



Jamen Júlio Ali Mussa

Otimização da aquacultura de corais (Scleractinia):
Montipora digitata

Optimization of coral aquaculture (Scleractinia):
Montipora digitata

DECLARAÇÃO

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



**Jamen Júlio Ali Mussa Otimização da aquacultura de corais (Scleractinia):
*Montipora digitata***

**Optimization of coral aquaculture (Scleractinia):
*Montipora digitata***

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestrado em Biologia Marinha, realizado sob a orientação científica do Doutor Rui Jorge Miranda Rocha (Investigador Auxiliar do Departamento de Biologia e CESAM, Universidade de Aveiro), da Doutora Andreia do Carmo Martins Rodrigues (Investigadora em Pós-Doutoramento do Departamento de Biologia e CESAM, Universidade de Aveiro) e do Professor Doutor Amadeu Mortágua Velho da Maia Soares (Professor Catedrático do Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro).



RUSSELL E. TRAIN
**EDUCATION
FOR
NATURE**

Jamen Júlio Ali Mussa, foi financiado para obtenção do grau de Mestre pela WWF, Russel E. Train, Education for Nature. SZ04/2017/18

Dedico este trabalho aos meus filhos Dylan e Jady.
Em memória do meu irmão Jufane Mussa

o júri

Presidente

Doutor Ricardo Jorge Guerra Calado
Investigador principal, Departamento de Biologia & CESAM,
Universidade de Aveiro

Arguente

Prof. Doutor Paulo José de Azevedo Pinto Rema
Professor Associado, Universidade de Trás-os-Montes e Alto
Douro

Supervisor

Doutor Rui Jorge Miranda Rocha
Investigador Auxiliar, Departamento de Biologia & CESAM,
Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Desde o início da vida, contei com a confiança e o apoio de inúmeras pessoas, em primeiro lugar a minha família, meu Pai, minha Mãe, Irmãos. Aos meus filhos, esposa e sobrinhos pela paciência e força de superar todas as dificuldades durante a minha ausência, obrigado. Ao Doutor Rui Rocha, Dra. Andreia Rodrigues e Prof. Amadeu Soares meus orientadores, agradeço o apoio, recepção calorosa no departamento de Biologia, a partilha do saber e as valiosas contribuições para o trabalho. Acima de tudo, obrigada por me continuar a acompanhar nesta jornada e por estimular o meu interesse pelo conhecimento e pela vida académica.

Ao Pedro Bem-Haja pela ajuda da estatística e análises de dados.

Ao grupo Aquinsight, que representou uma oportunidade ímpar de crescimento académico e também pessoal. A todos, obrigado pela oportunidade de fazer parte e dar confiança depositada.

O meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação a partir da amostragem até às análises de dados, Davide Silva, Ana Costa "grupo Eppendorf 14"

A WWF, Russel E. Train, Education for Nature, pelo financiamento dos estudos.

Sou muito grato a todos os meus amigos (grupo do Facebook movidos pelo álcool) pelo acolhimento, incentivo, ao longo destes anos, os jantares de curso, fins na praça e muito mais...obrigado pelo amor, alegria e atenção sem reservas, e a todos aqueles estiveram e ajudaram direta ou indiretamente durante este percurso...

Sem todos esses contributos, esta investigação não teria sido possível.

MUITO OBRIGADO

Palavras-chave

Aquacultura, Corais, Iluminação, Alocação de Energia Celular, Fotobiologia.

Resumo

Os recifes de coral representam um dos ecossistemas mais diversos do mundo, com importância crítica para diversos organismos. As pessoas também dependem fortemente deste ecossistema marinho em termos ecológicos, económicos e culturais. No entanto, os recifes de coral estão em declínio devido a vários fatores naturais e antropogénicos como o aquecimento global, a poluição ou a pesca ilegal, com métodos destrutivos. Adicionalmente, a captura de corais selvagens, é uma atividade praticada em várias regiões tropicais e subtropicais, principalmente para indústria de aquarofilia. A aquacultura de corais (*in situ* ou *ex situ*) é, portanto, uma possível solução para minimizar a captura de organismos selvagens, possibilitando a produção destes organismos para diversos fins, tais como o repovoamento, construção de recifes artificiais, extração de compostos bioativos e comercialização para fins educativos e ornamentais. No entanto, persiste a necessidade de otimizar os procedimentos zootécnicos de forma a maximizar a taxa de sobrevivência e de crescimento. Este trabalho teve como principais objetivos estudar o efeito da luz (intensidade e espectro) na sobrevivência, crescimento, fotobiologia, consumo de energia e reservas energéticas de fragmentos do coral duro *Montipora digitata*, provenientes de colónias mãe aclimatadas a diferentes cenários de luz (mimetizando diferentes profundidades). Oito colónias (com a mesma origem genética) foram aclimatadas por dois meses em sistemas experimentais com iluminação artificial (espectro total) com duas intensidades de radiação fotossintética ativa (PAR, 70 ± 10 e $130 \pm 20 \mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 4 colónias em cada condição). Posteriormente as colónias foram fragmentadas e os fragmentos cultivados durante quatro meses em quatro tratamentos ($n=7$), utilizando dois espectros de luz (vermelha e azul) com duas intensidades PAR: $130 \pm 20 \mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (luz alta) e $70 \pm 10 \mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (luz baixa). Durante a experiência não ocorreu mortalidade, mas verificou-se um efeito da origem da colónia e do espectro de luz nos parâmetros analisados. Observou-se que os fragmentos cultivados com espectro de luz vermelha e um PAR $70 \pm 10 \mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ apresentaram um crescimento mais elevado, quando comparados com os fragmentos cultivados com luz azul. Relativamente aos restantes parâmetros analisados, os resultados sugerem que os fragmentos cultivados em luz vermelha apresentaram de uma forma geral melhores resultados.

Keywords

Aquaculture, Coral, Lighting, Cellular Energy Allocation, Photobiology.

Abstract

Coral reefs represent one of the most diverse ecosystems in the world, with critical importance for various organisms. People also depend heavily on this marine ecosystem in ecological, economic and cultural terms. However, coral reefs are declining due to various natural and anthropogenic factors such as global warming, pollution or illegal fishing with destructive gears. In addition, the capture of wild corals is an activity practiced in several tropical and subtropical regions, mainly for the aquarium industry. Coral aquaculture (*in situ* or *ex situ*) is, therefore, a possible solution to minimize the capture of wild organisms, allowing the production of these organisms for various purposes, such as transplantation and restocking to accelerate the recovery of coral reefs, artificial reef building, extraction of bioactive compounds and commercialization for educational and ornamental purposes. However, the need to optimize zootechnical procedures persists in order to maximize survival and growth rates. The main objective of this work was to study the effect of light (intensity and spectra) on survival, growth, photobiology, energy consumption and energy reserves of scleractinian coral *Montipora digitata* fragments, obtained from mother colonies acclimated to different light scenarios (mimicking different sea depths). Eight colonies (with the same genetic origin) were acclimated for two months in experimental systems with artificial light (total spectrum) with two intensities of active photosynthetic radiation (PAR, 70 ± 10 and 130 ± 20 $\mu\text{mol quanta}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 4 colonies in each condition). Afterward, colonies were fragmented and the fragments were cultured for four months in four treatments ($n = 7$), using two light spectra (red and blue) with two PAR intensities: 130 ± 20 $\mu\text{mol quanta}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (high light) and 70 ± 10 $\mu\text{mol quanta}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (low light). No mortality occurred during the experiment, but an effect of the colony origin and the light spectrum was verified on the analyzed parameters. It was observed that fragments reared with the red light spectrum and a PAR 70 ± 10 $\mu\text{mol quanta}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ showed higher growth, when compared with the fragments cultured with blue light. Besides growth, results suggest that fragments reared in red light showed better results in the remaining evaluated parameters.

Índice

1.	<i>Introdução</i>	1
1.1.	Objetivo	6
1.1.1.	Objetivos específicos	6
1.1.2.	Hipóteses	7
2.	<i>Materiais e Métodos</i>	7
2.1.	Proveniência do organismo	7
2.2.	Configuração do sistema de aclimação e cultivo	7
2.3.	Fragmentação dos corais	10
2.4.	Desenho experimental	10
2.5.	Avaliação de sobrevivência e crescimento	11
2.6.	Atividade fotossintética <i>in vivo</i>	12
2.7.	Quantificação de células (<i>Symbiodinium</i> sp.)	12
2.8.	Biomarcadores bioquímicos	13
2.8.1.	Alocação de Energia Celular (CEA)	14
2.8.2.	Energia disponível (Ea)	14
2.8.3.	Consumo de energia (Ec)	14
2.9.	Análise de dados	15
3.	<i>Resultados</i>	16
3.1.	Sobrevivência e Crescimento	16
3.2.	Atividade fotossintética <i>in vivo</i>	20
3.3.	Quantificação de células (<i>Symbiodinium</i> sp.)	22
3.4.	Biomarcadores bioquímicos	24
3.4.1.	Lípidos	24
3.4.2.	Açúcares	25
3.4.3.	Proteínas	26
3.4.4.	Alocação de energia celular	27
4.	<i>Discussão</i>	30
5.	<i>Conclusão</i>	33
6.	<i>Referências bibliográficas</i>	34

Lista de figuras

Figura 1. Estrutura fisiológica de pólipos de coral duro e mole (Adaptado de Rocha, 2013): a – epiderme/ectoderme, b – gastroderme ou endoderme, c – mesogleia, d – cavidade gastrovascular, e – boca, f – tentáculos.	3
Figura 2. Colônia de <i>Montipora digitata</i> mantida nos sistemas da biblioteca de invertebrados marinhos do Ecomare.	7
Figura 3. Sistema experimental de cultivo: A) tanque de cultivo com luz de espectro azul, B) tanque de cultivo com luz de espectro vermelho, C) tanque de filtração de 54L (Sump), D) bomba submersa do sistema de entrada, E) escumador de proteína, F) bomba de circulação, G) sistema de iluminação, H) osmorregulador, I) aquecedor submersível, J) Válvulas de conexão do tanque de filtração, K) refrigerador, L) filtros biológicos, M) reator de hidróxido de cálcio, N) filtro ultra violeta.	9
Figura 4. Ilustração do fragmento de coral e a base.	10
Figura 5. Espectro de luz azul e vermelha absorvidos pelos corais.	10
Figura 6. Reta de calibração da distância focal ao fragmento.	11
Figura 7. Reta de calibração do papel de alumínio.	13
Figura 8. Diagrama com modelo de avaliação de parâmetros de crescimento de <i>M. digitata</i>	18
Figura 9. Diferenças no crescimento dos fragmentos de <i>M. digitata</i> proveniente de colônias mãe aclimatadas a diferentes intensidades de luz (intensidade alta – colônia clara, intensidade baixa – colônia escura), cultivados em diferentes espectros (azul e vermelho) e intensidades de luz (70 ± 10 e $130 \pm 20 \mu\text{mol quanta. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).	19
Figura 10. Ilustração de fragmentos de coral no pré e pós tratamento.	19
Figura 11. Valor médio do F_v/F_m no início (T0) e no fim (T1) do período experimental, dos fragmentos de <i>M. digitata</i> fragmentados de colônias mãe aclimatadas a diferentes intensidades de luz (intensidade alta – colônia clara, intensidade baixa – colônia escura), cultivados em diferentes espectros (azul e vermelho) e intensidades de luz (70 ± 10 e $130 \pm 20 \mu\text{mol quanta. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).	20
Figura 12. Efeitos de Tempo para cada uma das colônias de proveniência.	21
Figura 13. Valor médio do número de células. cm^{-2} no início (T0) e no fim (T1) do período experimental, dos fragmentos de <i>M. digitata</i> fragmentados de colônias mãe	

aclimatadas a diferentes intensidades de luz (intensidade alta – colónia clara, intensidade baixa – colónia escura), cultivado em diferentes espectros (azul e vermelho) e intensidades de luz (70 ± 10 e 130 ± 20 $\mu\text{mol quanta. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).	23
Figura 14. Valor médio da percentagem do teor lipídico no início (T0) e no fim (T1) do período experimental, dos fragmentos de <i>M. digitata</i> fragmentados de colónias mãe aclimatadas a diferentes intensidades de luz (intensidade alta – colónia clara, intensidade baixa – colónia escura), cultivados em diferentes espectros (azul e vermelho) e intensidades de luz (70 ± 10 e 130 ± 20 $\mu\text{mol quanta. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).	24
Figura 15. Valor médio da percentagem do teor açúcares no início (T0) e no fim (T1) do período experimental, dos fragmentos de <i>M. digitata</i> fragmentados de colónias mãe aclimatadas a diferentes intensidades de luz (intensidade alta – colónia clara, intensidade baixa – colónia escura), cultivados em diferentes espectros (azul e vermelho) e intensidades de luz (70 ± 10 e 130 ± 20 $\mu\text{mol quanta. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).	25
Figura 16. Valor médio da percentagem de proteínas no início (T0) e no fim (T1) do período experimental, dos fragmentos de <i>M. digitata</i> fragmentados de colónias mãe aclimatadas a diferentes intensidades de luz (intensidade alta – colónia clara, intensidade baixa – colónia escura), cultivados em diferentes espectros (azul e vermelho) e intensidades de luz (70 ± 10 e 130 ± 20 $\mu\text{mol quanta. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).	26
Figura 17. Valor médio de alocação de energia celular (CEA) no início (T0) e no fim (T1) do período experimental, dos fragmentos de <i>M. digitata</i> fragmentados de colónias mãe aclimatadas a diferentes intensidades de luz (intensidade alta – colónia clara, intensidade baixa – colónia escura), cultivados em diferentes espectros (azul e vermelho) e intensidades de luz (70 ± 10 e 130 ± 20 $\mu\text{mol quanta. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).	27
Figura 18. Análise visual para todas as variáveis em estudo	28
Figura 19. Correlações paralelas: Colónia Mãe x Fv/Fm: r1 = Correlação entre Fv/Fm e Proteínas quando Intensidade é Baixa; r2 = Correlação entre Fv/Fm e Proteínas quando Intensidade é Alta; r3 = Correlação entre número de células de <i>Symbiodinium</i> sp. por cm^2 e lípidos quando intensidade é baixa; r4 = correlação entre nº cél. cm^{-2} e lípidos quando intensidade é alta. * $p < .05$; ** $p < .001$	29

1. Introdução

Os corais são animais do filo Cnidária, Classe Anthozoa, o táxon mais vasto do filo, com mais de 6000 espécies identificadas (Barnes, 1987; Ruppert et al., 2004). Os corais representam a base dos recifes de coral, um dos ecossistemas mais diversos no mundo (Barnes, 1987), que abriga uma grande diversidade de outros organismos, com características variadas, sésseis ou móveis, que interagem entre si (Cole et al., 2008).

Para além da relevância ecológica, os recifes de coral providenciam bens e serviços para milhões de pessoas (Graham et al., 2011; Veron et al., 2009), maioritariamente em países em desenvolvimento (Wabnitz et al., 2003). Os recifes de coral oferecem proteção às zonas costeiras contra a ação das ondas, proporcionam abrigo para organismos vertebrados e invertebrados que aí se reproduzem, representando assim uma fonte de obtenção nutrientes para as comunidades costeiras, e constituem também uma importante fonte de receitas ao nível do turismo (Hughes and Connell, 1999; Wijgerde et al., 2012; Laurans et al., 2013; McClanahan et al., 2014; Spalding et al., 2017).

Os corais são encontrados maioritariamente em regiões tropicais e subtropicais (Hutchings et al., 1968; Veron, 1995), que apresentam valores médios de temperatura (27 ± 2 °C) e salinidade (35 ± 1 ‰) relativamente estáveis durante todo o ano (Coles and Jokiel, 1978; Hoek and Bayoumi, 2017; Hutchings et al., 1968), pelo que estes organismos apresentam pouca tolerância a variações destes parâmetros (Coles and Jokiel, 1978).

Os corais podem ser informalmente divididos em dois grupos principais, vulgarmente designados por corais duros (Sub-classe Hexacorallia, Ordem Scleractinia) ou corais moles (maioritariamente representados pela Sub-classe Octacorallia, Ordem Alcyonacea) (Figura 1). Os corais duros formam o seu esqueleto através da precipitação de carbonato de cálcio. Mesmo depois da sua morte, o esqueleto pode ser colonizado por outros organismos (Hutchings et al., 1968), sendo este o motivo que leva a que estes corais sejam considerados

formadores dos recifes de coral. Por outro lado, os corais moles não formam esqueleto, contendo apenas espículas calcárias separadas que dão alguma sustentação e forma à colónia (Barnes, 1987).

A nível fisiológico e anatómico os corais são organismos simples, que têm simetria radial, não apresentam um sistema nervoso central e são compostos por dois epitélios (organismos diblásticos), a gastroderme, que reveste a cavidade gastrovascular, e a epiderme, que reveste o pólipó exteriormente. Entre as duas camadas celulares, epiderme e gastroderme, existe uma camada gelatinosa designada mesogleia. A cavidade gastrovascular dos pólipos está separada do ambiente exterior pela boca, que é rodeada de tentáculos, em número múltiplo de 6 ou de 8, quando se trata da Sub-classe Hexacorallia ou Octocorallia, respetivamente (Figura 1).

A nutrição nos corais pode ocorrer de forma heterotrófica e autotrófica, no caso dos corais que vivem em simbiose com dinoflagelados fotossintéticos do género *Symbiodinium*, comumente designados por zooxantelas. A alimentação heterotrófica é feita pela boca, com auxílio dos tentáculos, e baseia-se na ingestão de fitoplâncton, zooplâncton, bactérias ou partículas suspensas, que são decompostos por enzimas no interior da cavidade gastrovascular (fase extracelular da digestão), e posteriormente fagocitados e absorvidos pelas células que revestem a cavidade gastrovascular, completando assim o processo digestivo (Barnes, 1987). A alimentação autotrófica, resulta da relação de simbiose que a maioria das espécies de corais tropicais mantêm com organismos fotossintéticos, que lhes permite usufruir dos produtos da fotossíntese, como contrapartida da proteção e nutrientes que fornecem aos seus endosimbiontes (Barnes, 1987).

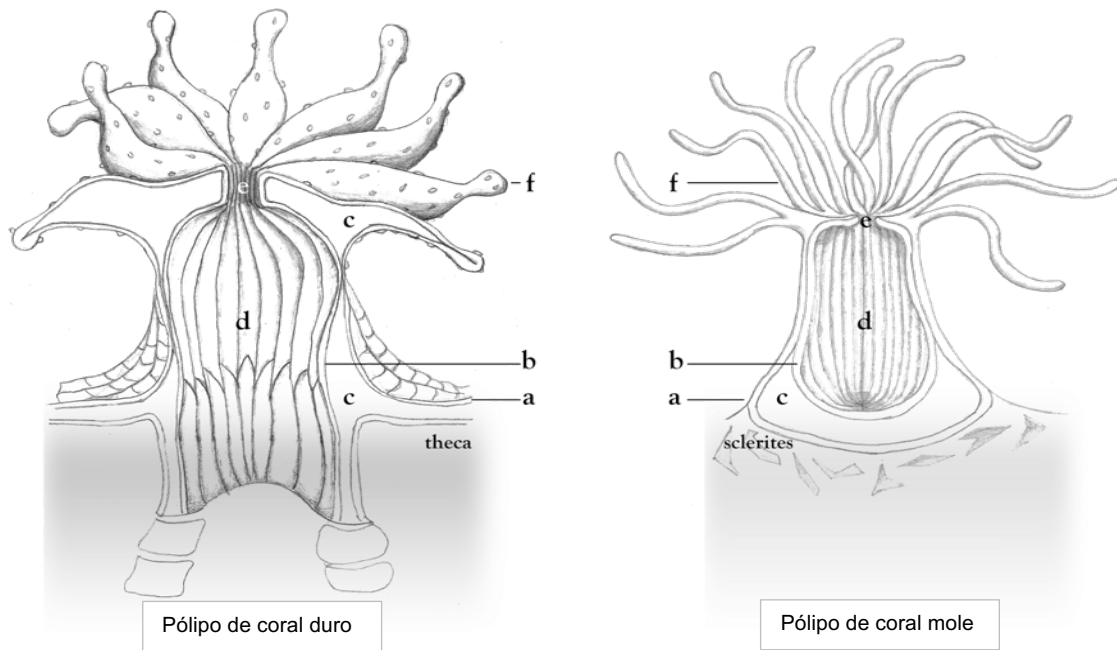


Figura 1. Estrutura fisiológica de pólipos de coral duro e mole (Adaptado de Rocha, 2013): a – epiderme/ectoderme, b – gastroderme ou endoderme, c – mesogleia, d – cavidade gastrovascular, e – boca, f – tentáculos.

Os corais têm a capacidade de se reproduzir de duas formas, sexuada e assexuada (Barnes, 1987). Estes organismos podem ser hermafroditas ou apresentar sexos separados. No primeiro caso, os corais desenvolvem ovários ou testículos no mesmo mesentério, ou em diferentes mesentérios dentro do mesmo pólipos (Barnes, 1987; Richmond and Hunter, 2007). Na época reprodutiva, os ovos e os espermatozoides são lançados em simultâneo na coluna de água. Depois de fertilizado, o oócito assume a forma de plânula (larva planctónica). A plânula, num intervalo de uma a duas semanas vai fixar-se num substrato, formando finalmente um pólipos (Veron, 2000). Este processo acontece normalmente num período do ano, na lua cheia, consoante o local (Richmond and Hunter, 2007; Veron, 2000).

A reprodução assexuada permite a produção de vários indivíduos a partir do mesmo indivíduo, mantendo todas as características genéticas do organismo principal (clone) (Barton et al., 2017; Richmond and Hunter, 2007). Os corais têm vários métodos de reprodução assexuada: fragmentação, bipartição e brotamento (Barton et al., 2017; Delbeek, 2001). A reprodução por fragmentação é largamente usada nos processos de cultivo de corais, contudo, durante o processo de fragmentação por vezes cria um stress ao organismo (Rocha et al., 2013c).

Nos últimos anos os corais têm sofrido cada vez mais ameaças, sendo estas causadas por fatores naturais e antropogênicos (Maina et al., 2011; McClanahan et al., 2014). Nos fatores naturais incluem-se as alterações climáticas (aumento da temperatura nos oceanos), as tempestades (como El Niño) e terremotos, que ocorrem de uma forma periódica, destruindo inevitavelmente grandes áreas de recife. Os fatores humanos resultam majoritariamente de uma fraca fiscalização, que favorece a prática de atividades nocivas aos recifes de coral, como por exemplo a sobre-exploração dos recursos, o uso de métodos destrutivos de pesca (como explosivos ou produtos tóxicos), a poluição de origem urbana e industrial, ou o aumento do dióxido de carbono no mar (Cowburn et al., 2018; McClanahan et al., 2014), que reduz a taxa de calcificação dos organismos formadores de recife (Anthony et al., 2008; Speers et al., 2016).

A tolerância dos corais aos diversos fatores de stress é determinada pela história filogenética, sendo alguns géneros mais tolerantes a efeitos antropogênicos que outros (Kavousi et al., 2016; McClanahan et al., 2007). Por exemplo, alguns géneros como *Acropora*, *Montipora*, *Seriatopora* ou *Pocillopora* são mais vulneráveis ao branqueamento (Cowburn et al., 2018; McClanahan et al., 2007). Deste modo a tolerância dos corais a pressões antropogênicas depende da história evolutiva de cada espécie e da sua capacidade de adaptação (Kavousi et al., 2016, Rinkevich, 2005; Roth, 2014).

Nos últimos anos, o comércio dos corais está sendo praticado em vários países tropicais e sub-tropicais para diversas finalidades, como a aquariofilia, a prospeção de compostos bioativos ou mesmo para ações de repovoamento e reabilitação de recifes degradados (Wijgerde et al., 2012). Estima-se que a nível global o comércio de corais atinja cerca de 11 a 12 milhões de dólares americanos (Wabnitz et al., 2003; Wijgerde et al., 2012). O aumento do comércio de corais, tem levado à captura descontrolada destes organismos do seu habitat natural (Wabnitz et al., 2003). Consequentemente, o declínio dos recifes, causado pelas pressões naturais e antropogênicas, e agravado pelo aumento da exploração destes organismos, está a provocar uma pressão insustentável neste recurso natural.

Assim, a otimização da aquacultura de corais pode dar um grande contributo para a reduzir a captura de organismos selvagens, podendo proporcionar também

o cultivo de organismos mais resistentes a determinados fatores de stresse, proporcionando o cultivo de organismos mais resistentes para utilização em ações de repovoamento ou até na construção de recifes artificiais.

A aquacultura de corais pode ser praticada de duas formas: *in situ* ou *ex situ*, apresentando cada uma delas vantagens e desvantagens associadas ao processo de cultivo. A aquacultura *in situ*, feita no próprio ambiente de origem do organismo, não acarreta custos elevados produção, nem implica a utilização de tecnologia de ponta. No entanto, os organismos ficam expostos a vários fatores, como a predação, sedimentação, doenças, condições meteorológicas ou competição, o que pode levar à redução da taxa de sobrevivência e crescimento (Rinkevich, 2005). A aquacultura *ex situ* ocorre fora do ambiente natural dos corais, normalmente em sistemas fechados, onde há controlo dos diversos fatores que podem afetar a sobrevivência e crescimento dos corais. No entanto, este tipo de produção acarreta custos elevados e implica o investimento em tecnologia, para otimizar os parâmetros de cultivo (Forsman et al., 2012; Rinkevich, 2005).

As vantagens da aquacultura *ex situ* tornam-na atrativa a vários níveis, tornando-se apetecível para a indústria da aquariofilia, obtenção de biomassa para estudos e prospeção de compostos bioativos, ou até mesmo para estudos de preservação da biodiversidade e reabilitação de recifes danificados (Edwards et al., 2010; Rinkevich, 2005). Assim, esta prática tem evoluído gradualmente ao longo dos últimos anos. Contudo, necessita de muitos estudos para a sua otimização (Delbeek, 2001; Forsman et al., 2012), de forma a compreender melhor os fatores que podem influenciar a sobrevivência, o metabolismo e o crescimento e dos corais.

Um dos fatores mais importantes para o cultivo de corais tropicais fotossintéticos *ex situ* é a luz, que desempenha um papel preponderante na recuperação pós-fragmentação dos corais (Rocha et al., 2013c), visto que, com a luz os endossimbiontes *Symbiodinium* sp. convertem o dióxido de carbono providenciado pelos corais em carbono orgânico e oxigénio para estimular o crescimento e a calcificação (Roth, 2014). No entanto, embora alguns estudos revelem que a luz tem um papel importante no processo de crescimento de corais duros tropicais da Ordem Scleractinia (Forsman et al., 2012; Rocha et al., 2013c; Titlyanov et al., 2001), poucos são os estudos que relacionam diferentes

intensidades de luz com os processos metabólicos como alocação e consumo de energia em corais (Khalesi et al., 2009; Leuzinger et al., 2012).

Algumas teorias sugerem que os fatores de stress nos organismos podem afetar o metabolismo do animal, provocando um esgotamento das suas energias, com posteriores consequências para a reprodução ou crescimento (De Coen and Janssen, 1997). No entanto, não existem estudos que avaliem a interação destes fatores com a proveniência da colônia mãe, designadamente no que se refere às condições de luz. Deste modo, o estudo da influência do espectro e da intensidade da luz em fragmentos provenientes de colônias aclimatadas a diferentes intensidades de radiação fotossintética ativa, o que naturalmente ocorre a diferentes profundidades, ou na mesma profundidade, em posições que beneficiem de iluminação direta ou estejam sujeitas a ensombramento parcial ou total, poderá dar informações importantes para a otimização da aquacultura de corais, contribuindo para a inovação dos processos de seleção de colônias mãe e de cultivo destes organismos.

1.1. Objetivo

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estudar o efeito da luz (intensidade e espectro) na sobrevivência, crescimento, fotobiologia, alocação e consumo de energia de fragmentos do coral duro *Montipora digitata*, provenientes de colônias mãe aclimatadas a diferentes intensidades de luz.

1.1.1. Objetivos específicos

Avaliar o efeito da luz (intensidade e espectro):

- sobrevivência;
- crescimento;
- eficiência fotossintética;
- alocação de energia;
- consumo de energia

1.1.2. Hipóteses

- i. As condições da luz (PAR e ESPECTRO) não influenciam o crescimento dos fragmentos de coral
- ii. A proveniência das colónias não tem influência na sobrevivência, crescimento, fotobiologia e nos processos metabólicos dos fragmentos;

2. Materiais e Métodos

2.1. Proveniência do organismo

As colónias utilizadas na experiência resultaram da fragmentação de uma colónia de *Montipora digitata* (Dana, 1846, figura 2) cedida pelo Oceanário de Lisboa. As colónias foram mantidas durante cerca de 2 anos nos sistemas de cultivo da “biblioteca de invertebrados marinhos” do Ecomare, em circuito fechado, sob condições controladas.



Figura 2. Colónia de *Montipora digitata* mantida nos sistemas da biblioteca de invertebrados marinhos do Ecomare.

2.2. Configuração do sistema de aclimação e cultivo

As colónias de *M. digitata* utilizadas no presente estudo foram aclimatadas a diferentes condições de iluminação artificial: intensidade da radiação fotossintética ativa – PAR – com radiação no espectro total da luz visível, quatro colónias em cada condição de luz. Utilizaram-se para o efeito dois tanques de vidro de 235 L (1.48,5 cm x 32,5 cm x 48,5 cm) conectados ao mesmo tanque de filtração

de 54 L (30 cm x 37 cm x 49 cm) composto por um escumador de proteínas (Deltec SC 500, Germany), um reator de hidróxido de cálcio (Kalkwassermischer KM 500S Deltec 7,5 V), um refrigerador (Hailea Model HC-500A), dois aquecedores com termostato (Eheim Jäger 150 W, Deizisau, Germany), um filtro ultra violeta (Commercial UV Steriliser 1 Lamp 55W 220-240V 50HZ), um filtro biológico (5 L de biobolas), um filtro químico (1 L de com carvão ativado), um sistema de reposição automática de água (Detelec aquastat 1001, para compensar a água perdida por evaporação com água de osmose inversa), uma bomba de água (EHEIM universal 1200) que circulava a água do sistema pelo refrigerador e pelo equipamento UV em sequência, e por uma bomba de água (EHEIM universal 3400) que bombeava água do tanque de filtração para os dois tanques de aclimação (aproximadamente 1000 L.h⁻¹ em cada tanque) (Figura 3).

O sistema funcionou com água salgada reconstituída, preparada através da mistura de água doce purificada em osmose reversa (V2 Pure 360 Reverse Osmosis System) e sal (Red Sea Coral pro Salt). A temperatura foi mantida 25±0.5°C e salinidade de 35±1‰. Semanalmente realizaram-se trocas parciais de água (25% do volume total do sistema) e testes para controlo dos parâmetros da água (salinidade, temperatura, pH, cálcio e nitratos) que foram mantidos a valores tidos como ótimos.

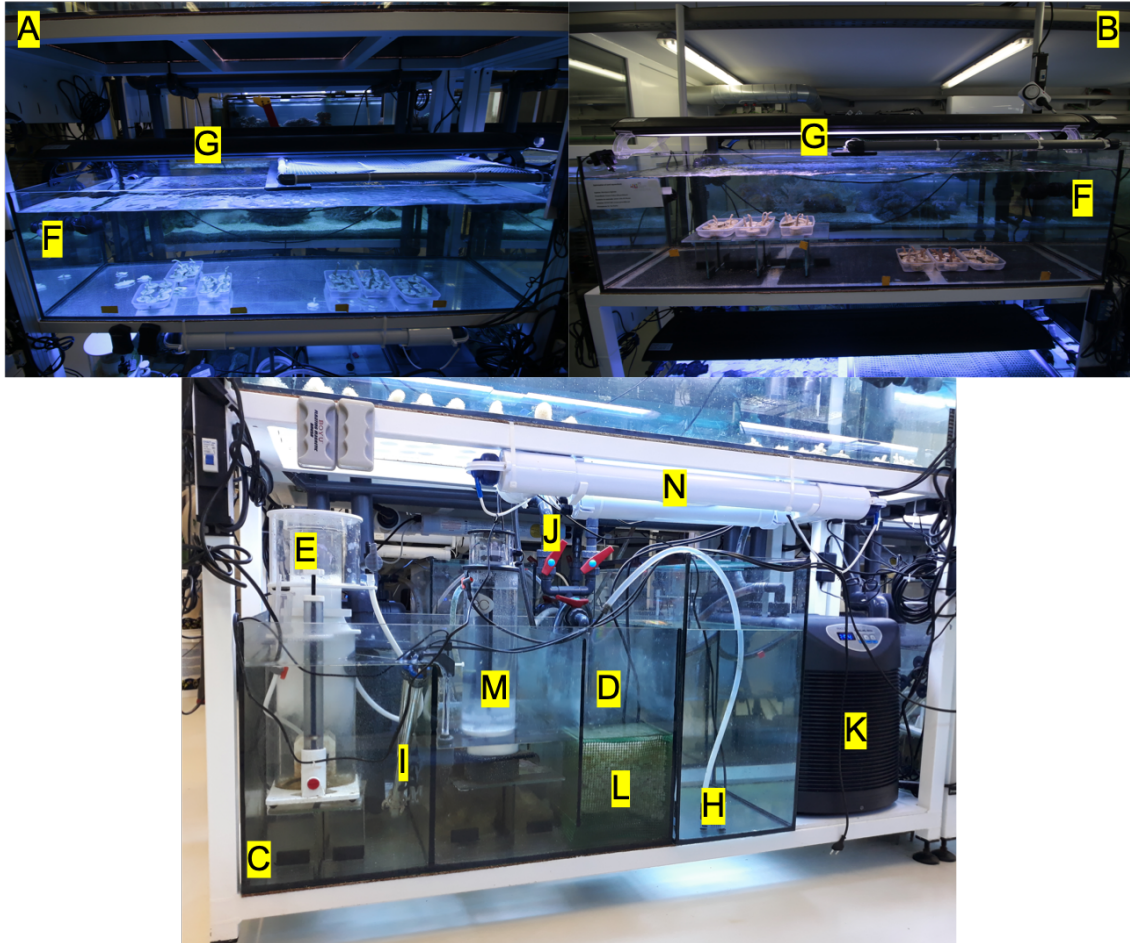


Figura 3. Sistema experimental de cultivo: A) tanque de cultivo com luz de espectro azul, B) tanque de cultivo com luz de espectro vermelho, C) tanque de filtração de 54L (Sump), D) bomba submersa do sistema de entrada, E) escumador de proteína, F) bomba de circulação, G) sistema de iluminação, H) osmorregulador, I) aquecedor submersível, J) Válvulas de conexão do tanque de filtração, K) refrigerador, L) filtros biológicos, M) reator de hidróxido de cálcio, N) filtro ultra violeta.

Cada tanque de aclimatação estava equipado com duas bombas de circulação (Turbelle nannostream-6025 Tunze, Germany) com um caudal máximo de 2500 L.h⁻¹, cujo fluxo era programado através de um controlador (Turbelle nannostream-6025 Tunze, Germany).

Os tanques de aclimatação foram iluminados com lâmpadas fluorescentes T5 Red Sea de 80 W (2 lâmpadas REEF-SPEC Actinic 22000 K e 2 lâmpadas REEF-SPEC Pink, com espectro maioritariamente azul e vermelho, respetivamente, colocadas alternadamente (Figura 3)). Os tanques de aclimatação foram mantidos com um fotoperíodo de 14D:10N horas de luz: horas de escuro, com dois valores distintos de PAR (130±20 e 70±10 μmol quanta.m⁻².s⁻¹, respetivamente). Foram

mantidas no sistema durante um período mínimo de dois meses de aclimação antes da fragmentação.

2.3. Fragmentação dos corais

Após a aclimação das colônias mãe de *M. digitata* em luz alta e baixa por dois meses, estas foram fragmentadas e obtidos 56 fragmentos. A fragmentação foi feita usando um bisturi e os fragmentos fixados com cola (Lactite Super cola 3), num substrato poroso feito de cimento, areão e água (Figura.4).

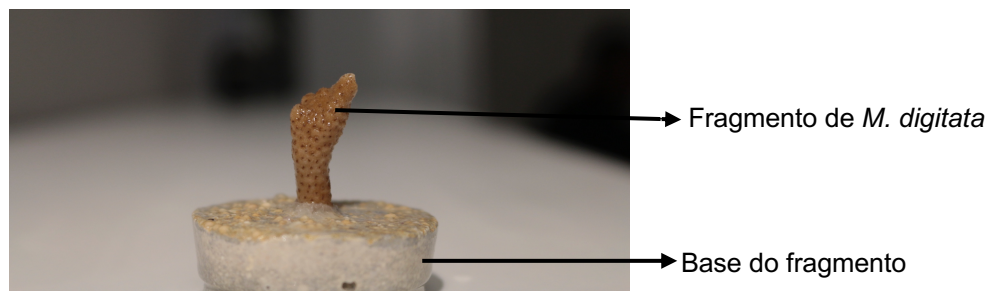


Figura 4. Ilustração do fragmento de coral e a base.

2.4. Desenho experimental

Após fragmentação, os corais foram devidamente etiquetados e distribuídos por 8 tratamentos (n=7), que resultaram da combinação de 2 valores de PAR, 2 espectros e proveniência. O estudo realizou-se em tanques experimentais idênticos aos tanques de aclimação anteriormente descritos. Testaram-se dois valores de PAR e dois espectros de luz nos corais provenientes das colônias aclimatadas nas condições de luz anteriormente referidas (Figura 5).

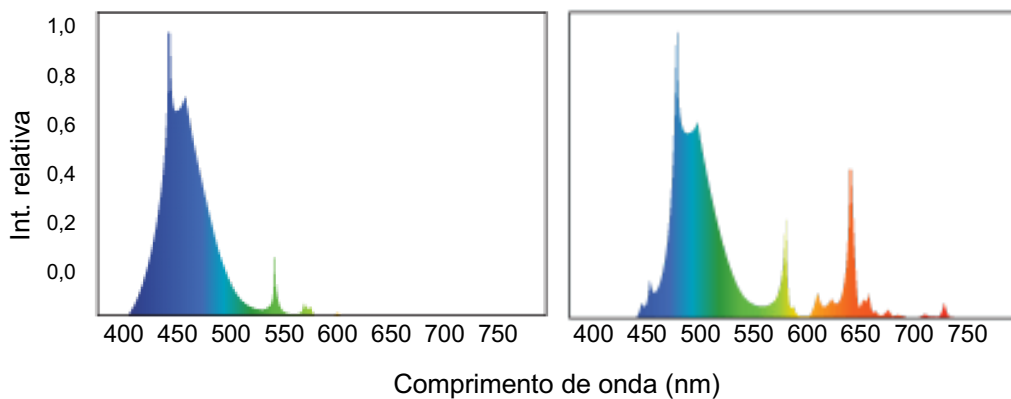


Figura 5. Espectro de luz azul e vermelha absorvidos pelos corais.

O PAR de cada espectro de cada fonte foi obtido pela medição aleatória em pontos diferentes do sistema, por medidor de fluxo quântico (Apogee, MQ-510) com um sensor submersível. Para obter uma intensidade da luz baixa foi colocada uma rede sobre uma área do tanque de cultivo, para obter uma área de sombra com PAR de $70 \pm 10 \mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Na restante área do tanque o valor médio de PAR foi de $130 \pm 20 \mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Utilizou-se um fotoperíodo de 14D:10N horas de luz: horas de escuro e realizaram-se os mesmos procedimentos de trocas parciais de água descritas para o período de aclimatação das colônias.

2.5. Avaliação de sobrevivência e crescimento

Para a avaliação do crescimento foram tiradas fotografias no início (T0) e no final dos quatro meses usando uma camera fotográfica (Canon 70D lente de 60mm) a uma distância focal de 26 cm do sensor da lente ao fragmento.

As medições das fotos para o crescimento foram feitas no aplicativo *Coral Point Conte* (CPCe) versão 3.6. A calibração (Figura 6) foi feita com base na foto da escala (régua) tirada a 26, 30, 35 e 40 cm de distancia do alvo, houve necessidade de se ajustar as distâncias focais visto que alguns fragmentos cresceram acima da distância focal do T0. Foram feitas seis medições de pixéis por um centímetro, e calculada a média e o desvio padrão. A média do número de pixéis por centímetro foi utilizada como escala nas imagens em suas respectivas distâncias. Em cada fragmento foi calculado a distância vertical entre a base e a parte mais alta da colónia. A taxa de crescimento vertical foi calculada pelo rácio do tamanho final por inicial (T1/T0). Nesta análise não foi calculada a taxa de expansão lateral.

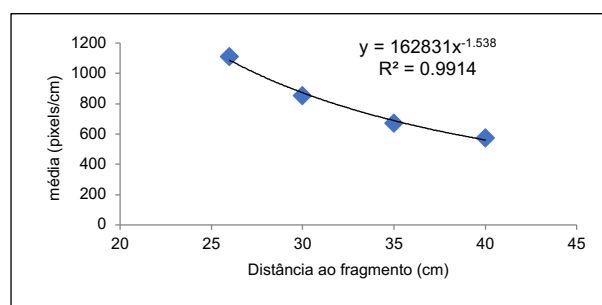


Figura 6. Reta de calibração da distância focal ao fragmento.

2.6. Atividade fotossintética *in vivo*

Após a avaliação do crescimento mediu-se a atividade fotossintética usando o PAM (Pulse Amplitude Modulation fluorometry) no início (T0) e no fim (T1) da amostragem, para a medição da eficiência fotossintética (Fv/Fm). Os corais foram aclimatados no escuro por um período de 15 a 20 minutos de modo a ter uma ativação completa do aparelho fotossintético do *Symbiodinium* sp. (Bhagooli and Hidaka, 2004; Dustan, 1982; Titlyanov et al., 2002). As medições foram feitas com luz azul LED (com pico de 450 nm e uma largura de banda a 20 nm) num fio de fibra ótica plástica de 1.5mm. A fibra ótica foi posicionada perpendicularmente à superfície do fragmento do coral, para determinar a fluorescência de nível mínimo ou escuro (F₀), parâmetro conhecido como estando relacionado como conteúdo de clorofila (Ptushenko et al., 2017; Rocha et al., 2013b). Posteriormente aplicou-se um pulso de saturação por um período de 0.8 s para obter a fluorescência máxima (F_m). Estes parâmetros (F₀ e F_m) foram usados a fim de determinar a quantidade máxima do rendimento quântico de PSII de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{f_v}{f_m} = \frac{f_m - f_0}{f_m}$$

Onde: f_v : Fluorescência variável, f_m : Fluorescência máxima e f_0 - Fluorescência inicial.

2.7. Quantificação de células (*Symbiodinium* sp.)

No início da experiência (T0) foram removidos fragmentos das colónias mãe, para determinação do número de células e para as análises bioquímicas, de acordo com as metodologias descritas abaixo para os fragmentos.

No final, após quatro meses de cultivo, cada fragmento foi dividido em dois pedaços, um deles foi fixado e corado com solução de Lugol a 4% para a contagem de células (*Symbiodinium* sp.) e o outro rapidamente congelado em azoto líquido e armazenado a -80°C, para posterior análise de biomarcadores de alocação de energia celular.

O tecido dos fragmentos foi removido usando um “airpick” com compressor de ar. Juntamente com a pressão do ar, o “airpick” liberta um jato de água,

removendo o tecido de *M. digitata*. O tecido removido foi colocado num tubo cônico de 50 mL, adaptando o método de Johannes and Wiebe (1970). As células foram contadas no microscópio ótico numa câmara de hemocitômetro de Neubauer melhorada (no mínimo de 4 contagens por amostra).

Os esqueletos dos fragmentos de onde foram removidos os tecidos foram envolvidos em papéis de alumínio para determinar a área (cm²) do esqueleto e normalizar o número de células à superfície de coral (células cm⁻²).

Efetuiu-se previamente uma calibração com a relação área/peso de diversos pedaços de papel de alumínio (Figura 7), utilizando o método descrito por (Marsh, 1970).

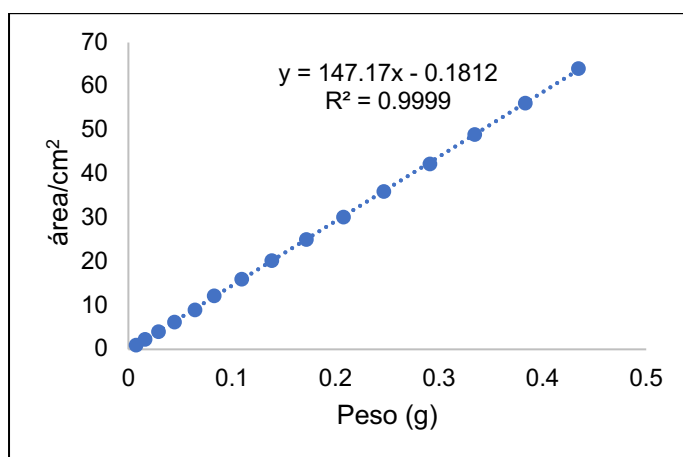


Figura 7. Reta de calibração do papel de alumínio

2.8. Biomarcadores bioquímicos

Amostras de tecido de corais *M. digitata*, congelados em azoto líquido imediatamente após a amostragem e armazenados a -80 °C, foram esmagados individualmente no almofariz com azoto líquido e homogeneizadas em água ultrapura, em gelo. De cada amostra, três alíquotas foram retiradas para a análise do conteúdo em lípidos, açúcares e proteínas, assim como da atividade da cadeia transportadora de elétrões. Todas as determinações de biomarcadores foram realizadas espectrofotometricamente, em microensaios montados em placas de 96 poços de fundo plano, com o leitor Microplate MultiSkan Spectrum (Thermo Fisher Scientific, EUA).

2.8.1. Alocação de Energia Celular (CEA)

Energia disponível (E_a) é obtida através da soma de açúcares, lípidos e proteínas e consumo de energia (E_c) é estimado através da atividade da cadeia transportadora de elétrons (ETS), que foram determinados pelos métodos descritos por De Coen and Janssen (1997) com ligeiras modificações para microplacas (Rodrigues et al., 2015). O valor final do CEA é calculado como: $CEA = E_a/E_c$ (Verslycke et al., 2004).

2.8.2. Energia disponível (E_a)

O conteúdo total de lípidos de cada amostra é determinado adicionando clorofórmio, metanol e água ultrapura numa proporção de 2:2:1. Após a centrifugação, a fase orgânica de cada amostra é transferida para tubos de vidro e é adicionado H_2SO_4 antes da incubação durante 15 min a 200 °C. A absorvância é medida a 375 nm e a tripalmitina é usada como padrão. A quantificação de açúcares é realizada pela adição de 5% de fenol e H_2SO_4 às amostras, com glicose como padrão, e a absorvância lida a 492 nm. O método de Bradford (Bradford, 1976) é usado para quantificação do conteúdo de proteína total usando albumina de soro bovino como padrão e medindo a absorvância a 520 nm. As frações de energia disponíveis são convertidas em valores de equivalentes energéticos usando a energia de combustão correspondente: 39500 mJ/g de lípido, 17500 mJ/g de glicogénio, 24000 mJ/g de proteína (Gnaiger, 1983).

2.8.3. Consumo de energia (E_c)

A atividade da cadeia transportadora de elétrons é medida utilizando o ensaio de redução INT (Iodo nitro tetrazólio), é medida a taxa de redução de INT na presença do detergente não iónico Triton X-100, com a absorvância lida a 490 nm. A taxa de consumo de oxigênio celular é calculada com base na relação estequiométrica em que para 2 μ mol de formazan formado, 1 μ mol de oxigênio é

consumido. O valor de energia consumida é obtido pela conversão em valores energéticos usando o equivalente oxigênio específico para uma mistura média de lipídios, proteínas e açúcares de 480 kJ/mol O₂ (Gnaiger, 1983)

2.9. Análise de dados

As análises estatísticas foram feitas usando quatro aplicativos. Para a medição dos corais usou-se o *Coral Point Conte* (CPCe) versão 3.6, com a calibração feita com base na foto da escala (régua) tirada a 26, 30, 35 e 40 cm de distância do fragmento. A taxa de crescimento vertical foi calculada pelo rácio do tamanho final / inicial (T1/T0). Para os restantes parâmetros avaliados utilizou-se o SPSS 23, Jasp 4.3 e o Matlab 2018. Efetuou-se uma anova mista 2*2*2*2 (2^K; K=4) com 3 fatores “between” (Colónia Mãe: escura vs. clara; Cor: azul vs. vermelho, Intensidade: baixa vs. alta) e 1 fator “within” (Tempo: pré vs. pós tratamento) para avaliar as diferenças a nível do crescimento, fotobiologia (Fv/Fm), biomarcadores e quantidades de *Symbiodinium* sp.

3. Resultados

Apesar da mesma origem genética, verificou-se que após o período de aclimação das colónias mãe às duas condições de intensidade de radiação fotossintética ativa (70 ± 10 e $130 \pm 20 \mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), em espectro total, as colónias aclimatadas à intensidade mais baixa denotavam uma coloração substancialmente mais escura que as colónias aclimatadas a uma intensidade de luz mais elevada, designadas assim como colónias claras.

3.1. Sobrevivência e Crescimento

Após o término da experiência, num total de 56 amostras, provenientes de duas colónias mãe (escura e clara) expostas a espectro de luz azul e vermelha, a um PAR de 130 ± 20 e $70 \pm 10 \mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ respetivamente, houve sucesso em termos de sobrevivência de 100% em todos tratamentos, pelo período de teste de quatro meses.

Com o intuito de avaliar o impacto das variáveis: colónia mãe, cor e intensidade no crescimento foi realizada uma anova $2 \times 2 \times 2$ (Colónia Mãe: escura vs. clara; Cor luz: azul vs. vermelho, Intensidade: baixa vs. alta) em que a variável dependente foi o rácio $T1/T0$ (tabela 1).

Tabela 1. Análise do crescimento observado em relação o tipo de luz e intensidade

ANOVA – Rácio T1/T0

Casos	Soma dos quadrados	df	Média dos quadrados	F	p	VS-MPR*	ω^2
COLÓNIA	1.174	1	1.174	6.180	0.018	5.182	0.103
COR	0.027	1	0.027	0.142	0.709	1.000	0.000
INTENSIDADE	0.189	1	0.189	0.993	0.326	1.007	0.000
COLÓNIA * COR	0.094	1	0.094	0.492	0.487	1.000	0.000
COLÓNIA * INTENSIDADE	9.775e -4	1	9.775e -4	0.005	0.943	1.000	0.000
COR * INTENSIDADE	0.862	1	0.862	4.537	0.040	2.863	0.070
COLÓNIA * COR * INTENSIDADE	0.025	1	0.025	0.134	0.716	1.000	0.000
Residual	7.029	37	0.190				

Note. Type III Sum of Squares

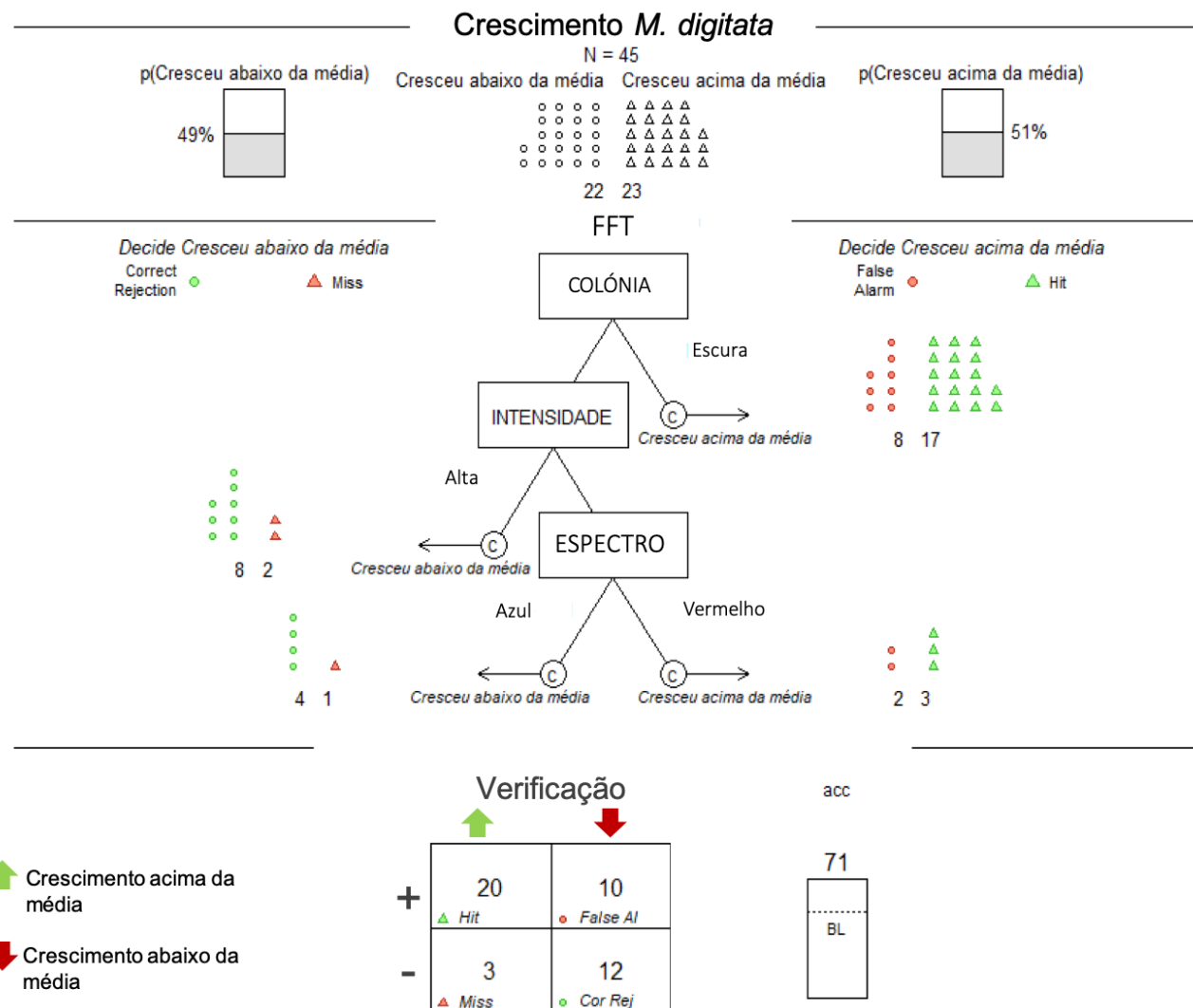


Figura 8. Diagrama com modelo de avaliação de parâmetros de crescimento de *M. digitata*.

O diagrama (Figura 8) mostra uma avaliação do crescimento do coral *M. digitata* tendo em consideração as variáveis (Colônia, Intensidade, Espectro). Foi feita uma análise FFT (“fast frugal decision trees”) dividindo a amostra em duas partes: crescimento acima e abaixo da média, foi observado 71% a nível da precisão do modelo, tendo um acerto de 32 e um erro de 13, com o rácio de 2.5, de acordo com a medida de verificação. O fator mais importante a considerar no cultivo de corais é a colônia mãe (Origem) e por último o espectro de luz.

Foi registado o efeito principal de Colônia mãe $F(1, 37)=6.180$, $p=.018$ com o crescimento a ser significativamente maior nos fragmentos provenientes da colônia escura, independentemente do tratamento. Foi ainda obtida uma interação Cor*intensidade. Esta interação materializa-se num maior crescimento dos corais expostos a uma intensidade alta, com o tratamento de luz azul, e por um maior crescimento dos corais expostos a uma intensidade baixa com o tratamento de luz vermelha (Figura 9 e 10).

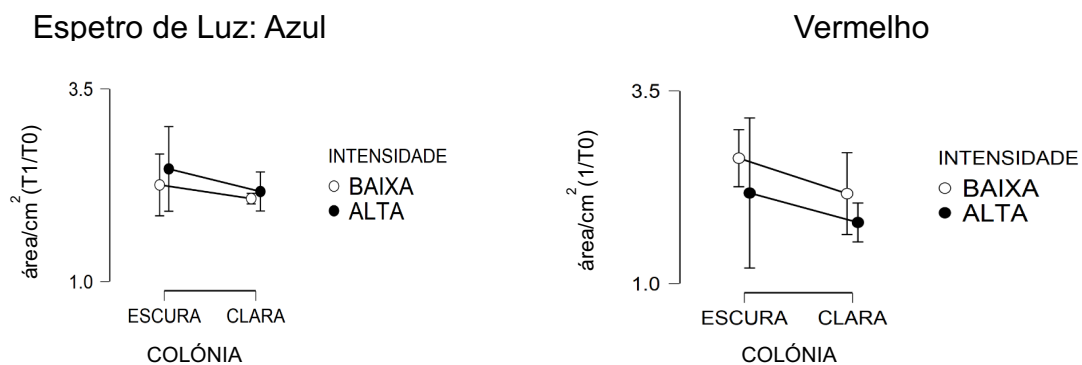


Figura 9. Diferenças no crescimento dos fragmentos de *M. digitata* proveniente de colônias mãe aclimatadas a diferentes intensidades de luz (intensidade alta – colônia clara, intensidade baixa – colônia escura), cultivados em diferentes espectros (azul e vermelho) e intensidades de luz (70 ± 10 e $130 \pm 20 \mu\text{mol quanta. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).



Figura 10. Ilustração de fragmentos de coral no pré e pós tratamento.

3.2. Atividade fotossintética *in vivo*

No que diz respeito à eficiência fotossintética, avaliada com o rácio de fluorescência F_v/F_m , o gráfico da média obtida por tempo (T0 e T1), colónia (escura e clara), espectro de luz (azul e vermelha) e Intensidade da luz (baixa e alta) encontra-se na figura 11.

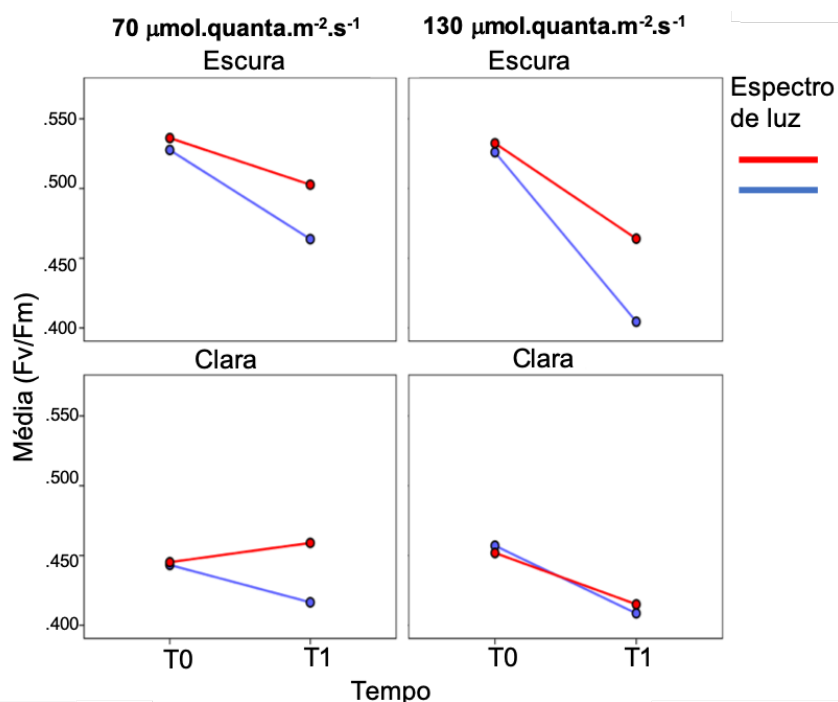


Figura 11. Valor médio do F_v/F_m no início (T0) e no fim (T1) do período experimental, dos fragmentos de *M. digitata* fragmentados de colónias mãe aclimatadas a diferentes intensidades de luz (intensidade alta – colónia clara, intensidade baixa – colónia escura), cultivados em diferentes espectros (azul e vermelho) e intensidades de luz (70 ± 10 e $130\pm 20 \mu\text{mol}\cdot\text{quanta}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

No sentido de avaliar o significado estatístico das diferenças absolutas registadas no gráfico 1 foi efetuada uma anova mista $2^2 \times 2^2$ (2^K ; $K=4$) com 3 fatores “between” (Colónia Mãe: escura vs. clara; Cor: azul vs. vermelho, Intensidade: baixa vs. alta) e 1 fator “within” (Tempo: pré vs. pós tratamento). Os resultados desta análise mostraram efeitos principais de tempo ($F(1,37)=105.694$, $p<.001$, VS-MPR¹= 6.38×10^9 , $\omega^2=.575$), de colónia mãe ($F(1,37)=145.550$, $p<.001$, VS-MPR= 5.38×10^{11} , $\omega^2=.648$) de Cor ($F(1,37)=17.409$, $p<.001$, VS-MPR=243.058,

¹* Vovk-Sellke Maximum p -Ratio: Calculado com base no valor de p ; chances máximas a favor da hipótese alternativa (H_1) sobre a hipótese nula (H_0) = $1/(-e \cdot p \log(p))$ for $p \leq .37$ (Sellke, Bayarri, & Berger, 2001).

$\omega^2=.074$) e de Intensidade ($F(1,37)= 12.433$, $p<.001$, VS-MPR=47.475, $\omega^2=.051$). Foram ainda registadas interações significativas tempo*colónia mãe ($F(1,37)= 25.363$, $p<.001$, VS-MPR=2585.478, $\omega^2=.239$), tempo*cor ($F(1,37)= 13.114$, $p<.001$, VS-MPR=59.797, $\omega^2=.135$) e tempo*intensidade ($F(1,37)= 19.349$, $p<.001$, VS-MPR=444.229, $\omega^2=.192$). Não foram registadas outras interações simples, duplas ou triplas (todos $p< .085$), destacando-se o facto de não ter sido observada nenhuma interação entre fatores “between”.

No que diz respeito à variável tempo, o efeito principal obtido materializa-se por uma menor eficiência fotossintética no pós-teste. Contudo, tendo em conta os valores absolutos presentes no gráfico da figura 11 e a interações registadas parece que este efeito está a ser arrastado por determinados níveis de outros fatores. De facto uma análise de efeitos principais simples da variável tempo com a moderação da variável Colónia mãe mostrou que apesar de se registarem diferenças significativas entre T0 e T1 em ambas as colônias de proveniência, o efeito para a colônia escura ($F=158.98$, $p<.001$) é muito maior do que o efeito obtido na colónia clara ($F=10.12$, $p=.006$) ver diferença nos efeitos na figura 12.

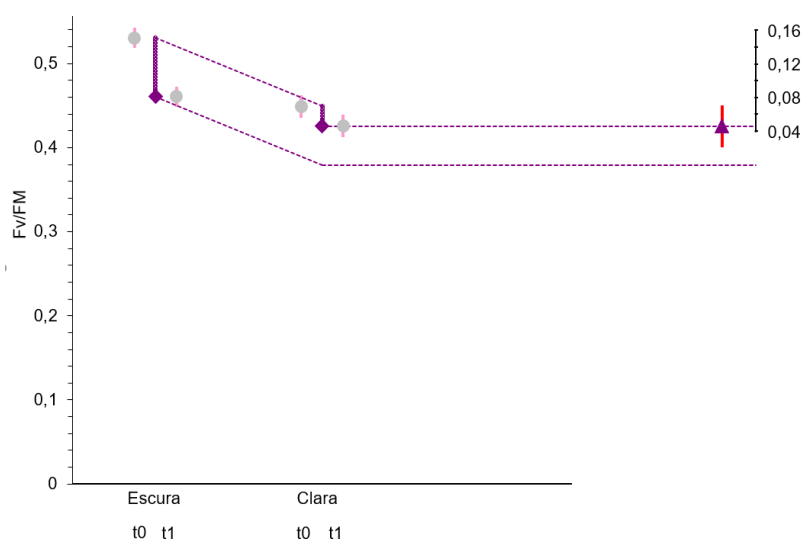


Figura 12. Efeitos de Tempo para cada uma das colónias de proveniência.

Numa análise mais detalhada verifica-se que este resultado ainda depende da intensidade da luz, sendo que a eficiência fotossintética desceu significativamente nos corais provenientes da colónia escura, independentemente

da intensidade da luz exposta, enquanto que nos corais provenientes da colônia clara a descida de eficiência apenas se registou quando estes estavam expostos a alta intensidade da luz ($F=0.345$, $p=.573$). Este resultado parece estar a ser arrastado devido a uma flutuação positiva na exposição ao espectro vermelho ($F=1.344$, $p=.276$).

Relativamente à variável colônia mãe, o efeito principal obtido na ANOVA (ver resultado da anova acima referido) mostrou uma eficiência fotossintética significativamente maior nos fragmentos das colônias escuras do que nos fragmentos provenientes das colônias claras. Os efeitos principais simples usando os outros fatores como moderadores mostraram que apesar da interação tempo*colônia mãe, a colônia escura tem maior eficiência fotossintética independentemente do nível dos outros fatores (''all'' $p<.05$).

No que coaduna à variável Cor, o efeito principal registado, deriva de uma maior eficiência fotossintética quando os corais foram expostos ao espectro de cor vermelha. Contudo, os resultados dos efeitos principais simples mostraram que enquanto que na colônia escura o vermelho é significativamente melhor independentemente da intensidade, na colônia clara não existem diferenças entre cores para ambas as intensidades de luz.

Em relação à variável intensidade, o efeito principal é objetivado por uma superioridade significativa de eficiência fotossintética dos corais expostos à intensidade baixa. O efeito da intensidade depende da colônia mãe, só sendo registado na colônia escura ($F=21.142$, $p<.001$) e da cor da luz, apenas com significado estatístico para o vermelho ($F=17.070$, $p<.001$).

3.3. Quantificação de células (*Symbiodinium* sp.)

No que diz respeito à contagem de células, avaliada o rácio células/área o gráfico da média obtida por tempo (T0 e T1), Colônia Mãe (escura e clara), Cor da luz (azul e vermelha) e Intensidade da luz (baixa e alta) encontra-se na figura 13.

A anova mista $2*2*2*2$ (Colônia Mãe: escura vs. clara; Cor: azul vs. vermelha, intensidade: (baixa vs. alta) e 1 fator "within" (tempo: pré vs. pós tratamento) mostrou efeitos principais de tempo ($F(1,37)=68.039$, $p<.001$, VS-

MPR=2.63x10⁷, ω^2 =.469), de Cor ($F(1,37)$ =9.232, p <.01, VS-MPR=15.566, ω^2 =.141) e de Intensidade ($F(1,37)$ = 8.191, p <.01, VS-MPR=10.727, ω^2 =.123). Não foram registados efeitos significativos de colónia mãe ($F(1,37)$ =2.631, p =.113, VS-MPR=1.491, ω^2 =.028). No que diz respeito às interações, foram registadas interações significativas Tempo*Intensidade ($F(1,37)$ =8.191, p =.007, VS-MPR=10.727, ω^2 =.123) e Tempo*cor ($F(1,37)$ =9.232, p =.004, VS-MPR=15.566, ω^2 =.141).

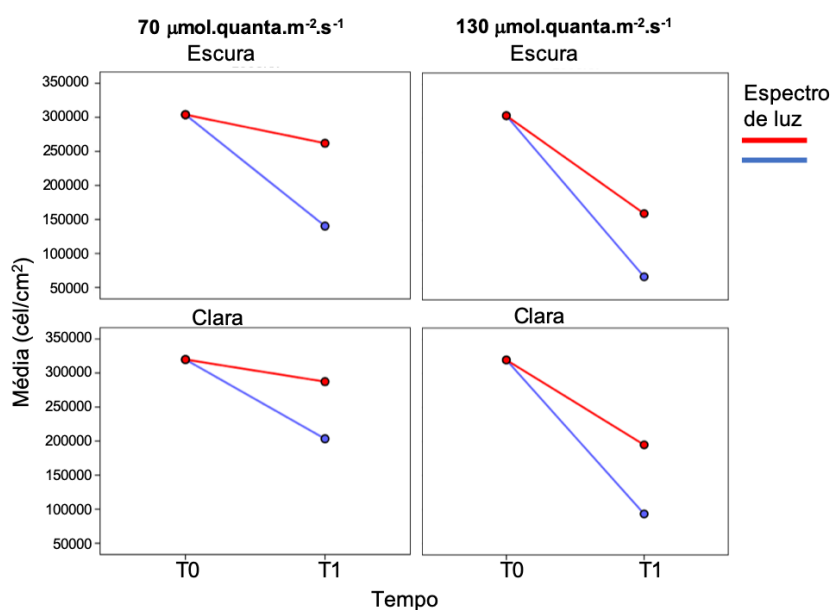


Figura 13. Valor médio do número de células.cm⁻² no início (T0) e no fim (T1) do período experimental, dos fragmentos de *M. digitata* fragmentados de colónias mãe aclimatadas a diferentes intensidades de luz (intensidade alta – colónia clara, intensidade baixa – colónia escura), cultivado em diferentes espectros (azul e vermelho) e intensidades de luz (70±10 e 130±20 µmol quanta.m⁻².s⁻¹).

Relativamente ao efeito da cor registado, este mostrou ser independente da colónia mãe, atingindo resultados significativo quer na clara ($F=4.751$, p <.05) como na escura ($F=5.406$, p <.05). O mesmo não aconteceu para o efeito da intensidade que apenas é significativo quando a proveniência é luz clara ($F=6.409$, p <.05). A intensidade alta regista significativamente maiores valores de células para a cor vermelha e para o azul. Com isso, os resultados parecem evidenciar uma quantidade de células significativamente maior para a cor vermelha, independentemente de outros fatores e uma menor no pós tratamento, e uma menor quantidade na intensidade alta apenas para a colónia clara.

Assim, os resultados parecem evidenciar uma quantidade de células significativamente maior para a luz vermelha, independentemente de outros fatores e um menor número de células no pós fragmento.

3.4. Biomarcadores bioquímicos

Tendo em conta a fórmula de cálculo da Energia disponível (E_a), e a possibilidade de esconder ou arrastar efeitos unitários de cada um dos macronutrientes (Proteínas, Lípidos e Açúcares) foi realizada uma análise individual. As figuras seguintes mostram as médias dos três macronutrientes para o T0 e T1² por colónia mãe (escura e clara).

3.4.1. Lípidos

Em relação aos lípidos, o gráfico da média obtida para o T0 e T1 por colónia mãe (escura e clara), cor da luz (azul e vermelha) e intensidade da luz (baixa e alta) encontra-se na figura 14.

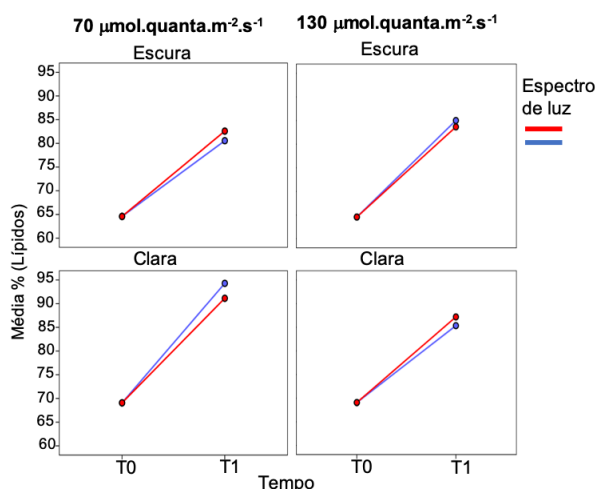


Figura 14. Valor médio da percentagem do teor lipídico no início (T0) e no fim (T1) do período experimental, dos fragmentos de *M. digitata* fragmentados de colónias mãe aclimatadas a diferentes intensidades de luz (intensidade alta – colónia clara, intensidade baixa – colónia escura), cultivados em diferentes espectros (azul e vermelho) e intensidades de luz (70 ± 10 e 130 ± 20 $\mu\text{mol. quanta. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

² * Vovk-Sellke Maximum p -Ratio: Calculado com base no valor de p ; chances máximas a favor da hipótese alternativa (H_1) sobre a hipótese nula (H_0) = $1/(-e p \log(p))$ for $p \leq .37$ (Sellke, Bayarri, & Berger, 2001).

Os resultados da anova mista 2*2*2*2 (colónia mãe: escura vs. clara; cor: azul vs. vermelho, intensidade: baixa vs. alta) e 1 fator envolvido (Tempo: pré vs. pós tratamento) mostraram apenas efeito principal de tempo ($F(1,37)=399.961$, $p<.001$, VS-MPR= 8.12×10^{17} , $\omega^2=.847$) e de colónia mãe ($F(1,37)=32.353$, $p<.001$, VS-MPR= 14078.071 , $\omega^2=.412$) materializados pela maior percentagem de lípidos antes do tratamento e em corais provenientes de colónia clara. Foi ainda registada uma interação significativa entre Colónia mãe e Intensidade ($F(1,37)=5.637$, $p<.01$, VS-MPR= 4.213 , $\omega^2=.061$). Esta interação concretizar-se pelo facto de quando a proveniência do coral é a colónia clara obteve-se valores mais elevados para a intensidade baixa, enquanto que quando os corais proveem da colónia escura os valores mais elevados obtêm-se na intensidade alta.

3.4.2. Açúcares

No que diz respeito aos Açúcares, o gráfico da média obtida para o T0 e T1 por colónia mãe (escura e clara), cor da luz (azul e vermelho) e intensidade da luz (baixa e alta) encontra-se na figura 15.

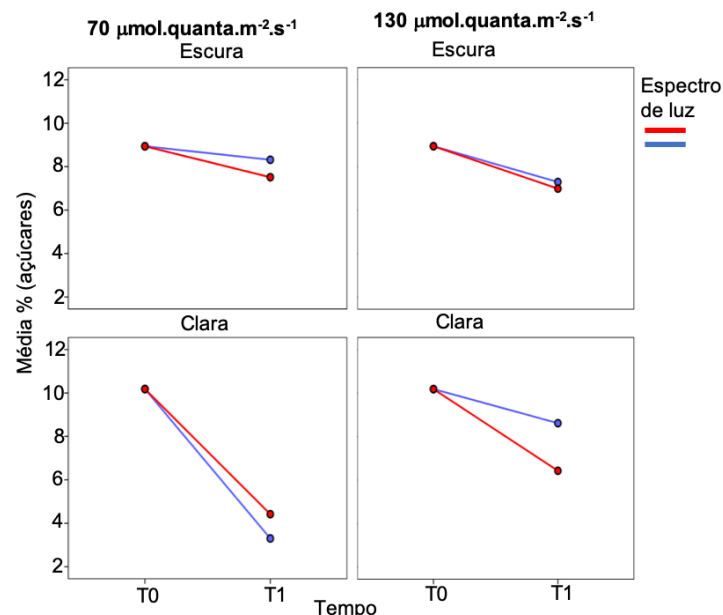


Figura 15. Valor médio da percentagem do teor açúcares no início (T0) e no fim (T1) do período experimental, dos fragmentos de *M. digitata* fragmentados de colónias mãe aclimatadas a diferentes intensidades de luz (intensidade alta – colónia clara, intensidade baixa – colónia escura), cultivados em diferentes espetros (azul e vermelho) e intensidades de luz (70 ± 10 e $130 \pm 20 \mu\text{mol quanta. m}^{-2}\text{s}^{-1}$).

A Anova mista 2*2*2*2 (colónia mãe: escura vs. clara; cor: azul vs. vermelho, intensidade: baixa vs. alta) e 1 fator “within” (tempo: pré vs. pós tratamento) mostrou um efeito de tempo ($F(1,37)=58.144$, $p<.001$, VS-MPR= 3.20×10^6 , $\omega^2=.442$), com menor percentagem de açúcares no T1 e interações Tempo*Colonia($F(1,37)=15.837$, $p<.001$, VS-MPR=138.620, $\omega^2=.171$) e colónia*Intensidade($F(1,37)=8.211$, $p<.01$, VS-MPR=10.592, $\omega^2=.141$) visíveis no figura 15.

3.4.3. Proteínas

No que diz respeito às proteínas, o gráfico da média obtida para o T0 e T1 por colónia mãe (escura e clara), cor da luz (azul e vermelho) e intensidade da luz (baixa e alta) encontra-se na figura 16.

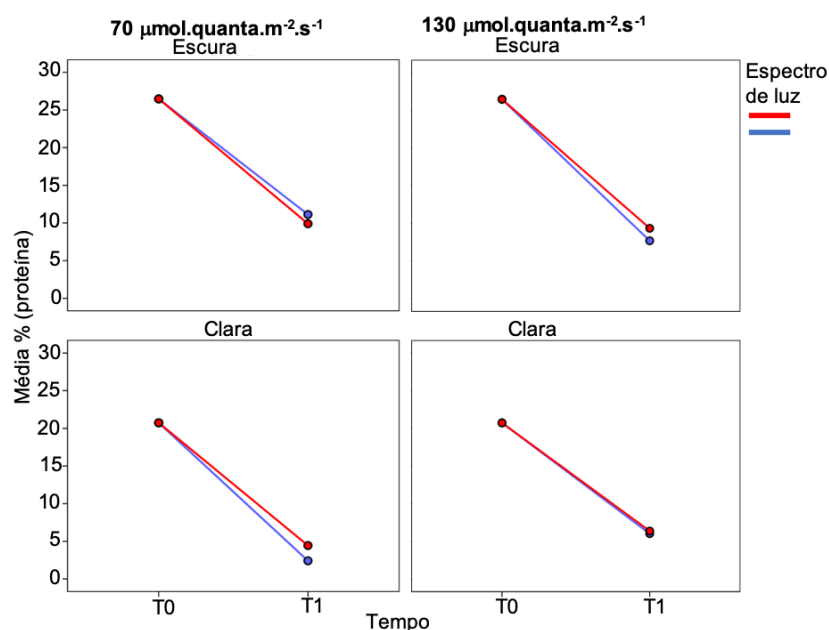


Figura 16. Valor médio da percentagem de proteínas no início (T0) e no fim (T1) do período experimental, dos fragmentos de *M. digitata* fragmentados de colónias mãe aclimatadas a diferentes intensidades de luz (intensidade alta – colónia clara, intensidade baixa – colónia escura), cultivados em diferentes espetros (azul e vermelho) e intensidades de luz (70 ± 10 e $130 \pm 20 \mu\text{mol.quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

A Anova mostrou apenas um efeito principal de tempo ($F(1,37)=595.768$, $p<.001$, VS-MPR= 4.81×10^{20} , $\omega^2=.892$), com menor percentagem de proteínas no

T1 e de colónia ($F(1,37)=60.071$, $p<.01$, $VS-MPR=4.51 \times 10^6$, $\omega^2=.588$) com maior percentagem de proteínas dos corais provenientes da colónia escura.

3.4.4. Alocação de energia celular

Em relação à alocação de energia, avaliada com o rácio energia disponível/Energia consumida, o gráfico da média obtida para o T0 e T1³ por colónia mãe (escura e clara), cor da luz (azul e vermelho) e Intensidade da luz (baixa e alta) encontra-se na figura 17.

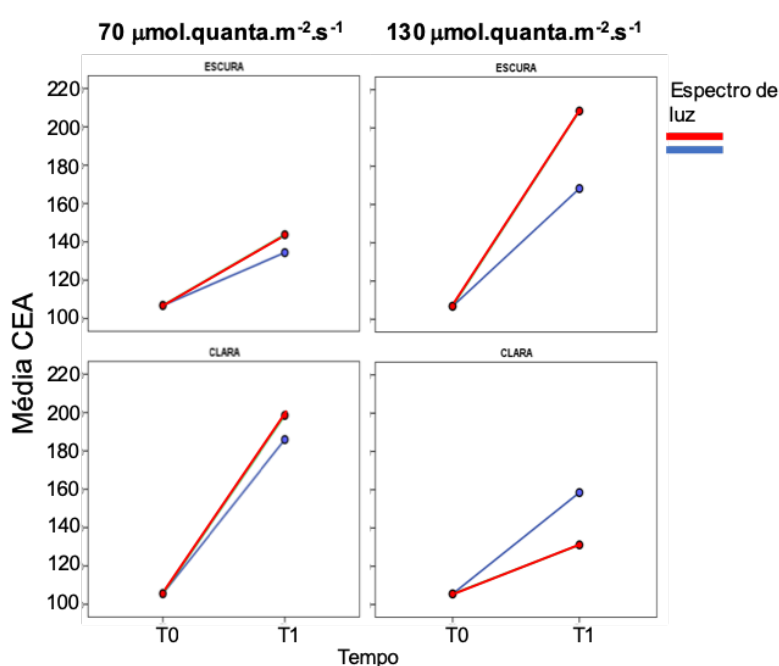


Figura 17. Valor médio de alocação de energia celular (CEA) no início (T0) e no fim (T1) do período experimental, dos fragmentos de *M. digitata* fragmentados de colónias mãe aclimatadas a diferentes intensidades de luz (intensidade alta – colónia clara, intensidade baixa – colónia escura), cultivados em diferentes espectros (azul e vermelho) e intensidades de luz (70 ± 10 e 130 ± 20 $\mu\text{mol quanta}$).

Os resultados da anova mista $2 \times 2 \times 2 \times 2$ (Colónia Mãe: Escura vs. Clara; Cor: azul vs. vermelho, Intensidade: baixa vs. alta) e 1 fator “within” (Tempo: pré vs. pós tratamento) mostraram apenas efeito principal de tempo ($F(1,44)=40.663$, $p<.001$, $VS-MPR=183867.660$, $\omega^2=.321$) com um aumento da alocação energética do T0

³ O gráfico do momento t0 (pré-tratamento) não foi “plotado” por COR e INTESIDADE, uma vez que, ao contrário do que aconteceu na fotoluminescência, o t0 era constante entre condições, variando apenas para a colónia (ver método). O tempo foi utilizado apenas para a inferência estatística.

para o T1. Não foram obtidos efeitos principais de Cor ($F(1,44)=0.308$, $p=.582$, VS-MPR=1, $\omega^2=.0$), de Intensidade ($F(1,44)=0.071$, $p=.791$, VS-MPR=1, $\omega^2=.0$) nem de colônia mãe ($F(1,44)=0.592$, $p=.446$, VS-MPR=1, $\omega^2=.0$). Foi ainda registada uma interação significativa entre colônia mãe e Intensidade ($F(1,44)=6.445$, $p<.01$, VS-MPR=5.834, $\omega^2=.108$). Esta interação materializa-se pelo facto de quando a proveniência do coral é a colônia clara obteve-se valores mais elevados para a intensidade baixa, enquanto que quando os corais proveem da colônia escura os valores mais elevados obtêm-se na intensidade alta.

Exploração de Potenciais cruzamentos de variáveis

Com o intuito ter uma vista geral das flutuações simultâneas das variáveis em estudo foi realizado um gráfico de análise visual dos dados (Figura 17)

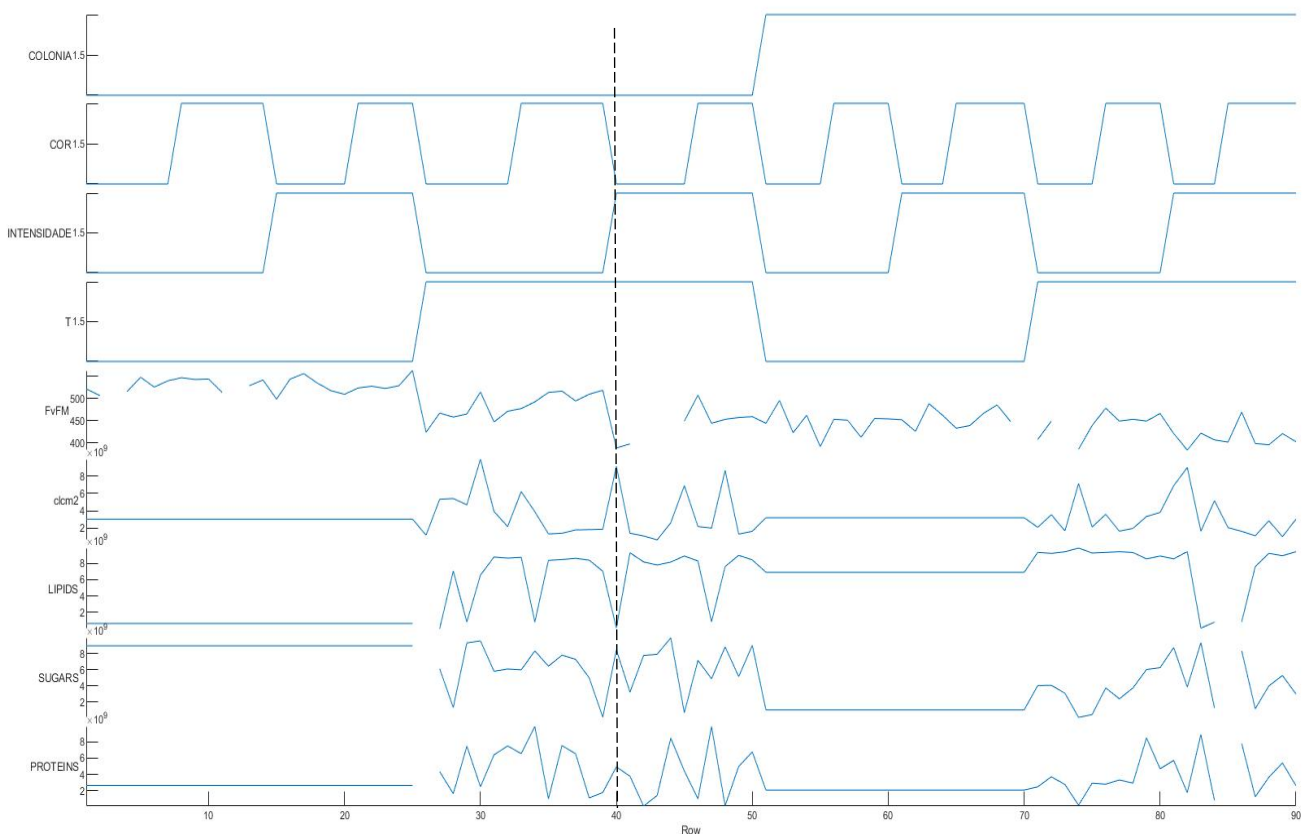


Figura 18. Análise visual para todas as variáveis em estudo

Através de uma análise visual dos dados (Figura 13) podemos verificar um padrão oposto no número de células (*Symbiodinium* sp.) e nos lípidos. Parece ainda que o número de células (*Symbiodinium* sp.) tem ainda uma flutuação muito semelhante às proteínas. É notória ainda uma maior eficiência fotossintética para os corais provenientes de colônia escura. Este último resultado também é notório nas correlações paralelas (Figura 19), mostrando a importância da proveniência do coral. Uma análise exploratória de matrizes correlacionais entre o Fv/Fm e a percentagem de proteínas quando a intensidade é alta, não acontecendo quando a intensidade luminosa é baixa. Por outro lado, foi encontrada uma correlação estatisticamente significativa entre o número de células e a percentagem de lípidos apenas quando a intensidade é alta (ver Figura 14).

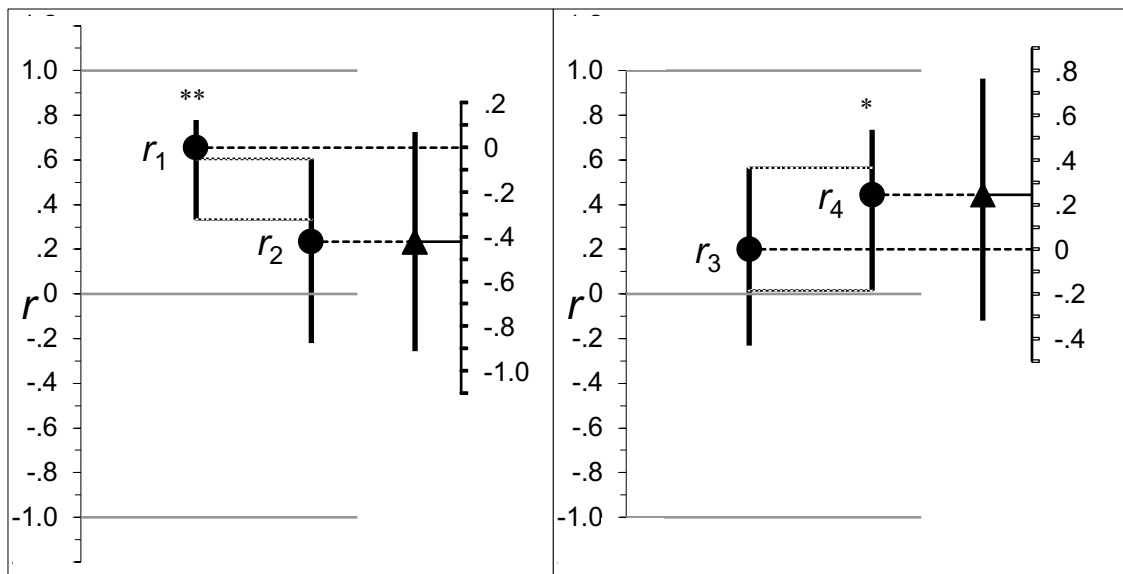


Figura 19. Correlações paralelas: Colônia Mãe x Fv/Fm: r_1 = Correlação entre Fv/Fm e Proteínas quando Intensidade é Baixa; r_2 = Correlação entre Fv/Fm e Proteínas quando Intensidade é Alta; r_3 = Correlação entre número de células de *Symbiodinium* sp. por cm^2 e lípidos quando intensidade é baixa; r_4 = correlação entre n° cél. cm^{-2} e lípidos quando intensidade é alta. * $p < .05$; ** $p < .001$.

4. Discussão

As condições de luz, água e manejo do sistema a que foram expostos os organismos em estudo mostraram-se adequadas ao cultivo desta espécie de corais, uma vez que foi verificado uma percentagem de sobrevivência de 100%, tal como em estudos realizados anteriormente com outras espécies neste laboratório (Costa et al., 2016; Rocha et al., 2013b).

A sensibilidade dos corais a diferentes intensidades luminosas tem sido estudada e é sabido que intensidades mais elevadas (acima de $600 \mu\text{mol quanta. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) podem levar a deterioração do tecido do coral e conseqüentemente a mortalidade (Khalesi et al., 2009; Wijgerde et al., 2014). No entanto estes valores situam-se muito acima dos valores utilizados nesta experiência.

Em termos de crescimento, os corais expostos a uma intensidade baixa com o tratamento de luz vermelha apresentaram um melhor crescimento, tal como foi verificado noutras espécies por diferentes autores (Papina et al., 2007; Rocha et al., 2013b). Neste ensaio, isto foi verificado principalmente nos fragmentos de coral provenientes de colónias mãe escuras, aclimatadas a luz com baixa intensidade PAR. Assim, podemos considerar que a proveniência da colónia mãe, em termos de exposição à luz, é um facto muito importante para o sucesso no cultivo de corais. De salientar que o crescimento da *M. digitata* pode ser vertical e horizontal (Harpeni and David, 2011), pelo que foram observados alguns fragmentos que apresentavam um crescimento horizontal sobre a base. Sendo um fator que se deve ter em conta no cultivo de organismos com crescimento tridimensional, no uso de fotografias para avaliar o crescimento (Kikuzawa et al., 2018).

A respeito da eficiência fotossintética, há maior eficiência das colónias escuras, aclimatadas a luz de baixa intensidade, em comparação com as colónias claras, aclimatadas a luz de elevada intensidade, o que está de acordo com os resultados observados por vários autores (DiPerna et al., 2018; Khalesi et al., 2009; Leuzinger et al., 2012; Rocha et al., 2013a; Titlyanov et al., 2002). Neste estudo, estas diferenças foram mais notórias nas diferentes intensidades, no espectro de luz vermelha.

Apesar de diferentes espécies de corais poderem ter diferentes exigências de luz, níveis de intensidade luminosa mais intensas podem causar uma foto

inibição, reduzindo assim a capacidade fotossintética das zooxantelas (Barton et al., 2017; Roth, 2014).

Uma outra explicação para os valores de atividade fotossintética observados pode estar relacionada com a quantidade do *Symbiodinium* sp., visto que houve um aumento do número de células por área nas colónias expostas a espectro de luz vermelha, independentemente da intensidade. No entanto, outros estudos observaram o efeito contrário (Chalker et al., 1988; Wijgerde et al., 2014), mas esta diferença pode estar associada o tipo de luz usado (LED).

Neste estudo foram também observadas diferenças na alocação de energia nos fragmentos de corais dos diferentes tratamentos registando-se uma interação significativa entre colónia mãe e intensidade de luz, em termos da composição de lípidos. Esta interação concretiza-se pelo facto de os corais provenientes de colónias claras, apresentarem uma maior percentagem de lípidos, quando expostos a intensidade baixa. O presente estudo obteve também um aumento acima da percentagem média de lípidos em comparação com o valor inicial, sendo de salientar que este comportamento ocorreu principalmente em organismos proveniente da colónia mãe clara, havendo poucas variações em termos do espectro de luz. O mesmo foi observado em estudos semelhante com a mesma espécie que teve um aumento de 50% (Leuzinger et al., 2012).

Relativamente ao conteúdo de açúcares, foi observado um decréscimo em relação ao tempo. Por outro lado, verificou-se um aumento da percentagem de proteínas dos corais provenientes da colónia escura. Um balanço geral levou aumento em termos da alocação de energia celular do T0 para T1 entre os fragmentos da colónia escura expostas a alta intensidade, havendo uma interação significativa colónia mãe-Intensidade, uma vez que os corais provenientes da colónia clara apresentaram valores elevados quando expostos a luz baixa e os corais provenientes de colónia mãe escura quando expostos a luz alta.

Verifica-se no presente estudo que a alocação de energia aumenta com a intensidade da luz à semelhança do que foi observado noutros estudos (Leuzinger et al., 2012). Possivelmente, a energia é priorizada para a sobrevivência e crescimento em intensidades altas e também para a regeneração do esqueleto nos fragmentos (Leuzinger et al., 2012). Processos semelhantes foram também

descritos em alguns organismos aquáticos (crustáceos), em que os valores de alocação de energia variam tendo em conta a estação do ano. Na primavera aloca mais energia para a suas reservas do que verão e inverno (Verslycke et al., 2004).

Neste trabalho também se observou uma correlação entre o F_v/F_m e a percentagem de proteínas, em intensidade de luz altas, independentemente do tipo de luz. Este resultado pode estar relacionado com o aumento das proteínas fluorescentes (PF), que são proteínas que absorvem maior energia e reemitem luz de menor energia (Alieva et al., 2008; Quick et al., 2018; Roth, 2014; Venton, 2016), são produzidas em quantidade para suprir alguns processos metabólicos, ou sendo um mecanismo de foto-proteção já descrito para algumas espécies (*Acropora digitifera* e *Acropora tenuis*) de baixa profundidade (Roth, 2014; Venton, 2016).

Em resumo, o presente estudo enfatiza a importância das condições de luz em que a colónia mãe se desenvolveu para o posterior sucesso no cultivo dos corais. Em forma de mimetizar o meio natural os corais que serão coletados a profundidades altas podem apresentar uma taxa de crescimento considerável em comparação aos corais recolhidos a baixa profundidade, embora estes sejam mais tolerantes a temperaturas altas comparando com os de alta profundidade (Papina et al., 2007; Rocha et al., 2013a; Wijgerde et al., 2014).

5. Conclusão

Foi notório que a luz vermelha com baixa intensidade PAR proporcionou a obtenção de melhores resultados, designadamente ao nível do crescimento, eficiência fotossintética e quantidade de endossimbiontes fotossintéticos (*Symbiodinium* sp.).

Este estudo evidencia que a origem da colónia desempenha também um papel preponderante no sucesso pós fragmentação, como forma de maximizar o crescimento. Ou seja, a recolha de corais em maior profundidade, ou aclimatados a condições de baixa intensidade luminosa, combinado com um ajuste das condições de intensidade e o espectro de luz na fase de cultivo *ex situ*, são essenciais para maximizar e otimizar a aquacultura de corais.

A conjugação destes fatores poderá ajudar na intensificação da produção de corais para uso em diversos fins, nomeadamente na restauração ou construção de recifes artificiais, na prospeção de compostos bioativos ou para a indústria de aquarofilia, reduzindo assim a captura de organismos selvagens.

6. Referencias bibliográficas

- Alieva, N.O., Konzen, K.A., Field, S.F., Meleshkevitch, E.A., Hunt, M.E., Beltran-Ramirez, V., Miller, D.J., Wiedenmann, J., Salih, A., Matz, M. V., 2008. Diversity and evolution of coral fluorescent proteins. *PLoS One* 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002680>
- Anthony, K.R.N., Kline, D.I., Diaz-Pulido, G., Dove, S., Hoegh-Guldberg, O., 2008. Ocean acidification causes bleaching and productivity loss in coral reef builders. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 17442–17446. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804478105>
- Barnes, R.D., 1987. *Invertebrate Zoology*, 5th ed. W.B. Saunders Company, UK.
- Barton, J.A., Willis, B.L., Hutson, K.S., 2017. Coral propagation: a review of techniques for ornamental trade and reef restoration. *Rev. Aquac.* 9, 238–256. <https://doi.org/10.1111/raq.12135>
- Bhagooli, R., Hidaka, M., 2004. Release of zooxanthellae with intact photosynthetic activity by the coral *Galaxea fascicularis* in response to high temperature stress. *Mar. Biol.* 145, 329–337. <https://doi.org/10.1007/s00227-004-1309-7>
- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Bradford, M. M. (1976). A Rapid Sensitive Method Quant. Microgram Quant. Protein Util. Princ. Protein-Dye Bind. 254, 248–254. 254, 248–254.
- Chalker, B.E., Barnes, D.J., Dunlap, W.C., Jokiel, P.L., 1988. Light and Reef-Building Corals. *Interdiscip. Sci. Rev.* 13, 222–237. <https://doi.org/10.1179/isr.1988.13.3.222>
- Cole, A.J., Pratchett, M.S., Jones, G.P., 2008. Diversity and functional importance of coral-feeding fishes on tropical coral reefs 286–307.
- Coles, S.L., Jokiel, P.. L., 1978. Synergistic effects of temperature, salinity and light on the hermatypic coral *Montipora verrucosa*. *Mar. Biol.* 49, 187–195. <https://doi.org/10.1007/BF00391130>
- Costa, A.P.L., Calado, R., Marques, B., Lillebø, A.I., Serôdio, J., Soares, A.M.V.M., Serrão, E.A., Rocha, R.J.M., 2016. The effect of mixotrophy in the ex situ culture of the soft coral *Sarcophyton cf. glaucum*. *Aquaculture* 452, 151–159.

- <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.032>
- Cowburn, B., Samoilys, M.A., Obura, D., 2018. The current status of coral reefs and their vulnerability to climate change and multiple human stresses in the Comoros Archipelago, Western Indian Ocean. *Mar. Pollut. Bull.* 133, 956–969. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.04.065>
- De Coen, W.M., Janssen, C.R., 1997. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular Energy Allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recover.* 6, 43–55. <https://doi.org/10.1023/A:1008228517955>
- Delbeek, J.C., 2001. Coral Farming: Past, Present and Future Trends. *Aquarium Sci. Conserv.* 1995, 171–181. <https://doi.org/10.1023/A:1011306125934>
- DiPerna, S., Hoogenboom, M., Noonan, S., Fabricius, K., 2018. Effects of variability in daily light integrals on the photophysiology of the corals *Pachyseris speciosa* and *Acropora millepora*. *PLoS One* 13, e0203882. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203882>
- Dustan, P., 1982. Depth-dependent photoadaptation by zooxanthellae of the reef coral *Montastrea annularis*. *Mar. Biol.* 68, 253–264. <https://doi.org/10.1007/BF00409592>
- Edwards, A., Edwards, A.J., Guest, J., Shafir, S., Fisk, D., Gomez, E., Rinkevich, B., Heyward, A., Omori, M., Iwao, K., Dizon, R., Morse, A., Boch, C., Job, S., Bongiorno, L., Levy, G., Shaish, L., Wells, S., 2010. Reef Rehabilitation, The Coral Reef Targeted Research & Capacity Building for Management Program. The Coral Reef Targeted Research & Capacity Building for Management Program, St Lucia QLD 4072 Australia.
- Forsman, Z.H., Kimokeo, B.K., Bird, C.E., Hunter, C.L., Toonen, R.J., 2012. Coral farming: effects of light, water motion and artificial foods. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 92, 721–729. <https://doi.org/10.1017/S0025315411001500>
- Gnaiger, E., 1983. Calculation of Energetic and Biochemical Equivalents. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*.
- Graham, N.A.J.J., Chabanet, P., Evans, R.D., Jennings, S., Letourneur, Y., Aaron MacNeil, M., McClanahan, T.R., Öhman, M.C., Polunin, N.V.C.C., Wilson, S.K., 2011. Extinction vulnerability of coral reef fishes. *Ecol. Lett.* 14, 341–348.

- <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01592.x>
- Harpeni, E., David, A.L., 2011. Life history studies of *Montipora digitata* in Pioneer Bay, North Queensland, Australia. *J. Coast. Dev.* 15, 72–81.
- Hoek, L.S. Van Den, Bayoumi, E.K., 2017. Importance , Destruction and Recovery of Coral Reefs 12, 59–63. <https://doi.org/10.9790/3008-1202025963>
- Hughes, T.P., Connell, J.H., 1999. Multiple stressors on coral reefs: A long -term perspective. *Limnol. Oceanogr.* 44, 932–940. https://doi.org/10.4319/lo.1999.44.3_part_2.0932
- Hutchings, P., Kingsford, M., Guldberg, O.H.- (Eds.), 1968. The Great Barrier Reef: *Biology, Environment and Management*, Second. ed. CSIRO, Australia.
- Johannes, R.E., Wiebe, W.J., 1970. Method for determination of coral tissue biomass and composition. *Limnol. Oceanogr.* 15, 822–824. <https://doi.org/10.4319/lo.1970.15.5.0822>
- Kavousi, J., Tanaka, Y., Nishida, K., Suzuki, A., Nojiri, Y., Nakamura, T., 2016. Colony-specific calcification and mortality under ocean acidification in the branching coral *Montipora digitata*. *Mar. Environ. Res.* 119, 161–165. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.05.025>
- Khalesi, M.K., Beeftink, H.H., Wijffels, R.H., 2009. Light-dependency of growth and secondary metabolite production in the captive zooxanthellate soft coral *Sinularia flexibilis*. *Mar. Biotechnol.* 11, 488–494. <https://doi.org/10.1007/s10126-008-9164-z>
- Kikuzawa, Y.P., Toh, T.C., Ng, C.S.L., Sam, S.Q., Taira, D., Afiq-Rosli, L., Chou, L.M., 2018. Quantifying growth in maricultured corals using photogrammetry. *Aquac. Res.* 49, 2249–2255. <https://doi.org/10.1111/are.13683>
- Laurans, Y., Pascal, N., Binet, T., Brander, L., Clua, E., David, G., Rojat, D., Seidl, A., 2013. Economic valuation of ecosystem services from coral reefs in the South Pacific: Taking stock of recent experience. *J. Environ. Manage.* 116, 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.11.031>
- Leuzinger, S., Willis, B.L., Anthony, K.R.N., 2012. Energy allocation in a reef coral under varying resource availability. *Mar. Biol.* 159, 177–186. <https://doi.org/10.1007/s00227-011-1797-1>
- Maina, J., McClanahan, T.R., Venus, V., Ateweberhan, M., Madin, J., 2011. Global Gradients of Coral Exposure to Environmental Stresses and Implications for

- Local Management. *PLoS One* 6, e23064.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023064>
- McClanahan, T., Ateweberhan, M., Graham, N., Wilson, S., Sebastián, C., Guillaume, M., Bruggemann, J., 2007. Western Indian Ocean coral communities: bleaching responses and susceptibility to extinction. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 337, 1–13. <https://doi.org/10.3354/meps337001>
- McClanahan, T.R., Graham, N.A.J., Darling, E.S., 2014. Coral reefs in a crystal ball: predicting the future from the vulnerability of corals and reef fishes to multiple stressors. *Curr. Opin. Environ. Sustain.* 7, 59–64.
<https://doi.org/10.1016/j.cosust.2013.11.028>
- Papina, M., Meziane, T., van Woesik, R., 2007. Acclimation effect on fatty acids of the coral *Montipora digitata* and its symbiotic algae. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 147, 583–589.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.02.011>
- Ptushenko, V. V., Ptushenko, O.S., Samoilo,va, O.P., Solovchenko, A.E., 2017. Analysis of photoprotection and apparent non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in *Tradescantia* leaves based on the rate of irradiance-induced changes in optical transparence. *Biochem.* 82, 67–74.
<https://doi.org/10.1134/S0006297917010072>
- Quick, C., D'Angelo, C., Wiedenmann, J., 2018. Trade-Offs Associated with Photoprotective Green Fluorescent Protein Expression as Potential Drivers of Balancing Selection for Color Polymorphism in Reef Corals. *Front. Mar. Sci.* 5.
<https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00011>
- Richmond, R., Hunter, C., 2007. Reproduction and recruitment of corals: comparisons among the Caribbean, the Tropical Pacific, and the Red Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 60, 185–203. <https://doi.org/10.3354/meps060185>
- Rinkevich, B., 2005. Conservation of coral reefs through active restoration measures: Recent approaches and last decade progress. *Environ. Sci. Technol.* <https://doi.org/10.1021/es0482583>
- Rocha, R.J.M., 2013. Effect of light on *ex situ* production of symbiotic corals. Universidade de Aveiro.
- Rocha, R.J.M., Calado, R., Cartaxana, P., Furtado, J., Serôdio, J., 2013a.

- Photobiology and growth of leather coral *Sarcophyton cf. glaucum* fragments stocked under low light in a recirculated system. *Aquaculture* 414–415, 235–242. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.08.018>
- Rocha, R.J.M., Pimentel, T., Serôdio, J., Rosa, R., Calado, R., 2013b. Comparative performance of light emitting plasma (LEP) and light emitting diode (LED) in *ex situ* aquaculture of scleractinian corals. *Aquaculture* 402–403, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.03.028>
- Rocha, R.J.M., Serôdio, J., Leal, M.C., Cartaxana, P., Calado, R., 2013c. Effect of light intensity on post-fragmentation photobiological performance of the soft coral *Sinularia flexibilis*. *Aquaculture* 388–391, 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.01.013>
- Rodrigues, A.C.M., Gravato, C., Quintaneiro, C., Golovko, O., Žlábek, V., Barata, C., Soares, A.M.V.M., Pestana, J.L.T., 2015. Life history and biochemical effects of chlorantraniliprole on *Chironomus riparius*. *Sci. Total Environ.* 508, 506–513. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.021>
- Roth, M.S., 2014. The engine of the reef: photobiology of the coral-algal symbiosis. *Front. Microbiol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00422>
- Ruppert, E.E., Fox, R.S., Barnes, R.D., 2004. Invertebrate Zoology A fundamental evolutionary approach, Seventh. ed. *Thomson Book/cole*, USA.
- Spalding, M., Burke, L., Wood, S.A., Ashpole, J., Hutchison, J., zu Ermgassen, P., 2017. Mapping the global value and distribution of coral reef tourism. *Mar. Policy* 82, 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2017.05.014>
- Speers, A.E., Besedin, E.Y., Palardy, J.E., Moore, C., 2016. Impacts of climate change and ocean acidification on coral reef fisheries: An integrated ecological–economic model. *Ecol. Econ.* 128, 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2016.04.012>
- Titlyanov, E.A., Titlyanova, T. V, Van Woesik, R., Yamazato, K., 2002. Acclimation of the hermatypic coral *Stylophora pistillata* to bright light. *Russ. J. Mar. Biol.* 28, 436–441.
- Titlyanov, E.A., Titlyanova, T. V, Yamazato, K., Van Woesik, R., 2001. Photoacclimation dynamics of the coral *Stylophora pistillata* to low and extremely low light, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* Ž.

- Venton, D., 2016. Highlight: Shining New Light on Coral Fluorescent Proteins. *Genome Biol. Evol.* 8, 3627–3628. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw294>
- Veron, J.E.N., 2000. Corals of the world, Vol 1-3. ed. Australian Institute of Marine Science, Townsville, Australia.
- Veron, J.E.N., 1995. Corals in space and time: The biogeography and evolution of the Scleractinia. Cornell University Press.
- Veron, J.E.N., Hoegh-Guldberg, O., Lenton, T.M., Lough, J.M., Obura, D.O., Pearce-Kelly, P., Sheppard, C.R.C., Spalding, M., Stafford-Smith, M.G., Rogers, A.D., 2009. The coral reef crisis: The critical importance of <350ppm CO₂. *Mar. Pollut. Bull.* 58, 1428–1436. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.09.009>
- Verslycke, T., Ghekiere, A., Janssen, C.R., 2004. Seasonal and spatial patterns in cellular energy allocation in the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) of the Scheldt estuary (The Netherlands). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 306, 245–267. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.01.014>
- Wabnitz, C., Taylor, M., Green, E., Razak, T., 2003. From ocean to aquarium: The global trade in marine ornamental species. UNEP-WCMC, Cambridge, UK.
- Wijgerde, T., Henkemans, P., Osinga, R., 2012. Effects of irradiance and light spectrum on growth of the scleractinian coral *Galaxea fascicularis* — Applicability of LEP and LED lighting to coral aquaculture. *Aquaculture* 344–349, 188–193. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.03.025>
- Wijgerde, T., van Melis, A., Silva, C.I.F., Leal, M.C., Vogels, L., Mutter, C., Osinga, R., 2014. Red Light Represses the Photophysiology of the Scleractinian Coral *Stylophora pistillata*. *PLoS One* 9, e92781. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092781>