



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia

2010

Harith Omar **Optimização da fragmentação e transporte do coral**
Morgadinho Farooq *Sarcophyton* sp.



Universidade de
Aveiro
2010

Departamento de Biologia

**Harith Omar
Morgadinho Farooq**

**Optimização da fragmentação e transporte do coral
Sarcophyton sp.**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Marinha, realizada sob a orientação científica do Doutor Ricardo Calado, Investigador Auxiliar do Departamento de Biologia e do CESAM, da Universidade de Aveiro, e co-orientação do Professor Doutor Amadeu Soares, Professor Catedrático do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Prof. Doutor Victor Manuel dos Santos Quintino

Professor Auxiliar, Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutor Rui Afonso Bairrão da rosa

Investigador Auxiliar, Departamento de Biologia Animal, Faculdade de Ciências,
Universidade de Lisboa

Doutor Ricardo Jorge Guerra Calado (Orientador)

Investigador Auxiliar do Departamento de Biologia e do CESAM (Centro de
Estudos do Ambiente e do Mar), Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Amadeu Mortágua Velho da Maia Soares (Co-Orientador)

Professor Catedrático do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Gostaria de agradecer em primeiro lugar à Universidade de Aveiro pela oportunidade de me albergar nesta instituição durante estes seis fantásticos anos. Um muito obrigado também ao meu orientador, o Dr. Ricardo Calado pela sua ajuda e ensinamentos quer cientificamente, quer pessoalmente e o Co-Orientador Amadeu Soares. Agradeço também ao Dr. Newton Gomes, Rui Rocha, Abel Ferreira, Tânia Pimentel, Francisco Coelho, Patrícia, Verónica e António Louvado pela enorme ajuda, e muita da qual infelizmente permanece invisível nesta dissertação. Por fim agradeço à minha Mãe, Stella Morgadinho, pelo apoio nas mais variadas formas e aos meus amigos pelo apoio moral e incondicional que tenho o prazer de desfrutar todos os dias.

palavras-chave

Recifes de coral, corais moles, sarcophyton, aquacultura, aquário, transporte de coral, fragmentação

resumo

Os recifes de coral são ecossistemas complexos e ricos em biodiversidade. Fornecem-nos os mais variados bens e serviços desde alimentação ao turismo passando pela própria protecção costeira. Estes ecossistemas estão todavia ameaçados e em constante diminuição, quer por acções antropogénicas directas quer indirectas. Portanto é necessário continuar a desfrutar dos benefícios dos recifes sem haver danificação dos mesmos. Esta necessidade leva-nos à Aquacultura, que é um campo a abranger, para diminuir e quem sabe eliminar pequenos bens que o homem retira do mar, trocando o mar pelos aquários.

Neste trabalho caracteriza-se um sistema de aquário para a manutenção de *Sarcophyton* sp. e é feita uma descrição da fragmentação e posterior transporte para se avaliar a adequabilidade dos métodos.

keywords

Coral Reefs, Soft corals, sarcophyton, aquaculture, aquarium, coral transoport, fragmentation.

abstract

Coral Reefs are rich and complex ecosystems in terms of biodiversity. They provide us with a vast amount of goods and services, from food to tourism, even in coastal protection. The ecosystems are indeed threaten and in constant decrease, both from direct and indirect antropogenic influence. So it is necessary to continue enjoying the reef benefits without damaging them. This necessity takes us to Aquaculture, which is a field to embrace, to decrease and even end some of the goods that we take from sea, exchanging the sea with the aquariums.

In this work we characterize an aquarium system to the maintenance of *Sarcophyton* sp. And it's done a description of the fragmentation and further transport to evaluate the methods adequability.

Índice

1. Introdução	3
1.1. Biologia dos Recifes	3
1.2. Distribuição geográfica dos Recifes de Coral.....	7
1.3. Importância dos recifes	8
1.4. Ameaças aos recifes de coral.....	10
1.5. Taxonomia e fisiologia	14
1.6. Corais moles	17
1.6.1. Ciclo de vida.....	20
1.6.2. Reprodução de corais.....	20
1.6.3. Farmacologia	20
1.6.4. <i>Sarcophyton</i>	21
2. Objectivos	23
3. Material e Métodos.....	23
3.1. Sistemas de aquários.....	23
3.1.1. Sistema do Aquário das Colónias Mãe (Aquário 1):	23
3.1.3. Água dos aquários	25
3.2. Classificação da Qualidade	25
3.3. Fragmentação - Clonagem.....	25
3.4. Transporte e estabulação	26
3.5. Acondicionamento para transporte	31
3.6. Extracção de DNA	33
3.7. Amplificação por Reacção da Polimerase em Cadeia (PCR)	33
4. Resultados	34
5. Discussão	35
6. Considerações finais	37
7. Bibliografia.....	38

1. Introdução

1.1. Biologia dos Recifes

Os recifes de coral são ecossistemas marinhos superficiais muito produtivos (Tabela 1) compostos por esqueletos calcários rígidos formados pelo crescimento sucessivo, depósito e consolidação de restos de corais construtores de recifes e algas coralinas (Odum and Odum 1955). As unidades básicas dos recifes são os pólipos de coral e as algas endosimbióticas que vivem no interior dos tecidos do coral. Esta relação simbiótica é um factor chave que explica a produtividade dos recifes e os requisitos ambientais estritos dos corais (Cesar 2000; Miller and Harley 2001; Krebs 2008). Os recifes de coral estão entre os habitats marinhos mais ameaçados e em conjunto com as florestas tropicais formam os ecossistemas mais ricos em biodiversidade do planeta. Os recifes são o lar de milhares de espécies de peixes, e cerca de 100.000 espécies de invertebrados já foram descritas em recifes de coral. Esta diversidade de recifes de coral tem um enorme valor intrínseco e económico. Um décimo dos peixes capturados em todo o mundo é proveniente dos recifes de coral, uma área que representa apenas 0,17% da superfície do oceano. Os recifes de coral atraem igualmente um número bastante elevado de turistas, traduzindo-se esta actividade em milhares de milhões de dólares por ano (Krebs 2008).

Ecosistema	Produtividade Primária Líquida por Unidade de Área (g/m²)
Recifes de coral	2500
Floresta tropical húmida	2200
Pantanal	2000
Floresta tropical sazonal	1600
Estuários	1500
Floresta temperada perene	1300
Floresta temperada caducifolia	1200
Savana	900
Floresta setentrional	800
Terra cultivada	650
Lagos e rios	360
Plataforma continental	250
Oceano aberto	125
Deserto extremo, rochas, areia e gelo	3

Tabela 1: Produtividade de diferentes ecossistemas, adaptado de (Krebs 2008)

Os corais juntamente com os micróbios procarióticos e as algas simbióticas formam um holobionte. A comunidade microbiana que coloniza o muco, a superfície e os tecidos de muitas espécies de corais pode ter grande importância na fisiologia e saúde do holobionte, variando a mesma com as espécies de coral, a profundidade e a sua localização geográfica (Kooperman, Ben-Dov et al. 2007).

Esta biota microbiana pode beneficiar os corais no ciclo do carbono, na fixação de azoto e fósforo, na quelação de ferro e produção de antibióticos que protegem o coral de outros micróbios (Kooperman, Ben-Dov et al. 2007; Kellogg, Lisle et al. 2009).

As zooxantelas (figura 1) são dinoflagelados fotossintéticos que fornecem aos seus hospedeiros nutrientes, e é a fotossíntese conduzida pelas zooxantelas que faz dos recifes de coral, um dos ecossistemas mais produtivos da Terra. Os corais vivem principalmente em mares tropicais quentes que normalmente são oligotróficos e que sem o auxílio dos seus endossimbiontes fotossintéticos não seriam capazes de formar grandes recifes. A maioria do carbono que as zooxantelas fixam é transmitido ao coral hospedeiro sob a forma de açúcares (Castro and Huber 2005). Os corais podem receber até 95% das emissões de carbono da fotossíntese das zooxantelas, enquanto as zooxantelas adquirem o azoto e outros nutrientes inorgânicos em produtos de excreção de coral para o seu crescimento (Burkpile and Hay 2008). A fotossíntese realizada pelas zooxantelas melhora a calcificação dos corais e aumenta as taxas de crescimento do coral, levando ao aumento de recifes em muitos mares tropicais. Assim, a estrutura física dos corais fornece heterogeneidade e complexidade de habitats, facilitando a coexistência de diversas plantas e animais (Burkpile and Hay 2008).

Apesar de se ter assumido inicialmente que existia uma única espécie de zooxantelas, evidências moleculares recentes demonstram que há pelo menos sete estirpes distintas (referidas na literatura como *clades* A-G). Muitos corais hospedam diferentes tipos de estirpes de zooxantelas. As diferentes estirpes de zooxantelas diferem na sua capacidade fotossintética, tolerância à luz, temperatura e outros factores de stress, tornando-se diferencialmente úteis para os seus hospedeiros, sob condições ambientais variáveis. Quando os corais estão expostos a um factor promotor de stress, tais como o aumento da intensidade luminosa ou temperatura, muitas vezes expõem as suas zooxantelas. Este processo de branqueamento conhecido como *bleaching* pode permitir que os corais possam adquirir novas estirpes de zooxantelas que se adaptem melhor a novas condições ambientais. No entanto, os corais que não conseguem readquirir zooxantelas após o branqueamento podem não recuperar do stress fisiológico causado e eventualmente acabar por morrer. Tal alteração na simbiose coral-zooxantela pode permitir que os corais tenham uma maior flexibilidade na adaptação às mudanças climáticas globais, sendo estas uma grande ameaça para a saúde dos recifes de coral e para a integridade da simbiose coral-zooxantela (Burkpile and Hay 2008). Se as temperaturas da superfície do mar se elevarem acima dos 30 ° C, os pólipos expulsam as algas simbióticas que fornecem nutrientes essenciais. A coloração rica dos corais dá lugar a uma aparência branqueada (Figura 3), e se a temperatura do mar não cair abaixo de 30 ° C dentro de aproximadamente três dias, os corais morrem e a organização das comunidades dos recifes de coral muda radicalmente. Com o aumento da temperatura global, as comunidades dos recifes de coral aproximam-se de um limite precário de mudança, apesar de resistente à mudança, a resistência é limitada à faixa de temperatura da superfície do mar de 24-30 °C (Miller and Harley 2001).

O branqueamento e a sua subsequente mortalidade pode resultar em sérios impactos socioeconómicos, particularmente para os países em que a sua economia está intensamente dependente da oferta gerada pelo turismo e pescas baseados nos recifes.

As áreas mais fortemente atingidas foram os recifes de Coral do Sri Lanka e das Maldivas no Sul da Ásia à linha costeira da África Oriental (Cesar 2000).

Esta reacção de branqueamento de um recife de coral, se for resultado de uma perturbação local, pode ser revertida muito rapidamente. No entanto perturbações em grande escala, podem resultar na morte de grandes extensões de recifes de corais, que requerem milhares de anos para se recuperar. Nos últimos anos, o branqueamento maciço tem sido relatado em águas tropicais do Oceano Atlântico, Caraíbas, Pacífico e Índico. Os recifes exigem água limpa, constantemente quente, e relativamente rasas para suportar o crescimento de zooxantelas, que sustentam os corais anthozoa (Krebs 2008).

Embora os corais poderem readquirir os simbiossomas e recuperar em semanas ou meses, os corais recuperados crescem mais lentamente e apresentam menores índices de fecundidade comparativamente a corais que nunca experimentaram branqueamento, atribuindo aos corais resistentes ao branqueamento uma vantagem ecológica a eventos de branqueamento. Em casos graves, quando a mortalidade por branqueamento de corais se aproxima dos 100%, o branqueamento pode ocorrer na escala de centenas de milhares de quilómetros e alterar radicalmente a cobertura de coral e composição. O branqueamento não só diminui a cobertura de corais vivos, como também proporciona grandes áreas para a colonização de algas, e estas algas podem impedir os corais de se restabelecerem, se não houverem herbívoros presentes suficientes para conter a colonização e crescimento das algas. Além disso, o branqueamento em grande escala e mortalidade dos corais pode suprimir populações de peixes que são dependentes dos corais vivos para abrigo e alimentação.

As análises de branqueamento de corais nos recifes das Caraíbas nas duas últimas décadas sugerem que pequenos aumentos na temperatura da superfície do mar na ordem dos 0,1 °C resultam em grandes aumentos de extensão geográfica e intensidade de eventos de branqueamento. E sabendo através de modelos de mudanças climáticas de um aumento nas temperaturas da superfície do mar de 1-3 °C ao longo dos próximos 5-10 anos, o branqueamento dos corais pode tornar-se um stress intenso e anual sobre os recifes de coral por todo o Mundo. Apesar de os corais poderem adaptar-se e os seus limiares de branqueamento poderem aumentar ao longo do tempo, com o aumento das temperaturas da superfície do mar, a ameaça de eventos de branqueamento repetidos e intensos ao longo das próximas décadas constitui uma preocupação significativa. Se até mesmo as previsões mais conservativas dos modelos de mudanças climáticas globais se realizarem, estas mudanças

podem resultar na reorganização fundamental da ecologia dos recifes de coral (Burkepile and Hay 2008).

As alterações nos níveis de nutrientes e salinidade, marés baixas e aumento da radiação UV podem causar também branqueamento (Figura 3). Os corais podem recuperar, mas estarão enfraquecidos pelo incidente. A morte, se ocorrer, pode ser largamente atribuída à fome, embora se pense que exista autólise (destruição dos tecidos). Os mecanismos fisiológicos envolvidos com o branqueamento não são completamente compreendidos e são actualmente uma fonte de investigação. É hipótese de que as algas são expelidas para abrir caminho para o potencial de repovoamento dos corais por algas mais resistentes ao stress.

Este tipo de simbiose animal-zooxantela pode igualmente ser encontrado em anémonas, amêijoas gigantes e outros invertebrados marinhos (Castro and Huber 2005).

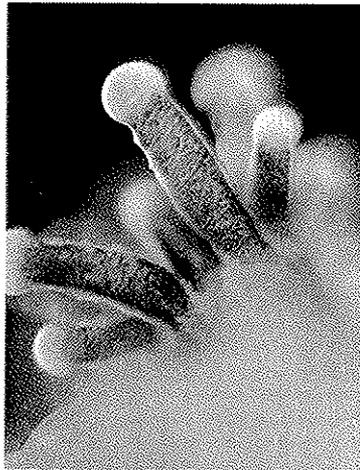


Figura 1: Vista de zooxantelas castanhas-douradas microscópicas nos tentáculos de um pólipó (Castro and Huber 2005)

1.2. Distribuição geográfica dos Recifes de Coral

Em geral, os recifes de coral são abundantes nas áreas com zonas costeiras rasas e águas límpidas e quentes onde a descarga fluvial de sedimentos é baixa. Os grandes recifes de coral são raramente encontrados em áreas do oceano acima de 29° de latitude onde as temperaturas caem abaixo dos 18 °C por períodos prolongados, pois tais condições retardam o crescimento de corais e a sua capacidade de construir grandes recifes. No entanto, os corais que possuem zooxantelas podem ser encontrados em áreas com temperaturas de água tão baixas como 11 °C (figura 2). As algas são mais

abundantes em áreas temperadas, o que faz com que nestas zonas estas possam ocupar de forma mais eficiente os habitats que possam estar disponíveis para os corais. A combinação de águas frias e a concorrência mais intensa por parte das algas interagem, provavelmente, para limitar latitudinalmente os recifes de coral.

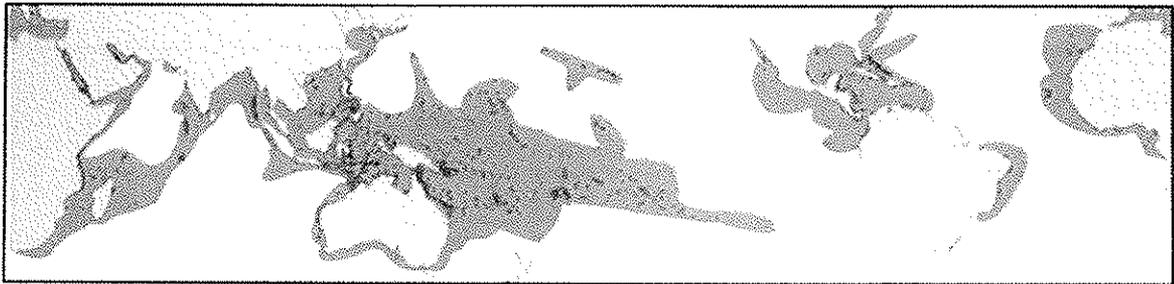


Figura 2: Distribuição Mundial de recifes de coral (Krebs 2008)

Os recifes de coral (pontos vermelhos) cobrem cerca de 250 000km² da superfície da Terra, mas corais com zooxantela habitam uma zona muito mais abrangente (sombra azul).

1.3.Importância dos recifes

Os recifes de coral têm importantes funções no ecossistema, fornecem bens e serviços cruciais a milhões de pessoas. Os bens e serviços formam uma importante fonte de rendimento a populações locais (pesca, aquacultura) que vivem com baixos níveis de subsistência (McManus, Nanola et al. 1992).

Os motivos ecológicos, estéticos e económicos para preservar os recifes de coral são portanto inegáveis (Krebs 2008).

Para os ecologistas modernos, os recifes podem servir como um modelo de ecossistema para o desenvolvimento de hipóteses básicas sobre a ecologia e evolução da estrutura populacional, de organização da comunidade, e sobre como a diversidade das espécies evolui e é mantida.

Além disso, os recifes dão-nos um vislumbre da história da Terra através dos esqueletos dos corais duros fossilizados fornecendo um longo registo histórico de mudanças na distribuição dos corais, na sua abundância, fornecem informação sobre eventos climáticos passados e também alterações de temperatura e nível médio da água do mar.(Burkepile and Hay 2008).

Os recifes fornecem ao Homem dos mais variados bens e serviços. De entre os bens fornecidos pelos recifes de coral podem destacar-se os peixes, as algas e invertebrados, assim como recursos geológicos não renováveis obtidos com a mineração dos recifes para obter areia ou pedra calcária (tabela 2). Relativamente aos serviços, destaca-se a protecção natural contra ondas e erosão, os serviços bióticos, quer dentro ecossistemas (manutenção do habitat) quer entre ecossistemas (suporte biológico por ligações móveis), serviços biogeoquímicos, como a fixação de azoto, serviços de informação (informação histórica do clima) e finalmente serviços sociais e culturais como o turismo e a geração de rendimentos locais por exportação (tabela 2) (Moberg and Folke 1999; Brander, Van Beukering et al. 2007)

Tabela 2: Bens e serviços dos Recifes de Coral (Moberg and Folke 1999)

Bens	Serviços Ecológicos						
	Recursos Renováveis	Mineração de Recifes	Serviços de Estrutura Física	Serviços Bióticos (dentro do Ecossistema)	Serviços Bióticos (entre Ecossistemas)	Serviços Biogeoquímicos	Serviços de Informação
Manisco	Blocos de Coral, cascalho arca para a construção	Protecção da Costa	Manutenção de Habitats	Suporte biológico através de redes biológicas	Fixação de Azoto	Monitorização e registo da poluição	Recreação
Materia-prima e compostos bioactivos	Materiais para a produção de calcário e cimento	Acumulação de terra	Manutenção da biodiversidade e uma 'biblioteca' genética	Exportação de produtos orgânicos para cadeias alimentares pelágicas	Controlo de Dióxido de Carbono e Cálcio	Controlo do Clima	Valores estéticos e inspiração artística
Outras materias-primas (ex. algas)	Óleo Mineral e gas	Promove o crescimento de mangais e saiações	Regulação dos processos e funções do ecossistema		Assimilação de lixo		Sustento das comunidades
Jóias e "Souvenirs"		Geração de areia de coral	Manutenção Biológica da resiliência				Suporte de valores culturais, religiosos e espirituais
Peixes vivos e corais para o comércio da Aquacultura							

1.4. Ameaças aos recifes de coral

Hoje em dia, os recifes de coral estão em rápida diminuição em muitos locais do mundo devido a práticas de pesca destrutivas, mineração do coral, poluição marinha, sedimentação... Adicionalmente, o branqueamento de corais a uma escala global tornou-se recentemente numa das mais sérias ameaças (Cesar 2000).

Os distúrbios nos recifes de coral podem ser devastadores, pois os recifes crescem muito lentamente. Normalmente, os recifes apresentam cor viva, enquanto um recife perturbado torna-se branco como resultado da morte das zooxantelas nos pólipos (Krebs 2008).

Cerca de 93% de todos os recifes no mundo, entre os ecossistemas mais ricos em comunidades de espécies aquáticas, já foram danificados por actividades humanas, à actual taxa de destruição, 40-50% dos recifes, que abrigam um terço das espécies conhecidas de peixes marinhos, pode ser perdida nos próximos 30-40 anos (Campbell and Reece 2005)

As principais ameaças para os recifes de coral têm origem em causas antropogénicas, algumas delas resultando da acção directa do Homem nos recifes de coral.

O Homem danifica os recifes através de práticas de pesca destrutiva e não-sustentável como a pesca com veneno, pesca por explosão e a pesca de “muro-ami” (onde os corais são stressados mecanicamente para espantar os peixes). O excesso de sedimentação impede as algas simbióticas de obterem luz solar e os pólipos dos corais de capturem o plâncton, limitando assim fontes primárias de nutrição dos corais. Por outro lado, o excesso de poluição causa um aumento nos níveis de azoto que ao acelerar o crescimento de algas pode eventualmente contribuir para que os corais “sufoquem” (figura 3). A mineração e dragagem também prejudicam os recifes através da exploração e destruição de grande parte da sua estrutura. Por fim o Homem através de práticas de turismo descontroladas acaba por colocar os recifes em risco, quer de forma directa (ex. destruição de recifes para construção hoteleira), quer de forma indirecta (ex. poluição através de efluentes urbanos) (McManus, Cleto L . Nañola et al. 1992; Cesar 2000; Miller and Harley 2001; Purves, Sadava et al. 2004; Burkepile and Hay 2008).

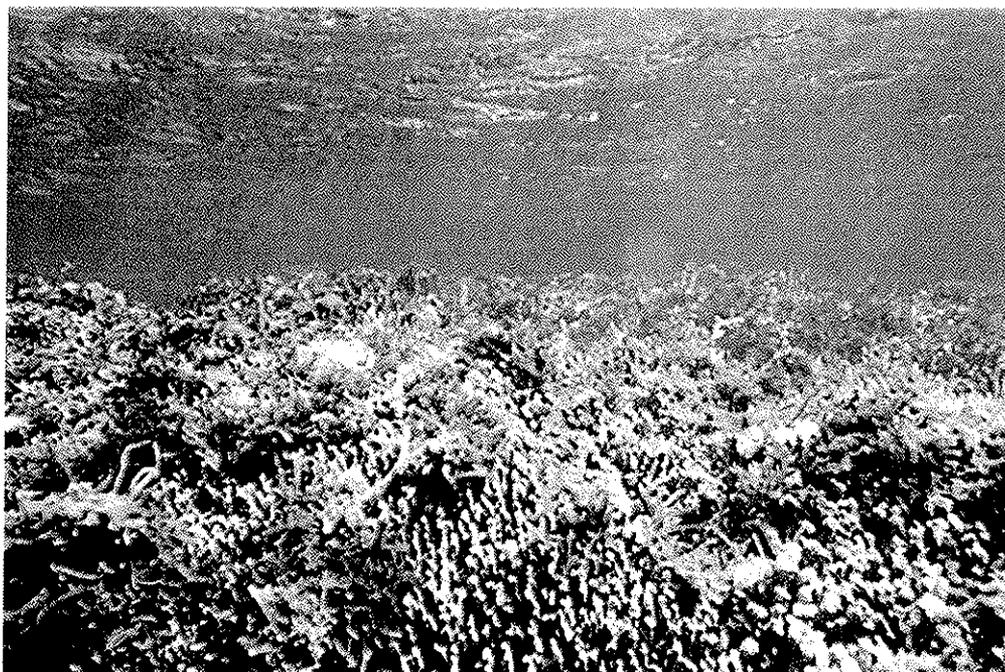


Figura 3: Vista da alga vermelha *Kappaphycus striatum*, fora de controle, crescendo sobre o recife e sufocando os corais (Miller and Harley 2001)

. Em resultado do aquecimento global, o aumento da temperatura da água, a alteração do nível do mar e o aumento da frequência de tempestades tropicais tem o potencial de danificar os recifes, alterando as condições ambientais favoráveis para a sobrevivência e crescimento dos mesmos (Krebs 2008).

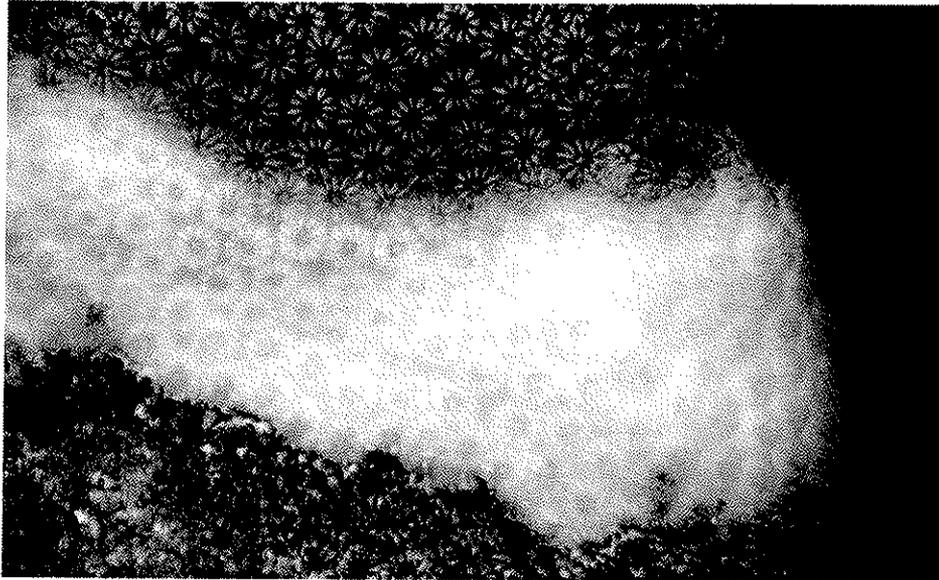


Figura 4: Coral a sofrer de branqueamento (Miller and Harley 2001)

Os corais sob stress sofrem muitas vezes de infecções bacterianas, devido à produção excessiva de muco protector. A produção excessiva de muco resultante de acções antropogénicas (por exemplo, aumento de sedimentação, produtos químicos tóxicos) pode também aumentar o número de algas verdes-azuis que se pensa ser responsável pela doença de banda negra (figura 5). Os pólipos de coral são mortos com o avanço da banda negra deixando apenas para trás o esqueleto de calcário branco do coral.

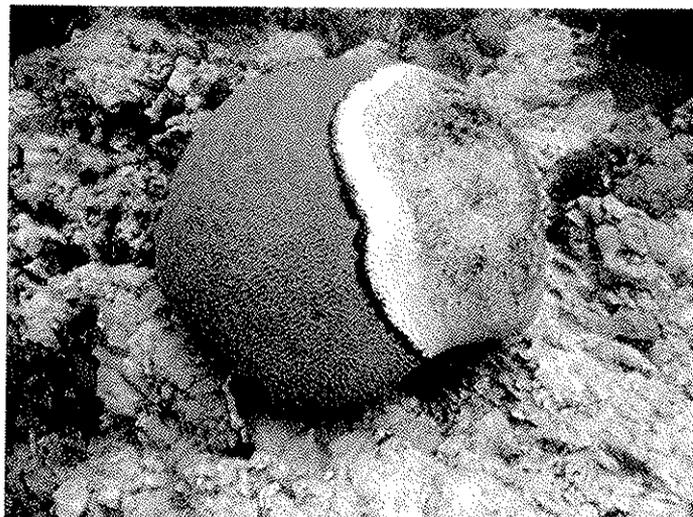


Figura 5: Doença da banda negra em um coral <http://www.climateshifts.org/?p=1727>

Um outro exemplo dos danos colaterais por parte do Homem nos recifes é o aumento recente nas populações da estrela-do-mar coroa de espinhos (figura 6) através da colheita do seu predador natural, o “Triton Trumpet” (figura 7), e através da libertação de nutrientes provenientes de efluentes. Este equinoderme é um predador voraz de corais duros e quando presentes em grande número estes animais são capazes de devastar grandes áreas de corais. A recuperação dos corais a partir desses focos pode levar 20 a 40 anos, isto quando os danos não são graves. No entanto, a recuperação em algumas partes do mundo nunca poderá acontecer pois os corais duros encontram-se recobertos de algas e de outras espécies de corais moles. Estes equinodermes podem gerar milhões de descendentes em apenas um ano de vida e ao terem ao seu dispor mais aliemento (e.g. microalgas) durante as suas fases larvares adquirem uma maior probabilidade de sobrevivência (Krebs 2008).

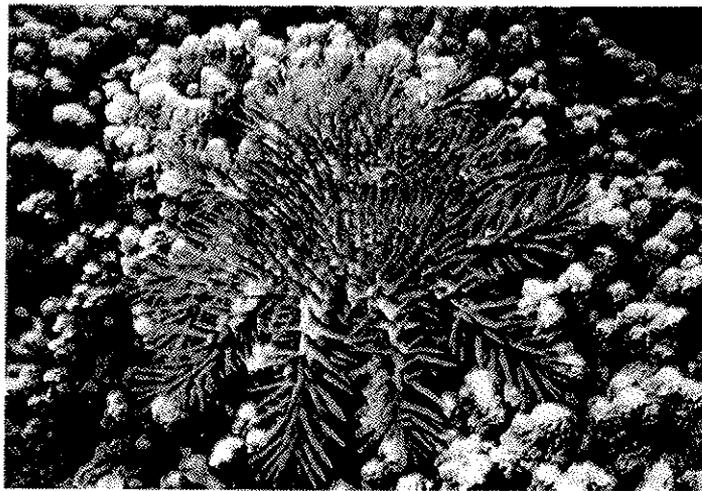


Figura 6: Vista de cima de uma estrela-do-mar coroa de espinhos (*Acanthaster planci*) (Castro and Huber 2005)



Figura 7: Vista lateral do Gastrópode “Atlantic Triton's Trumpet” *Charonia variegata*
<http://reefguide.org/carib/atlantictritonstrumpet.html>

1.5. Taxonomia e fisiologia

A taxonomia de organismos vivos segue um esquema de classificação conhecido como nomenclatura científica e que agrupa organismos vivos tendo por base características partilhadas.

Os taxonomistas de corais examinam a estrutura do esqueleto de coral para agrupar os corais por família, género e espécie, usando material quer de corais vivos quer de fósseis de exemplares extintos. As características esqueléticas dos corais duros variam entre indivíduos da mesma espécie de diferentes regiões no mundo, ou de diferentes locais no recife.

Os taxonomistas de corais devem familiarizar-se com as gamas de variação morfológica de uma espécie para serem capazes de distinguir o que define espécies diferentes de variedades da mesma espécie (Delbeek and Sprung 1994).

A estrutura das partes do pólipos vivo e o seu esqueleto ajudam-nos a distinguir espécies, e a compreender as relações entre os géneros e famílias. Porém algumas espécies de coral quando vivas são bastante semelhantes entre si, ou apresentam uma grande variabilidade morfológica como resultado de diferentes factores ambientais (Delbeek and Sprung 1994)

Os corais pertencem ao filo Cnidaria, ou seja, têm cnidócitos, cavidade gastrovascular e simetria radial (Figura 8). O filo Cnidária é um conjunto altamente diversificado, que inclui também as

medusas, anêmonas, hidróides e gorgônias. Actualmente existem cerca de 11 000 espécies de cnidários (Brusca and Brusca 2003).

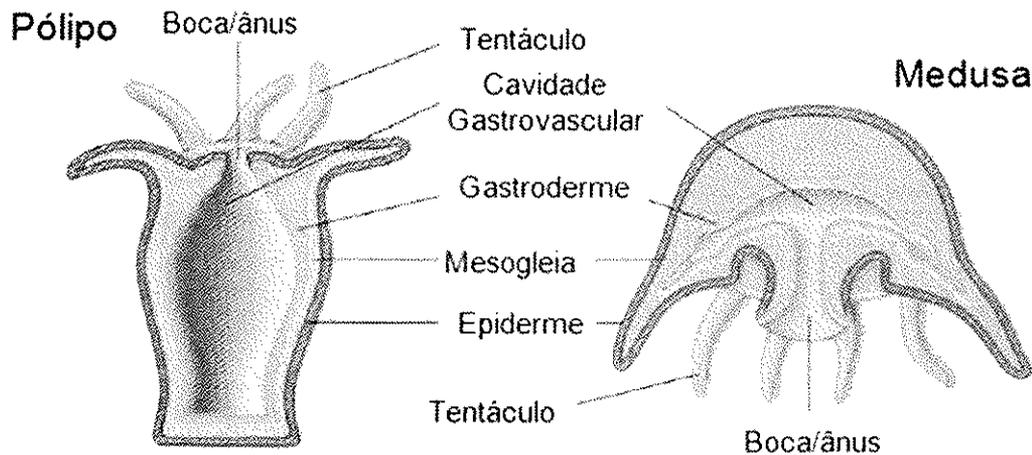


Figura 8:Esquema da estrutura básica dos cnidários (Campbell and Reece 2005)

Diferem acentuadamente das esponjas na organização, apresentam simetria radial e têm tecidos bem definidos ao contrário das esponjas que não apresentam uma simetria bem definida, embora ambos não tenham evoluído órgãos verdadeiros. Esta presença de tecidos diferenciados permitiu aos cnidários adquirir funções mais complexas que as esponjas. Os cnidários não apresentam vasos sanguíneos, sistema respiratório, ou órgãos excretores, porém apresentam vantagens na alimentação, as esponjas digerem o alimento em células individuais enquanto os cnidários digerem o alimento em uma cavidade, a cavidade gastrovascular, uma outra característica dos cnidários em relação às esponjas é de poderem sentir e responder ao ambiente (Castro and Huber 2005).

Existem seis classes de cnidários (Figura 9): Hydrozoa (hidrozoários), Scyphozoa (medusas), Cubozoa (água-viva). Staurozoa, Polypodiozoa e por fim a classe Anthozoa (figura 4) (anêmonas e corais) (Castro and Huber 2005).

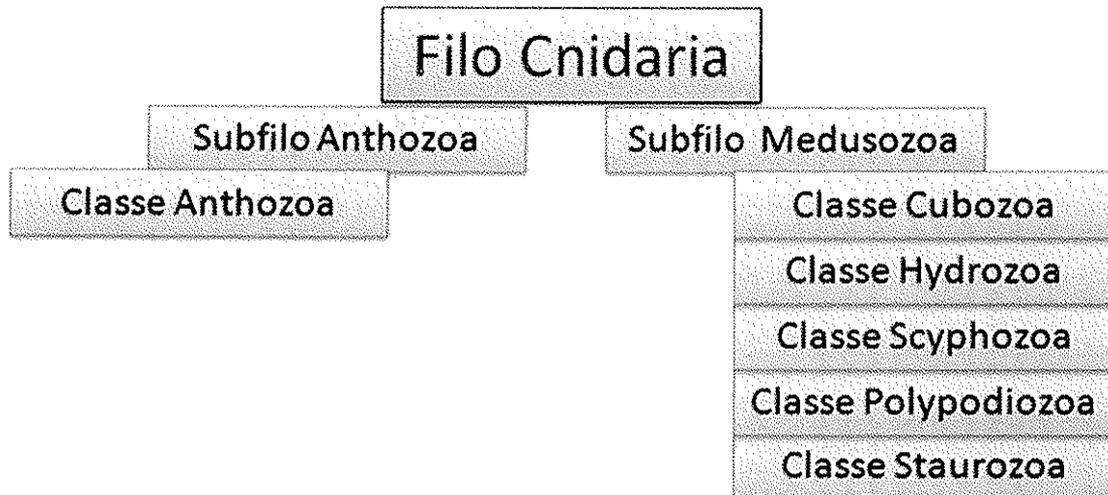


Figura 9: Representação esquemática das classes dos cnidários

Os corais moles pertencem à subclasse Alcyonaria (figura 5) e são também chamados de octocorais, também conhecida por Octorallia pois apresentam pólipos com oito tentáculos ocos, marginais e pinados, assim como 8 mesentérios completos (perfeitos) (figura 4) (Castro and Huber 2005). Os corais moles estão actualmente classificados na ordem Alcyonacea (figura 11), estando os diferentes géneros distribuídos por um total de 9 famílias.

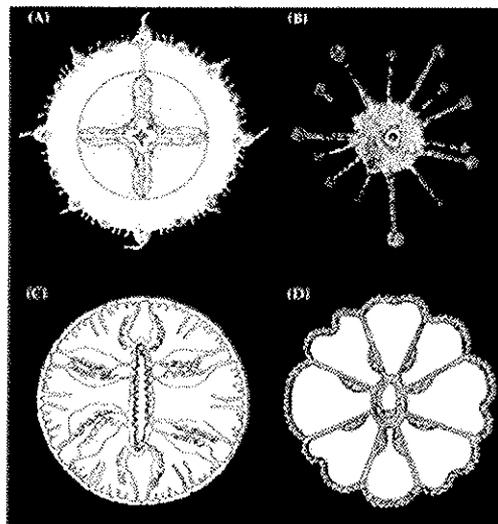


Figura 10: Diferentes Simetrias radiais entre cnidários

- (A) simetria Quadriradial de Hydromedusa.
- (B) a simetria radial de um pólipo hidrozoário.
- (C) simetria Biradial de um pólipo actiniaria (anémone-do-mar)
- (D) a simetria Biradial de um pólipo octocoral (Anthozoa)

1.6. Corais moles

Os Corais moles são colónias de animais pequenos conhecidos como cnidários poliplóides. Estes pólipos raramente excedem 5mm em diâmetro e estão arranjados em colónias moles, carnudas e irregularmente formadas com mais de 1 metro de tamanho. Os pólipos estão incorporados em conjunto, como uma colónia numa massa de tecido chamado mesogleia, que é alimentada e mantido a partir da cavidade gastrovascular dos pólipos, e protegidos por uma pele protectora. A colónia cresce por bipartição assexual e conseqüentemente formação de mesogleia à volta do novo pólipos. Apresentam órgãos especiais chamados amebócitos, que segregam espículas de carbonato de cálcio na mesogleia, que fornece rigidez e suporte à colónia. As espículas diferem em tamanho e forma entre géneros e são usadas para identificar diferentes espécies de corais moles (Ellis and Sharron 1999; Castro and Huber 2005).

Os corais moles no oceano alimentam-se através da captura de presas com os seus nematocistos, umas células com uma espécie de arpão presentes nos seus tentáculos, que imobilizam o plâncton microscópico e o transferem para a cavidade corporal para a digestão. Todavia, muitos corais moles de águas superficiais que estão proeminentes no recife também apresentam algas simbióticas chamadas de zooxantelas. Estas zooxantelas vivem na mesogleia dos corais moles e usam a fotossíntese para produzir açúcares, ácidos gordos e aminoácidos que ajudam a alimentar a colónia. Em contrapartida a zooxantela recebe protecção e nutrientes, tais como o azoto e dióxido de carbono dos pólipos. As espécies com zooxantela obtêm muita da sua energia através da fotossíntese, e podem ficar sem alimento se os dinoflagelados morrerem ou se a sua fonte luminosa for bloqueada, por longos períodos de tempo.

Classe Anthozoa	
Subclasse Alcyonaria	Subclasse Zoantharia
Ordem Helioporacea	Ordem Hexanthiniaria (extinto)
Ordem Stolonifera	Ordem Kilbuchophyllida (extinto)
Ordem Alcyonacea (corais moles)	Ordem Antipatharia
Ordem Gorgonacea	Ordem Ceriantharia
Ordem Pennatulacea	Ordem Zoanthidea
	Ordem Ptychodactiaria
	Ordem Actiniaria
	Ordem Cothoniida (extinto)
	Ordem Tabulata (extinto)
	Ordem Rugosa (extinto)
	Ordem Scleractinia
	Ordem Heliolitida (extinto)
	Ordem Cystiphyllida (extinto)
	Ordem Heterocorallia (extinto)

Figura 11: Representação esquemática da classe Anthozoa

Como todos os cnidários, os corais moles possuem um corpo em forma de saco e simetria radial. Apresentam uma cavidade gastrovascular (figura 8), o que significa que têm uma abertura até à cavidade digestiva que serve quer como boca quer como ânus. Passam quase as suas vidas todas num estágio de pólipos, não apresentando o estágio de medusa. Apesar de serem animais relativamente simples, os corais apresentam um sistema muscular e nervoso, que toma a forma de uma rede não centralizada

Os corais moles não apresentam esqueletos rígidos de carbonato de cálcio como os corais duros, em contrapartida são constituídos quase exclusivamente de tecido vivo e a maioria são suportados por esqueletos hidrostáticos. Isto ajuda as colónias a responder rapidamente a ondas fortes ou a correntes, pela eliminação do excesso de água e consequente diminuição de tamanho. As espécies maiores, podem apresentar espículas que ajudam no suporte de colónias massivas.

Os corais moles obtêm energia de variadas fontes, a maioria são filtradores pois os pólipos individuais são pequenos demais para apanhar presas maiores como as anémonas e medusas o fazem. Muitos alimentam-se de plâncton e de larvas de outros invertebrados.

Devido à forma corporal simples, os corais moles executam muitas das suas funções vitais por difusão, como por exemplo trocas gasosas e excreções de azoto em forma de amónia, são difundidas através da parede corporal. Pois tal como todos os cnidários, os corais moles não apresentam nenhum órgão especializado em trocas gasosas e excreção.

Apresentam uma base lisa, sem pólipos, e por cima, assenta uma coroa que alberga a zooxantela e pólipos dando à colónia um aspecto de cogumelo. A coroa pode ser lobada ou ondulada para aumentar a superfície de contacto, principalmente em espécies maiores (Ellis and Sharron 1999).

Os corais moles são também importantes competidores por espaço nos recifes, e em alguns lugares constituem quase metade do tecido vivo do recife de coral. Ao não apresentarem um esqueleto calcário os corais moles podem crescer mais rápido do que os corais duros. Alguns corais moles contêm afiadas agulhas de carbonato de cálcio, ou espículas que desincentivam a predação. Muitos deles contêm também vários compostos químicos que são tóxicos ou pelo menos pouco agradáveis aos predadores. Por causa destes mecanismos de defesa, apenas alguns predadores especializados se alimentam de corais moles. Estes químicos defensivos podem também ser lançados na água, onde matam corais duros que se “aproximam” demasiado (Castro and Huber 2005).

1.6.1. Ciclo de vida

Os corais moles começam a sua vida na forma de pequenas larvas que nadam livremente na coluna de água, chamadas plânulas. As plânulas geralmente circulam num estado planctónico por vários dias até encontrar um substrato aceitável. Esta característica permite aos corais moles espalhar-se e colonizar outros recifes em outras partes do mundo se forem apanhadas por correntes oceânicas.

A principal característica que classifica um substrato como aceitável para um coral mole é a quantidade de luz que recebe, apesar de a temperatura da água e força da corrente serem também factores importantes.

Os substratos duros e sólidos são geralmente preferidos em relação à areia e cascalho. Depois da plânula assentar num substrato aceitável, sofre uma metamorfose, e transforma-se num pólipó com os 8 tentáculos característicos dos corais moles. Esta é também a altura do ciclo de vida no qual a maioria dos corais moles adquire as suas algas simbióticas. De um modo geral, essas algas simbióticas entram nos tecidos dos pólipos provenientes do meio circundante.

1.6.2. Reprodução de corais

Os corais são animais extremamente adaptáveis, existem em todas as formas e tamanhos e têm várias formas de se alimentarem. Não deverá ser surpresa então que também apresentem mais de uma forma de reprodução.

De certa forma, o crescimento e reprodução são a mesma coisa em corais. A colónia de corais cresce quando os pólipos se reproduzem. O processo atravessa a fina linha entre crescimento e reprodução quando um pedaço de coral se parte, se separa da colónia mãe e continua a crescer. É agora uma nova colónia, apesar de ser geneticamente idêntica à colónia mãe.

Algumas espécies de coral dependem fortemente deste tipo de reprodução assexuada e podem mesmo estar adaptados a partirem-se facilmente. Após um recife ser severamente danificado por uma tempestade, uma parte importante da sua recuperação é o crescimento dos pedaços das colónias de coral que foram partidos.

1.6.3. Farmacologia

Um outro aspecto da biologia dos corais moles é o facto de quase não apresentarem parasitas. Os corais alcionáceos produzem terpenóides e outros químicos tóxicos que evitam uma grande

quantidade de espécies de microrganismos de viverem na sua superfície. Estes químicos apresentam também a vantagem de eliminar organismos sésseis vizinhos que possam a vir a bloquear a luz solar.

Os corais moles não têm uma defesa física efectiva, mas em contrapartida apresentam armas químicas, o que os tornam um alvo primário na exploração de compostos bioactivos devido ao seu potencial para fornecer moléculas de uso em farmacologia como agentes anti-incrustantes (Coll 1992).

Outros exemplos de novos químicos com potencial farmacêutico, encontrados nos corais moles são o sarcophytolide (Badria, Guirguis et al. 1998), alguns esteróis (Fleury, Lages et al. 2008; Sarma, Krishna et al. 2009) e terpenóides (Cheng, Huang et al. 2009), etc.

Os potenciais benefícios da farmacologia marinha ainda estão para ser revelados, mas já foram identificados e caracterizados diversos novos produtos naturais isolados a partir de bactérias, algas e invertebrados bentónicos, tais como corais moles, esponjas e anémonas. Os organismos marinhos podem conter vários compostos que podem dar origem a novos fármacos, nomeadamente devido às condições ambientais exclusivas encontradas nos seus habitats. Estas condições ao longo da sua história evolutiva levaram à síntese de compostos químicos exclusivos.

1.6.4. *Sarcophyton*

O género *Sarcophyton* é extremamente abundante no Pacífico tropical, no Oceano Índico e no Mar Vermelho, ocorrendo muitas vezes em áreas de elevado hidrodinamismo e poças de maré, assim como em águas mais profundas. Como quase todos os corais moles cultivados, o género *Sarcophyton* possui zooxantelas e geralmente apresenta uma coloração bege, verde azeitona, castanho ou amarelo claro. As espécies do género *Sarcophyton* têm uma base lisa sem pólipos que é coberta por uma coroa que alberga a zooxantela e pólipos, dando à colónia a impressão de um cogumelo largo. A coroa pode ser lobada ou ondulada para aumentar a área de superfície, especialmente em espécies maiores. O tamanho, forma e a cor do pólipos podem variar drasticamente entre espécies de *Sarcophyton* tornando-os adições atractivas para aquários marinhos (Ellis and Sharron 1999).

O *Sarcophyton glaucum* é um dos corais mais estudados, está entre as espécies de corais mais abundantes em muitos recifes e tende a formar grandes "tapetes" monoespecíficos (figura 12) de vários metros quadrados (Bishara, Rudi et al. 2007; Ainsworth and Hoegh-Guldberg 2009).



Figura 12: Vista de uma planície de corais moles na Nova Guiné (Castro and Huber 2005)

2. Objectivos

O objectivo do presente trabalho foi testar a adequabilidade de um método de propagação assexuada por fragmentação e diferentes tempos de transporte de fragmentos de coral do género *Sarcophyton* e elaborar uma comparação molecular dos resultados.

3. Material e Métodos

Para realizar esta experiência foram usados 2 aquários, um onde se encontrava estabelecida a colónia mãe ou aquário 1, e o segundo aquário que é o aquário de recepção de fragmentos ou aquário 2.

3.1. Sistemas de aquários

3.1.1. Sistema do Aquário das Colónias Mãe (Aquário 1):

Para o sistema das colónias mãe (figura 13) foi utilizado 1 aquário de vidro de 90 L (0.6 m * 0.6 m * 0.3 m) conectados em paralelo a um tanque de filtro de 150L equipado com um espumador de proteínas (APF600 Deltec®, Germany), um filtro biológico, duas resistências termóstato (Eheim Jäger® 300W, Germany), um reactor de hidróxido de cálcio (KM500 Deltec®, Germany) conectado a um osmoregulador associado a um depósito de 80L de água de osmose para reposição da água evaporada do sistema e uma bomba de retorno (EHEIM 1260, Germany) fornecendo um fluxo de aproximadamente 2400L.h⁻¹. O aquário estava equipado com 3 bombas de recirculação (Turbelle nannostream- 6025 Tunze®, Germany), que fornecia aproximadamente um fluxo de água de 2500 L h⁻¹. O aquário estava iluminado com projector de HQI com uma lâmpada metálica de 150W com uma temperatura de 10.000 K (Sylvania®, Germany).

O regime de luz foi de 12h luz : 12h escuro.

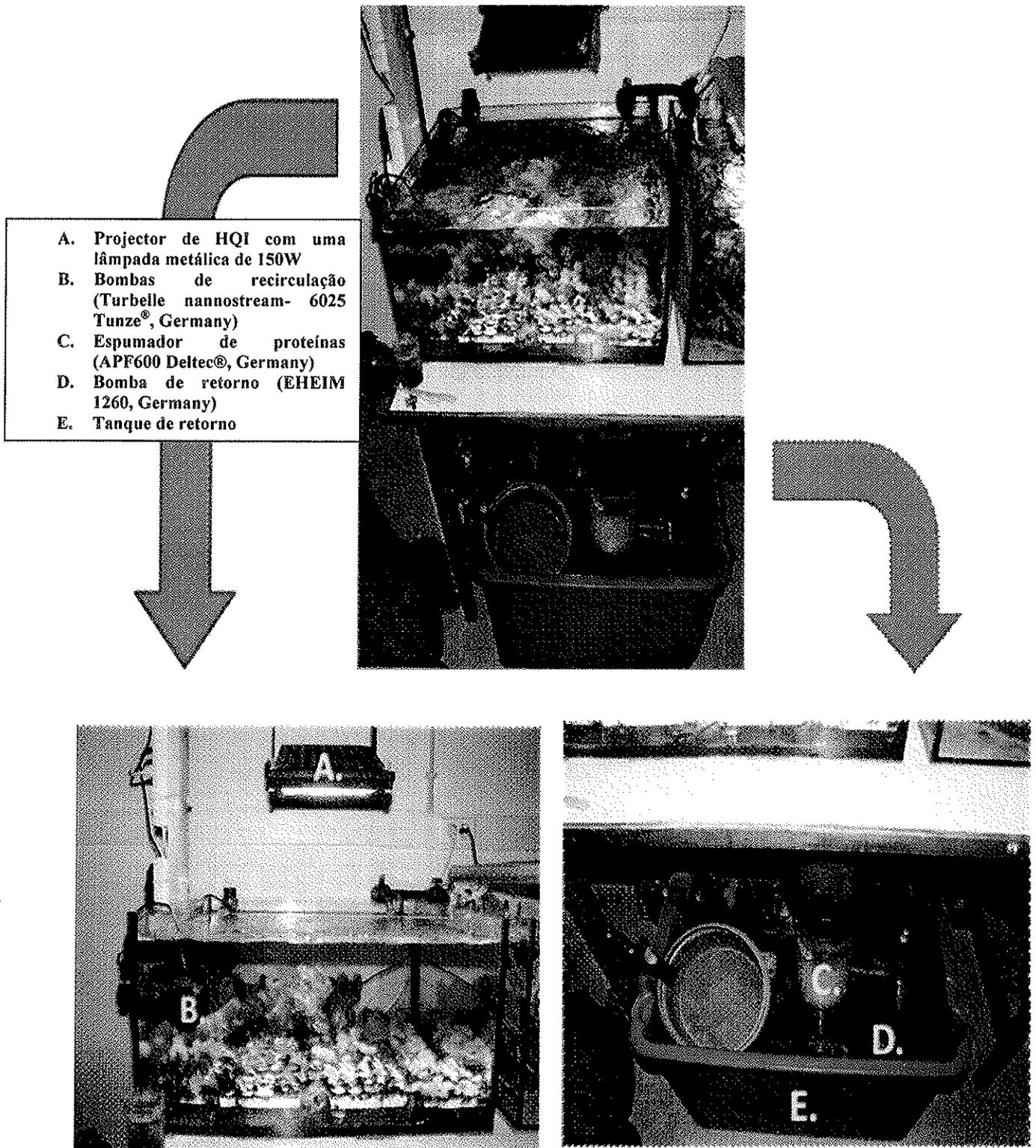


Figura 13: Vista geral do sistema de monitorização de vida utilizado para manutenção de colónias mãe de coral em cativeiro

3.1.2. Sistema do aquário receptor dos fragmentos (Aquário 2)

O sistema era composto por 3 aquários de vidro *de 90 L* (0.6 m * 0.6 m * 0.25 m) conectados em paralelo a um tanque de filtro de 150L equipado com um a protein skimmer (AP851 Deltec®, Germany), um filtro biológico, dois aquecedores (Eheim Jäger® 300W, Germany), um reactor de hidróxido de cálcio (KM500 Deltec®, Germany) conectado a um osmoregulador em uma bomba submersa (EHEIM 1262, Germany) fornecendo um fluxo de aproximadamente 1000L.h⁻¹ para cada aquário. Cada aquário estava equipado com uma bomba de circulação (Turbelle nannostream- 6025 Tunze®, Germany), que fornecia aproximadamente um fluxo de água de 2500 L h⁻¹. Cada aquário estava iluminado com uma lâmpada metálica halide de 150W com uma das seguintes temperaturas - 10.000 K (Sylvania®, Germany); O regime de luz foi 12h luz : 12h escuro.

3.1.3. Água dos aquários

Foi usada água do mar sintética, para os sistemas de manutenção de corais vivos em cativeiro, preparada misturando água purificada por uma unidade de osmose reversa Tropic Marin Pro Reef® salt (Tropic Marine, U.K.). Os parâmetros da água foram monitorizados de dois em dois dias e mantidos em valores próximos dos valores ótimos para o género *Sarcophyton* durante o período experimental (temperatura 26 ± 0.5 °C; pH 8 – 8.5; KH 10 – 12; Cálcio 400 ± 10 mg.L⁻¹; salinidade: 35; amónia, nitrito e nitrato: 0, 0 e 5 ± 1 mg L⁻¹, respectivamente).

3.2. Classificação da Qualidade

Para classificar a qualidade dos fragmentos de coral após o transporte foi criada uma escala com 4 níveis: no nível 1o coral apresenta uma qualidade máxima, com pólipos expandidos; o nível 2 é caracterizado por um estado aparentemente saudável mas com pólipos retraídos; o nível 3 caracteriza-se por apresentar pólipos retraídos e zonas com necrose (morte de tecido); no nível 4 o coral está morto.e

3.3. Fragmentação - Clonagem

Cortaram-se cerca de 50 fragmentos de cerca de 3 por 3 cm (9 cm²) de uma colónia mãe (Figura 15) do coral mole *Sarcophyton* sp. proveniente da Indonésia. O corte foi efectuado com um bisturi, fora do aquário (Figuras 16 e 17).

Os fragmentos foram colocados em “coral cradles” (Figura 20) e fixados com elásticos (Figura 18), e de seguida colocados numa grelha (Figura 21) para ficarem fixos na base do aquário. A colónia mãe e os fragmentos foram colocados no aquário 1 após o procedimento anteriormente descrito (Figura 22).

Nas semanas seguintes foram realizadas mudanças diárias de água do aquário devido às secreções libertadas pelos dos fragmentos produzidos.

3.4. Transporte e estabulação

Após 30 dias de estabulação, dos 50 fragmentos que tinham sido produzidos seleccionaram-se 30 de forma aleatória, os quais foram retirados do aquário e divididos em 6 tratamentos cada um com 5 réplicas cada.

Nos tratamentos 1 e 2 os fragmentos foram simplesmente colocados no aquário 2 e monitorizados 1 hora e um mês após a sua estabulação, respectivamente. Estes tratamentos funcionaram como os grupos controlo da experiência. Os restantes 20 fragmentos foram embalados a fim de simular o transporte. Ver secção 3.5. Acondicionamento para transporte para uma descrição detalhada do procedimento de embalagem dos corais.

No dia 2 da experiência, passadas 24 horas do início da mesma, retiraram-se 10 das réplicas embaladas (tratamentos 3 e 4). Os corais do tratamento 3 foram classificados 1 hora após o transporte, enquanto no tratamento 4 os corais foram colocadas no aquário 2 durante um mês e apenas depois foram classificados. Os tratamentos 5 e 6 foram levados a cabo da mesma forma, tendo o tempo de transporte sido de 48h.

Por fim foi determinada a taxa de DOA (“dead on arrival”) para os tratamentos 1, 3 e 5.



Figura 14: Vista lateral da colônia mãe do coral *Sarcophyton* sp,

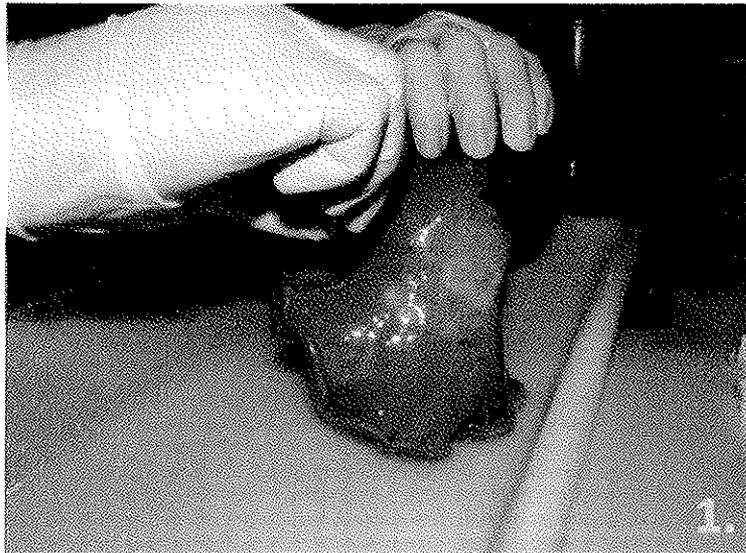


Figura 15: Início da fragmentação com bisturi

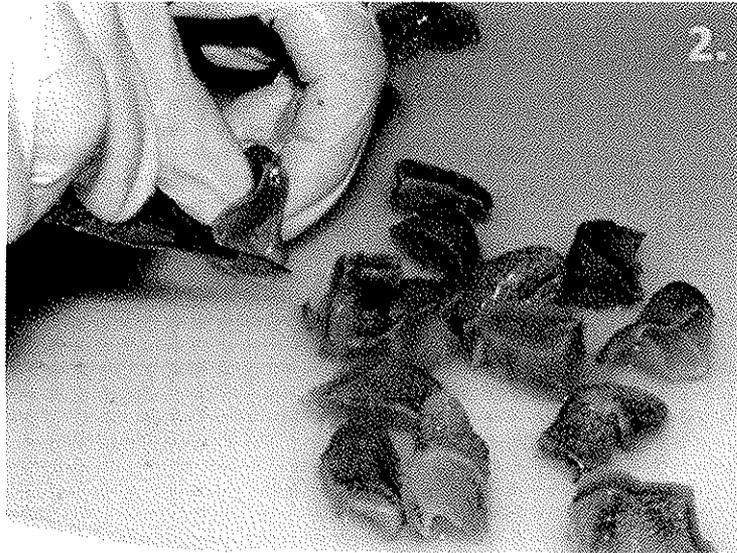


Figura 16: Fragmentos da colônia mãe após o corte com um bisturi



Figura 17: Fragmento de *Sarcophyton* sp. preso a um "Cradle" por um elástico

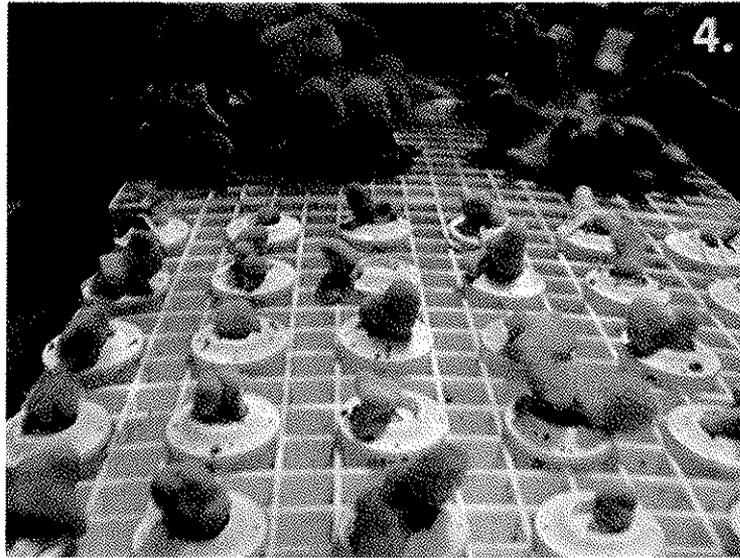


Figura 18: Fragmentos e Colônia Mãe no mesmo aquário



Figura 19: Vista lateral de um "cradle" usado para base de fixação dos fragmentos



Figura 20: Esquema da montagem do "Cradle" na grelha

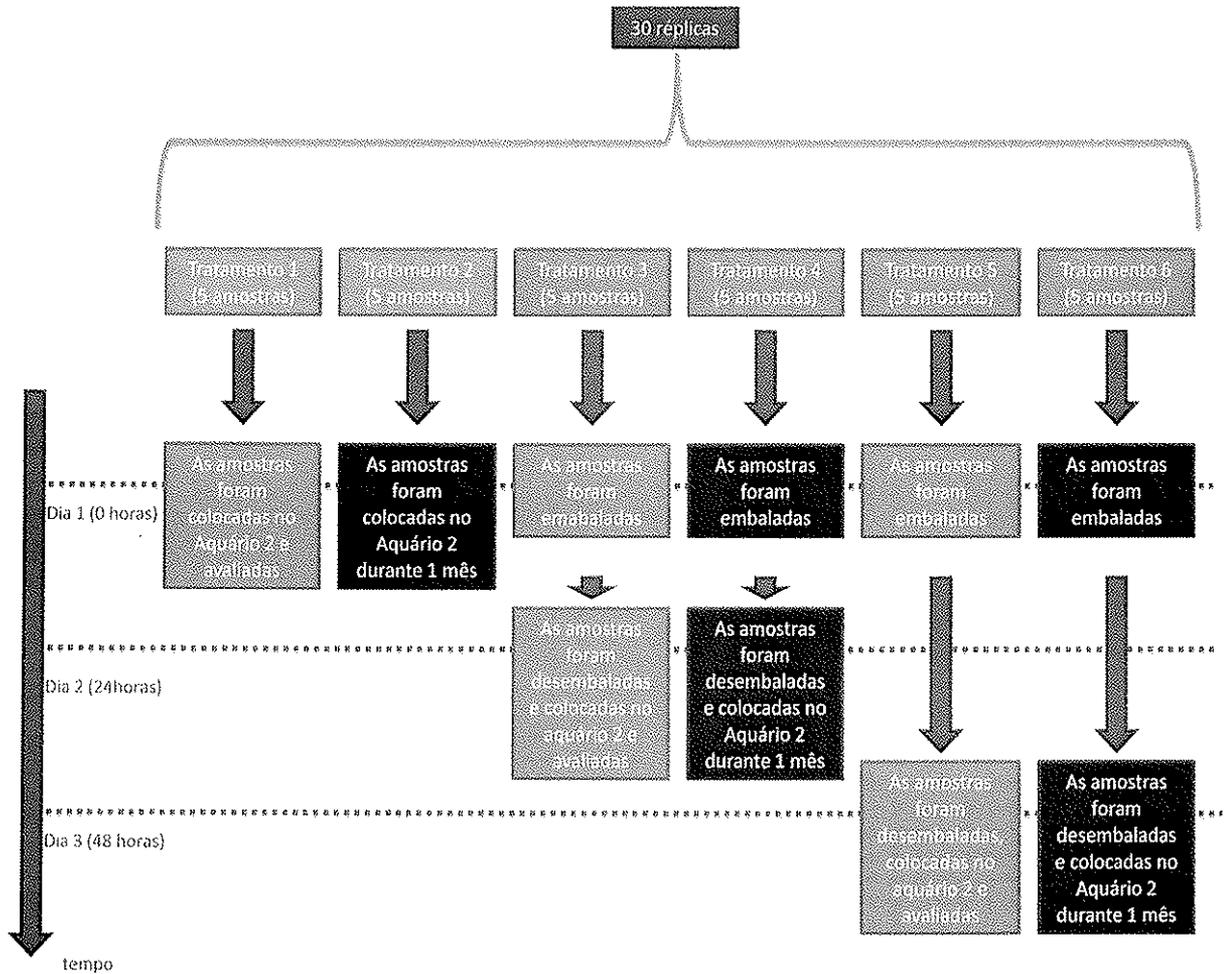


Figura 21: Representação esquemática do desenho experimental

3.5.Acondicionamento para transporte

Os fragmentos foram retirados do aquário da colónia mãe e colocados em sacos plásticos de 1,5 L de capacidade, em que cerca de 1/3 do seu volume foi preenchido com água proveniente do aquário, tendo o restante volume sido preenchido com oxigénio puro.

O transporte de corais foi feito seguindo as normas da OIE (World Organization for Animal Health) nomeadamente:

Artigo 5.4.2

Medidas particulares para as embalagens

1. A construção das embalagens com o objectivo de transportar animais aquáticos deve ser feita no sentido de prevenir a perda de água durante o transporte.
2. No caso de transporte de animais aquáticos, as autoridades devem ser alertadas para observação preliminar do conteúdo das embalagens.
3. As embalagens em trânsito nas quais existem animais aquáticos não devem ser abertos, a não ser que os Serviços de Saúde dos animais aquáticos do país acharem necessário.
4. As embalagens só devem conter um tipo de produto, ou pelo menos com tipos de produto que não sejam susceptíveis a contaminação entre eles.
5. Corresponde a cada país decidir o tipo de equipamento necessário para o trânsito e importação de animais aquáticos e produtos de animais aquáticos em embalagens.

Artigo 5.4.3

Considerações particulares para o transporte de animais aquáticos por via aérea

1. As densidades do “stock” para o transporte de animais em embalagens deve ser determinado seguindo as seguintes indicações aquando do transporte por via aérea:
 - a. O volume total de espaço disponível para cada animal aquático
 - b. A capacidade de oxigenação disponível para as embalagens enquanto em terra e durante todas as fases do voo.

Em relação a peixes, moluscos e crustáceos, o espaço reservado para cada espécie de animal aquático em embalagens que foi ajustado para o transporte em separado de animais em grande número, ou para o transporte de grupos de animais aquáticos, deve obedecer a densidades especificadas aceitáveis para as espécies em questão.

2. O regulamento da Associação de Transporte Aéreo Internacional (IATA) aprovado pela OIE para animais vivos pode ser adoptado se não houver conflito com a legislação local

http://www.oie.int/eng/normes/fcode/en_chapitre_1.5.4.htm

3.6.Extracção de DNA

O DNA microbiano foi extraído das amostras de coral utilizando UltraClean Soil DNA Isolation Kit® (Mo Bio Laboratories, Inc; Carlsbad, CA, USA), seguindo as recomendações dadas pelo fabricante. O DNA extraído foi armazenado a -20°C para as futuras aplicações.

3.7.Amplificação por Reacção da Polimerase em Cadeia (PCR)

O DNA extraído foi amplificado através da Reacção da Polimerase em Cadeia (PCR). No primeiro PCR foram aplicados os primers universais 27-F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3') e 1512-R (5'- TAC GGT TAC CTT GTT ACG AC -3') para amplificar cerca de 1450 pb do 16S rDNA, seguindo o protocolo estabelecido por(Hardoim, Costa et al. 2009) com algumas alterações. O PCR foi realizado num Multigene Gradient Thermal Cycler do Labnet (Labnet International Inc., Woodbridge, NJ). A reacção de PCR utilizada (25µl) para a amplificação continha: 1µl de amostra de DNA, 2.5 µl de tampão PCR 1X(Fermentas), 2.5 µl de dNTPs, 3.75 µl de MgCl₂, 1µl de BSA, 0.25µl de cada primer, 0.2µl de Taq Polimerase (todos os reagentes foram adquiridos na MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania) e 13.55µl de volume de H₂O.

O termociclador foi programado para: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, 30 ciclos de desnaturação a 94°C 45 segundos, emparelhamento dos primers a 56°C 45 segundos e extensão a 72°C 1:30 minutos e extensão final a 72°C durante 10 minutos.

O segundo PCR, nested PCR, foram utilizados primers universais para a região bacteriana V6-V8 do 16S rDNA, 968F-GC (5'-GC-clamp-AAC GCG AAG AAC CTT AC -3') e 1401R (5'- GCG TGT GTA CAA GAC CC -3'), e seguiram o protocolo estabelecido por(Hardoim, Costa et al. 2009), com algumas alterações. A reacção de PCR utilizada para amplificação continha: 2.5 µl de tampão PCR 1X(Fermentas), 3µl de MgCl₂, 2.5 µl de dNtps, 0.25 µl de cada primer, 0.5 µl de Taq Polimerase(Fermentas), 0.5µl de acetamida para facilitar a desnaturação da hélice dupla do DNA e para impedir a formação de estruturas secundárias. O PCR foi realizado num MultiGene Gradient Thermal Cycler (LabNet International Inc., Woodbridge, NJ). Desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguido de 34 ciclos de desnaturação a 95°C 1 min, *annealing* a 53°C 1 min e extensão a 72°C durante 7 min. Os produtos da amplificação foram analisados através de electroforese em gel de agarose e armazenadaos a -20°C até a sua utilização.

4. Resultados

Para os 50 fragmentos (clones) cortados e mantidos durante o período de estabilização de 3-4 semanas foi registada uma sobrevivência de 100%.

Nos tratamentos 1 e 2 (controlos) para os quais não houve transporte, houve apenas mudança de aquários, a sobrevivência foi de 100% e os fragmentos obtiveram uma classificação de 1 (máxima) em qualidade.

Nos tratamentos 3 e 4 a sobrevivência foi igualmente de 100% e os fragmentos apresentaram uma classificação de 1 (máxima) em qualidade.

Os mesmos resultados foram registados para os tratamentos 5 e 6 (sujeitos a um transporte durante 48h).

Os tratamentos 1, 3 e 5 apresentaram uma taxa de DOA de 0%.

Tratamento	Sobrevivência	Qualidade
1	100%	Nível 1
2	100%	Nível 1
3	100%	Nível 1
4	100%	Nível 1
5	100%	Nível 1
6	100%	Nível 1

Tabela 3: Representação dos resultados dos tratamentos relativamente à sobrevivência e qualidade

Em relação à análise molecular, a extracção de DNA feita usando o “UltraClean Soil DNA Isolation Kit® (Mo Bio Laboratories, Inc; Carlsbad, CA, USA)” e seguindo as recomendações dadas pelo fabricante não obteve resultados, por conseguinte todo o esforço usado na Amplificação do DNA por PCR foi em vão.

5. Discussão

Nesta experiência o tipo de fragmentação utilizado proporcionou uma taxa de sucesso de 100%, o que revela que esta prática é simples, barata e sobretudo eficiente. Este método permite um número indefinido de clones de uma colónia mãe que apresente alguma característica morfológica ou química de interesse. Esta vantagem é de grande importância não só no comércio ornamental, onde se podem “fixar” variedades (polimorfologias) do mesmo coral (cor, forma etc), mas também para a farmacêutica pois da mesma forma que é possível clonar variedades de maior interesse farmacológico.

Outra vantagem da fragmentação é o facto do crescimento dos fragmentos ser muito superior ao da colónia mãe, isto é, a fragmentação não é só um método de obter clones, mas também um método de obter biomassa. Este aspecto é muito vantajoso para a farmacêutica, onde são precisas grandes quantidades de coral para se extraírem os compostos pretendidos.

Os tratamentos sujeitos a transporte obtiveram uma mortalidade de 0% e um nível de qualidade máximo tal como nos controlos, o que comprova que o método de transporte é eficiente e simples. A análise molecular dos fragmentos obtidos iria fornecer informação relativa à clonagem da comunidade microbiana da colónia mãe e se a mesma era influenciada pelo tempo de transporte. Esta informação seria de extrema importância para a fragmentação e a importação de corais com o objectivo de extrair compostos químicos de interesse farmacológico, pois sabe-se que muitas vezes o composto bioactivo de interesse não é produzido pelo coral mas sim pela sua comunidade microbiana. No entanto, face às dificuldades registadas nas metodologias moleculares, foi impossível proceder à análise e comparação das comunidades microbianas da colónia mãe e dos fragmentos produzidos.

É do conhecimento geral que os recifes são de extrema importância, não só pelos bens que fornecem, como os próprios peixes, corais e invertebrados mas também pelos seus serviços ecológicos. Porém para ser feita a extracção de compostos químicos de interesse farmacológico são por vezes necessárias grandes quantidades de biomassa, o que obviamente vai impactar negativamente os recifes. Deste modo, é óbvio que a aquacultura tem um papel fundamental na mitigação deste impacto, onde como se verificou neste trabalho com o género *Sarcophyton*, é relativamente fácil e pouco dispendioso produzir *in situ* ou *ex situ* este tipo de organismos.

Com o melhoramento da tecnologia que permite a manutenção de corais em aquário, o seu estudo é facilitado comparativamente ao seu estudo nos recifes. Ao eliminar variáveis num sistema fechado é

possível tentar descobrir soluções *ex situ* para o desenvolvimento de técnicas que permitam mitigar os efeitos deletérios promovidos pelos fenómenos de branqueamento de coral.

Com a crescente diminuição e risco de desaparecimento de muitas espécies de corais, a manutenção e propagação de corais em aquários constitui uma forma de garantir a preservação do património genético destas espécies. Adicionalmente podem ainda ser desenvolvidos esforços de restauração de recifes com espécies de aquacultura mais resistentes a episódios de branqueamento.

A optimização do transporte de corais por via aérea terá que passar por estudos posteriores ao deste trabalho no sentido de chegar aos limites de ar e água mínimos possíveis para uma taxa de DOA de 0%. Mais uma vez a aquacultura de corais tem um papel fundamental a desempenhar neste contexto, pois estes testes podem ser conduzidos com organismos produzidos em cativeiro sem ser necessário recorrer a corais “naturais”. Tal como comprova este trabalho, a colónia mãe perdeu a biomassa de 50 fragmentos, usados na experiência porém ao fim de 6 meses já a tinha recuperado na totalidade, voltando ao tamanho anterior à fragmentação. Com o aumentar do preço dos combustíveis fósseis, uma diminuição do “esforço de transporte” aéreo acarretará uma vantagem económica, onde será possível transportar mais e gastar menos.

De um ponto de vista ambiental, é possível diminuir os custos associados ao gasto de combustíveis e viagens aéreas, e assim diminuir a pegada ecológica do transporte de corais.

Por fim, os corais com zooxantelas são uma ótima escolha para criadores de corais, pois podem crescer rapidamente recorrendo apenas à fotossíntese dos seus endossimbiontes. O facto de não ser necessário proceder à alimentação deste tipo de corais, tal como *Sarcophyton* sp. usado nesta experiência, diminui significativamente os seus custos de produção quando comparados com outros organismos marinhos utilizados em aquacultura.

6. Considerações finais

O método de fragmentação utilizado revelou ser uma forma prática de se obterem clones de uma colónia mãe e ter a vantagem de ser de fácil realização, sem custos elevados e com uma taxa de sobrevivência elevada para fragmentos relativamente pequenos (3 cm). Outra vantagem da fragmentação é a de aumentar a produção de biomassa de coral, pois os fragmentos crescem mais rapidamente do que a colónia mãe.

O método de transporte deu uma garantia de 100%, não sendo no entanto o mais interessante do ponto de vista económico, pois o transporte de corais é geralmente efectuado por via aérea onde o peso da mercadoria é determinante. Numa situação em que por exemplo sejam transportados 100 fragmentos, se for adicionada uma quantidade de 500 mL de água a cada fragmento, teremos facilmente 50 Kg de peso. Este cenário revela de forma inequívoca como esta técnica torna extremamente dispendioso o transporte de corais por via área.

Como comprova esta dissertação, a manutenção, fragmentação e transporte de *Sarcophyton* sp. é actualmente possível e com resultados bastante satisfatórios. Embora exista ainda margem para melhoramento das técnicas de transporte destes organismos, é possível que a longo prazo possa ser eliminada por completo a necessidade de explorar organismos selvagens desta espécie de coral.

7. Bibliografia

- Ainsworth, T. D. and O. Hoegh-Guldberg (2009). "Bacterial communities closely associated with coral tissues vary under experimental and natural reef conditions and thermal stress." Aquatic Biology **4**(3): 289-296.
- Badria, F. A., A. N. Guirguis, et al. (1998). "Sarcophytolide: a new neuroprotective compound from the soft coral *Sarcophyton glaucum*." Toxicology **131**(2-3): 133-143.
- Bishara, A., A. Rudi, et al. (2007). "Three Biscembranoids and their Monomeric Counterpart Cembranoid, a Biogenetic Diels–Alder Precursor, from the Soft Coral *Sarcophyton elegans*." Journal of Natural Products **70**(12): 1951-1954.
- Brander, L. M., P. Van Beukering, et al. (2007). "The recreational value of coral reefs: A meta-analysis." Ecological Economics **63**(1): 209-218.
- Brusca, R. C. and G. J. Brusca (2003). Invertebrates Sunderland, Mass. : Sinauer Associates.
- Burkpile, D. E. and M. E. Hay (2008). Coral Reefs. Encyclopedia of Ecology. S. E. Jorgensen and B. D. Fath, Oxford:Elsevier: 784-796.
- Campbell, N. A. and J. B. Reece (2005). Biology. San Francisco - USA, Pearson Education.
- Castro, P. and M. E. Huber (2005). Marine Biology. New Jersey, McGraw-Hill.
- Cesar, H. S. J. (2000). Coral Reefs: Their Functions, Threats and Economic Value. Collected Essays on the Economics of Coral Reefs. CORDIO. Kalmar University, Sweden.
- Cheng, S.-Y., K.-J. Huang, et al. (2009). "New Terpenoids from the Soft Corals *Sinularia capillosa* and *Nephthea chabroli*." Organic Letters **11**(21): 4830-4833.
- Coll, J. C. (1992). "The chemistry and chemical ecology of octocorals (Coelenterata, Anthozoa, Octocorallia)." Chemical Reviews **92**(4): 613-631.
- Delbeek, J. C. and J. Sprung (1994). The Reef Guide: The comprehensive Guide to the Identification and Care of Tropical Marine Invertebrates. Florida - USA, Recordera Publishing.
- Ellis, S. and L. Sharron (1999). The Culture of Soft Corals (Order: Alcyonacea) for the Marine Aquarium Trade, Center for Tropical and Subtropical Aquaculture.

Fleury, B., B. Lages, et al. (2008). "New Hemiketal Steroid from the Introduced Soft Coral *Chromonephthea braziliensis* is a Chemical Defense against Predatory Fishes." Journal of Chemical Ecology **34**(8): 987-993.

Hardoim, C. C. P., R. Costa, et al. (2009). "Diversity of Bacteria in the Marine Sponge *Aplysina fulva* in Brazilian Coastal Waters." Appl. Environ. Microbiol. **75**(10): 3331-3343.

Kellogg, C. A., J. T. Lisle, et al. (2009). "Culture-independent characterization of bacterial communities associated with the cold-water coral *Lophelia pertusa* in the northeastern Gulf of Mexico." Applied and environmental microbiology **75**(8): 2294-2303.

Kooperman, N., E. Ben-Dov, et al. (2007). "Coral mucus-associated bacterial communities from natural and aquarium environments." FEMS Microbiology Letters **276**(1): 106-113.

Krebs, C. (2008). Ecological World View. Melbourne, Australia, CSIRO Publishing.

McManus, J. W., J. Cleto L. Nañola, et al. (1992). Resource ecology of the Bolinao coral reef system, ICLARM Stud: 117 p.

McManus, J. W., C. L. J. Nanola, et al. (1992). Resource ecology of the Bolinao coral reef system. T. Reports.

Miller, S. A. and J. P. Harley (2001). Zoology Boston: WCB/McGraw-Hill.

Moberg, F. and C. Folke (1999). "Ecological goods and services of coral reef ecosystems." Ecological Economics **29**(2): 215-233.

Odum, H. T. and E. P. Odum (1955). "Trophic Structure and Productivity of a Windward Coral Reef Community on Eniwetok Atoll." Ecological Monographs **25**(3): 291-320.

Purves, W., D. Sadava, et al. (2004). Life: The Science of Biology, Sinauer Associates, Inc.

Sarma, N. S., M. S. Krishna, et al. (2009). "Marine Metabolites: The Sterols of Soft Corals." Chemical Reviews **109**(6): 2803-2828.