualquer vestígio de sêmen e transferidos para uma solução fixadora. Alíquotas (± 1 mL) de sêmen contendo espermatozoides foram coletadas do fundo do tubo e transferidas para a solução fixadora.

2.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a microscopia eletrônica de varredura as amostras foram fixadas em glutaraldeído 25% com solução tampão fosfato 0,2 M, de acordo com a metodologia descrita por Morris (1965). Os materiais fixados foram lavados 3 vezes (30 minutos cada) no mesmo tampão. A desidratação foi realizada em séries crescentes de acetona (30% a 100%) por 10 minutos e a dessecação dos materiais ocorreu em aparelho de Ponto Crítico (Critical Point Dryer, Leica EM CPD030, Alemanha). Para a metalização o material recebeu a condução por meio de ouro e platina, utilizando Super Cool Sputter Coater, (Leica EM SCD050, Alemanha) e em seguida levado para observação em microscópio eletrônico de varredura (Joel JSM 6060, EUA e Zeiss Evo 50, Alemanha).

2.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para as análises de microscopia eletrônica de transmissão, as amostras foram fixadas em solução contendo glutaraldeído 25%, paraformaldeído 8% e tampão fosfato 0,2 M (Morris 1965). O material pré-fixado foi lavado 3 vezes (30 minutos cada) no mesmo tampão. A pós-fixação foi realizada em 2% de OsO₄ em tampão fosfato 0,2 M (45 minutos) seguida por 3 banhos no mesmo tampão (15 minutos cada). A desidratação foi realizada em séries crescentes de acetona (30% a 100%) por 10 minutos e a pré-embrição realizada em banhos, misturando o desidratante com resina (Kit Epoxy Embedding) em proporções gradativas e crescentes, com tempo mínimo de 2 horas em cada banho. A embrição foi realizada com banho de resina (100%) durante 24 horas e a inclusão foi realizada em moldes de silicone com resina pura, em estufa (60°C) por 72 horas. Cortes ultrafinos (80 nm) foram depositados em grids e contrastados com solução aquosa de acetato de uranila 2% e citrato de chumbo, e observados em microscópio eletrônico de transmissão (FEI COMPANY, Tecnai G² 20 S-TWIN, USA).

2.5. Microscopia Óptica (MO)

Para as análises histológicas, as amostras foram fixadas e desidratadas da mesma maneira descrita nas amostras para MET. Após a desidratação as amostras foram incluídas em glicol metacrilato (Historesin, Leica, Alemanha) e realizados cortes

de 3 μm de espessura, com o auxílio de um micrótomo rotativo (Leica, RM2255, Alemanha), utilizando-se navalhas de vidro. Os cortes foram aderidos em lâminas de vidro e corados com azul de toluidina e Hematoxilina-eosina (HE). As amostras foram montadas com Entellan (Merck, Frankfurt, Alemanha), fotodocumentadas em fotomicroscópio Olympus BX53 (Tóquio, Japão) com câmera Olympus DP73 acoplada.

2.6. Análises preliminares

As imagens obtidas por MEV, MET e MO foram avaliadas por meio do software de análise digital ImageJ (Microsoft Java 1.1.4.).

3. Resultados

3.1. Ultraestrutura do oócito

As análises realizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostraram que os oócitos possuem um formato arredondado (Fig. 1 a-b), sendo recobertos por uma camada de muco. Sob essa camada de muco, microvilosidades estão presentes por toda a superfície do oócito (Fig. 1 c-d), e em alguns pontos foi possível identificar entre os microvilos uma estrutura similar à escamas (Fig. 1 e-f).

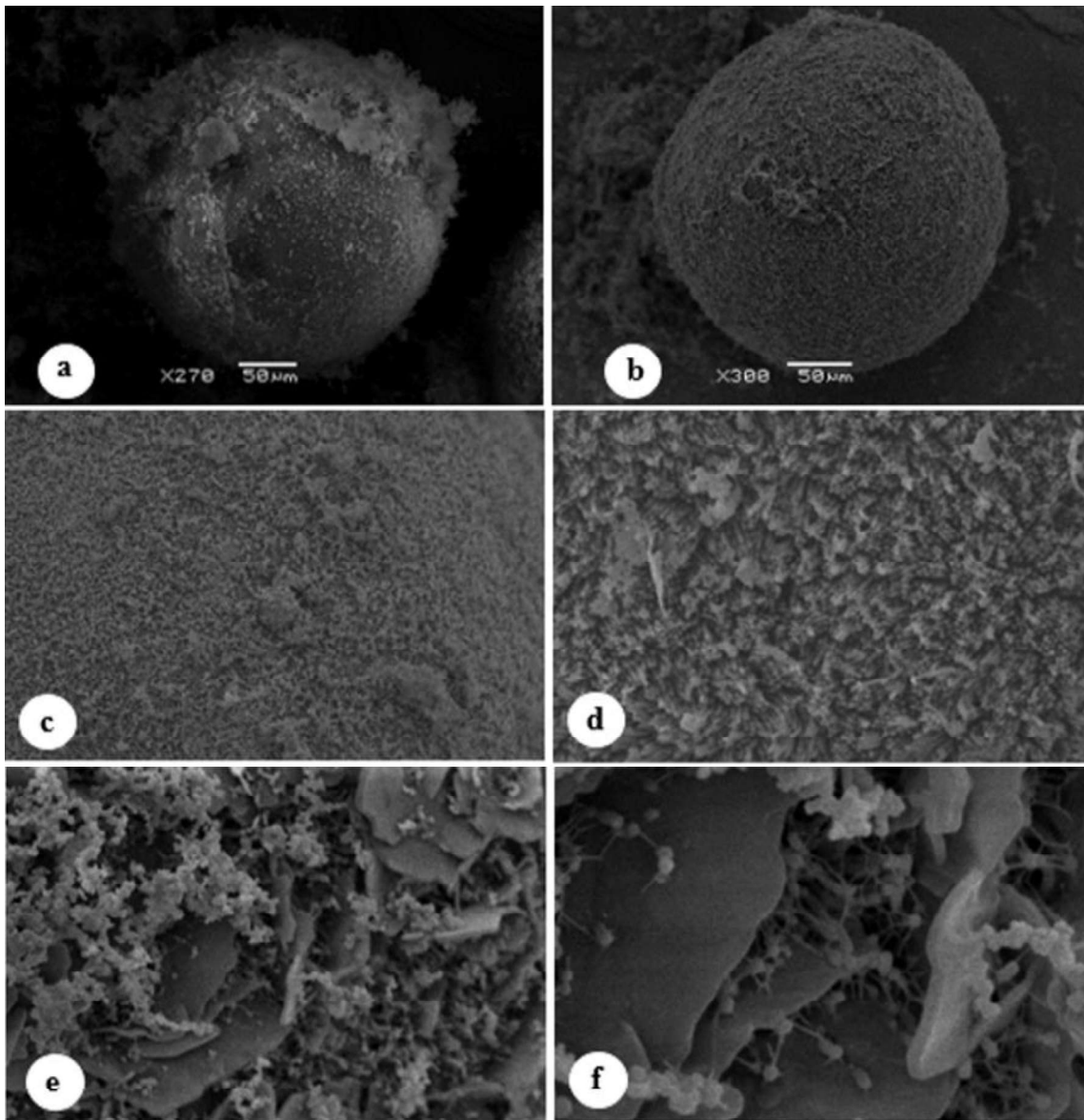


Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura dos oócitos de *M. hartii* (a) Oócito arredondado com uma densa camada de muco aderida à sua superfície. (b) Oócito arredondado com uma fina camada de muco sobre sua superfície. (c) Micovilosidades distribuídas por todo o oócito e a presença de muco aderido à elas. (d) Detalhe dos microvilos por toda a superfície do oócito. (e) Presença de estrutura similar à escamas na superfície do oócito. (f) Detalhe das estruturas similares à escamas.

Nos oócitos avaliados por MET foram observadas microvilosidades, vesículas corticais, grânulos de lipídios, corpos de vitelo variando em tamanho, forma e densidade de elétrons e um material fino granular disperso no citoplasma. Além disso, nós encontramos mitocôndrias e células denominadas de *Symbiodinium-like* (Fig. 2 a). As microvilosidades foram observadas na porção mais externa da membrana plasmática. Em decorrência do formato esférico dos oócitos e do ângulo em que foi realizado o corte, as microvilosidades, que frequentemente aparecem como projeções

alongadas em forma de dedos, apresentaram-se aqui como uma série de pontos ao redor da periferia do oócito (Fig. 2 b). Os grânulos de lipídeos eram esféricos e continham faixas claras (Fig. 2 c) e um grande número de corpos de vitelo ao seu redor (Fig. 2 d). As vesículas corticais apresentavam, na maioria das vezes, formato ovoide, conteúdo filamentososo homogêneo e se localizavam próximas (Fig. 3 a) ou fundidas à membrana plasmática (Fig. 3 b). Foi possível observar mitocôndrias distribuídas por todo o citoplasma do oócito (Fig. 3 c). Além disso, células menores descritas como *Symbiodinium-like* (veja Leite et al. 2017) foram identificadas na região periférica do oócito (Fig. 3 d).

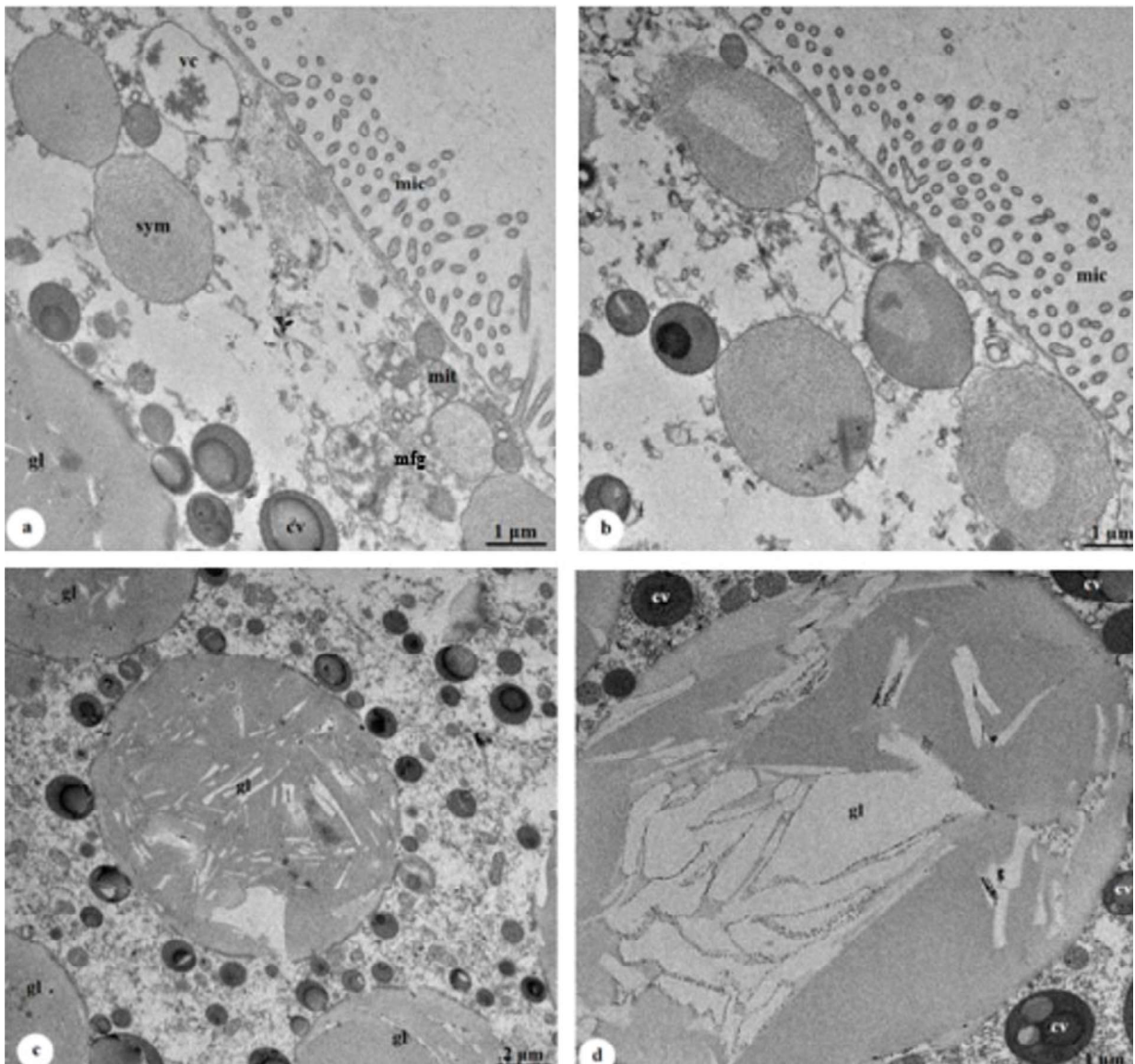


Figura 2. Microscopia eletrônica de transmissão mostrando os constituintes internos dos oócitos de *M. harttii*. **(a)** Visão geral: Observe a presença de microvilosidades (mic), mitocôndrias (mit), vesículas corticais (vc), células *Symbiodinium-like* (sym), corpos de vitelo (cv), grânulos lipídicos (gl) e material fino granular (mfg). **(b)** Microvilosidades em formato de pontos devido ao ângulo do corte histológico. **(c)** Grânulos lipídicos (gl) com faixas claras. **(d)** Detalhe dos corpos de vitelo (cv) variando em tamanho, forma e densidade eletrônica.

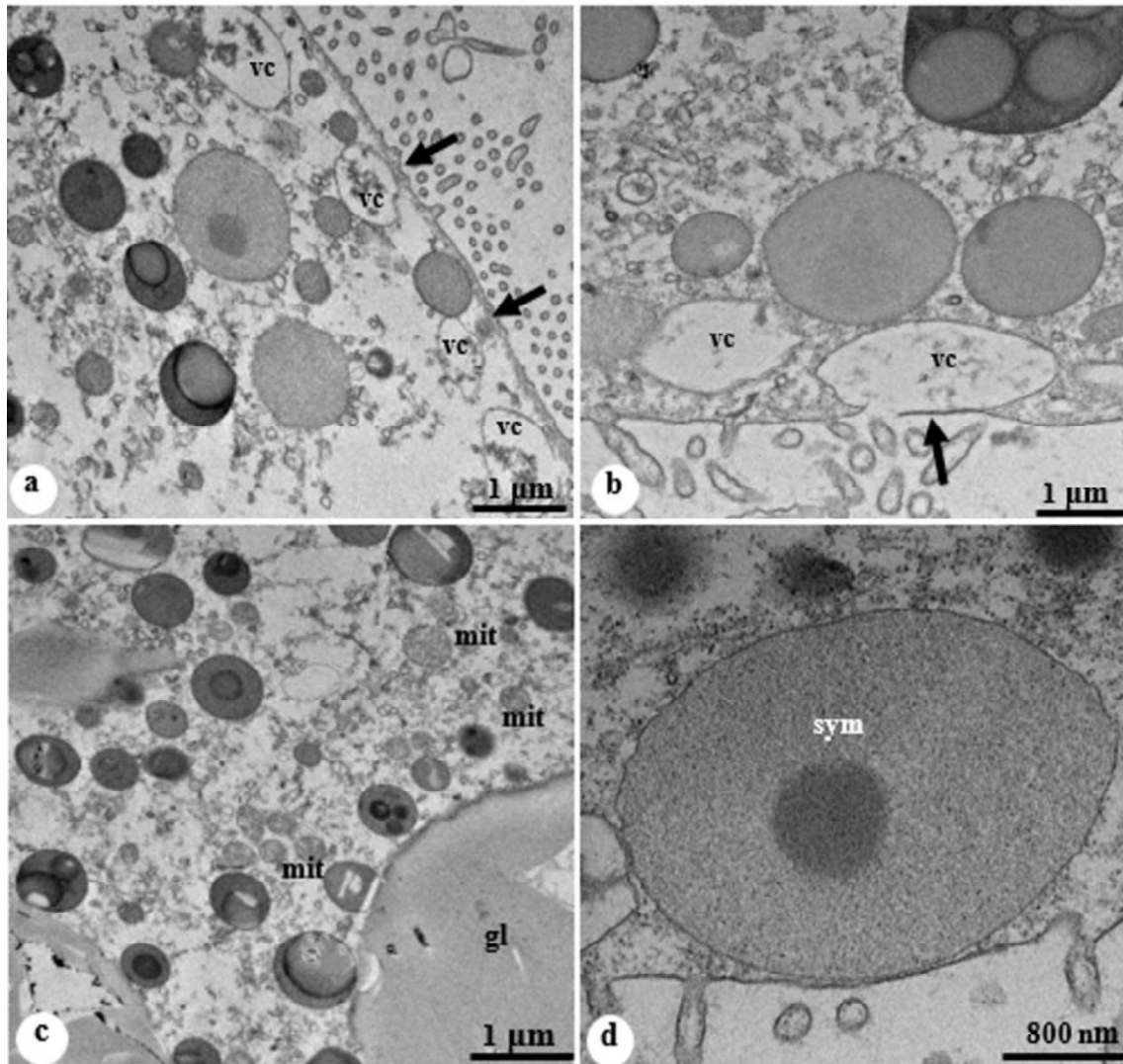


Figura 3. Microscopia eletrônica de transmissão detalhando os constituintes do interior dos oócitos de *M. harttii*. **(a)** Vesículas corticais (vc) homogêneas e ovóides próximas à membrana plasmática do oócito (setas pretas). **(b)** Vesícula cortical (vc) fundida à membrana e possivelmente liberando material extracelular (seta preta). **(c)** Presença de mitocôndrias (mit) distribuídas no citoplasma do oócito. **(d)** Célula *Symbiodinium-like* (sym) próxima a periferia do oócito.

3.2. Ultraestrutura do espermatozoide

Os espermatozoides da *M. harttii* têm comprimento total de $6,25 \pm 1,34 \mu\text{m}$, apresentam uma cabeça oval ($0,40 \pm 0,11 \mu\text{m}$) e um longo flagelo ($5,53 \pm 1,25 \mu\text{m}$), que representa 88,38% do seu tamanho total (Fig. 4 a-b).

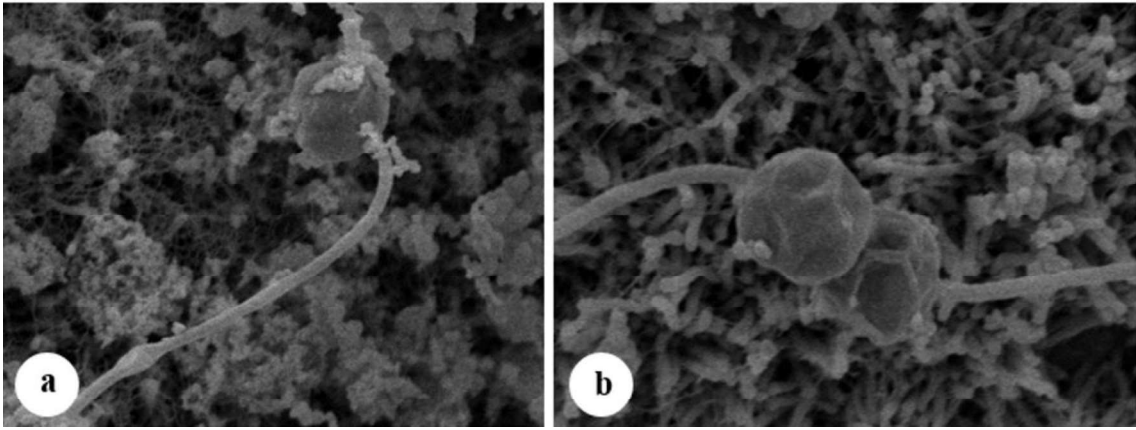


Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura dos espermatozoides de *M. hartii* **(a)** Espermatozoide com flagelo estendido e com muco aderido à sua cabeça. **(b)** Detalhe da cabeça ovoide dos espermatozoides.

O núcleo ocupa a região central da cabeça do espermatozoide, exibindo formato ovoide e material genético elétron denso variado (Fig. 5 a-b). Abaixo do núcleo pode-se observar o ligamento dos centríolos (Fig. 5 c-d) com os axonemas, exibindo o padrão conhecido para vertebrados e invertebrados (veja Inaba 2003) no arranjo dos microtúbulos (9+2), juntamente com sua membrana flagelar estendida lateralmente (Fig. 6 a-b). Nas regiões periféricas, próximo a membrana plasmática, foram observadas vesículas elétron densas delimitadas por lamelas, semelhantes às encontradas nos complexos de Golgi (Fig. 6 c-d). Nos lados direito e esquerdo do núcleo foram observadas lamelas empilhadas em disposição paralela, denominadas de complexo de Golgi (Fig. 7 a-b), e abaixo de cada Golgi foi observada uma mitocôndria (Fig. 7 c-d). Com base nas análises ultraestruturais dos espermatozoides de *M. hartii* nós criamos uma representação esquemática do espermatozoide com suas principais organelas (Fig. 8).

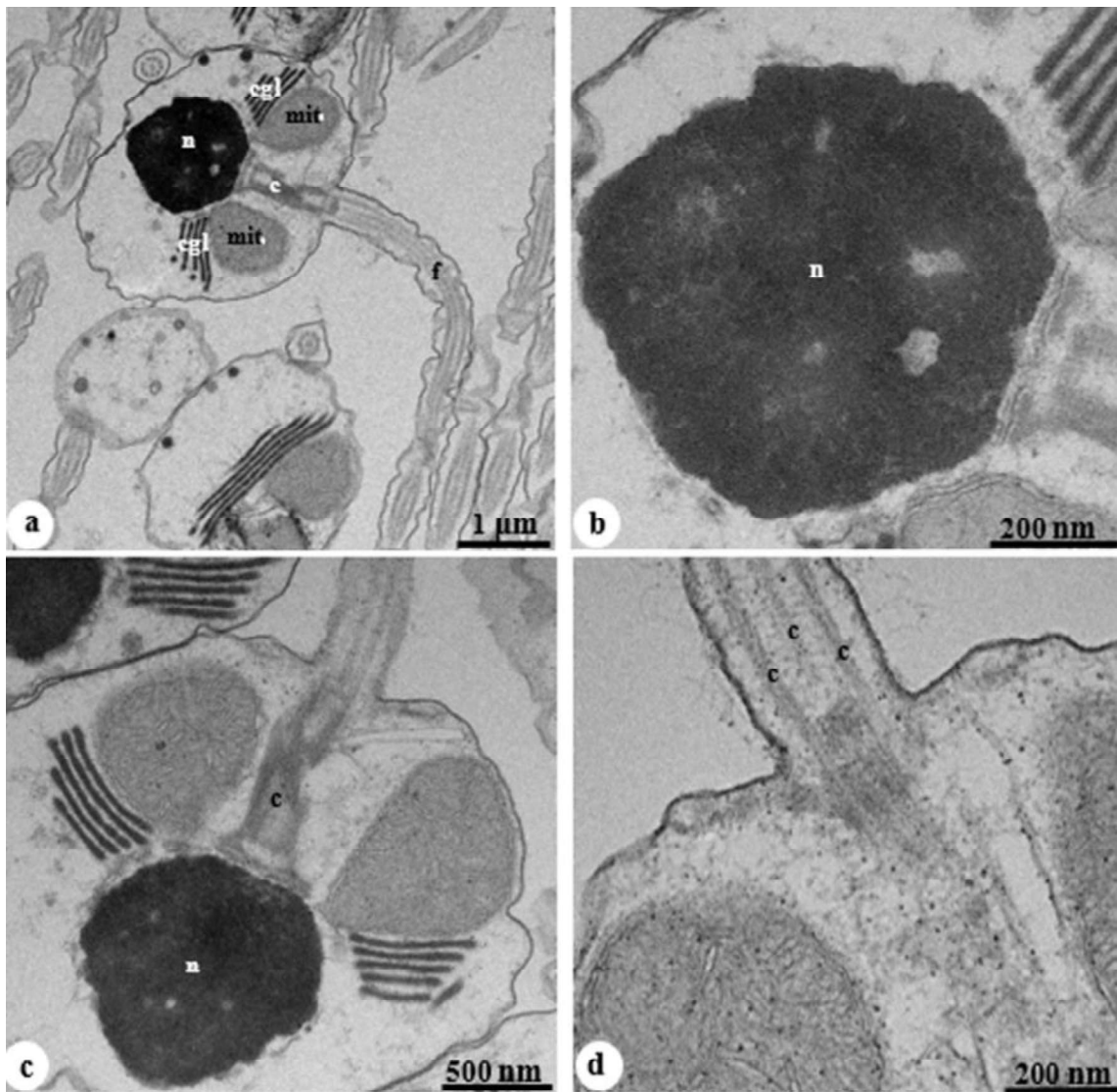


Figura 5. Microscopia eletrônica de transmissão dos espermatozoides de *M. hartii*. **(a)** Visão geral: Observe o núcleo (n), conectados a ele os centríolos (ct), as vesículas elétrons densas (v), duas regiões com complexos de Golgi (gc), abaixo de cada Golgi existe uma única mitocôndria (mit), e o flagelo (fg). **(b)** Detalhe do núcleo (n) exibindo regiões mais elétrons densas que outras. **(c)** Os centríolos (ct) penetram no fundo do núcleo (n). **(d)** Os centríolos (ct) distais dão origem a matriz microtubular do flagelo (fg).

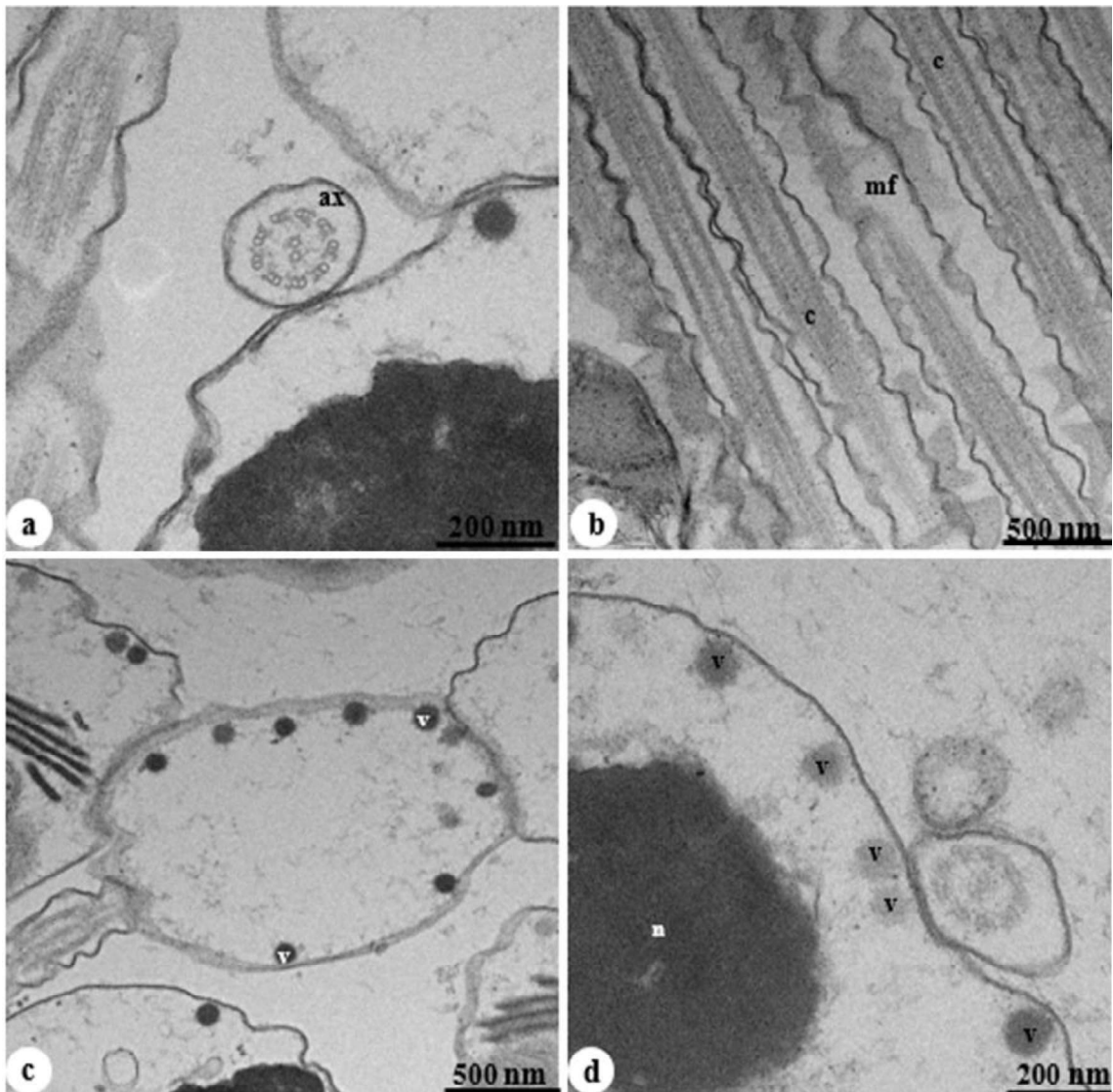


Figura 6. Microscopia eletrônica de transmissão dos espermatozoides de *M. hartii* mostrando (a) Os axonemas (ax) dos microtubulos 9+2 do flagelo (fg). (b) Detalhes da posição dos centríolos (ct) e a matriz flagelar (fm). (c) Vesículas (v) na região periférica. (d) Detalhes das vesículas (v) mostrando uma borda semelhante as encontradas nos complexos de Golgi (gc).

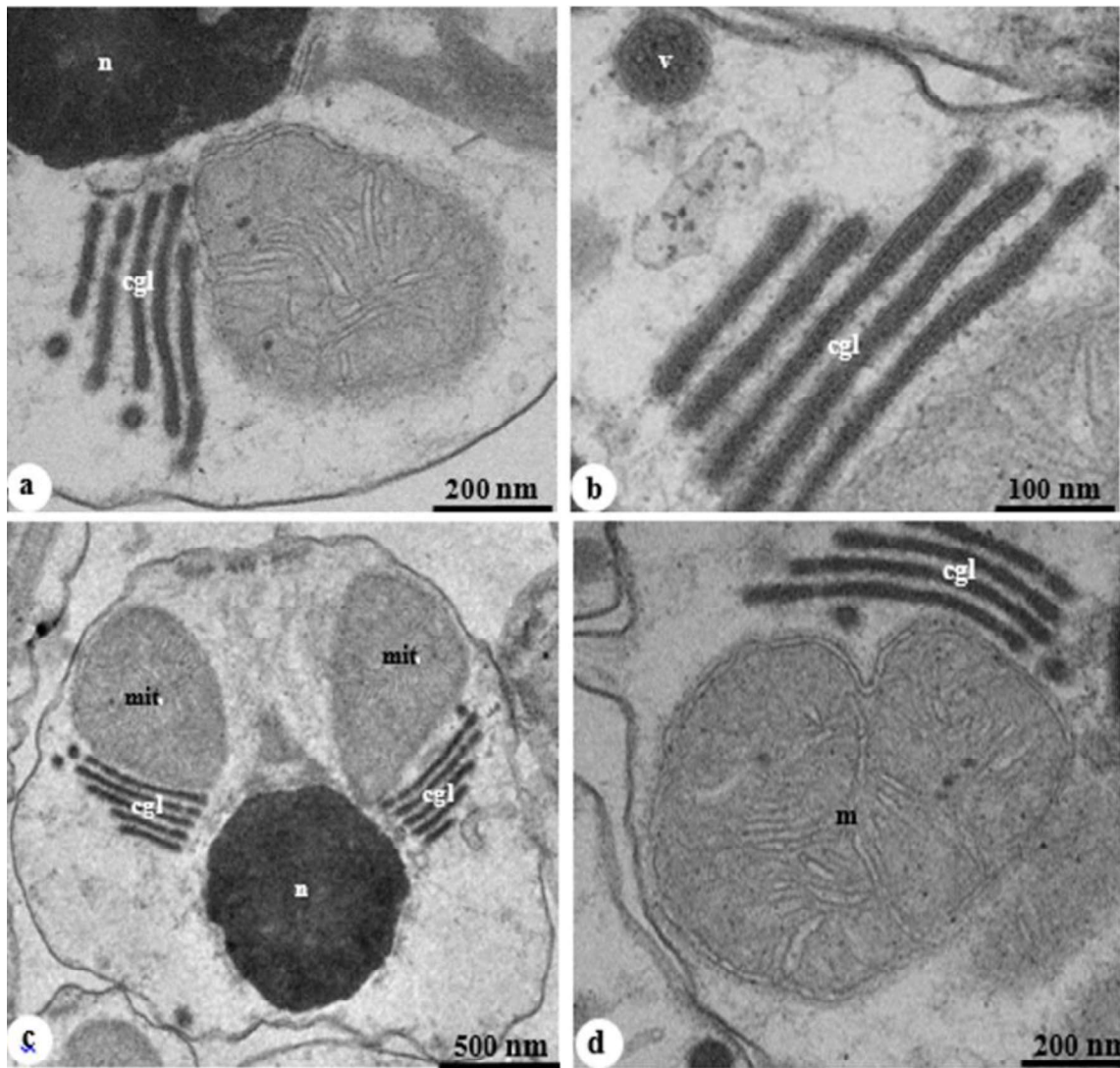


Figura 7. Microscopia eletrônica de transmissão dos espermatozoides de *M. hartii*. **(a)** Complexo de Golgi (gc) paralelos e empilhados. **(b)** Detalhes do complexo de Golgi (gc) mostrando as lamelas semelhantes às encontradas nas vesículas (v). **(c)** Mitocôndria (mit) única abaixo de cada Golgi (gc). **(d)** Detalhes da mitocôndria (mit) mostrando as cristas e a dupla membrana.



Figura 8. Representação esquemática do espermatozoide de *M. harttii* com suas organelas. Vesículas elétricas densas (v), núcleo (n), complexos de Golgi (gc), duas mitocôndrias (mit), centríolos (ct), flagelo (fg) e matriz flagelar (fm).

Alguns espermatozoides apresentavam mitocôndrias aparentemente fundidas, formando uma única organela (Fig. 9 a-b). Além das mitocôndrias fundidas, alguns espermatozoides também apresentavam a cromatina descondensada (núcleo). Nós também observamos espermatozoides com diferentes estruturas mitocondriais, fundidas ou individualizadas, próximos uns aos outros (Fig. 9 c).

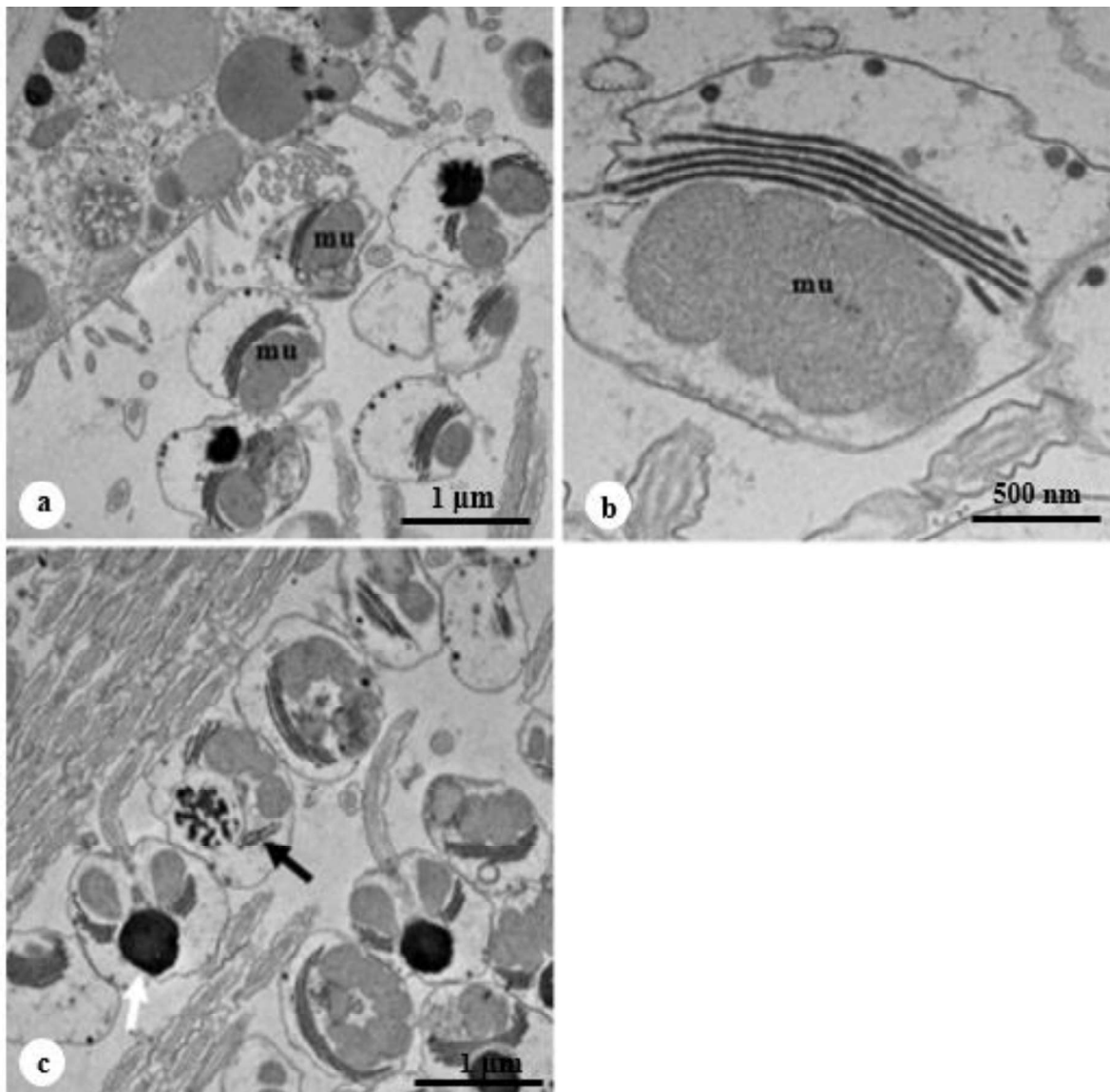


Figura 9. Microscopia eletrônica de transmissão dos espermatozoides de *M. hartii*. **(a)** Espermatozoides com mitocôndrias fundidas (mf). **(b)** Detalhes das mitocôndrias fundidas formando uma única organela (mf). **(c)** Espermatozoide com mitocôndrias unidas e cromatina descondensada (seta preta), próximos a espermatozoides com mitocôndrias individualizadas e cromatina condensada (seta branca).

4. Discussão

4.1. Ultraestrutura do oócito

Este trabalho traz informações inéditas sobre a morfologia dos gametas do coral *Mussismilia harttii*. Nós realizamos uma descrição morfológica ultraestrutural detalhada, avaliando as organelas presentes no interior dos gametas bem como suas funções associadas. O formato arredondado do oócito, que observamos nas imagens de MEV, é esperado para aqueles dissociados do pacote de gametas, ou seja, que já haviam entrado em contato com a água marinha e estavam aptos para serem fecundados. As microvilosidades dos oócitos da *M. harttii* se assemelham àquelas encontradas em oócitos de outras seis espécies de corais pétreos (Tsai et al. 2016) e aos corais moles *Junceella juncea* (Benayahu et al. 1989) e *Heteroxenia fuscescens* (Tsai et al. 2014). Essas microvilosidades apresentavam estrutura delgada e espaçada, e estavam distribuídas por toda a superfície dos oócitos. A presença dessas microvilosidades atesta a maturidade dos oócitos e corrobora os achados de Padilla-Gamiño et al. (2011) em oócitos maduros do coral *Montipora capitata*.

Muito além de uma indicação de maturidade oocitária, acreditamos que as microvilosidades observadas possam desempenhar função protetora e nutricional ao oócito da *Mussismilia harttii*. Observações ultraestruturais em oócitos de alguns invertebrados aquáticos como os moluscos *Lymnaea stagnalis* (Eckelbarger e Davis 1996) e *Haliotis varia* (Najmudeen 2008), revelaram que as microvilosidades funcionam como uma barreira protetora, evitando danos provocados pelo atrito entre os gametas femininos durante a oogênese e choques físicos quando liberados para o ambiente externo. Os estudos moleculares e histológicos conduzidos por Tan et al. (2020) apontam que as microvilosidades participam na captação de nutrientes pelos oócitos durante a vitelogênese do coral *Acropora tenuis*. Além disso, estudos revelaram ainda que as microvilosidades podem estar associadas ao processo de fecundação. As observações morfológicas e ultraestruturais nos oócitos do ouriço-do-mar *Arbacia punctulata* mostraram que as microvilosidades auxiliam na formação do cone de fertilização, uma extensão protoplasmática que se forma no ponto de contato entre o espermatozoide e o oócito para prevenir a polispermia (Tilney e Jaffe 1980). Ao verificarem a estrutura das microvilosidades dos oócitos da estrela do mar *Patiria pectinifera* em diferentes estágios de maturação, Santella et al. (2020) observaram que quando os oócitos alcançam o período ótimo para a fertilização, estas tornavam-

se mais curtas e, iniciava-se uma maturação estrutural, promovendo a migração e acúmulo dos grânulos corticais em direção ao córtex do oócito. Portanto, fica claro que maior atenção deveria ser dada a esse tema e a necessidade de estudos mais aprofundados e específicos, que possam nos ajudar a compreender melhor a função das microvilosidades nos oócitos de corais.

Em algumas regiões foi possível observar entre as microvilosidades uma estrutura similar à escamas. Com base nas observações da superfície dos oócitos da *M. harttii* por MEV, acreditamos que essa estrutura semelhante à escamas seja na verdade resquílios das estruturas hexagonais onde os espermatozoides são armazenados antes da dissociação do pacote (Valente et al. *in prep.*), as quais devem ter permanecido aderidas ao oócito por meio do muco.

As imagens de MET nos permitiram constatar que a maior parte do volume dos oócitos de *M. harttii* consiste em *yolk materials* como os *yolk bodies* (esféricos, elétrondensos e granulados) e os *lipid granules* (esféricos, maiores e com faixas claras), os quais estão relacionados à reserva de energia para o oócito (Tsai et al. 2016). Em adição a esses *yolk materials*, um grande número de vesículas também pode ser encontrado dentro do citoplasma. Essas vesículas podem servir como transportadores para a transferência de nutrientes do retículo endoplasmático para os *yolk materials* (Tsai et al. 2016). A presença de grande quantidade de *yolk bodies* e *lipid granules* no citoplasma dos oócitos sugere que essas organelas auxiliam na flutuabilidade, permitindo que uma vez dissociados do pacote, os oócitos boiem até a superfície do oceano.

Observações do conteúdo lipídico no interior dos oócitos em diferentes espécies de corais revelam que os *lipid granules* também são utilizados como energia para o crescimento tecidual, através da reabsorção de oócitos imaturos ao final da oogênese (Davies 1991). Além disso, os *lipid granules* são utilizados como energia metabólica (Imbs et al. 2006) e fornecem energia para o desenvolvimento larval após a fecundação (Edmunds e Davies 1986). Ao analisarem o conteúdo lipídico no interior dos oócitos imaturos dos corais *Junceella juncea* e *Junceella fragilis* Lin et al. (2012) verificaram que o teor de lipídico total diminuiu durante o desenvolvimento oocitário, reforçando que esse componente é utilizado para a produção de energia durante a oogênese.

No presente estudo, as vesículas corticais apresentavam, na maioria das vezes, formato ovoide, conteúdo homogêneo filamentosos e se localizavam próximas ou fundidas à membrana plasmática dos oócitos. Estudos com invertebrados marinhos

como a anêmona do mar *Bunodosoma cavernata* (Dewel e Clark 1974) e o ouriço do mar *Arbacia lixula* (Monroy 1953) revelaram que as vesículas corticais observadas para ambas as espécies estavam fundidas à membrana plasmática e liberavam grânulos corticais para a região extracelular do oócito, após o contato com a água marinha. Nossas observações realizadas por MET, antes da dissociação do pacote de gametas da *M. harttii*, revelam que as vesículas corticais dos oócitos da espécie aparentam liberar grânulos para a região extracelular (Fig. 2 f - detalhe). Nós acreditamos que quando os oócitos são liberados dos mesentérios para a cavidade gastrovascular, o contato dos gametas femininos com a água presente nesta região faz com que reações corticais aconteçam nas vesículas, promovendo a liberação de material cortical para a região extracelular. Porém, até o momento nenhum estudo ultraestrutural avaliou as possíveis reações corticais em oócitos de corais após o contato com a água e subsequente fecundação. Clark et al. (1980) verificaram que o contato do oócito do camarão *Penaeus aztecus* com a água do mar resultou em uma grande liberação de grânulos corticais através de suas criptas. Esses grânulos eram constituídos principalmente por proteínas e carboidratos (Lynn e Clark, 1987). A semelhança na densidade de elétrons dos grânulos presentes na região interna das vesículas corticais e na camada mucosa (extracelular) dos pacotes de *M. harttii* sugere que essas vesículas podem ainda auxiliar na formação do pacote de oócitos-espermatozoides. O estudo de Padilla-Gamiño et al. (2011) também revelou que a densidade de elétrons dos grânulos presentes no interior dos oócitos do coral escleractíneo *Montipora capitata* se assemelha ao muco formador do pacote de oócitos-espermatozoides na espécie. Contudo, estudos detalhados sobre as vesículas corticais devem ser realizados afim de se conhecer suas funções durante a oogênese, na formação do pacote e após a dissociação do gameta do pacote.

Foi possível observar mitocôndrias distribuídas por todo o citoplasma dos oócitos, devido ao seu papel principal no fornecimento da energia necessária para o desenvolvimento oocitário (Tsai et al. 2016). Estas apresentavam formato ovoide, suas cristas eram bem evidentes e estavam próximas aos lipid granules e aos yolk bodies. A distribuição das mitocôndrias por todo o oócito parece de fato ser uma característica comum em diversos invertebrados marinhos como a ascídea *Ciona intestinalis* (Tosti et al. 2003), o molusco *Bolinus brandaris* (Pérez et al. 2004) e a anêmona *Actinio fragacea* (Larkman 1984).

Os corais escleractíneos mantêm uma relação endossimbiótica com dinoflagelados do gênero *Symbiodinium* (Muscatine, 1990). Os compostos orgânicos

sintetizados por esses organismos fotossinteticamente ativos são destinados para o crescimento, calcificação e produção de gametas do coral (Rinkevich 1989; Muscatine 1990). A aquisição dos *Symbiodinium* pelas células gastrodérmicas do coral é geralmente via transmissão vertical ou horizontal (Lin et al. 2018). No primeiro processo, os *Symbiodinium* são transferidos do coral ("parent") para o oócito ou para a larva. Estes possuem a vantagem de poderem contar com uma fonte adicional de alimento durante o seu desenvolvimento. Por outro lado, a transmissão horizontal em que os *Symbiodinium* são adquiridos diretamente da coluna d'água fornece aos oócitos e às larvas a chance de absorverem cepas que podem ser mais adequadas ao seu novo ambiente (Van Oppen 2004; Coffroth 2005). A prole de certos gêneros de corais como *Montipora*, *Porites* e *Pocillopora* (Padilla-Gamiño et al. 2012; Sharp et al. 2012; Ceh et al. 2012) herda os *Symbiodinium* da linhagem parental (transmissão vertical), porém, esse fenômeno é mais comum em corais incubadores. As espécies liberadoras de gametas usualmente requerem que seus gametas ou larvas obtenham os *Symbiodinium* da coluna d'água (transmissão horizontal). Herdar os *Symbiodinium* através dos oócitos pode influenciar o comportamento de assentamento e sucesso da fertilização (Boulotte et al. 2016). Leite et al. (2017) ao avaliarem a ultraestrutura dos pacotes de gametas do coral *Mussismilia hispida* não observaram a presença de células do gênero *Symbiodinium* ou células bacterianas. Contudo, células menores denominadas de *Symbiodinium-like* foram identificadas na região periférica dos oócitos. Nossas observações por MET também revelaram a presença das células *Symbiodinium-like* nos oócitos, e acreditamos que a transmissão dessas células em *M. harttii* ocorra de forma vertical (transferidos das colônias parentais para os oócitos). Padilla-Gamiño et al. (2012) confirmam que a transmissão de células simbióticas pode ocorrer diretamente de corais progenitores para os oócitos, mesmo em espécies de corais liberadores de gametas.

4.2. Ultraestrutura do espermatozoide

Talvez uma das razões para o pouco conhecimento morfológico acerca dos espermatozoides maduros em corais escleractíneos liberadores de gametas seja devido a sua rápida diluição e dispersão no oceano. Aqui, nós trouxemos informações inéditas sobre a morfologia e ultraestrutura dos gametas masculinos. Os espermatozoides da *M. harttii* apresentam uma cabeça ovoide e inclui um núcleo na região central, exibindo material elétron denso evidente. Vesículas elétron densas

acima do núcleo foram observadas próximas à membrana plasmática dos espermatozoides. Acreditamos que essas vesículas elétron densas desempenham uma função acrossômica, uma vez que não observamos a presença de poro germinativo (micrópila) nos oócitos de *M. harttii*. Ao avaliar a ultraestrutura dos espermatozoides de quatro espécies de corais escleractíneos do mar do Caribe, Steiner (1991; 1993) observou que a espécie *Siderastrea siderea* apresentava vesículas elétron-densas membranosas (chamadas vesículas pró-acrossomais) próximas à membrana plasmática. Para os corais negros gonocóricos *Cirrhopathes* sp. (Gaino et al. 2008) e *Rhipidipathes reticulata* (Gaino e Scoccia 2010), também foi constatado a presença dessas vesículas elétron-densas. Abaixo do núcleo pôde-se observar o ligamento dos centríolos com os axonemas, num arranjo dos microtúbulos (9+2) juntamente com sua membrana flagelar. A presença das vesículas elétron-densas e o arranjo dos axonemas em conformação (9+2) nos flagelos dos espermatozoides são de fato características de espermatozoides primitivos que realizam fecundação externa (Reunov 2005).

A partir das imagens de MET foi possível observar lamelas empilhadas em disposição paralela, denominadas de complexos de Golgi. Essas organelas apresentam bordas eletrôn-lucente, enquanto que as regiões centrais são eletrôn-densas. Vesículas semelhantes às encontradas na cabeça dos espermatozoides foram observadas bem próximas ao Golgi (Fig. 4 i - detalhe). De acordo com a semelhança na densidade de elétrons e na proximidade com o aparelho de Golgi, acreditamos que a formação das vesículas elétron densas (pró acrossomais) nos espermatozoides de *M. harttii* ocorra a partir do complexo de Golgi. Nossos achados estão em acordo com o estudo de Dewel e Clark (1972), que investigaram a ultraestrutura da espermatogênese e dos espermatozoides maduros do cnidário *Bunodosoma cavernata*. Eles verificaram que as pequenas vesículas encontradas na cabeça do espermatozoide desempenhavam função acrossômica, e estas tinham de fato sua origem dos complexos de Golgi.

Duas grandes mitocôndrias foram observadas abaixo dos complexos de Golgi e próximas aos centríolos. Sua função está associada ao fornecimento de energia para o batimento flagelar do espermatozoide durante a desova (Cummins 2009). Além das duas mitocôndrias grandes (mais frequentes), as imagens de MET nos permitiram observar (com menos frequência) alguns espermatozoides com pequenas mitocôndrias distribuídas no citoplasma. Acreditamos que as mitocôndrias pequenas tendem a se fundir formando uma mitocôndria maior. Gaino et al. (2008) também

observaram a presença de numerosas e pequenas mitocôndrias em espermatozoides imaturos do coral gonocórico *Cirrhopathes* sp., as quais se fundiram durante a espermatogênese dando origem a uma mitocôndria maior. Segundo Steiner (1991), a fusão parcial ou total das mitocôndrias em corais escleractíneos tem como função aumentar a membrana interna e diminuir a membrana externa. Essa estratégia é utilizada para diminuir barreiras, promovendo maior movimento do substrato no interior da matriz mitocondrial (Baccetti e Afzelius 1976).

Observações feitas por Gaino et al. (2008) e Gaino e Scoccia (2009) tais como a presença de axonemas livres, citoplasma rico em mitocôndrias pequenas e núcleo com cromatina descondensada eram características indicativas de imaturidade em espermatozoides dos corais negros *Cirrhopathes* sp. e *Cupressopathes pumila*. Semelhantemente, a presença de células espermáticas com cromatina descondensada e pequenas mitocôndrias fundidas em nosso estudo (fig. 9 a - c), pode ser indicativo de uma possível imaturidade de alguns espermatozoides durante a desova de *M. hartii*.

O presente estudo é o primeiro relato sobre a ultraestrutura dos espermatozoides e oócitos de um coral escleractíneo endêmico no oceano Atlântico Sul. As análises por meio da microscopia eletrônica de varredura e transmissão são essenciais para compreendermos em detalhes a biologia e fisiologia dos gametas em corais. Nosso estudo fornece uma visão minuciosa dos gametas em nível ultraestrutural. Os achados aqui detalhados darão suporte para futuros e necessários estudos que buscam compreender melhor a gametogênese, a formação do pacote de gametas e a fecundação em corais escleractíneos. Além disso, biotecnologias reprodutivas como criopreservação de gametas e fecundação *in vitro* farão bom uso das informações aqui contidas.

Agradecimentos

O Projeto Coral Vivo e seus patrocinadores, a Petrobras, por meio do Programa Petrobras Socioambiental, e o Arraial d'Ajuda Eco Parque, são reconhecidos por financiar pesquisas de campo e utilização de instalações de estação de pesquisa. WV recebeu bolsa de pesquisa de campo do Fundo Brasileiro para a Biodiversidade (Funbio) e do Instituto Humanize (N ° 121/2019). Agradecemos o apoio financeiro da Fundação Grupo Boticário de Proteção à Natureza. LG é bolsista de pesquisa do CNPq-Brasil (310463 / 2018-1).

5. Referências

- Baccetti B, Afzelius B (1976) *The Biology of the Sperm Cell*. Basel, New York, 254 p
- Baird AH, Guest JR (2009) Spawning synchrony in scleractinian corals: comment on Mangubhai & Harrison (2008). *Mar Ecol Prog Ser* 374:301–304
- Benayahu Y, Berner T, Achituv Y (1989) Development of planulae within a mesogleal coat in the soft coral *Heteroxenia fuscescens*. *Mar Bio* 100(2):203-210 [doi: <https://doi.org/10.1007/BF00391959>]
- Boulotte NM, Dalton SJ, Carroll AG, Harrison PL, Putnam HM., Peplow LM, Van Oppen MJ (2016) Exploring the Symbiodinium rare biosphere provides evidence for symbiont switching in reef-building corals. *ISME J* 10(11):2693-2701 [doi: <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.54>]
- Castro CB, Zilberberg C (2016) Recifes brasileiros, sua importância e conservação. *Conhecendo os recifes brasileiros* (eds Zilberberg, C. et al.) 17-26
- Castro CB and Pires DO (1999) A bleaching event on a Brazilian coral reef. *Braz J Oceanogr* 47(1):87-90 [doi: <https://doi.org/10.1590/S1413-77391999000100008>]
- Ceh J, Raina JB, Soo RM, Keulen M, Bourne DG (2012) Coral-bacterial communities before and after a coral mass spawning event on Ningaloo Reef. *PLoS One* 7(5):36920 [doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036920>]
- Clark Jr WH, Lynn JW, Yudin, AI, Persyn HO (1980) Morphology of the cortical reaction in the eggs of *Penaeus aztecus*. *Biol Bull* 158(2):175-186 [doi: <https://doi.org/10.2307/1540929>]
- Coffroth MA (2005) Genetic diversity of symbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium*. *Protist* 156:19-34 [doi: <https://doi.org/10.1016/j.protis.2005.02.004>]
- Cummins J (2009) Sperm motility and energetics In *Sperm biology* (pp. 185-206). Academic Press [doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372568-4.00005-7>]
- Davies PS (1991) Effect of daylight variations on the energy budgets of shallow-water corals. *Mar Bio* 108(1), 137-144 [doi: <https://doi.org/10.1007/BF01313481>]
- De Lacaze-Duthiers H (1873) *Developpement des coralliaires. Actiniaires a Polypiers*. *Arch Zool Exp Gen* 2:269–348
- Dewel WC, Clark Jr WH (1974) A fine structural investigation of surface specializations and the cortical reaction in eggs of the cnidarian *Bunodosoma cavernata*. *J Cell Biol* 60(1), 78-91 [doi: <https://doi.org/10.1083/jcb.60.1.78>]
- Dewel WC, Clark Jr WH (1972) An ultrastructural investigation of spermiogenesis and the mature sperm in the anthozoan *Bunodosoma cavernata* (Cnidaria). *J*

- Ultrastructure Res 40(3-4), 417-431 [doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(72\)90111-6](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(72)90111-6)]
- Drury C, Greer JB, Baums I, Gintert B, Lirman D (2019) Clonal diversity impacts coral cover in *Acropora cervicornis* thickets: Potential relationships between density, growth, and polymorphisms. *Ecol Evol* 9:4518-4531
- Eckelbarger KJ, Davis CV (1996) Ultrastructure of the gonad and gametogenesis in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. I. Ovary and oogenesis. *Mar Bio* 127(1) 79-87 [doi: <https://doi.org/10.1007/BF00993647>]
- Edmunds PJ, Davies PS (1986) An energy budget for *Porites porites* (Scleractinia). *Mar Bio* 92(3), 339-347 [doi: <https://doi.org/10.1007/BF00392674>]
- Imbs AB, Demina OA, Demidkova DA (2006) Lipid class and fatty acid composition of the boreal soft coral *Gersemia rubiformis*. *Lipids* 41(7):721-725 [doi: <https://doi.org/10.1007/s11745-006-5023-8>]
- Fabricius KE (2005) Effects of terrestrial runoff on the ecology of corals and coral reefs: review and synthesis. *Mar Poll Bull* 50: 125–146
- Fadlallah YH (1983) Sexual reproduction, development and larval biology in scleractinian corals. A review. *Coral Reefs* 2:129–150
- Francini-Filho RB, Moura RL, Thompson FL, Reis RM, Kaufman L, Kikuchi RK, Leão ZM (2008) Diseases leading to accelerated decline of reef corals in the largest South Atlantic reef complex (Abrolhos Bank, eastern Brazil). *Mar Pollut Bull* 56(5):1008-1014 [doi: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.02.013>]
- Gaino E, Scoccia F (2010) Gamete spawning in *Antipathella subpinnata* (Anthozoa, Antipatharia): a structural and ultrastructural investigation. *Zoomorphology* 129(4):213-219 [doi: <https://doi.org/10.1007/s00435-010-0112-x>]
- Gaino E, Scoccia F (2009) Release of sperm clusters in spheres by the black coral *Cupressopathes pumila* (Anthozoa, Antipatharia). *Coral Reefs* 28(4):851-857 [doi: <https://doi.org/10.1007/s00338-009-0525-5>]
- Gaino E, Bo M, Boyer M, Scoccia F (2008) Sperm morphology in the black coral *Cirrhopathes* sp. (Anthozoa, Antipatharia). *Invertebrate Bio* 127(3):249-258 [doi: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2008.00132.x>]
- Goffredo S, Arnone S, Zaccanti F (2002) Sexual reproduction in the Mediterranean solitary coral *Balanophyllia europaea* (Scleractinia, Dendrophylliidae). *Mar Ecol Prog Ser* 229:83-94 [doi: <https://doi.org/10.3354/meps229083>]

- Guest JR, Baird AH, Goh BPL, Chou LM (2005) Seasonal reproduction in equatorial coral reefs. *Invert Reprod Dev* 48:207–218
- Harrison PL, Wallace CC (1990) Reproduction, dispersal and recruitment of scleractinian corals. In: Dubinsky Z (ed) *Ecosystems of the world: coral reefs*, vol 25. Elsevier, New York, pp 133–207
- Harrison PL, Jamieson BGM (1999) Cnidaria and Ctenophora. In: Jamieson BGM (ed) *Reproductive biology of invertebrates, Volume IX Part A, progress in male gamete ultrastructure and phylogeny*. Oxford-IBH, New Delhi, pp 21–95
- Harrison PL, Booth DJ (2007) Coral reefs: naturally dynamic and increasingly disturbed ecosystems. In: Connell SD, Gillanders BM (eds) *Marine ecology*. Oxford University Press, Melbourne, pp 316–377
- Harrison PL (2011) Sexual reproduction of scleractinian corals. In *Coral reefs: an ecosystem in transition*. Springer, Dordrecht pp. 59-85 [doi: https://doi.org/10.1007/978-94-007-0114-4_6]
- Hughes TP, Anderson KD, Connolly SR, Heron SF, Kerry JT, Lough JM, Baird AH, Baum JK, Berumen ML, Bridge TC, Claar DC, Eakin CM, Gilmour JP, Graham NAJ, Harrison H, Hobbs J-PA, Hoey AS, Hoogenboom M, Lowe RJ, McCulloch MT, Pandolfi JM, Pratchett M, Schoepf V, Torda G, Wilson SK (2018) Spatial and temporal patterns of mass bleaching of corals in the Anthropocene. *Science* 359:80–83
- Hughes TP, Kerry JT, Baird AH, Connolly SR, Chase TJ, Dietzel A, Hill T, Hoey AS, Hoogenboom MO, Jacobson M, Kerswell A, Madin JS, Mieog A, Paley AS, Pratchett MS, Torda G, Woods RM (2019) Global warming impairs stock–recruitment dynamics of corals. *Nature* 568:387–390
- Inaba K (2003) Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling. *Zoolog Sci* 20(9):1043-1056 [doi: <https://doi.org/10.2108/zsj.20.1043>]
- Kawaroe M, Soedharma D (2007) Oogenesis Karang Sclerectinia *Caulastrea furcata* dan *Lobophyllia corymbosa*. HAYATI J Biosci 14(1):31-35 [doi: <https://doi.org/10.4308/hjb.14.1.31>]
- Kolinski SP, Cox EF (2003) An update on modes and timing of gamete and planula release in Hawaiian scleractinian corals with implications for conservation and management. *Pac Sci* 57:17–27
- Larkman AU (1984) The fine structure of mitochondria and the mitochondrial cloud during oogenesis on the sea anemone *Actinia*. *Tissue Cell* 16(3), 393-404 [doi: [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(84\)90058-2](https://doi.org/10.1016/0040-8166(84)90058-2)]

- Leão ZM, Kikuchi RK, Ferreira BP, Neves EG, Sovierzoski HH, Oliveira MD, Johnsson R (2016) Brazilian coral reefs in a period of global change: A synthesis. *Braz J Oceanogr* 64 (SPE2):97-116 [doi: <https://doi.org/10.1590/S1679-875920160916064sp2>]
- Leite DC, Leão P, Garrido AG, Lins U, Santos HF, Pires DO, Peixoto RS (2017) Broadcast spawning coral *Mussismilia hispida* can vertically transfer its associated bacterial core. *Front Microbiol* 8, 176 [doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00176>]
- Lin C, Zhuo JM, Chong G, Wang LH, Meng PJ, Tsai S (2018) The effects of aquarium culture on coral oocyte ultrastructure. *Sci Rep* 8(1):1-13 doi: [<https://doi.org/10.1038/s41598-018-33341-x>]
- Lin C, Wang LH, Fan TY, Kuo FW (2012) Lipid content and composition during the oocyte development of two gorgonian coral species in relation to low temperature preservation. *PLoS One* 7(7):38689 [doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038689>]
- Loya Y, Rinkevich B (1980) Effects of oil pollution on coral reef communities. *Mar Ecol Prog Ser* 3:167–180
- Lynn JW, Clark Jr WH (1987) Physiological and biochemical investigations of the egg jelly release in *Penaeus aztecus*. *Biol Bull* 173(3), 451-460 [doi: <https://doi.org/10.2307/1541692>]
- LVFBAE - Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume VII – Invertebrados --1.ed.--Brasília,DF:ICMBio/MMA,2018. 7 v.:il.
- Monroy A (1953) A model for the cortical reaction of fertilization in the *Sea-urchin* egg. *Experientia* 9(11), 424-425 [doi: <https://doi.org/10.1007/BF02175529>]
- Morris JK (1965) A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27:1A-149^a
- Mulhall M (2008) Saving the rainforest of the sea: An analysis of international efforts to conserve coral reefs. *Duke Env'tl. L. & Pol'y F* 19:321
- Muscantine L (1990) The role of symbiotic algae in carbon and energy flux in reef corals. *Coral Reefs* 25:(1.29)
- Najmudeen TM (2008) Ultrastructural studies of oogenesis in the variable abalone *Haliotis varia* (Vetigastropoda: Haliotidae). *Aquat Biol*, 2(2) 143-151 [doi: <https://doi.org/10.3354/ab00046>]

- Neves E, Pires D (2002) Sexual reproduction of Brazilian coral *Mussismilia hispida* (Verrill, 1902). *Coral Reefs* 21(2):161-168 [doi: <https://doi.org/10.1007/s00338-002-0217-x>]
- Padilla-Gamiño JL, Pochon X, Bird C, Concepcion GT, Gates RD (2012) From parent to gamete: vertical transmission of *Symbiodinium* (Dinophyceae) ITS2 sequence assemblages in the reef building coral *Montipora capitata*. *PLoS One* 7(6), e38440 [doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038440>]
- Padilla-Gamiño JL, Weatherby TM, Waller RG, Gates, RD (2011) Formation and structural organization of the egg–sperm bundle of the scleractinian coral *Montipora capitata*. *Coral Reefs* 30(2):371-380 [doi: <https://doi.org/10.1007/s00338-010-0700-8>]
- Pérez A, José M, Ramón Herrero M, Durforti CM (2004) Ultrastructural studies of oogenesis in *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae). *Sci Mar* 2004, (68):343-353 [doi: <https://doi.org/10.3989/scimar.2004.68n3343>]
- Pires DO, Castro CB, Segal B, Pereira CM, Carmo EC, Silva RG, Calderon EN (2016) Reprodução de corais de águas rasas do Brasil. In: Zilberberg C, Abrantes DP, Marques JÁ, Machado LF, Marangoni LFB (eds) *Conhecendo os recifes brasileiros*. Museu Nacional, Rio de Janeiro, pp 111-128
- Pires DO, Castro CB, Ratto CC (1999) Reef coral reproduction in the Abrolhos Reef Complex, Brazil: the endemic genus *Mussismilia*. *Mar Biol* 135:463-471 [doi: <https://doi.org/10.1007/s002270050646>]
- Reunov AA (2005) Problem of terminology in characteristics of spermatozoa of Metazoa. *Russian J Dev Biol* 36(6), 335-351 [doi: <https://doi.org/10.1007/s11174-005-0050-6>]
- Richmond RH, Hunter CL (1990) Reproduction and recruitment of corals: comparisons among the Caribbean, the Tropical Pacific, and the Red Sea. *Mar Ecol Prog Ser* 60:185–203
- Richmond RH (1993) Coral reefs: present problems and future concerns resulting from anthropogenic disturbance. *Am Zool* 33:524–536
- Richmond RH (1997) Reproduction and recruitment in corals: critical links in the persistence of reefs. *Life and death of coral reefs*. Chapman e Hall 175-197 [doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5995-5_8]
- Rinkevich B (1989) The contribution of photosynthetic products to coral reproduction. *Mar Biol* 101(2):259-263 [doi: <https://doi.org/doi.org/10.1007/BF00391465>]

- Santella L, Limatola N, Chun JT (2020) Cellular and molecular aspects of oocyte maturation and fertilization: a perspective from the actin cytoskeleton. *Zoological Lett* 6:1-21 [doi: <https://doi.org/10.1186/s40851-020-00157-5>]
- Sharp KH, Distel D, Paul VJ (2012) Diversity and dynamics of bacterial communities in early life stages of the Caribbean coral *Porites astreoides*. *ISME J* 6(4):790-801 [doi: <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.144>]
- Steiner SC (1993) Comparative ultrastructural studies on scleractinian spermatozoa (Cnidaria, Anthozoa). *Zoomorphology* 113(2), 129-136 [doi: <https://doi.org/10.1007/BF00026453>]
- Steiner SCC (1991) Sperm morphology of scleractinians from the Caribbean. Kluwer Academic Publishers. *Hydrobiologia* Vol. 216, No. 1, pp. 131-135 [doi: <https://doi.org/10.1007/BF00403090>]
- Tan ES, Izumi R, Takeuchi Y, Isomura N, Takemura A (2020) Molecular approaches underlying the oogenic cycle of the scleractinian coral, *Acropora tenuis*. *Sci Rep* 10(1):1-16 [doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66020-x>]
- Tilney LG, Jaffe LA (1980) Actin, microvilli, and the fertilization cone of sea urchin eggs. *J Cell Biol* 87(3):771-782 [doi: <https://doi.org/10.1083/jcb.87.3.771>]
- Tosti E, Romano G, Buttino I, Cuomo A, Ianora A, Miralto A (2003) Bioactive aldehydes from diatoms block the fertilization current in ascidian oocytes. *Mol Rep Dev: Incorporating Gamete Research* 66(1):72-80 [doi: <https://doi.org/10.1002/mrd.10332>]
- Tsai S, Chang WC, Chavanich S, Viyakarn V, Lin C (2016) Ultrastructural observation of oocytes in six types of stony corals. *Tissue Cell* 48(4), 349-355 [doi: <https://doi.org/10.1016/j.tice.2016.05.005>]
- Tsai S, Jhuang Y, Spikings E, Sung PJ, Lin C (2014) Ultrastructural observations of the early and late stages of gorgonian coral (*Junceella juncea*) oocytes. *Tissue Cell* 46(4), 225-232 [doi: <https://doi.org/10.1016/j.tice.2014.05.002>]
- Van Oppen MJ (2004) Mode of zooxanthella transmission does not affect zooxanthella diversity in acroporid corals. *Mar Biol* 144(1):1-7 [doi: <https://doi.org/10.1007/s00227-003-1187-4>]
- Vargas-Ángel B, Colley SB, Hoke SM, Thomas JD (2006) The reproductive seasonality and gametogenic cycle of *Acropora cervicornis* off Broward County, Florida, USA. *Coral Reefs* 25(1):110-122 [doi: <https://doi.org/10.1007/s00338-005-0070-9>]

Wallace CC (1985) Reproduction, recruitment and fragmentation in nine sympatric species of the coral genus *Acropora*. *Mar Biol* (88):217–233 [doi: <https://doi.org/10.1007/BF00392585>]

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos através deste estudo, o presente trabalho é o primeiro relato sobre a ultraestrutura dos pacotes, espermatozoides e oócitos de um coral escleractíneo endêmico no oceano Atlântico Sul. Investigamos a composição dos pacotes de *M. hartii* avaliando seu arranjo e organização dos gametas usando análises histológicas e ultraestruturais de uma maneira muito detalhada. Além disso, este estudo fornece uma visão minuciosa dos gametas em nível ultraestrutural.

As análises por meio da microscopia eletrônica de varredura e transmissão são essenciais para compreendermos em detalhes a biologia e fisiologia dos gametas em corais. Os achados aqui detalhados darão suporte para futuros e necessários estudos que buscam compreender melhor a gametogênese, a formação do pacote de gametas e a fecundação em corais escleractíneos.

Este relatório inicial lança luz sobre uma área pouco explorada que pode auxiliar em um melhor entendimento da fertilização de corais hermafrodita, bem como fornecer suporte para estudos futuros sobre biotecnologias reprodutivas para a conservação de corais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKER, A. C.; GLYNN, P. W.; RIEGL, B. Climate change and coral reef bleaching: an ecological assessment of long-term impacts, recovery trends and future outlook. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, London, v. 80, n. 4, p. 435-471, 2008.

BENDER, M. G. *et al.* Local ecological knowledge and scientific data reveal overexploitation by multigear artisanal fisheries in the Southwestern Atlantic. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 10, [art.] e110332, 2014.

BRUNO, J. F.; VALDIVIA, A. Coral reef degradation is not correlated with local human population density. **Scientific Reports**, London, n. 6, [art.] 29778, [p. 1-8], 2016.

CAIRNS, S. D. Deep-water corals: an overview with special reference to diversity and distribution of deep-water scleractinian corals. **Bulletin of Marine Science**, New Hampshire, v. 81, n. 3, p. 311-322, 2007.

CASTRO, C. B.; PIRES, D. O. A bleaching event on a Brazilian coral reef. **Revista Brasileira de Oceanografia**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 1, p. 87-90, 1999.

CASTRO, C. B.; ZILBERBERG, C. Recifes brasileiros, sua importância e conservação. *In*: ZILBERBERG, C. *et al.* (ed.). **Conhecendo os recifes brasileiros: rede de pesquisas coral vivo**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, UFRJ, 2016. p. 17-26.

COSTA, C. F.; SASSI, R.; AMARAL, F. D. Annual cycle of symbiotic dinoflagellates from three species of scleractinian corals from coastal reefs of northeastern Brazil. **Coral Reefs**, Berlin, v. 24, n. 2, p. 191-193, 2005.

CRESSEY, D. Coral crisis: great barrier reef bleaching is “the worst we’ve ever seen”. **Nature**, London, 13 Apr. 2016. Disponível em: <https://www.nature.com/news/coral-crisis-great-barrier-reef-bleaching-is-the-worst-we-ve-ever-seen-1.19747>. Acesso em: 5 ago. 2020.

DANOVARO, R. *et al.* Sunscreens cause coral bleaching by promoting viral infections. **Environmental Health Perspectives**, Washington, DC, Ancona, v. 116, n. 4, p. 441-447, 2008.

FAUTIN, D. G.; MARISCAL, R. N. Cnidaria: anthozoa. *In*: HARRISON, F.; WESTFALL, J. (ed.). **Microscopic anatomy of invertebrates: protozoa**. New York: Wiley-Liss, 1991. v. 2, p. 267–358.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The state of world fisheries and aquaculture 2018: meeting the sustainable**

development goals. Rome: FAO, 2018. (The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA)).

FONSECA, J. S. *et al.* Effects of increasing temperature alone and combined with copper exposure on biochemical and physiological parameters in the zooxanthellate scleractinian coral *Mussismilia harttii*. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 190, p. 121-132, 2017.

FRANKOWIAK, K. *et al.* Photosymbiosis and the expansion of shallow-water corals. **Science Advances**, Washington, DC, v. 2, n. 11, [art.] e1601122, 2016.

GLYNN, P. W. *et al.* Reef coral reproduction in the eastern pacific: Costa Rica, Panama, and Galapagos Islands (Ecuador). **Marine Biology**, Berlin, v. 109, n. 3, p. 355-368, 1991.

GODOY, L. C. *et al.* A study on the vitrification of stage III zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles. **Cryobiology**, San Diego, v. 67, n. 3, p. 347-354, 2013.

GODOY, L. C. Projeto ReefBank: usando biotecnologias a favor da conservação dos recifes de coral. **Revista Aquaculture Brasil**, Laguna, n. 15, p. 24-28, nov./dez. 2018.

HAGEDORN, M. M. *et al.* Cryopreservation of fish spermatogonial cells: the future of natural history collections. **Scientific Reports**, London, n. 8, [art.] 6149, [p. 1-11], 2018.

HAGEDORN, M. M. *et al.* First frozen repository for the Great Barrier Reef coral created. **Cryobiology**, San Diego, v. 65, n. 2, p. 157-158, 2012.

HAGEDORN, M. M. *et al.* Preliminary studies of sperm cryopreservation in the mushroom coral, *Fungia scutaria*. **Cryobiology**, San Diego, v. 52, n. 3, p. 454-458, 2006.

HARRISON, P. L. Sexual reproduction of scleractinian corals. *In*: DUBINSKY, Z.; STAMBLER, N. (ed.). **Coral reefs: an ecosystem in transition**. Dordrecht: Springer, 2011. p. 59-85.

HERON, S. F. *et al.* Warming trends and bleaching stress of the world's coral reefs 1985–2012. **Scientific Reports**, London, n. 6, [art.] 38402, [p. 1-14], 2016.

HOEGH-GULDBERG, O. *et al.* Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. **Science**, Washington, DC, v. 318, n. 5857, p. 1737-1742, 2007.

HUANG, D. Threatened reef corals of the world. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 3, [art.] e34459, 2012.

ICMBIO - INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção: volume IV - répteis**. Brasília, DF: ICMBio/MMA, 2018.

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

LEÃO, Z. M. *et al.* Brazilian coral reefs in a period of global change: a synthesis. **Brazilian Journal of Oceanography**, São Paulo, v. 64, p. 97-116, 2016. Número Especial, 2.

MARCELINO, V. O.; VERBRUGGEN, H. Multi-marker metabarcoding of coral skeletons reveals a rich microbiome and diverse evolutionary origins of endolithic algae. **Scientific Reports**, London, v. 6, [art.] 31508, [p. 1-9], 2016.

MULHALL, M. Saving the rainforest of the sea: an analysis of international efforts to conserve coral reefs. **Duke Environmental Law & Policy Forum**, Durham, v. 19, n. 2, p. 321-351, 2008.

MUÑOZ, I. *et al.* Ranking potential impacts of priority and emerging pollutants in urban wastewater through life cycle impact assessment. **Chemosphere**, Oxford, v. 74, n. 1, p. 37-44, 2008.

OHKI, S. *et al.* Cryopreservation of *Acropora digitifera* sperm with use of sucrose and methanol based solution. **Cryobiology**, San Diego, v. 69, n. 1, p. 134-139, 2014.

PIRES, D. O. *et al.* Reprodução de corais de águas rasas do Brasil. *In*: ZILBERBERG, C. *et al.* (ed.). **Conhecendo os recifes brasileiros: rede de pesquisas coral vivo**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, UFRJ, 2016. p. 111-128.

RICHMOND, R. H. Reproduction and recruitment in corals: critical links in the persistence of reefs. *In*: BIRKELAND, C. **Life and death of coral reefs**. New York: Chapman & Hall, 1997. p. 175-197.

ROHWER, F. *et al.* Diversity and distribution of coral-associated bacteria. **Marine Ecology Progress Series**, Oldendorf (Luhe), v. 243, p. 1-10, 2002.

SCHMIDT, H.; ZISSLER, D. **Die spermien der anthozoen und ihre phylogenetische-bedeutung**. Stuttgart: Schweizerbart, 1979.

STANLEY, G. D. Jr. The history of early Mesozoic reef communities: a three-step process. **Palaios**, Tulsa, v. 3, n. 2, p. 170-183, 1988.

VENTURA, C. R. R. *et al.* Ciclo de vida de invertebrados marinhos. *In*: PEREIRA, R. C.; SOARES-GOMES, A. (org.). **Biologia marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, 2002. p. 50-67.

VERON, J. E. *et al.* Delineating the coral triangle. **Galaxea, Journal of Coral Reef Studies**, Tokyo, v. 11, n. 2, p. 91-100, 2009.

VILAÇA, R. Recifes biológicos. *In*: PEREIRA, R. C.; SOARES-GOMES, A. (org.). **Biologia marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, 2002. p. 115-127.

WELLS, J. W. **Recent corals of the Marshall Islands**. Washington, DC: Government Printing Office, 1954.

WILKINSON, C.; SALVAT, B. Coastal resource degradation in the tropics: does the tragedy of the commons apply for coral reefs, mangrove forests and seagrass beds. **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 64, n. 6, p. 1096-1105, 2012.

WOLSTENHOLME, J. K. Temporal reproductive isolation and gametic compatibility are evolutionary mechanisms in the *Acropora humilis* species group (Cnidaria; Scleractinia). **Marine Biology**, Berlin, v. 144, n. 3, p. 567-582, 2004.

APÊNDICES

Jornal Coral Reefs instruções para autores

Careful adherence to these instructions will avoid delays and extra work for authors. Poorly prepared submissions will be returned for correction and may result in immediate rejection.

1. Copyright declaration

The authors guarantee that the manuscript will not be published elsewhere in any language without the consent of the copyright holders, that the rights of third parties will not be violated, and that the publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation. Authors wishing to include figures or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright holder (s) and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Copyright for US Government Employees: The work of US Government employees prepared as part of their official duties cannot be copyrighted and, therefore, copyright cannot be transferred. Authors should, however, complete the Springer Copyright Form and add the following wording: "I (we) certify that the article named above was prepared as part of my (our) official duties. The article is thus in the public domain and cannot be copyrighted." US Government authors are permitted to distribute or post their published papers elsewhere but normal subscription terms apply for access to the article via Springerlink.

2. Copyright Form

When authors receive their proofs from the publisher they will be required to sign the copyright declaration.

3. Submission procedure and peer review

Manuscripts must be submitted online at the journal website www.editorialmanager.com/core/. Authors using the Editorial Manager site for Coral Reefs for the first time will need to complete a simple registration procedure to obtain an account. They will then be led through a series of menus that will help them submit

their manuscript. Authors will be able to check the progress of the review by logging on to their account. They will also be notified by e-mail when the review is complete. Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation. 2020

Peer review will involve the following steps:

1. Author submits manuscript.
2. Editorial Office checks for completeness.
3. Editor-in-Chief assigns a Topic Editor.
4. Manuscript is subject to Pre-Review (manuscript may be returned for corrections at this stage)
5. Topic Editor assigns Reviewers.
6. Reviewers submit reviews.
7. Topic Editor makes recommendation.
8. Editor-in-Chief makes final decision.
9. Where manuscript is recommended for publication, it is sent for copy-editing and is checked for formatting (manuscript may be returned for minor edits at this stage).
10. Author is informed of decision.

The manuscript and all accompanying tables, figures and supplementary information must conform to the style and formatting detailed in these instructions. Editorial Office will return improperly formatted manuscripts for correction that may cause serious delays in publication. If any data in the manuscript were previously published or are used in another manuscript presently under consideration elsewhere, describe the extent of the overlap in the cover letter and include copies of the relevant papers. Similarly, include PDF copies of related manuscripts that are ‘in press’, submitted to another journal, or that reviewers are likely to have difficulty locating.

Pre-Review

Manuscripts will be subject to a pre-review on the following criteria:

1. Does the paper fall within the scope of Coral Reefs?
2. Does the paper have the potential to make a substantial contribution to the field of research?

3. Is the subject area of potential interest to a wide readership?
4. Is the paper in the correct style and format for Coral Reefs?
5. Are the figures appropriate and well presented – is there unnecessary use of color?
6. Is the manuscript well written?
7. Authorship should be limited to those that significantly participated in the research and/or made a substantial intellectual contribution to the manuscript. In cases of a disproportionate number of authors, an explanation of coauthor specific contributions will be requested. Na excessive number of authors is not acceptable.

Either the Editor-in-Chief or a Topic Editor undertakes the pre-review assessment. A manuscript may be returned to the authors for revision or rejected without further review at this stage.

4. Revisions and Resubmissions

Requests for revision of a manuscript are common. Coral Reefs normally only allows one major revision of any submission. When submitting a revised manuscript authors must explain how they have responded to editor and reviewer comments in an accompanying cover letter. If the revision of a paper is still not acceptable the manuscript may be rejected. Rejection of a manuscript typically arises because of flaws in experimental design or methodology, or if the writing is unclear, the manuscript poorly organized, incomplete, or deviates significantly from the Coral Reefs style. In certain circumstances, the editor may invite an author to resubmit a paper for consideration as a new manuscript after further research or analyses have been undertaken. Resubmissions must represent a profound rewrite and not merely cosmetic changes.

5. Decisions

The decision to accept or reject a manuscript is made by the Editor-in-Chief. The comments and recommendations by the Topic Editors and the reviewers are carefully assessed in each case. However, authors should be aware that other considerations such as publication space and the relative importance of the work are also factors that the Editor-in-Chief will take into account. The Editor-in-Chief may also seek additional reviews and defer decision until those reviews are received. The decision by the Editor-in-Chief is final and appeals will only be considered in exceptional circumstances.

6. Manuscript Types

Reports are full length papers that should not exceed 8000 words, including Abstract, References, Acknowledgements, and Figure Legends (approximately 10-12 printed journal pages).

Reviews may be invited by the Editor-in-Chief or proposed by authors. Authors who wish to write a review must submit a proposal to the Editor-in-Chief for approval. Proposals should be limited to 1000 words, and should include the following: a provisional title a list of authors and roles, including all institutional affiliations an explanation of material to be covered and excluded a statement indicating why the review is both timely and needed; an explanation of the approach to be taken; an explanation of the overall novelty of the approach and its likely impact on practice or the field. The proposal may be sent out to experts in the field for comment before the Editor-in-Chief allows submission. The length of Reviews will normally be the same length as Reports and any deviation from those. Since a Review is intended to be an authoritative statement, a very high standard of presentation will be required both in language, style, and figures.

Notes are short papers up to 2900 words including Abstract, References, Acknowledgements, and Figure Legends (2–4 printed journal pages). They should combine the results and discussion into a single section, and have an abstract of no more than 150 words.

Perspectives are short papers that present opinions or novel interpretation of existing ideas. They may be submitted in Note format, but will be as 'Perspectives'. Headings may be chosen to suit the style of the perspective.

Comments and Responses – Coral Reefs welcomes constructive comments and criticism of papers already published in the journal, where these are in the interests of science. Such manuscripts should be structured and styled in a manner similar to a full-length paper, modified to suit the circumstances. They will be subject to the normal review process. Comments and responses concerning papers published elsewhere will not be considered, they should properly be sent to the publishing journal.

7. Cover Letter

Upon submission include a cover letter that identifies the important findings of your manuscript and the audience that you believe will find your submission most interesting. Any additional information, such as the presence of other relevant submissions and in press manuscripts, or other pertinent information should also be

discussed in the cover letter. The cover letters are provided to reviewers and material that you wish to be seen by the editors alone should be placed in “Enter Comments” field when submitting the manuscript. Cover letters for revisions or resubmissions should explain how you have addressed the editor’s and reviewers’ comments.

8. Manuscript preparation

General remarks – All manuscripts are subject to final copy editing by the publisher, after acceptance and thus any deviations from the formatting outlined below will result in publication delays.

Language - Manuscripts should be in English. If English is not your first language we suggest that the text is edited before submission, by an English speaker. Poorly drafted manuscripts will be returned immediately.

English Language Editing – For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

- Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.
- Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.
- Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts. Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted. If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.

Style – Manuscripts may be written in either first person or third person, but manuscripts must be consistent throughout.

Spelling – Coral Reefs accepts both English and American variants of spelling, but manuscripts must be consistent throughout.

Configuration and Layout

- **Format:** Word.doc or Word.docx
- **Font:** Times New Roman is preferred as this converts best to the PDF proof.

- **Line Spacing:** double space the abstract, main text, and figure legends. Single space and use hanging indents in the reference list. Single space the body of Tables.
- **Headers and Footers** should not be used in the manuscript.
- **Line and Page Numbering** – Use the Line and Page Numbering options.
- **Headings:** If you do not use the template, your main headings should be in lowercase bold letters using a large font. Use bold normal sized font for sub-headings; and further subheadings may be used as long as their order is clear (e.g., use italics or bold italics). Headings should be kept short. Do not number headings and subheadings.
- **Cite** each figure and table at the appropriate point, written as Fig. and Table, numbered consecutively as they are referenced within the text.
- **Species names** must be in italics; the genus is written in full at the first mention in the Abstract and again in the main text and the figure and table legends, and abbreviated thereafter. Where two genera names are abbreviated with the same letter and used prevalently, they should be written out in full throughout.
- **Abbreviations and Acronyms** should be defined at first mention in the Abstract, and again in the main body of the text, and thereafter use only the abbreviation. Do not use a list of abbreviations at the beginning of the manuscript. In exceptional cases abbreviations may be included as one of the Tables. Appendices: If there is more than one appendix, they should be numbered consecutively.
- **Footnotes:** In general, avoid the use of footnotes; essential footnotes to the text should be numbered consecutively and placed at the bottom of the page to which they refer.
- **Units:** Use standard SI units. Relations or concentrations (e.g., mg per l) must be given as 'mg l⁻¹' (not 'mg/l'). This applies to text, tables, and figure labels. Units of time should be expressed as s, min, h, d, yr; do not abbreviate 'week' or 'month'. Use hhmm for time of day. Do not use 'am' or 'pm', e.g., use 0900 hrs or 2300 hrs, not 9:00 AM or 11:00 PM.
- **Means and standard deviations / standard errors:** If you present results as means with either the standard deviation (SD) or standard error (SE) make it clear which you are reporting, e.g., 300 ± 20.5 cm (mean ± SD). Similarly if you are reporting a range or a confidence interval say so.

- **Date Format:** Use English date formats, i.e., 3rd March 2005; 1–3 March 2003; between 1 and 3 March 1980; 1 March to 1 April (not 1 March–1 April); March 1980 to August 1981; March – April 1991.
- **Equations:** Use the Equation Editor within Word for all equations.

9. Order of Manuscript/ Section Formats

The Word file must contain ALL of and ONLY the following sections in this order. (Information such as Author details, Abstract and Keywords, that you provide on the manuscript submission site is used as 'metadata' and should be repeated, as directed below in the manuscript file.)

Title Page – The first page should contain the following information:

- A concise and informative title. (Titles should accurately reflect the content of the paper. Coral

Reefs is a scientific publication, and 'eye catching' titles are generally inappropriate.)

- Names of the authors
- Affiliations and addresses of authors
- E-mail address and/or telephone of communicating author
- Keywords - 4 to 6 key words are required for indexing purposes.

Abstract - Reports and Reviews must be preceded by a single paragraph abstract presenting the most important results and conclusions in **no more than 300 words**.

Notes should have a short abstract of up to 150 words. Abstracts should state what was explicitly found in the study. Abstracts must not contain literature cited, or excessive data. Omit 'introductory' statements that summarize previous work and avoid statements that do not identify actual findings. Summarize, rather than advertise both the important findings and their significance.

Introduction -The Introduction should state the purpose of the investigation in the context of earlier studies. A short review of the pertinent literature is generally appropriate, not a dissertation. The Introduction should conclude with a statement of the scientific hypothesis to be tested / purpose of the study. Do not report the findings of the study in the Introduction.

Materials and methods -This section should give sufficient information for the methodology to be critically evaluated. Descriptions of the study site should appear in this section.

Results -The Results should describe the outcome of the study.

Discussion - The Discussion should explain and interpret the results in the context of other published research and may be used to present concepts or theories based upon the findings.

Do not use a 'Conclusion' or 'Summary' section.

Acknowledgements -These should be brief. Any grant that requires acknowledgement may be mentioned. The names of funding organizations should be written in full. Authors are responsible for ensuring that all persons named in the Acknowledgments section know and agree to being identified there (since it may be interpreted as endorsement of the data or conclusions).

Reference List - see below for further details

Figure Legends – see below for further details

Tables must be submitted separately from the text in a single Word.DOC file containing all of the tables. See below for further details.

10. References

Citations within the text: In the manuscript text, references should be cited by the author and year. References should be separated by semicolons, listed in year order first, followed alphabetically for references with the same year. Multiple references by the same author are separated by a comma.

Examples include (Hammer et al. 1993; Hammer 1994; Hammer and Sjöquist 1995; Jones 1995a, 1995b; Brown 2000, 2004). Please note the correct punctuation; use 'and' where there are two authors and 'et al.' for multiple authors. Do not use italics. Where a citation needs to be differentiated within the text, use 'a' or 'b': e.g., (Smith et al. 1999a, 1999b), and include the 'a' or 'b' in the Reference List.

Reference List -The list of References should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. It should be in alphabetical order. Where there are multiple papers by the same first author, the correct order is; single author papers, followed by two author papers, three author papers, etc., and by year within each group. Always show all the names of the authors in the Reference List – do not abbreviate to 'et al.'

Citations of Abstracts, or '**In preparation**', '**submitted**' or '**in review**' manuscripts are NOT acceptable; all are 'unpublished'.

Unpublished data – the citation of unpublished material or data is generally not acceptable and will be removed by the Editorial Office during the initial checks. Do not use your manuscript to include previous unpublished data unless you are willing to

subject it to full peer review. If necessary this can be done by means of ESM (see below), where the same standards of reporting and review apply. If an author considers that there are sound reasons that the manuscript should be allowed to contain unpublished material then a case must be made in the cover letter. The Editor will consider this during the pre-review.

Commercial Software -do not list normal commercial software in the Reference List; however, include unusual or specialist software that is otherwise difficult to locate.

Personal communications -should only be mentioned in the text with the initials and name of the correspondent e.g., (J Doe pers. comm.). Keep personal communications to a minimum. They are the exception rather than the rule.

Reports, Newsletters, Magazines -Do not cite articles from magazines, newsletters (e.g., Reef Encounter, Eos) or newspapers). Reports of Government and International Organizations, learned bodies, Non-Governmental Organizations are normally acceptable, but these should be readily accessible.

Theses – Ph.D. theses may be cited, but the inclusion of unpublished data from these sources will be carefully reviewed, and may not be acceptable. M.Sc. theses may only be cited if they have been subject to external examination and are readily available either on the internet on a permanent website or through Inter Library Loan. Undergraduate theses are not acceptable. Authors must give full details of the availability of any thesis in the covering letter.

11. Reference List Formats

Following acceptance, the most common delays in publication come from improperly formatted and/or missing references. Please review the following information in detail, including several examples of properly formatted references:

Correct punctuation is required in References – e.g., no spacing between authors' initials, comma between multiple authors, no stops after journal abbreviated names. Include a Digital Object Identifier (DOI) in brackets (see formatting below) **only** for manuscripts not yet published in print or where there are no page numbers

Journals - Coral Reefs uses abbreviated journal titles according to the NLM Catalog, which can be searched at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>. Where a journal is not listed the name is given in full. Do not include issue numbers in the citations unless each issue is paginated separately from the volume. Risk MJ, Sammarco PW, Edinger EN (1995) Bioerosion in Acropora across the continental shelf

of the Great Barrier Reef. *Coral Reefs* 14:79–86 Conley DJ, Schelske CL, Stoermer EF (1993) Modification of the biogeochemical cycle of silica with eutrophication. *Mar Ecol Prog Ser* 101:179-192 Goreau TJ (1977) Coral skeletal chemistry: physiological and environmental regulation of stable isotopes and trace metals in *Montastrea annularis*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 196:291315 Gooseff MN, McKnight DM, Lyons HJ, Blum RJ (2002) Weathering reactions and hyporheic exchange controls on stream water chemistry in a glacial meltwater stream in the McMurdo Dry Valleys. *Water Resour Bull* 38 [doi: 10.1029/2001WR000834]

Books, Book Chapters, and Technical Reports - Do not capitalize book titles: i.e., “Coral reef ecology” NOT “Coral Reef Ecology”. Capitals should only be used for proper names or where convention requires. You should aim to provide sufficient detail to enable a reader to locate the book/report. Each publication will have been produced in a different way so there can be no hard and fast rule.

Sorokin YI (1993) *Coral reef ecology*. Springer, Heidelberg

Bosence DWJ (1991) Coralline algae: mineralization, taxonomy, and palaeoecology. In: Riding R, Jones FR(eds) *Calcareous algae and stromatolites*. Springer, New York, pp 98–113

Food and Agriculture Organization, FAO (2001) *Global forest resource assessment 2000: Main report*. FAO Forestry paper 240, FAO, Rome

Theses and dissertations (use the term thesis)

Coppard SE (2002) Morphological and ecological differences between species of the echinoid genera. Ph.D. thesis, University of London, p 82

International Coral Reef Symposia - The International Coral Reef Symposia are treated as a special case by the journal and are shown as follows:

Steven ADL, Broadbent AD (1997) Growth and metabolic responses of *Acropora paliferata* long-term nutrient enrichment. *Proc 8th Int Coral Reef Symp* 1:867–872

Other Conference Proceedings - For conference proceedings other than the Coral Reef Symposia, please give the title of the proceedings in full. You should aim to provide sufficient detail to enable a reader to locate the proceedings. Each conference will have been published in a different way so there can be no hard and fast rule.

Lough JM (2001). Perspectives on global climate change and coral bleaching: 1997-1998 sea surface temperatures at local to global scales. *Proceedings JAMSTEC International Coral Reef. Symposium: Coral Reef Biodiversity and Health as Indicators of Environmental Change*. Science and Technology Agency, Japan Marine Science & Technology Center, Tokyo, pp 215-229

Websites -The citing of websites should be avoided because of their temporal nature. The Editorial Office will verify that websites are sufficiently permanent as part of the reference check carried out after submission. Stewart SR (2005). Tropical cyclone report: Hurricane Ivan. National Hurricane Center.

<http://www.nhc.noaa.gov/2004ivan.shtml>

Articles In Press - If a reference does not yet have page numbers, the DOI may be added in lieu of volume and page numbers (see above), or the paper should be cited as 'in press' as follows:

Authors will be expected to provide the publication details when they receive the proofs for correction from the publisher.

Simberloff D (in press) Flagships, umbrellas, and keystones: is single-species management passé in the landscape era? Biol Conserv

Automated bibliography users – an output style is available for download which can be used.

EndNote files - Please remove EndNote file codes before submission.

Authors should still check the format of both the in text cites and the Reference List as minor errors often occur.

12. Reporting Statistical Results

Significance and threshold values - A result is significant if the P value is less than a preset threshold value α . In Coral Reefs α should normally be set at 0.05 or lower. If a result is significant, the P value can be reported in the text or a table, together with the F-stat, e.g., $F_{1,24}=5.6$, $p=0.001$. It is equally acceptable to use $p<0.05$, or <0.01 etc. For non-significant P values authors should consider whether a non-significant result may have been the result of a lack of statistical power and whether this might affect the interpretation of their results. In these circumstances it is acceptable to report a P value greater than 0.05, at the same time you must report the power and explain the context of the result. In all other cases, simply report "X was not significantly different from Y".

Terminology - do not use terms such as highly and extremely significant where $p<0.01$ or 0.001 respectively, it will be for the reader to assess the relative importance of the result. Also do not use almost significant or just not significant where $p>0.05$.

13. Figures

General Remarks – Please consult the Springer Artwork page for a more detailed guide to figure formats and general information about Artwork submission:

<https://www.springer.com/gp/authors-editors/journal-author/journal-authorhelpdesk/preparation/1276#c1260>

Do not embed your figures in the manuscript.

Only **Figure Legends** should be typed at the end of the manuscript, and must be brief, self-sufficient explanations of the illustration. Always give any species name or acronyms in full where they first appear in each legend. Do not include 'results' in the legend. Be sure that symbols and the use of color are clearly explained.

Please prepare your figures very carefully; poor figures are a principal source of delay and additional work in the review and production process. Each figure will be checked by the Editorial Office before the manuscript enters the review process. Obvious errors or poor quality will be returned to the author at this stage. Manuscripts will only be accepted into review when the Editorial Office is satisfied that they are publication quality, this avoids unnecessary work for Editors and Reviewers and unnecessary delays for authors.

Color charges - Coral Reefs does not charge for color figures in either the online or printed version of the journal. However, the Editors will assess in each case whether the use of color is justified. Figures must be uploaded onto Editorial Manager each in its own file, correctly formatted.

Graphs and Line Drawings - Prepare as VECTOR format line graphics and store in EPS format (with TIF preview). Adobe Illustrator is the preferred program to create EPS files. Please do not draw with hairlines; the minimum line width is 0.2 mm (i.e., 0.567 pt) relative to the final size. Use Open Type fonts or convert fonts to paths or outlines. If a line drawing cannot be computer generated it may be captured by scanning and inserted as a bitmap into an EPS file. The scan should be composed at 800 dpi or greater relative to final size, before inserting in the EPS file. Please bear in mind that any bitmap images embedded in an EPS file cannot be edited by the journal office, or the printer. Any alterations required, however minor, will have to be returned to the author. Where possible any text, etc., should be added in vector EPS format.

Programs such as Adobe Illustrator and Corel Draw can also be used to vector trace and vector paint embedded bitmaps, but the end result will depend on the initial bitmap quality. Graphs should be prepared using a good scientific graphing program which can save/export the graph directly to an EPS file. We cannot accept scanned graphs

other than in exceptional circumstances with prior approval from the Editorial Office. Figures composed of part photograph and extensive line art (whether color or black and white) should be submitted in EPS format where the photograph will be in bitmap format (at 300dpi) and the line art/text in vector. If the figure only contains a very small amount of line art, e.g., scale bars and labels, it may be prepared as a photograph (see below). In EPS figures, the edges of lines and text should be crisp when viewed at high magnification 'onscreen'. Pixelly or fuzzy edged line art will not be suitable. Please be sure that all figure axes are labeled and include the appropriately formatted units. Text within the figure should not vary greatly in text size, e.g., subheadings, axis labels, and scales should be similarly sized.

Composite Figures

Where a figure contains several parts, these must always be presented as a single composite. Lowercase letters (a, b etc.) must be used to identify figure parts in the figure, in the manuscript text, and in the figure legend. If the composite involves both halftones (e.g., photographs) and line art (graphs or line drawings) the correct format is an EPS file with the halftone as an embedded raster (bitmap) image and the remaining line art and text mark up in VECTOR format. Vector drawing programs such as Adobe Illustrator and Corel Draw should be used to do this. Composites containing halftones with limited additions of text and markers, such as labels, arrows, and scale bars, can be prepared in image processing software (e.g., Photoshop) and submitted as TIF files.

Maps

These should be prepared as for Line Drawings. They should include a scale and a compass orientation. Latitude and Longitude should be expressed in degrees, minutes, and where necessary, seconds together with N/S and E/W. They must include some text mark up to identify important features.

Photographs

Black and White, and Color photographs should be saved in TIF format (Color as RGB 8 bits per channel, B&W as greyscale) Scan/save the image at 300dpi. Use scale bars and embedded text and annotations as required. Several figures or figure parts should be grouped in a plate on one page. Where there is extensive annotation it is better to

use an EPS format (see above) adding the mark up in VECTOR text. TIF figures are preferred at the size of one or two column widths (either 8.6 or 17.6 cm). The maximum printed page height is 23.6 cm. Authors should prepare any TIF figures at the intended final size, and view and run a test print prior to submission. If all parts of the figure can be clearly seen in the printed version this will be a good indication that the figures will be acceptable.

14. Tables

Tables must be submitted separately from the text in a single Word.DOC file containing ALL of the tables. Table legends must be included in the table file, each legend above each table to which it refers. Legends should be brief and include any species names or acronyms in full together with an explanation of any abbreviation or symbol (e.g., asterisks for significance value) used in that table. Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters. Double line space the legends and single space the table content. Care should be taken to produce well designed layouts.

15. Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

Aspect ratio: 16:9 or 4:3

Maximum file size: 25 GB

Minimum video duration: 1 sec

Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability. A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), wrl (VRML), nb (Mathematica notebook), and tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables. Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4". Name the files consecutively, e.g. "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf".

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material. Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

Support for Research Data Sharing

Many journals and funding agencies encourage or require data sharing in repositories. If you need help organising and sharing your research data (including code, text, raw and processed data, video and images) you should consider:

- Finding a suitable data repository for your data

- Uploading your data to Springer Nature Research Data Support
- Contacting Springer Nature's Research Data Support Helpdesk for advice

List of recommended data repositories

Access Research Data Support

More information on Research Data Support

Contact the Research Data Helpdesk

Research Data Support is an optional Springer Nature service available to all researchers who have datasets they want to make easier to cite, share and find. The service provides a secure portal for data upload, and data and metadata are curated and improved by professional Research Data Editors. The publication of datasets is coordinated by our Research Data Editors in consultation with the researcher, and a DOI is provided to allow the dataset to be cited and shared.

Checks are carried out as part of a submission screening process to ensure that researchers who should use a specific community-endorsed repository are advised of the best option for sharing and archiving their data. Use of Research Data Support is optional and does not imply or guarantee that a manuscript will be accepted.

16. Proofreading

Authors will be notified by e-mail once the printer's proofs are available online. Full instructions are provided at that time. The author is entitled to formal corrections only. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title, and authorship are not allowed without approval. In such circumstances please contact the Editor-in-Chief before returning the proofs to the publisher.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

18. After acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at

Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice and offprints. Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

19. Online first

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

20. Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

21. Open Choice

Open Choice allows you to publish open access in more than 1850 Springer Nature journals, making your research more visible and accessible immediately on publication. Article processing charges (APCs) vary by journal – view full list

Benefits:

- Increased researcher engagement: Open Choice enables access by anyone with an internet connection, immediately on publication.
- Higher visibility and impact: In Springer hybrid journals, OA articles are accessed 4 times more often on average, and cited 1.7 more times on average*.
- Easy compliance with funder and institutional mandates: Many funders require open access publishing, and some take compliance into account when assessing future grant applications.

It is easy to find funding to support open access – please see our funding and support pages for more information.

Within the first three years of publication. Springer Nature hybrid journal OA impact analysis,

2018.

Open Choice

Funding and Support pages

Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License. Find out more about the license agreement

22. General Journal Instructions for Authors

More information on the Springer journal general instructions for authors can be found here: <https://www.springer.com/gp/authors-editors/journal-author/journal-authorhelpdesk/preparation/1276#c1260>

23. Publishing Ethics

Researchers should conduct their research from research proposal to publication in line with best practices and codes of conduct of relevant professional bodies and/or

national and international regulatory bodies. In rare cases it is possible that ethical issues or misconduct could be encountered in your journal when research is submitted for publication. Please find more information on the below topics here:

<https://www.springer.com/gp/authors-editors/journal-author/journal-authorhelpdesk/publishing-ethics/14214>

- Ethical responsibilities of authors
- Authorship principles
- Compliance with ethical standards
- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving human participants and/or animals
- Research involving human embryos, gametes, and stem cells
- Informed consent
- Springer's guide on publishing ethics
- Appeals and complaints
- Predatory journals and references
- Interactive course

<http://www.springer.com/journal/338>

Coral Reefs

Editor-in-Chief: Morgan Pratchett

ISSN: 0722-4028 (print version)

ISSN: 1432-0975 (electronic version)

Journal no. 338

<http://www.springer.com/journal/338>

VITA

Wanderson Valente dos Santos, nascido no dia 05 de agosto de 1993, na cidade de Viçosa - MG, filho de Sinval dos Santos e Ana Elisabete Valente dos Santos. Coursou ensino fundamental e médio na Escola Estadual "Alice Loureiro", em Silvestre - Viçosa, concluindo seus estudos em 2010. Junto ao ensino médio concluiu o curso técnico em Meio Ambiente em 2010. Ingressou no curso de Ciências Biológicas com Ênfase em Biologia Animal (Licenciatura e Bacharelado), da Universidade Federal de Viçosa – MG no ano de 2013, onde estagiou nas áreas de Entomologia, PIBID, Herpetologia, Morfologia Animal e Fisiologia Aplicada a Piscicultura, concluindo a graduação em Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas em 2019. No ano de 2019, obteve aprovação no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação do Professor Leandro Cesar de Godoy, obtendo bolsa de estudos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.