

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
Instituto de Biociências - Campus de Botucatu

JÚLIA MELO MOLINA

**DIVERSIDADE INVISÍVEL A OLHO NU: EXPLORANDO O MICROBIOMA
ASSOCIADO À *ACTINOSTELLA FLOSCULIFERA* (CNIDARIA; ANTHOZOA) E
CASSIOPEA ANDROMEDA (CNIDARIA; MEDUSOZOA)**

Botucatu

2026

JÚLIA MELO MOLINA

**DIVERSIDADE INVISÍVEL A OLHO NU: EXPLORANDO O MICROBIOMA
ASSOCIADO À *ACTINOSTELLA FLOSCULIFERA* (CNIDARIA; ANTHOZOA) E
CASSIOPEA ANDROMEDA (CNIDARIA; MEDUSOZOA)**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu, para a obtenção do título de Mestra em Zoologia (Área do Conhecimento: Sistemática, Filogenia e Evolução Animal).

Orientador: Sérgio Nascimento Stampar

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (CAPES) (Processo Nº 88887.952891/2024-00)

BOTUCATU

2026

M722d	Molina, Júlia Diversidade invisível a olho nu: explorando o microbioma associado à <i>Actinostella flosculifera</i> (Cnidaria; Anthozoa) e <i>Cassiopea andromeda</i> (Cnidaria; Medusozoa) / Júlia Molina. -- Botucatu, 2026 67 p. : tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu Orientador: Sérgio Nascimento Stampar 1. Simbiose. 2. Zooxantelas. 3. Invertebrados marinhos. I. Título.
-------	---



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Diversidade invisível a olho nu: explorando o microbioma associado à *Actinostella flosculifera* (Cnidaria; Anthozoa) e *Cassiopea andromeda* (Cnidaria; Medusozoa)

AUTORA: JÚLIA MELO MOLINA

ORIENTADOR: SÉRGIO NASCIMENTO STAMPAR

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências Biológicas (Zoologia), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. SÉRGIO NASCIMENTO STAMPAR (Participação Presencial)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências - UNESP Bauru

Prof. Dr. ROGERIO CAETANO DA COSTA (Participação Presencial)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências - UNESP Bauru

Prof. Dr. FILIPE PEREIRA MATTEOLI (Participação Presencial)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências - UNESP Bauru

Botucatu, 27 de março de 2026.



Willian Gabriel Miranda
Assistente Administrativo II da Seção Técnica de Pós-Graduação
Instituto de Biociências de Botucatu

AGRADECIMENTOS

Dedico os meus dois anos de mestrado àqueles que, à distância ou presencialmente, me viram transbordar em sentimentos e celebraram cada pequeno progresso resultante dessa pesquisa, bem como as suas falhas, igualmente valiosas para replanejamentos.

Agradeço aos meus pais pelo suporte e torcida incondicionais, assim como pela disponibilidade para me ouvir resmungar sempre que possível da bioinformática. Em novos recomeços, tenho a teimosia de um inseto que busca um caminho no terremoto, e vocês atuam como eixo fortalecedor e de inspiração.

Agradeço o apoio dos meus amigos próximos, colegas e companheiro, que vivem pelo interior, em capitais, estados e países distantes. Tive o privilégio de encontrar, através da UFMS, UNESP, USP e Stazione Zoologica Anton Dohrn, amigos e profissionais excepcionalmente brilhantes e inspiradores. Sem as trocas e presenças genuínas de vocês, Bianca, Rodrigo, Thiago, Yasmin, Lucas, Ingrid, Vitória, Marilaine, Karina, Jeferson, Lívia e Alice, o percurso teria sido infinitamente mais desafiador.

Ao meu orientador, agradeço por ter me recebido em sua antiga sala decorada no início do segundo semestre de 2019. São quase 7 anos de colaborações, planejamentos, replanejamentos, paciência, orientação e aprendizado. A experiência de crescer e amadurecer como pesquisadora no Laboratório de Evolução e Diversidade Aquática tem sido única e muito significativa.

E agradeço, por fim, as instituições e fundações que contribuíram para o desenvolvimento de um projeto redigido entusiasticamente por uma aluna fascinada pela pesquisa científica brasileira, incluindo o Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu, a Faculdade de Ciências da UNESP de Bauru, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Nº 22/16193-1 e 22/09430-7) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Nº 88887.952891/2024-00).

RESUMO

As associações simbióticas são cruciais para a troca de recursos e nutrientes, sustentando a vida em diversos ecossistemas. No vasto ambiente marinho, a intrincada rede de interações é particularmente dinâmica, moldando a biodiversidade e possibilitando a existência de inúmeros invertebrados. Os cnidários, especialmente as anêmonas-do-mar e as águas-vivas, desempenham um papel significativo nas cadeias alimentares marinhas. Eles cobrem uma ampla variedade de substratos e profundidades, e estabelecem relações ecológicas complexas com microrganismos, principalmente dinoflagelados da família Symbiodiniaceae, comumente conhecidos como zooxantelas. Apesar da importância dessas interações, os estudos que analisam o microbioma e seu impacto em organismos marinhos não associados a corais de recife ainda se limitam a poucas espécies modelo. Dada essa lacuna, a presente pesquisa busca caracterizar o microbioma da anêmona-do-mar *Actinostella flosculifera* (Le Sueur, 1817) e da água-viva *Cassiopea andromeda* (Forskål, 1775). O objetivo é avaliar a variabilidade latitudinal dos endossimbiontes associados a espécimes de *A. flosculifera* coletados em dois pontos distintos ao longo da costa brasileira, e analisar a composição do microbioma de uma espécie invasora de água-viva. A perspectiva inovadora abordada neste estudo abre caminho para novos estudos ecológicos do grupo, revelando a diversidade e a dinâmica de suas fascinantes interações simbióticas.

PALAVRAS-CHAVE: Simbiose, zooxantela, invertebrados marinhos

ABSTRACT

Symbiotic associations are crucial for the exchange of resources and nutrients, sustaining life in diverse ecosystems. In the vast marine environment, this intricate network of interactions is particularly dynamic, shaping biodiversity and enabling the existence of countless invertebrates. Cnidarians, especially sea anemones and jellyfish, play a highly important role in marine food chains. They cover a wide range of substrates and depths, and have complex ecological relationships with microorganisms, mainly dinoflagellates from the Symbiodiniaceae family, commonly known as zooxanthellae. Despite how important these interactions are, studies looking at the microbiome and its impact on marine organisms that are not associated with reef corals are still limited to a few model species. Given this gap, the present research seeks to characterize the microbiome of the sea anemone *Actinostella flosculifera* (Le Sueur, 1817) and the jellyfish *Cassiopea andromeda* (Forskål, 1775). The objective is to evaluate the latitudinal variability of endosymbionts associated with specimens of *A. flosculifera* collected at two distinct points along the Brazilian coast, and to analyze the microbiome composition of an invasive jellyfish species. The innovative perspective addressed in this study paves the way for further ecological studies of this group, unveiling the diversity and dynamics of their fascinating symbiotic interactions.

KEYWORDS: Symbiosis, zooxanthellae, marine invertebrates

SUMÁRIO

Introdução geral	8
Objetivos	10
Capítulo 1. Um mergulho nos padrões espaciais dos endossimbiontes de <i>Actinostella flosculifera</i> (Le Sueur, 1817)	11
Resumo	11
Abstract	13
Introdução	15
Materiais e Métodos	16
Resultados	17
Discussão	26
Reconhecimentos	28
Referências	28
Capítulo 2. Caracterização do microbioma da espécie invasora <i>Cassiopea andromeda</i> (Cnidaria; Medusozoa)	30
Resumo	30
Abstract	32
Introdução	34
Materiais e Métodos	35
Resultados	36
Discussão	41
Reconhecimentos	44
Referências	44
Capítulo 3. A diversidade oculta da família Symbiodiniaceae revelada por abordagens genômicas e transcriptômicas	46
Resumo	46
Abstract	48
Introdução	50
Materiais e Métodos	52

Resultados	55
Discussão	56
Reconhecimentos	61
Referências	61
Conclusão geral	63
Referências	65

INTRODUÇÃO GERAL

Ao trazer visões mais complexas para o estudo da biodiversidade, as simbioses são definidas como duas ou mais espécies vivendo juntas. A simetria ou a assimetria dessas relações, por sua vez, corresponde a presença ou ausência de benefícios que os parceiros recebem estabelecendo as associações. Essas interações, em sua maioria, podem ter caráter coevolutivo, no qual as espécies influenciam reciprocamente a evolução uma da outra, ou de evolução sequencial, no qual gradualmente apenas uma das espécies influencia a evolução da outra (Cavanaugh, 1994; Nitschke *et al.*, 2022).

Em virtude da quantidade significativa de organismos multicelulares que vivem em associação com comunidades diversas de microrganismos, sabe-se, atualmente, dos muitos benefícios que as associações simbióticas fornecem à resistência e resiliência dos hospedeiros (Weiland-Bräuer *et al.*, 2020). Um dos grupos de hospedeiros em destaque refere-se aos representantes do filo Cnidaria, especialmente corais recifais, que enfrentam progressivamente estressores ambientais no habitat marinho, e estabelecem relações com indivíduos da família Symbiodiniaceae (McCauley *et al.*, 2023). Ao avaliar a diversidade e variabilidade do microbioma de uma espécie, constitui-se um caminho significativo para estudar as funções, a dinâmica e a importância das comunidades em associação, fatores que moldam o equilíbrio dos ecossistemas marinhos (Millán-Márquez *et al.*, 2024).

Nas últimas décadas, as taxas globais de diversidade de corais formadores de recife sofreram um crítico declínio. Uma das maiores ameaças ao equilíbrio ecológico desse ecossistema é o branqueamento, fenômeno causado pela quebra das associações e perda dos simbiontes fotossintetizantes (i.e., disbiose) em razão das mudanças climáticas e consequente aumento da temperatura oceânica (Xu *et al.*, 2023). Em condições ambientais extremas, a resistência e tolerância dos holobiontes são comprometidas pela abundância de organismos oportunistas e patogênicos. Deste modo, a caracterização sazonal do microbioma dessas comunidades e a coleta de variáveis ambientais constituem passos cruciais para o estudo das associações simbióticas e o aumento de estratégias de conservação das espécies (Pita *et al.*, 2018).

Recentemente, a espécie de anêmona do mar *Exaiptasia diaphana* (Rapp, 1829), em razão da sua fácil manutenção em laboratório e ampla distribuição nos oceanos, tem sido utilizada como organismo modelo para estudos de interações entre cnidários e dinoflagelados. No entanto, pesquisas dedicadas ao estudo do microbioma de organismos não associados a recifes de corais são escassas e limitadas a poucas espécies modelo (Brown *et al.*, 2017; Curtis *et al.*, 2023; Guibert *et al.*, 2020; Maire *et al.*, 2021), gerando uma lacuna significativa na avaliação das interações simbióticas de cnidários solitários. Esses organismos podem apresentar estratégias de resiliência distintas e igualmente complexas, cujo estudo torna-se relevante para compreender a dinâmica dos ecossistemas marinhos frente às mudanças climáticas. Preencher essa lacuna, portanto, é decisivo, pois as estratégias adaptativas encontradas em espécies não recifais podem revelar mecanismos alternativos de sobrevivência, oferecendo novos paradigmas para a conservação marinha.

OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo geral avaliar a composição do microbioma de duas espécies do filo Cnidaria, identificando os táxons com potencial importância funcional. Deste modo, a pesquisa está centralizada no estudo de *Actinostella flosculifera*, uma actiniária, e *Cassiopea andromeda*, uma água-viva invasora da ordem Rhizostomeae. Para atingir tal objetivo, foram delineados os objetivos específicos abaixo:

- Analisar a variabilidade latitudinal dos endossimbiontes associados a espécimes de *A. flosculifera* coletados em dois pontos distintos da costa brasileira através do metabarcoding;
- Avaliar a diversidade de simbiontes em associação com *C. andromeda*, uma espécie exótica invasora das águas brasileiras;
- Reconstruir a posição filogenética dos simbiontes associados às espécies supracitadas a partir de abordagens genômicas, transcriptômicas e de *metabarcoding*.

CAPÍTULO 1.

Um mergulho nos padrões espaciais dos endossimbiontes de *Actinostella flosculifera* (Le Sueur, 1817)

Júlia M. Molina^{1,2}, Jeferson A. Durán-Fuentes³, Thais B. Santos², Sérgio N. Stampar²

¹Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, Brasil

²Faculdade de Ciências de Bauru, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Bauru, São Paulo, Brasil

³Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, São Paulo, Brasil

Correspondência

Júlia Melo Molina

julia.molina@unesp.br

RESUMO

A simbiose entre cnidários e microalgas da família Symbiodiniaceae é fundamental para a saúde dos ecossistemas recifais, mas a diversidade e especificidade dessa relação em anêmonas-do-mar, como *Actinostella flosculifera*, são menos compreendidas do que em corais. A flexibilidade na associação com diferentes linhagens de simbiontes pode conferir maior resiliência adaptativa frente às mudanças climáticas. Portanto, este estudo teve como objetivo caracterizar e comparar, através de metabarcoding, as comunidades de Symbiodiniaceae associadas a *A. flosculifera* em duas regiões biogeográficas distintas da costa brasileira: Nordeste, Salvador – Bahia (N = 3) e Sudeste, Ubatuba - São Paulo (N = 4). O DNA total extraído foi submetido ao sequenciamento de nova geração (NGS) focado na região marcadora dos simbiontes. A análise bioinformática iniciou-se com o controle de qualidade e filtragem das leituras brutas utilizando o Trimmomatic. Em seguida, as sequências foram montadas e agrupadas usando o Megahit, sendo retidas apenas sequências finais com tamanho superior a 200 pares de base (pb). A identificação taxonômica das linhagens foi realizada por comparação com o banco de dados GenBank, aplicando um limiar de similaridade de sequência de, no

mínimo, 98%. Os resultados revelaram diferenças geográficas significativas na diversidade de simbioss. Os espécimes (3) de Salvador, Bahia, apresentaram uma comunidade altamente diversa, com ao menos 7 linhagens distintas de Symbiodiniaceae identificadas. Esta comunidade incluía os gêneros *Breviolum*, *Cladocopium*, *Cladophora*, *Pavona* e *Symbiodinium*. Em notável contraste, os espécimes (4) de Ubatuba, São Paulo, exibiram uma diversidade consideravelmente menor, com apenas 3 linhagens de Symbiodiniaceae detectadas, incluindo os gêneros *Breviolum*, *Cladocopium* e *Symbiodinium*. Os gêneros *Breviolum*, *Cladocopium* e *Symbiodinium* parecem compor o núcleo da comunidade simbiótica de *A. flosculifera* em ambas as localidades. No entanto, a maior diversidade de linhagens encontrada no Nordeste sugere uma maior flexibilidade simbiótica ou a influência de condições ambientais locais mais quentes, destacando padrões biogeográficos claros na associação entre *A. flosculifera* e suas microalgas simbioss no Atlântico Sul Ocidental.

PALAVRAS-CHAVE: Actiniaria, microbioma, dinoflagelados

A dive into the spatial patterns of the endosymbionts of *Actinostella flosculifera* (Le Sueur, 1817)

Júlia M. Molina^{1,2}, Jeferson A. Durán-Fuentes³, Thais B. Santos², Sérgio N. Stampar²

¹Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, Brasil

²Faculdade de Ciências de Bauru, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Bauru, São Paulo, Brasil

³Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, São Paulo, Brasil

Correspondence

Júlia Melo Molina

julia.molina@unesp.br

ABSTRACT

The symbiosis between cnidarians and microalgae of the Symbiodiniaceae family is fundamental to the health of reef ecosystems, but the diversity and specificity of this relationship in sea anemones, such as *Actinostella flosculifera*, are less understood than in corals. A flexible association with different symbiont lineages may confer greater adaptive resilience to climate change. Therefore, this study aimed to characterize and compare, through metabarcoding, the Symbiodiniaceae communities associated with *A. flosculifera* in two distinct biogeographic regions of the Brazilian coast: Northeast, Salvador – Bahia (N = 3) and Southeast, Ubatuba – São Paulo (N = 4). The total DNA extracted was submitted to next-generation sequencing (NGS) focused on the symbiont marker region. Bioinformatic analysis began with quality control and filtering of raw reads using Trimmomatic. The sequences were then assembled and grouped using Megahit, retaining only final sequences larger than 200 base pairs (bp). Taxonomic identification of the lineages was performed by comparison with the GenBank database, applying a sequence similarity threshold of at least 98%. The results revealed significant geographical differences in symbiont diversity. The specimens (3) from Salvador, Bahia, presented a highly diverse community, with at least 7 distinct Symbiodiniaceae lineages identified. This community included the genera *Breviolum*, *Cladocopium*, *Cladophora*,

Pavona, and *Symbiodinium*. In notable contrast, the specimens (4) from Ubatuba, São Paulo, exhibited considerably less diversity, with only 3 Symbiodiniaceae lineages detected, including the genera *Breviolum*, *Cladocopium*, and *Symbiodinium*. The genera *Breviolum*, *Cladocopium*, and *Symbiodinium* appear to form the core of the symbiotic community of *A. flosculifera* at both locations. However, the greater diversity of lineages found in the Northeast suggests greater symbiotic flexibility or the influence of warmer local environmental conditions, highlighting clear biogeographic patterns in the association between *A. flosculifera* and its symbiotic microalgae in the Western South Atlantic.

KEYWORDS: Actiniaria, microbiome, dinoflagellates

INTRODUÇÃO

Distribuídos em três principais clados, Anthozoa, Endocnidozoa e Medusozoa, os cnidários compõem um dos grupos mais diversificados de animais quanto ao ciclo de vida, ecologia e morfologia (Zapata *et al.*, 2015). As anêmonas-do-mar, antozoários da ordem Actiniaria, representam as formas polipóides sem o estágio de medusa, habitando áreas fortemente variáveis em salinidade, temperatura e disponibilidade de recursos (Gregorin *et al.*, 2024; Sun *et al.*, 2021). Ao desempenhar funções significativas nas cadeias alimentares bentônicas, o grupo tem participação na produção primária dos ecossistemas marinhos por meio das associações com endossimbiontes fotossintéticos, especialmente dinoflagelados da família Symbiodiniaceae (Murray *et al.*, 2016).

As interações simbióticas são capazes de moldar a dinâmica das comunidades marinhas, influenciando a distribuição da biodiversidade no ecossistema (Benvenuti *et al.*, 2024; Titus *et al.*, 2020). Embora os cnidários marinhos abriguem uma ampla diversidade de comunidades microbianas em seus tecidos, a relação que recebe maior destaque engloba os corais formadores de recife e dinoflagelados, além de bactérias que atuam no metabolismo e defesa dos hospedeiros (MacVittie *et al.*, 2024).

Em razão da ampla tolerância fisiológica, os actiniários despertaram interesse no estudo das interações ecológicas marinhas. O uso de espécies modelo, como *Nematostella vectensis* e *Exaiptasia diaphana*, embora limitante e recente, sugere que, assim como os corais escleractíneos, as anêmonas-do-mar apresentam associações microbianas específicas que oferecem suporte ao seu desenvolvimento (Har *et al.*, 2015; Murray *et al.*, 2016). No entanto, os padrões de interações, bem como os papéis individuais e coletivos das comunidades microbianas, podem se distinguir a depender da espécie, da variação geográfica, e dos fatores ambientais locais.

Em períodos de estresse, as relações entre corais recifais e indivíduos da família Symbiodiniaceae podem ser rompidas. Em caso de perda dos simbiossiontes (i.e., disbiose), o coral hospedeiro sofre branqueamento, processo que pode resultar no colapso do holobionte (Dungan *et al.*, 2022). Como resultado das mudanças climáticas, mediar a sensibilidade ao estresse térmico de cnidários impulsionou

pesquisas ecológicas com actiniários, visto sua fácil manutenção em laboratório. Para compreender a capacidade de resistir às alterações ambientais dos cnidários, deste modo, é fundamental investigar a composição do microbioma de novas espécies, bem como os fatores que influenciam seu desempenho (McCauley *et al.*, 2023; Sydnor *et al.*, 2023).

A espécie central deste estudo, *Actinostella flosculifera* (Le Sueur, 1817), se distribui, principalmente, ao longo do Atlântico Ocidental, com registros também nas Ilhas Canárias e no Golfo da Guiné. Embora a ecologia da espécie seja limitadamente conhecida no Atlântico Sudoeste, sabe-se que os espécimes apresentam uma estrutura denominada “marginal ruff” (i.e., fronda), rica em zooxantelas e comumente utilizada para estudos de associação simbiótica. Essa extensão da coluna localiza-se próxima aos tentáculos, e atua na captura de presas a depender da exposição solar (Duran-Fuentes *et al.*, 2023). Diante desse cenário, este estudo tem como objetivo avaliar a composição do microbioma associado à *A. flosculifera* e comparar os endossimbiontes em associação, especialmente indivíduos da família Symbiodiniaceae, em dois pontos distintos da costa brasileira.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material

Os espécimes de *Actinostella flosculifera* (Le Sueur, 1817) foram coletados em zonas entremarés durante a maré baixa em duas localidades no litoral do Brasil. No Sudeste, quatro espécimes foram coletados na Praia do Codó/Prainha, Ubatuba, São Paulo (-23.5011 S, -45.1188 O). No Nordeste, três espécimes foram coletados na Praia do Jardim de Alah, Salvador, Bahia (-12.9981 S, -38.4417 O). Os espécimes foram removidos do sedimento com a utilização de pinças metálicas e preservados imediatamente em etanol 99°.

Extração, Construção de Bibliotecas e Sequenciamento de DNA Metabarcoding

A extração de DNA total foi conduzida com pedaços de aproximadamente 1cm² na margem da fronda de todos os espécimes. Essas extrações foram conduzidas com o kit de extração de coluna (Quatro G Biotecnologia 100197) em sistema isolado de fluxo laminar. Após a extração, o DNA foi quantificado em

sistema Nanodrop, encaminhado para confecção de bibliotecas e posterior sequenciamento em serviço terceirizado. A construção de bibliotecas foi realizada com amplificação do DNA utilizando os primers ITSint-for2 (sense, 5'-GAATTGCAGAACTCCGTG-3'; LaJeunesse e Trench 2000) e ITS2rev (antisense, 5'-GGGATCCATATGCTTAAGTTCAGCGGG-3'; Coleman *et al.*, 1994), e o sequenciamento foi realizado em equipamento NextSeq2000 (2 x 300 pb).

Processamento dos resultados

Os resultados obtidos do sequenciamento foram analisados inicialmente em plataforma Galaxy (version 25.1.rc1) com a implementação da seguinte ordem de aplicações: 1) As sequências brutas foram submetidas ao sistema Galaxy, onde os dados pareados de cada dataset configuraram dois arquivos; 2) Cada dataset foi submetido a aplicação Trimmomatic (versão 0.39) para o pré-processamento e limpeza dos dados. Nesta aplicação foram utilizados os comandos “ILLUMINACLIP” e “SLIDINGWINDOW”, sendo o segundo com valores AQR = 20 e QSE = Phred33; 3) Os dados limpos foram subsequentemente submetidos à aplicação “MEGAHIT” (versão 1.2.9), sendo este com valores k_min+2 (kmers = 21,29,39,59,79,99,119,141) e Contigs de no mínimo 200pb. Os Contigs foram importados em sistema Geneious e individualmente submetidos a comparação no banco de dados Genbank (Nucleotide collection – Megablast).

RESULTADOS

Os sequenciamentos resultaram em 7 datasets de metabarcoding de ITS. Os resultados brutos podem ser observados na Tabela e Figura 1, bem como o número de reads para a montagem dos Contigs mais representativos (Tabela 2 e Figura 2), e sua identificação (Tabela 3-9 e Figura 3-9). A partir destes dados, é possível verificar a diferença entre os resultados de Ubatuba (São Paulo) versus Salvador (Bahia).

Contigs são longas sequências de DNA formadas a partir da montagem e sobreposição de reads, ou leituras. A quantidade de Contigs por dataset (Tabela e Figura 1) exibe a divergência da sobreposição dos reads entre as amostras do Nordeste e Sudeste. Além de apresentar o menor número de Contigs, a região Sudeste carece de reads para a montagem dos Contigs mais representativos

(Tabela e Figura 2), resultando na identificação escassa de possíveis endossimbiontes.

Tabela 1. Resultado por cada dataset após montagem dos Contigs (Megahit).

Dataset	Quantidade de Contigs	Tamanho das sequências (Max - Mín) pb
Salvador 1	79	589 - 301
Salvador 2	129	594 - 301
Salvador 3	103	565 - 300
Ubatuba 1	12	583 - 319
Ubatuba 2	5	433 - 322
Ubatuba 3	4	533 - 391
Ubatuba 4	5	604 - 333

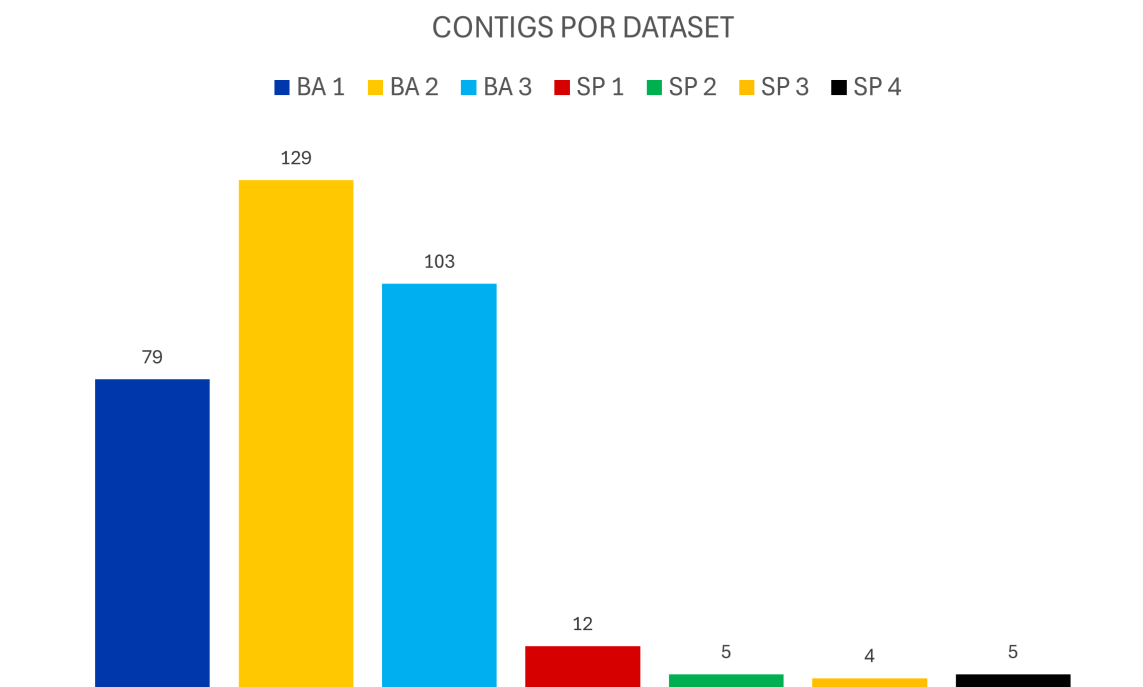


Figura 1. Gráfico representativo da quantidade de Contigs por dataset (amostras)

Tabela 2. Quantidade de reads para a montagem dos 10 Contigs mais representativos.

Datasets						
Salvador 1	Salvador 2	Salvador 3	Ubatuba 1	Ubatuba 2	Ubatuba 3	Ubatuba 4
51627	63076	56000	35698	55587	55455	33192
14638	8786	12177	1635	319	910	762
13374	1496	9610	93	4	4	47
837	1316	1766	12	2	3	3
814	903	1182	10	2	-	2
266	372	180	6	-	-	-
178	217	119	4	-	-	-
127	188	61	3	-	-	-
52	180	60	3	-	-	-
41	151	50	3	-	-	-

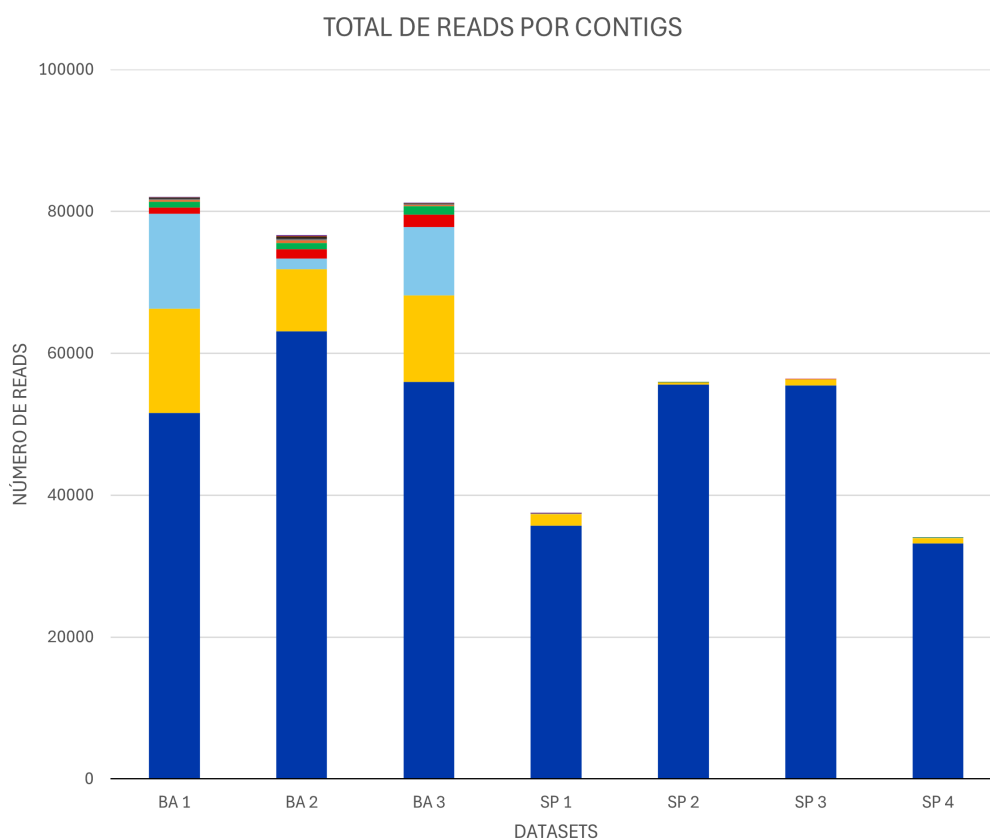


Figura 2. Gráfico representativo da quantidade de reads para a montagem dos Contigs mais representativos

As amostras obtidas da região Nordeste apresentam *Symbiodinium* sp. A e *Breviolum* como alguns dos grupos predominantes. Foram identificados, ainda, sequências de macroalgas, como *Grateloupia filicina*, outros cnidários, como *Oulactis mucosa*, algas verdes, como *Ulva ohnoi*, e dinoflagelados planctônicos, como *Prorocentrum donghaiense*, exibindo a ampla diversidade de potenciais endossimbiontes das anêmonas de Salvador.

Tabela 3. Identificação dos Contigs mais representativos do dataset Salvador 1.

Salvador 1/reads	IDs	Genbank ID	Similaridade
51627	<i>Symbiodinium</i> sp. A	KP134492	100%
14638	<i>Actinostella flosculifera</i>	PP531531	97,7%
13374	<i>Breviolum</i> sp.	OL375477	100%
837	<i>Grateloupia filicina</i>	AY775364	100%
814	Sem identificação	--	--
266	<i>Symbiodinium</i> sp.	OQ449281	98,7%
178	Sem identificação	--	--
127	<i>Oulactis mucosa</i>	KT852226	98,3%
52	<i>Gallid alphaherpesvirus</i>	OQ354889	95,9%
41	Sem identificação	--	--

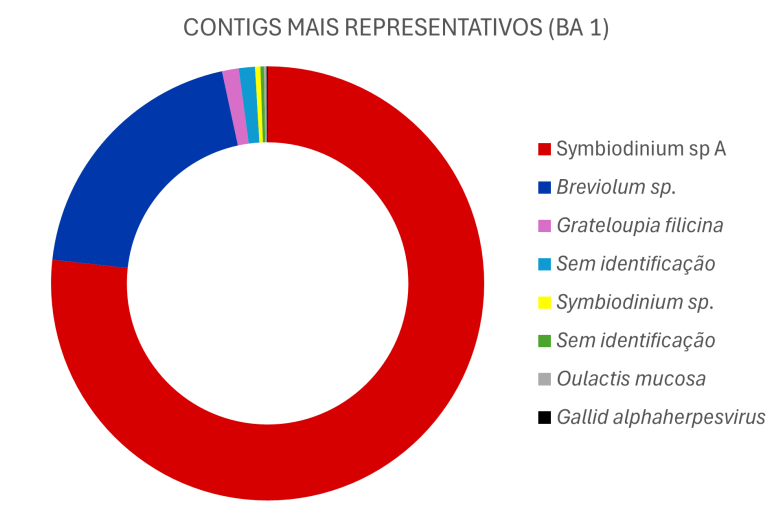
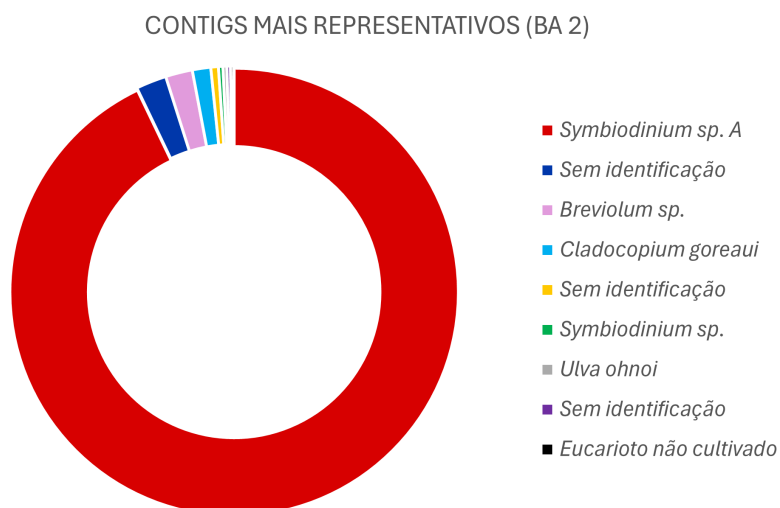


Figura 3. Representação gráfica da identificação dos Contigs mais representativos do dataset (amostra) Salvador 1

Tabela 4. Identificação dos Contigs mais representativos do dataset Salvador 2.

Salvador 2/reads	IDs	Genbank ID	Similaridade
63076	<i>Symbiodinium</i> sp. A	KP134492	100%
8786	<i>Actinostella flosculifera</i>	PP531531	97,7%
1496	Sem identificação	--	--
1316	<i>Breviolum</i> sp.	OL375525	96,4%
903	<i>Cladocopium goreau</i>	MT174582	100%
372	Sem identificação	--	--
217	<i>Symbiodinium</i> sp.	OQ449281	98,7%
188	<i>Ulva ohnoi</i>	MZ870650	99,7%
180	Sem identificação	--	--
151	Eucarioto não cultivado	KX113725	91,4%

**Figura 4.** Representação gráfica da identificação dos Contigs mais representativos do dataset (amostra) Salvador 2**Tabela 5.** Identificação dos Contigs mais representativos do dataset Salvador 3.

Salvador 3/reads	IDs	Genbank ID	Similaridade
56000	<i>Symbiodinium</i> sp. A	KP134492	100%
12177	<i>Symbiodinium</i> sp. B	JN602457	100%
9610	<i>Actinostella flosculifera</i>	PP531531	97,7%
1766	<i>Breviolum</i> sp.	OL375615	100%
1182	<i>Prorocentrum donghaiense</i>	MK217273	96,9%
180	<i>Symbiodinium</i> sp.	OQ449281	98,7%
119	Sem identificação	--	--

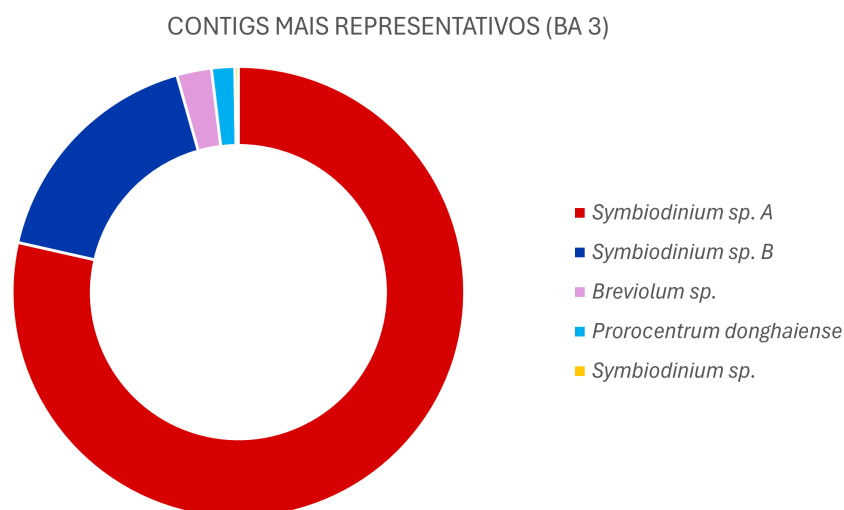


Figura 5. Representação gráfica da identificação dos Contigs mais representativos do dataset (amostra) Salvador 3

As amostras obtidas do Sudeste, por outro lado, são dominadas por *Breviolum sp.*, bem como por material da própria anêmona-do-mar e *Symbiodinium sp. B*, exclusivo da primeira amostra. A ausência de dados para alguns dos Contigs mais representativos exibe a falta de identificação das sequências, representando uma comunidade endossimbiótica mais restrita que segue determinados padrões ambientais.

Tabela 6. Identificação dos Contigs mais representativos do dataset Ubatuba 1.

Ubatuba 1/reads	IDs	Genbank ID	Similaridade
35698	<i>Symbiodinium sp. B</i>	JN602457	98,4%
1635	<i>Actinostella flosculifera</i>	JN602457	97,1%
93	Sem identificação	--	--
12	<i>Oulactis mucosa</i>	KT852226	98,5%
10	Sem identificação	--	--

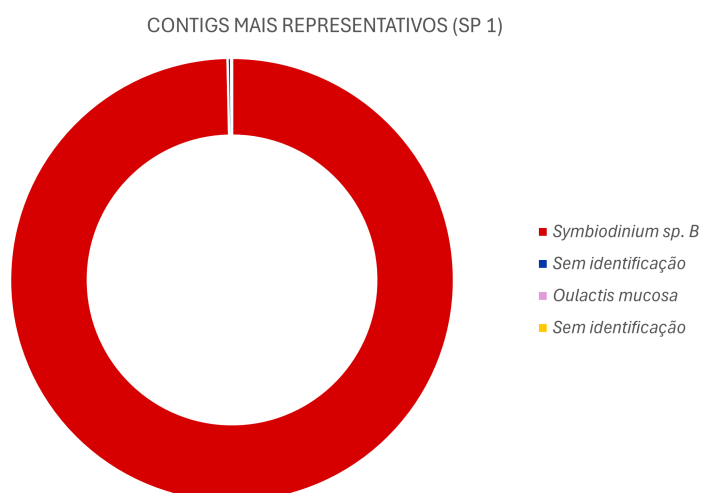


Figura 6. Representação gráfica da identificação dos Contigs mais representativos do dataset (amostra) Ubatuba 1

Tabela 7. Identificação dos Contigs mais representativos do dataset Ubatuba 2.

Ubatuba 2/reads	IDs	Genbank ID	Similaridade
55587	<i>Breviolum sp.</i>	OL375477	100%
319	<i>Calliactis polypus</i>	HQ156421	95,7%
4	Sem identificação	--	--
2	Sem identificação	--	--
2	<i>Ulva meridionalis</i>	MZ870623	99,7%
--	--	--	--

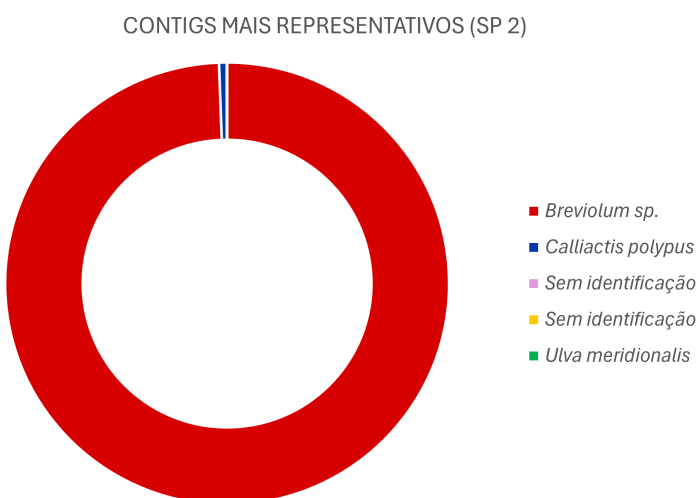


Figura 7. Representação gráfica da identificação dos Contigs mais representativos do dataset (amostra) Ubatuba 2

Tabela 8. Identificação dos Contigs mais representativos do dataset Ubatuba 3.

Ubatuba 3/reads	IDs	Genbank ID	Similaridade
55455	<i>Breviolum</i> sp.	OL375477	100%
910	<i>Actinostella</i> sp.	OQ517052	98,7%
4	Sem identificação	--	--
3	Sem identificação	--	--
--	--	--	--

**Figura 8.** Representação gráfica da identificação dos Contigs mais representativos do dataset (amostra) Ubatuba 3**Tabela 9.** Identificação dos Contigs mais representativos do dataset Ubatuba 4.

Ubatuba 4/reads	IDs	Genbank ID	Similaridade
33192	<i>Breviolum</i> sp.	OL375477	100%
762	<i>Actinostella flosculifera</i>	PP531531	97,5%
47	<i>Cladocopium</i> sp.	KJ488973	100%
3	Sem identificação	--	--
2	<i>Minidiscus comicus</i>	MN528688	99,2%
--	--	--	--
--	--	--	--
--	--	--	--
--	--	--	--
--	--	--	--

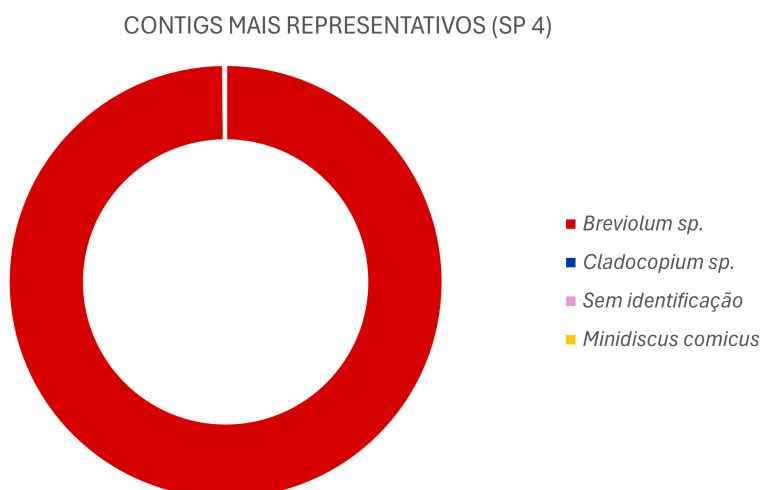


Figura 9. Representação gráfica da identificação dos Contigs mais representativos do dataset (amostra) Ubatuba 4

DISCUSSÃO

A aplicação de metabarcoding com o marcador ITS neste estudo permitiu, de forma inédita para o Atlântico Sul Ocidental, caracterizar a diversidade de simbiossitos associados à anêmona-do-mar *Actinostella flosculifera*. Os resultados evidenciam que a estrutura da comunidade simbiótica não é estática, mas sim governada por um complexo jogo entre zonamento latitudinal e heterogeneidade de micro-habitats, corroborando a visão de que cnidários bentônicos possuem comunidades microbianas dinâmicas que respondem a fatores ambientais locais (Gregorin *et al.*, 2024; McCauley *et al.*, 2023).

Partição Latitudinal: *Symbiodinium* vs. *Breviolum*

A análise comparativa entre os conjuntos de dados do Nordeste (Salvador) e do Sudeste (Ubatuba) revela um padrão biogeográfico claro de substituição de clados dominantes (turnover).

Dominância de *Symbiodinium* (antigo Clado A) em Salvador: A predominância quase exclusiva do gênero *Symbiodinium* (especialmente *Symbiodinium* sp. A) nas amostras da Bahia é consistente com a sua distribuição pantropical. Linhagens de *Symbiodinium* são evolutivamente adaptadas a condições de alta irradiância e estabilidade térmica, características de baixas latitudes. Essa associação sugere que, para *A. flosculifera* em regiões tropicais, a resistência à radiação UV e ao

estresse térmico provida por *Symbiodinium* é o fator chave para a estabilidade do holobionte (LaJeunesse *et al.*, 2018; Titus *et al.*, 2020).

Dominância de *Breviolum* (antigo Clado B) em Ubatuba: Em contraste, a prevalência de *Breviolum* na maioria das amostras do litoral paulista (Ubatuba 2, 3 e 4) reflete a adaptação deste gênero a ambientes subtropicais e temperados, onde as flutuações sazonais de temperatura e turbidez são mais acentuadas. *Breviolum* é frequentemente descrito como um gênero "oportunista" ou de ampla tolerância fisiológica, capaz de prosperar onde as condições são subótimas para especialistas estritos (Sun *et al.*, 2021), um atributo que possivelmente pode beneficiar o holobionte em regiões com variações intensas de temperatura.

Esta estruturação latitudinal indica que *A. flosculifera* exibe flexibilidade simbiótica em escala geográfica, selecionando parceiros que otimizam o desempenho metabólico conforme o regime térmico local, um mecanismo essencial para evitar a disbiose e o colapso do holobionte descritos por Dungan *et al.* (2022).

Plasticidade Fenotípica e o Efeito do Micro-habitat

Um achado notável que desafia a dicotomia latitudinal simples é o perfil da amostra Ubatuba 1 que, apesar de estar em uma região subtropical, apresentou dominância de *Symbiodinium* sp. B, similar às amostras da Bahia. Este resultado sugere que a seleção de simbiontes em *A. flosculifera* atua também em microescala. As zonas entremarés são ambientes altamente heterogêneos; poças de maré específicas podem reter água e sofrer aquecimento extremo durante a maré baixa, criando "ilhas de calor" que mimetizam condições tropicais.

A capacidade da anêmona de hospedar *Symbiodinium* em Ubatuba indica que a espécie possui plasticidade para associar-se a linhagens termotolerantes quando o micro-habitat exige. Isso reforça a hipótese de que a diversidade críptica de simbiontes atua como um reservatório de resiliência frente a estressores térmicos pontuais, possibilitando respostas rápidas (Sydnor *et al.*, 2023).

A "Biosfera Rara" e Potencial de Aclimação

A detecção de gêneros em baixa abundância (*background population*), como *Cladocopium* (antigo Clado C) nas amostras Salvador 2 e Ubatuba 4, e a

coexistência de *Breviolum* em amostras dominadas por *Symbiodinium*, apontam para a existência de uma diversidade funcional oculta.

Conforme discutido por MacVittie *et al.* (2024), essas populações de fundo não são ruído experimental, mas componentes vitais que podem se tornar dominantes através do processo de *shuffling* (embaralhamento) caso as condições ambientais mudem drasticamente. A presença de *Cladocopium*, um gênero conhecido por sua eficiência fotossintética em águas mais profundas ou turvas, sugere que *A. flosculifera* mantém um repertório genético simbiótico diversificado, fundamental para a sobrevivência em cenários de mudanças climáticas globais.

Interações Tróficas e Validação Metodológica

A recuperação de sequências de DNA do próprio hospedeiro (*Actinostella flosculifera* e *Actinostella* sp.) em todos os conjuntos de dados valida a metodologia de extração. Paralelamente, a detecção de macroalgas (*Ulva*, *Grateloupia*) e outros cnidários (*Oulactis*, *Calliactis*) nas leituras deve ser interpretada à luz da morfologia da espécie. Conforme descrito por Duran-Fuentes *et al.* (2023), a presença do "marginal ruff" (i.e., fronda) facilita a captura de detritos e presas na coluna d'água. Portanto, essas sequências exógenas provavelmente representam duas possibilidades: 1) Material alimentar: Algas e detritos orgânicos capturados ou ingeridos e/ou 2) Vizinhança bentônica: DNA ambiental (eDNA) de organismos sésseis adjacentes nas poças de maré.

Esses dados confirmam o papel de *A. flosculifera* como um elo ativo nas cadeias alimentares bentônicas, interagindo fisicamente com a comunidade ao seu redor, além de sua dependência dos endossimbiontes fotossintéticos (Murray *et al.*, 2016).

No geral, este estudo demonstra que *Actinostella flosculifera* não é fiel a uma única linhagem de zooxantelas. A espécie se comporta como um hospedeiro generalista capaz de modular suas associações simbióticas (*Symbiodinium* vs. *Breviolum*) em resposta a gradientes latitudinais e microclimáticos. Esta plasticidade sugere que a espécie pode ter uma capacidade de resiliência superior à de corais especialistas frente ao aquecimento dos oceanos, desde que as populações locais de simbiontes permaneçam disponíveis no ambiente.

RECONHECIMENTOS

Os estudos deste capítulo tiveram apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Nº 88887.952891/2024-00), e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Nº 22/16193-1 e 22/09430-7).

REFERÊNCIAS

- Benvenuti C, Fassio G, Russini V, Modica MV, Oliverio M, Davolos D, Nocella E (2024). A Metabarcoding Approach for Investigating the Stomach Microbiota of the Corallivorous Snail *Coralliophila meyendorffii* (Muricidae, Coralliophilinae) and Its Venomous Host, the Sea-Anemone *Parazoanthus axinellae* (Zoanthidea, Parazoanthidae). *Microbiology Research* 15(4): 2341–2357. <https://doi.org/10.3390/microbiolres15040157>.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30(15): 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
- Dungan AM, Hartman LM, Blackall LL, van Oppen MJH (2022). Exploring microbiome engineering as a strategy for improved thermal tolerance in *Exaiptasia diaphana*. *J Appl Microbiol* 132(4): 2940–2956. doi: 10.1111/jam.15465.
- Durán-Fuentes JA, Mendes F, da Costa RC, Pescinelli RA, Floeter SR, Stampar SN (2023). Ecological notes on *Actinostella flosculifera* (Le Sueur, 1817) (Cnidaria: Actiniaria: Actiniidae) in the Southwestern Atlantic, Brazil. *J Mar Biol Assoc UK* 103: e20, 1–6. <https://doi.org/10.1017/S0025315423000103>.
- Gregorin C, Vega Fernández T, Di Camillo CG, et al. (2024). Big enough for an extra-large meal: a review on predation upon large animals by benthic cnidarians. *Hydrobiologia* 851: 4307–4323. <https://doi.org/10.1007/s10750-024-05523-4>.
- Har JY, Helbig T, Lim JH, Fernando SC, Reitzel AM, Penn K, Thompson JR (2015). Microbial diversity and activity in the *Nematostella vectensis* holobiont: insights from 16S rRNA gene sequencing, isolate genomes, and a pilot-scale survey of gene expression. *Front Microbiol* 6: 818.
- Li D, Liu CM, Luo R, Sadakane K, Lam TW (2015). MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics* 31(10): 1674–1676. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv033>.
- MacVittie S, Doroodian S, Alberto A, Sogin M (2024). Microbiome depletion and recovery in the sea anemone, *Exaiptasia diaphana*, following antibiotic exposure. *mSystems* 9(6): e0134223. doi: 10.1128/msystems.01342-23.
- McCauley M, Goulet TL, Jackson CR, et al. (2023). Systematic review of cnidarian microbiomes reveals insights into the structure, specificity, and fidelity of marine associations. *Nat Commun* 14: 4899. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39876-6>.
- Murray AE, Rack FR, Zook R, Williams MJ, Higham ML, Broe M, Kaufmann RS, Daly M (2016). Microbiome Composition and Diversity of the Ice-Dwelling Sea Anemone, *Edwardsiella andrillae*. *Integr Comp Biol* 56(4): 542–555. doi: 10.1093/icb/icw095.

- Sydnor JR, Lopez J, Wolfe GV, Ott L, Tran C (2023). Changes in the microbiome of the sea anemone *Exaiptasia diaphana* during bleaching from short-term thermal elevation. *Front Mar Sci* 10: 1130964. doi: 10.3389/fmars.2023.1130964.
- Sun J, Hamel JF, Pemberton-Renaud V, Cossignani E, Mercier A (2021). Trophic ecology, diet and feeding behaviour of three bathyal sea anemones (Actiniaria: Cnidaria) in the Northwest Atlantic. *Deep Sea Res Part I: Oceanogr Res Papers* 179: 103678. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2021.103678>.
- The Galaxy Community (2024). The Galaxy platform for accessible, reproducible, and collaborative data analyses: 2024 update. *Nucleic Acids Res* gkae410. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae410>.
- Titus BM, Laroche R, Rodríguez E, Wirshing H, Meyer CP (2020). Host identity and symbiotic association affects the taxonomic and functional diversity of the clownfish-hosting sea anemone microbiome. *Biol Lett* 16: 20190738. <http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2019.0738>.
- Zapata F, Goetz FE, Smith SA, Howison M, Siebert S, Church SH, *et al.* (2015). Phylogenomic Analyses Support Traditional Relationships within Cnidaria. *PLoS ONE* 10(10): e0139068. doi: 10.1371/journal.pone.0139068.

CAPÍTULO 2.

Caracterização do microbioma da espécie invasora *Cassiopea andromeda* (Cnidaria; Medusozoa)

Júlia M. Molina^{1,2}, Sérgio N. Stampar²

¹Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, Brasil

²Faculdade de Ciências de Bauru, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Bauru, São Paulo, Brasil

Correspondência

Júlia Melo Molina

julia.molina@unesp.br

RESUMO

A medusa invertida, *Cassiopea andromeda* (Forskål, 1775), é um organismo modelo para estudos de simbiose com Symbiodiniaceae. Sua ocorrência é frequentemente associada a águas rasas e calmas, mas sua distribuição exata e a composição de seus simbiossomas na costa brasileira são pouco documentadas. Este estudo relata o primeiro registro de *C. andromeda* para a Ilha de Itaparica, Bahia, e utiliza a técnica de metabarcoding para caracterizar a comunidade total de eucariotos associada a esses espécimes. A análise via sequenciamento de nova geração (NGS) e bioinformática revelou uma composição simbiótica complexa. Conforme esperado para o gênero, os resultados confirmaram a ocorrência de duas linhagens de Symbiodiniaceae associadas às medusas, identificadas como dos gêneros *Breviolum* e *Symbiodinium*. No entanto, a investigação revelou um achado inédito e ainda inexplorado: a ocorrência significativa da microalga *Tetraselmis cordiformis*, além de outras sequências classificadas no gênero *Tetraselmis* (Chlorophyta). Esta é a primeira vez que se registra um potencial de associação estável entre *Cassiopea* e esta linhagem de alga verde, sugerindo um sistema simbiótico alternativo ou complementar ao de Symbiodiniaceae, cujas implicações ecológicas e fisiológicas são totalmente desconhecidas. De forma alarmante, o metabarcoding também revelou a presença de diversos outros organismos eucariotos no tecido ou no muco

das medusas, muitos dos quais são prejudiciais à saúde humana e ecossistêmica. Destacam-se a ocorrência de *Malassezia restricta*, um fungo oportunista associado a condições dermatológicas humanas, como dermatite seborreica e caspa, e *Pfiesteria piscicida*, um dinoflagelado notório por sua toxicidade e capacidade de causar mortandade de peixes. A detecção desses organismos específicos levanta sérias preocupações sobre a qualidade da água no local de coleta. A presença de *M. restricta* e *P. piscicida* é um forte indício de contaminação ambiental, possivelmente resultante do despejo de esgoto doméstico não tratado. Este estudo, portanto, além de expandir a área de ocorrência de *C. andromeda* e descobrir uma nova associação simbiótica potencial com Chlorophyta, demonstra a eficácia do metabarcoding como ferramenta de monitoramento ambiental, utilizando a medusa como um biossensor passivo da poluição local.

PALAVRAS-CHAVE: Bioinvasão, associação simbiótica, medusozoa

Microbiome characterization of the invasive species *Cassiopea andromeda* (Cnidaria; Medusozoa)

Júlia M. Molina^{1,2}, Sérgio N. Stampar²

¹Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, Brasil

²Faculdade de Ciências de Bauru, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Bauru, São Paulo, Brasil

Correspondence

Júlia Melo Molina

julia.molina@unesp.br

ABSTRACT

The upside-down jellyfish, *Cassiopea andromeda* (Forskål, 1775), is a model organism for studies of symbiosis with Symbiodiniaceae. Its occurrence is often associated with shallow, calm waters, but its exact distribution and the composition of its symbionts on the Brazilian coast are poorly documented. This study reports the first record of *C. andromeda* for Itaparica Island, Bahia, and uses the metabarcoding technique to characterize the total eukaryotic community associated with these specimens. The analysis via next-generation sequencing (NGS) and bioinformatics revealed a complex symbiotic composition. As expected for the genus, the results confirmed the occurrence of two strains of Symbiodiniaceae associated with the medusae, identified as belonging to the genera *Breviolum* and *Symbiodinium*. However, the investigation revealed an unprecedented and still unexplored finding: the significant occurrence of the microalga *Tetraselmis cordiformis*, in addition to other sequences classified in the genus *Tetraselmis* (Chlorophyta). This is the first time that a potentially stable association between *Cassiopea* and this green algae lineage has been recorded, suggesting an alternative or complementary symbiotic system to that of Symbiodiniaceae, whose ecological and physiological implications are completely unknown. Alarmingly, metabarcoding also revealed the presence of several other eukaryotic organisms in the tissue or mucus of the medusae, many of which are harmful to human and ecosystem health. The most notable are *Malassezia restricta*, an opportunistic fungus associated with human dermatological conditions

such as seborrheic dermatitis and dandruff, and *Pfiesteria piscicida*, a dinoflagellate notorious for its toxicity and ability to cause fish mortality. The detection of these specific organisms raises serious concerns about water quality at the collection site. The presence of *M. restricta* and *P. piscicida* is a strong indication of environmental contamination, possibly resulting from the discharge of untreated domestic sewage. This study, therefore, in addition to expanding the area of occurrence of *C. andromeda* and discovering a new potential symbiotic association with Chlorophyta, demonstrates the effectiveness of metabarcoding as an environmental monitoring tool, using medusae as a passive biosensor of local pollution.

KEYWORDS: Bioinvasion, symbiotic association, medusozoa

INTRODUÇÃO

Ao ameaçar a perda da biodiversidade, as espécies exóticas invasoras, especialmente marinhas, são uma consequência do transporte naval e marítimo. Embora possam ser introduzidas intencionalmente, a maioria das espécies torna-se inapta para estabelecer populações viáveis, resultando em poucos grupos capazes de invadir diferentes bacias oceânicas. Os representantes do filo Cnidaria, sobretudo as medusas, apresentam potenciais características biológicas que lhes fornecem essa capacidade, e ainda que poucos grupos sejam considerados invasores, há muitos registros. Este cenário é parcialmente provocado pela compreensão incompleta de aspectos ecológicos do grupo, incluindo sua distribuição, que engloba espécies crípticas (González-Duarte *et al.*, 2016; Morandini *et al.*, 2017).

O gênero *Cassiopea*, constituído pela água-viva “upside-down” (i.e., de cabeça para baixo), distribui cerca de doze espécies em águas tropicais e subtropicais rasas, incluindo recifes de corais, manguezais e lagoas costeiras. Ainda que sua distribuição se concentre ao longo do Atlântico Sul, Indo-Pacífico e Mar do Caribe, sabe-se que há uma expansão latitudinal que engloba outras zonas. O primeiro relato do gênero no Brasil, na região Sudeste, foi publicado em 2002 (Migotto *et al.*, 2002). Nos anos posteriores, como em 2005, 2007, 2008, 2011 e 2012, o grupo foi relatado em novas localidades, incluindo o Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia e Rio Grande do Norte (Morandini *et al.*, 2017; Morejón-Arrojo *et al.*, 2025).

A preferência do gênero *Cassiopea* por habitats específicos está relacionada à luminosidade e disponibilidade de matéria orgânica, fatores que equilibram sua interação com algas dinoflageladas e auxiliam na alimentação. Algumas espécies do gênero são mais abundantes em ambientes eutrofizados, cujas atividades antropogênicas são mais intensas. As altas taxas de nutrientes em ambientes perturbados, no entanto, além de resultarem em altas densidades de *Cassiopea*, podem alterar as comunidades bentônicas locais. Deste modo, o gênero exibe certo grau de influência na dinâmica do ciclo biogeoquímico do seu ecossistema (Niggli *et al.*, 2020; Morejón-Arrojo *et al.*, 2025).

Embora seu crescimento possa ser afetado por variáveis ambientais, como a temperatura, as espécies do gênero são ecologicamente resistentes. Ao

prosperarem em ambientes desafiadores, os indivíduos são resilientes às alterações de salinidade, temperatura e pH, que reforçam a sua capacidade de regeneração tecidual e reprodução assexuada. Além disso, a plasticidade trófica do gênero é positiva quando os indivíduos atenuam a fome durante períodos de estresse térmico. As fontes nutricionais autotróficas, no entanto, permitem que os espécimes continuem se desenvolvendo rapidamente e habitem novos locais durante esse período (Mammone *et al.*, 2021; Muffett *et al.*, 2022; Ostendarp *et al.*, 2022; Toullec *et al.*, 2024).

Em razão do aumento populacional de medusas em determinados ambientes, há um interesse progressivo no estudo dos simbiossomas que interagem com os cnidários. Ao atuarem expressivamente na nutrição das medusas, os simbiossomas se beneficiam de adaptações comportamentais e morfológicas dos hospedeiros. Os dinoflagelados que vivem em associação com espécies de medusas constituem a família Symbiodiniaceae, cujos indivíduos são distribuídos em diferentes gêneros e apresentam numerosas diferenças ecológicas e de distribuição geográfica (Djeghri *et al.*, 2019; Enrique-Navarro *et al.*, 2022; LaJeunesse *et al.*, 2018). Deste modo, o presente capítulo busca caracterizar o microbioma associado à *Cassiopea andromeda* (Forskål, 1775), com o intuito de explorar o papel ecológico de uma espécie invasora da costa brasileira.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material

Espécimes de *Cassiopea andromeda* (Forskål, 1775) foram coletados manualmente em um canal marinho na Praia Henriqueta Catarino, Itaparica, Bahia (-12.8850 S, -38.6773 O). Os espécimes foram removidos do sedimento com a utilização de pinças metálicas e preservados imediatamente em etanol 99°.

Extração, Construção de Bibliotecas e Sequenciamento de DNA Metabarcoding

A extração de DNA total foi conduzida com pedaços de aproximadamente 1cm² dos braços orais de todos os espécimes. Essas extrações foram conduzidas com o kit de extração de coluna (Quatro G Biotecnologia 100197) em sistema isolado de fluxo laminar. Após a extração, o DNA foi quantificado em sistema

Nanodrop, encaminhado para a confecção de bibliotecas e sequenciado em serviço terceirizado. A construção de bibliotecas foi realizada com amplificação do DNA utilizando os primers ITSint-for2 (sense, 5'-GAATTGCAGAACTCCGTG-3'; LaJeunesse e Trench 2000) e ITS2rev (antisense, 5'-GGGATCCATATGCTTAAGTTCAGCGGG-3'; Coleman *et al.* 1994), e o sequenciamento foi realizado em equipamento NextSeq2000 (2 x 300 pb).

Processamento dos resultados

Os resultados obtidos do sequenciamento foram analisados inicialmente em plataforma Galaxy (version 25.1.rc1) com a implementação da seguinte ordem de aplicações: 1) As sequências brutas foram submetidas ao sistema Galaxy, onde os dados pareados de cada dataset configuraram dois arquivos; 2) Cada dataset foi submetido a aplicação Trimmomatic (versão 0.39) para o pré-processamento e limpeza dos dados. Nesta aplicação foram utilizados os comandos “ILLUMINACLIP” e “SLIDINGWINDOW”, sendo o segundo com valores AQR = 20 e QSE = Phred33; 3) Os dados limpos foram subsequentemente submetidos a aplicação “MEGAHIT” (versão 1.2.9), sendo este com valores $k_{min}+2$ (kmers = 21,29,39,59,79,99,119,141) e Contigs de no mínimo 200pb. Os Contigs foram importados em sistema Geneious e individualmente submetidos a comparação no banco de dados Genbank (Nucleotide collection – Megablast).

RESULTADOS

Os sequenciamentos resultaram em 3 datasets de metabarcoding com ITS. Os resultados brutos podem ser observados na Tabela 1 e Figura 1, bem como o número de reads para a montagem dos Contigs mais representativos (Tabela 2 e Figura 2), e sua identificação (Tabela 3-5 e Figura 3-5). A partir desses dados, é possível verificar a diferença entre as amostras coletadas na região Nordeste, Salvador - Bahia.

Contigs são longas sequências de DNA formadas a partir da montagem e sobreposição de reads, ou leituras. Para Salvador, a amostra Itaparica 3 apresenta o maior número de Contigs (Tabela e Figura 1), enquanto a amostra Itaparica 1 apresenta o maior número de reads para a montagem dos Contigs mais representativos (Tabela e Figura 2).

Tabela 1. Resultado por cada dataset após montagem dos Contigs (Megahit).

Dataset	Quantidade de Contigs	Tamanho das sequências (Max - Mín) pb
Itaparica 1	39	571 - 301
Itaparica 2	33	579 - 301
Itaparica 3	261	567 - 206

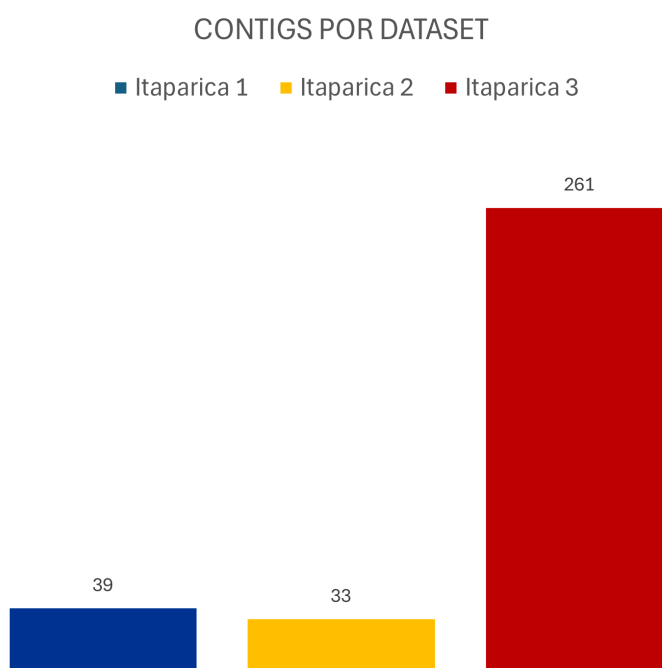
**Figura 1.** Gráfico representativo da quantidade de Contigs por dataset (amostras)

Tabela 2. Quantidade de reads para a montagem dos 10 Contigs mais representativos.

Datasets		
Itaparica 1	Itaparica 2	Itaparica 3
34572	16935	15715
18494	14329	2143
1848	457	657
712	280	134
162	230	123
75	67	104
61	40	93
35	33	89
33	28	84
32	20	83

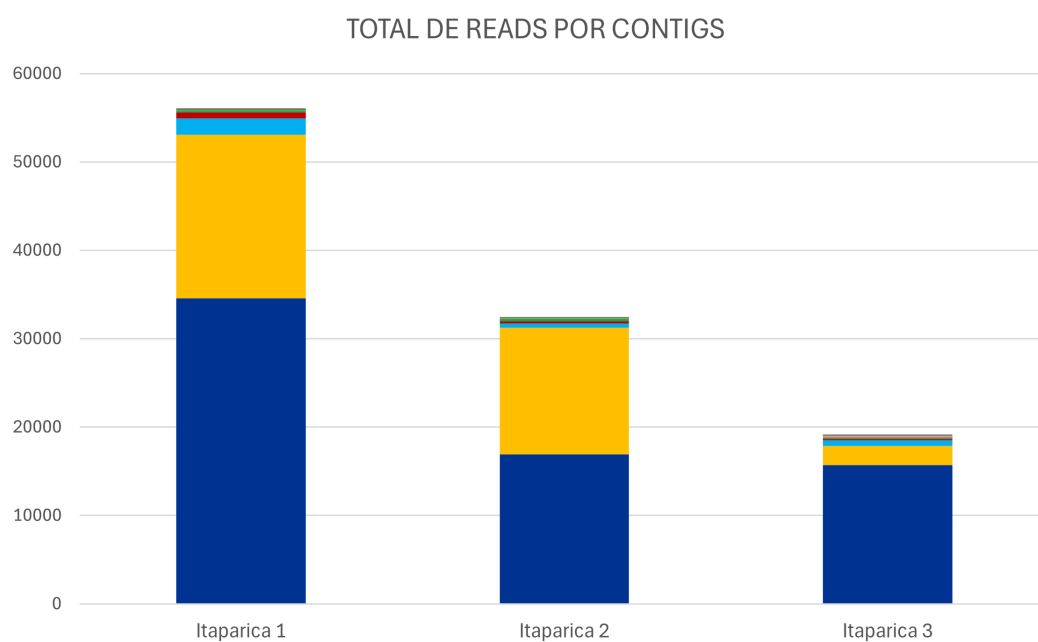


Figura 2. Gráfico representativo da quantidade de reads para a montagem dos Contigs mais representativos

As três amostras de Itaparica são dominadas pela presença de *Breviolum* sp., e *Symbiodinium* sp. Além de material gelatinoso, foram identificadas sequências de algas vermelhas, como *Grateloupia* sp, de leveduras presentes em pele humana,

como *Malassezia restricta*, Chlorophyta, como *Tetraselmis cordiformis*, protozoários ciliados, como *Dysteria brasiliensis*, e placozoários, como *Trichoplax adhaerens*.

Tabela 3. Identificação dos Contigs mais representativos do dataset Itaparica 1.

Itaparica 1/reads	IDs	Genbank ID	Similaridade
34572	<i>Breviolum</i> sp.	OL375477	100%
18494	<i>Symbiodinium</i> sp.	KP134492	100%
1848	Eucarioto não identificado	KX115303	97,6%
712	<i>Actinostella</i> sp.	OQ517056	98,6%
162	<i>Grateloupia</i> sp.	AY775369	100%
75	<i>Malassezia restricta</i>	PQ530878	99,8%
61	<i>Desmodesmus komarekii</i>	MN759324	99,5
35	Fungo não cultivado	OW838897	94,3%
33	<i>Symbiodinium natans</i>	PP563703	98,7%
32	<i>Rama falklandica</i>	OR197217	98,9%

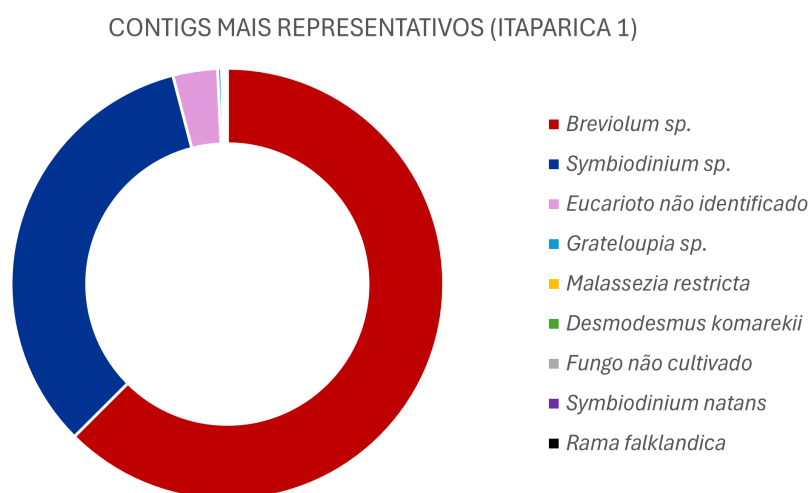
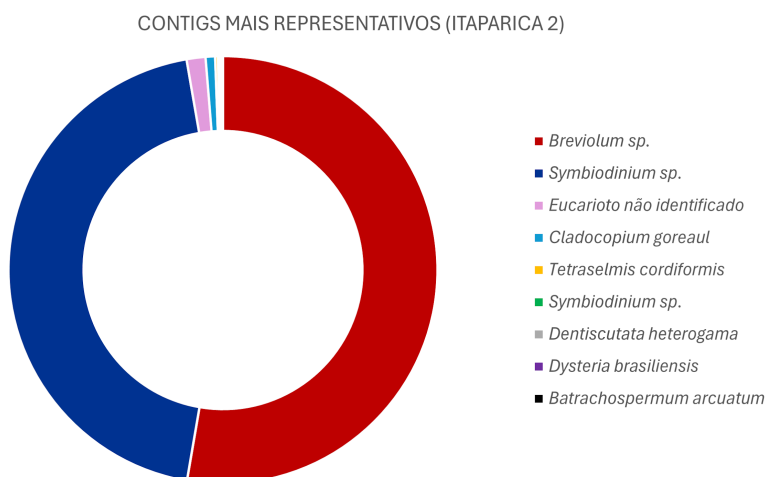


Figura 3. Representação gráfica da identificação dos Contigs mais representativos do dataset (amostra) Itaparica 1

Tabela 4. Identificação dos Contigs mais representativos do dataset Itaparica 2.

Itaparica 2 /reads	IDs	Genbank ID	Similaridade
16935	<i>Breviolum</i> sp.	OL375477	100%
14329	<i>Symbiodinium</i> sp.	KP134492	100%
457	Eucarioto não identificado	KX115335	97,6%
280	<i>Actinostella flosculifera</i>	PP531531	96,3%
230	<i>Cladocopium goreaul</i>	MT174582	99,7%
67	<i>Tetraselmis cordiformis</i>	MK460469	99,0%
40	<i>Symbiodinium</i> sp.	OQ449281	98,7%
33	<i>Dentiscutata heterogama</i>	PX215078	84,2%
28	<i>Dysteria brasiliensis</i>	KX099198	98,1%
20	<i>Batrachospermum arcuatum</i>	KC511096	96,0%

**Figura 4.** Representação gráfica da identificação dos Contigs mais representativos do dataset (amostra) Itaparica 2**Tabela 5.** Identificação dos Contigs mais representativos do dataset Itaparica 3.

Itaparica 3/reads	IDs	Genbank ID	Similaridade
15715	<i>Breviolum</i> sp.	OL375477	100%
2143	<i>Trichoplax adhaerens</i>	U65478	97,8%
657	<i>Actinostella flosculifera</i>	PP531531	97,7%
134	<i>Tetraselmis cordiformis</i>	MK460469	99,0%
123	<i>Symbiodinium</i> sp.	KM041038	100%
104	<i>Symbiodinium</i> sp.	OQ449281	98,7%
93	<i>Breviolum</i> sp.	OL375615	100%
89	Fungo não cultivado	OW838897	94,3%
84	<i>Tetraselmis cordiformis</i>	MK460468	99,0%

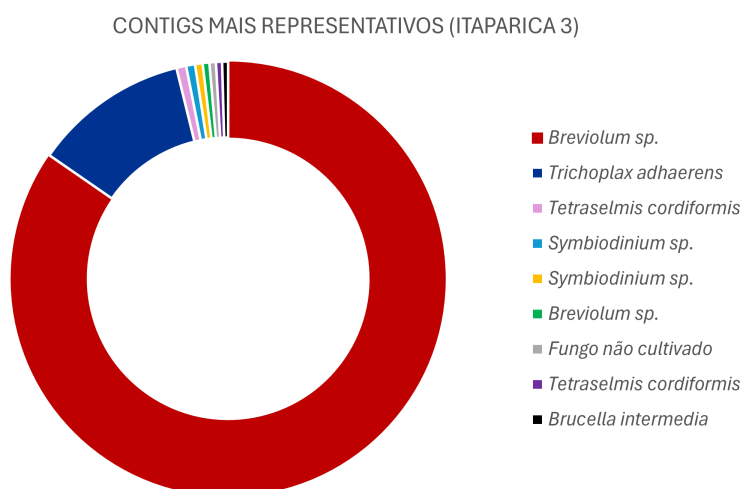


Figura 5. Representação gráfica da identificação dos Contigs mais representativos do dataset (amostra) Itaparica 3

DISCUSSÃO

O presente estudo utilizou uma abordagem de metabarcoding baseada no marcador ITS para caracterizar a diversidade eucariótica associada aos braços orais da medusa *Cassiopea andromeda* na Ilha de Itaparica, Bahia. Os resultados obtidos revelam um perfil complexo dominado por endossimbiontes dinoflagelados, mas também destacam a presença de organismos ambientais e potenciais contaminantes, fornecendo insights sobre a ecologia deste cifozoário em águas brasileiras.

Predominância de Symbiodiniaceae e Flexibilidade Simbiótica

A análise dos Contigs mais representativos nos três conjuntos de dados de Itaparica confirma que a *C. andromeda* mantém uma associação obrigatória e dominante com dinoflagelados da família Symbiodiniaceae.

Dominância de *Breviolum*: Em todas as amostras, o gênero *Breviolum* (antigo Clado B) foi o mais abundante, obtendo 100% de similaridade com *Breviolum* sp. Este achado é consistente com a literatura global, que frequentemente reporta *Breviolum*, um simbiote sensível ao calor, como predominante em *Cassiopea* sp., especialmente em águas tropicais e subtropicais. A alta contagem de reads (ex:

34.572 em Itaparica 1) sugere que este é o simbiote principal funcional (Fitt *et al.*, 2021).

Co-ocorrência com *Symbiodinium*: A detecção expressiva de *Symbiodinium* sp. (antigo Clado A) e, em menor escala, *Cladocopium* *goreaui* (filótipo C - amostra Itaparica 2), indica que os espécimes de Itaparica podem abrigar comunidades funcionalmente diversificadas de simbioses. Enquanto *Cladocopium* pode potencializar a captação de luz em locais turbidos, *Symbiodinium* pode fornecer proteção térmica, e *Breviolum* é capaz de atuar como um simbiote de base (LaJeunesse *et al.*, 2018). Essa plasticidade na associação com diferentes clados de Symbiodiniaceae pode ser um fator chave para o sucesso invasivo e adaptativo da *C. andromeda* em variados regimes térmicos e de irradiância no litoral brasileiro. Estudos filogeográficos e genômicos futuros podem considerar, ainda, se as medusas trouxeram linhagens consigo como vetores de dispersão ou se recrutaram linhagens do habitat brasileiro, alterando a macrofauna e a microbiota dos ecossistemas invadidos.

Diversidade Ambiental e Assinaturas de eDNA

A metodologia de extração a partir dos braços orais, combinada com a alta sensibilidade do sequenciamento NextSeq2000, resultou na detecção de organismos que provavelmente não são simbioses diretos, mas que coabitam o nicho bentônico da medusa ou servem de alimento. A espécie em questão produz muco de maneira contínua, criando uma matriz rica em nutrientes que atua como um substrato para o desenvolvimento de comunidades diversas.

Vizinhança Bentônica: A presença de sequências de *Actinostella* (anêmona) e *Dysteria brasiliensis* (ciliado) sugere a captação de DNA ambiental (eDNA) ou material particulado aderido ao muco da medusa, dado que *Cassiopea* é um organismo bentônico que repousa sobre o sedimento onde estes organismos também habitam.

Microalgas de Vida Livre: A detecção de *Tetraselmis cordiformis* e *Grateloupia* sp. nos tecidos orais da medusa pode representar microalgas presentes na coluna d'água capturadas para alimentação (heterotrofia), uma vez que *Cassiopea* é mixotrófica, ou seja, depende da fotossíntese dos simbioses e da captura ativa de fitoplâncton, bem como outras partículas da coluna d'água. Essa capacidade pode

conferir à medusa vantagem competitiva sobre indivíduos que habitam águas turbas e instáveis, e dependem exclusivamente da fotossíntese, tornando a mixotrofia um dos aspectos do seu sucesso invasivo (Morandini *et al.*, 2017).

O caso de *Trichoplax*: A identificação de *Trichoplax adhaerens* (Placozoa) na amostra Itaparica 3 é notável. Placozoários são frequentemente crípticos em ambientes marinhos costeiros e negligenciados em estudos de levantamento da biodiversidade. Sua associação neste capítulo reforça a capacidade do metabarcoding em detectar biodiversidade oculta associada à "biosfera" da medusa, que também pode atuar como um substrato móvel para esses organismos, visto que sua nutrição envolve consumo de biofilme. Deste modo, consoante à natureza dessa relação, a medusa pode atuar como um vetor facilitador de dispersão para espécies crípticas.

Variação Inter-amostral e Aspectos Metodológicos

Observou-se uma variação significativa entre os conjuntos de dados. Enquanto Itaparica 1 e 2 apresentaram um perfil mais focado nos simbiontes principais, Itaparica 3 mostrou um número muito maior de Contigs (261) com menor contagem de reads para os simbiontes dominantes. Isso pode indicar uma variação fisiológica no indivíduo da amostra 3 (menor densidade de zooxantelas) ou uma maior "contaminação" por material exógeno no momento da coleta.

A detecção de *Malassezia restricta*, um fungo frequentemente associado à pele humana, na amostra 1, ilustra a sensibilidade do método e as possíveis fontes de contaminação de estudos ambientais. Apesar da coleta com pinças, a presença deste fungo sugere contaminação humana durante o manuseio ou processamento laboratorial, o que é comum em estudos de *amplicon sequencing* sensíveis. Ao mesmo tempo, isso pode ser uma evidência da poluição do local de coleta. O canal de Itaparica (Figura 6), onde os espécimes foram coletados, recebe uma evidente quantidade de dejetos residenciais, fator que pode introduzir microrganismos no ambiente marinho. A possibilidade de contaminação humana durante o manuseio dos materiais, no entanto, não pode excluir uma potencial incorporação de microrganismos presentes na água pela medusa, sugerindo que a espécie pode ser utilizada como um bioacumulador de contaminação em ambientes costeiros.



Figura 6. Área do canal de coleta dos espécimes de *Cassiopea andromeda* na Ilha de Itaparica. Setas em vermelho: saídas de esgoto doméstico.

RECONHECIMENTOS

Os estudos deste capítulo tiveram apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Nº 88887.952891/2024-00), e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Nº 22/16193-1 e 22/09430-7).

REFERÊNCIAS

- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30(15): 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
- Djeghri N, Pondaven P, Stibor H, Dawson MN (2019). Review of the diversity, traits, and ecology of zooxanthellate jellyfishes. *Mar Biol* 166: 147. doi: 10.1007/s00227-019-3581-6.
- Enrique-Navarro A, Huertas E, Flander-Putrlé V, Bartual A, Navarro G, Ruiz J, Malej A, Prieto L (2022). Living Inside a Jellyfish: The Symbiosis Case Study of Host-Specialized Dinoflagellates, “Zooxanthellae,” and the Scyphozoan *Cotylorhiza tuberculata*. *Front Mar Sci* 9: 817312. doi: 10.3389/fmars.2022.817312.
- Fitt, W. K., Hofmann, D. K., Kemp, D. W., & Ohdera, A. H. (2021). Different Physiology in the Jellyfish *Cassiopea xamachana* and *C. frondosa* in Florida Bay. *Oceans*, 2(4), 811-821. <https://doi.org/10.3390/oceans2040046>

- González-Duarte MM, Megina C, López-González PJ, Galil B (2016). Cnidarian Alien Species in Expansion. In: Goffredo S, Dubinsky Z (eds) *The Cnidaria, Past, Present and Future*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31305-4_10.
- LaJeunesse TC, Parkinson JE, Gabrielson PW, Jeong HJ, Reimer JD, Voolstra CR, *et al.* (2018). Systematic revision of Symbiodiniaceae highlights the antiquity and diversity of coral endosymbionts. *Curr Biol* 28: 2570–2580. doi: 10.1016/j.cub.2018.07.008.
- Li D, Liu CM, Luo R, Sadakane K, Lam TW (2015). MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics* 31(10): 1674–1676. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv033>.
- Mammone M, Ferrier-Page's C, Lavorano S, Rizzo L, Piraino S, Rossi S (2021). High photosynthetic plasticity may reinforce invasiveness of upside-down zooxanthellate jellyfish in Mediterranean coastal waters. *PLoS ONE* 16(3): e0248814. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248814>.
- Migotto A, Marques A, Morandini A, Silveira F (2001). Checklist of the Cnidaria Medusozoa of Brazil. *Biota Neotropica* 2: 10.1590/S1676-06032002000100010.
- Morandini AC, Stampar SN, Maronna MM, Da Silveira FL (2017). All non-indigenous species were introduced recently? The case study of *Cassiopea* (Cnidaria: Scyphozoa) in Brazilian waters. *J Mar Biol Assoc UK* 97(2): 321–328. doi: 10.1017/S0025315416000400.
- Morejón-Arrojo RD, Mammone M, López-Figueroa NB, *et al.* (2025). Life upside-down: review of ecological roles of *Cassiopea* (Cnidaria: Scyphozoa) in marine ecosystems—a look at the Western Atlantic. *Discov Ecol* 1: 7. <https://doi.org/10.1007/s44396-025-00006-9>.
- Muffett K, Miglietta MP (2022). Impacts of light and food availability on early development of *Cassiopea* medusae. *Front Mar Sci* 8: 783876. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.783876>.
- Niggli W, Naumann MS, Struck U, Manasrah R, Wild C (2010). Organic matter release by the benthic upside-down jellyfish *Cassiopea* sp. fuels pelagic food webs in coral reefs. *J Exp Mar Biol Ecol* 384(1–2): 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2010.01.011>.
- Niggli W, Wild C (2010). Spatial distribution of the upside-down jellyfish *Cassiopea* sp. within fringing coral reef environments of the Northern Red Sea: implications for its life cycle. *Helgol Mar Res* 64(4): 281–287. <https://doi.org/10.1007/s10152-009-0181-8>.
- Ostendarp M, Plewka J, Flathmann J, Tilstra A, El-Khaled YC, Wild C (2022). Complete and rapid regeneration of fragments from the upside-down jellyfish *Cassiopea*. *Front Mar Sci* 9: 949233. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.949233>.
- The Galaxy Community (2024). The Galaxy platform for accessible, reproducible, and collaborative data analyses: 2024 update. *Nucleic Acids Res* gkae410. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae410>.
- Toullec G, Rädcker N, Pogoreutz C, Banc-Prandi G, Escrig S, Genoud C, *et al.* (2024). Host starvation and in hospite degradation of algal symbionts shape the heat stress response of the *Cassiopea*-Symbiodiniaceae symbiosis. *Microbiome* 12: 42. <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01738-0>.

CAPÍTULO 3.

A diversidade oculta da família Symbiodiniaceae revelada por abordagens genômicas e transcriptômicas

Júlia M. Molina^{1,2}, Jeferson A. Durán-Fuentes², Sérgio N. Stampar²

¹Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, Brasil

²Faculdade de Ciências de Bauru, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Bauru, São Paulo, Brasil

Correspondência

Júlia Melo Molina

julia.molina@unesp.br

RESUMO

Nos ecossistemas marinhos, os endossimbiontes fotossintéticos atuam em uma troca significativa de nutrientes, influenciando o desenvolvimento de inúmeros invertebrados. A relação mutualística entre corais recifais e dinoflagelados da família Symbiodiniaceae é destaque na literatura e exhibe a diversidade de gêneros dentro do grupo de microrganismos que opera na resistência dos seus hospedeiros. A diversidade das associações no ambiente marinho, portanto, revela o potencial adaptativo das inúmeras interações e as respostas fisiológicas dos hospedeiros, especialmente cnidários, tópicos pouco investigados em escalas genômicas e em organismos solitários. À vista disso, o presente estudo analisou a variabilidade do microbioma da anêmona-do-mar *Actinostella flosculifera* (Le Sueur, 1817) a partir da reconstrução da posição filogenética dos seus endossimbiontes. Através do método de “genome skimming” e de abordagens transcriptômicas, as sequências obtidas foram comparadas no banco de dados de nucleotídeos do GenBank utilizando uma sequência de referência (*Symbiodinium microadriaticum*), e separadas de acordo com os marcadores ITS1, 5.8S, ITS2 e 28S. A reconstrução filogenética revelou que a maioria dos endossimbiontes amostrados pertence aos clados A, do gênero *Symbiodinium*, e B, do gênero *Breviolum*, que engloba grande parte dos simbiontes associados aos espécimes coletados ao longo da costa norte e sudeste do Brasil.

Essa é uma abordagem inovadora que favorece estudos de filogenia e genômica comparativa, permitindo que os aspectos ecológicos e evolutivos das espécies sejam amplamente explorados.

PALAVRAS-CHAVE: Genome skimming, actiniidae, endossimbiontes

The hidden diversity of the Symbiodiniaceae family revealed by genomic and transcriptomic approaches

Júlia M. Molina^{1,2}, Jeferson A. Durán-Fuentes², Sérgio N. Stampar²

¹Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, Brasil

²Faculdade de Ciências de Bauru, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Bauru, São Paulo, Brasil

Correspondence

Júlia Melo Molina

julia.molina@unesp.br

ABSTRACT

In marine ecosystems, photosynthetic endosymbionts play a significant role in nutrient exchange, influencing the development of numerous invertebrates. The mutualistic relationship between reef corals and dinoflagellates of the Symbiodiniaceae family is highlighted in the literature and exhibits the diversity of genera within the group of microorganisms that operate in the resistance of their hosts. The diversity of associations in the marine environment, therefore, reveals the adaptive potential of numerous interactions and the physiological responses of hosts, especially cnidarians, which are topics that have been little investigated at genomic scale and in solitary organisms. In this context, the present study examined the variability of the microbiome of the sea anemone *Actinostella flosculifera* (Le Sueur, 1817) based on the reconstruction of the phylogenetic position of its endosymbionts. Using the genome skimming method and transcriptomic approaches, the sequences obtained were compared in the GenBank nucleotide database using a reference sequence (*Symbiodinium microadriaticum*) and separated according to the ITS1, 5.8S, ITS2, and 28S markers. The phylogenetic reconstruction revealed that most of the endosymbionts sampled belong to clades A, of the genus *Symbiodinium*, and B, of the genus *Breviolum*, which comprises most of the symbionts associated with specimens collected along the northern and southeastern coast of Brazil. This is an innovative approach that supports studies of phylogeny and comparative genomics, allowing the ecological and evolutionary aspects of species to be fully explored.

KEYWORDS: Genome skimming, actiniidae, endosymbionts

INTRODUÇÃO

Ao atuarem como endossimbiontes fotossintéticos de grupos distintos de invertebrados marinhos, como poríferos, cnidários, moluscos e platelmintos, os dinoflagelados da família Symbiodiniaceae influenciam a extensa biodiversidade dos ecossistemas costeiros (Pochon *et al.*, 2014). Uma das associações mais conhecidas corresponde à simbiose mutualística entre corais formadores de recife e organismos do gênero *Symbiodinium*, comumente conhecidos como zooxantelas, na qual há troca de nutrientes essenciais para o metabolismo, crescimento e reprodução do hospedeiro. Ao sustentarem parte da calcificação que constrói os esqueletos dos corais, os endossimbiontes moldam estruturas capazes de abrigar uma ampla e fundamental diversidade de vida nos recifes (Bellis *et al.*, 2016).

Nas últimas décadas, a diversidade de *Symbiodinium* tem sido caracterizada em múltiplas escalas espaciais e temporais, promovendo avanços significativos nos estudos sobre a ecologia e evolução das espécies marinhas (Franklin *et al.*, 2012). As respostas dos hospedeiros às variações ambientais, especialmente ao aumento da temperatura dos oceanos, têm despertado um interesse crescente na variabilidade dos endossimbiontes associados aos antozoários, uma vez que as alterações fisiológicas podem levar à ruptura das interações simbióticas e à expulsão dos simbiontes (i.e., branqueamento). Nesse contexto, em condições ambientais extremas, os hospedeiros podem estabelecer novas associações com genótipos alternativos de simbiontes, abrigando comunidades de Symbiodiniaceae potencialmente mais tolerantes ao calor. Assim, a diversidade das associações entre dinoflagelados e cnidários, sobretudo antozoários, evidencia a complexidade das respostas fisiológicas do grupo e o potencial adaptativo evolutivo dessas interações, aspectos ainda pouco explorados em escala genômica (Jones *et al.*, 2008; Keshavmurthy *et al.*, 2012; Logan *et al.*, 2014).

Com o avanço das técnicas moleculares, Rowan e Powers (1991) distinguiram o grupo *Symbiodinium* em três linhagens distintas – Clados A, B e C. A expansão dos estudos para áreas geográficas distintas, bem como o uso de diferentes marcadores moleculares, evidenciou seis novos clados (D-I), e posteriormente mais uma linhagem (J) com base em organismos de vida livre. Atualmente, revisões que integram informações genômicas e variações da sequência de DNA em diferentes tipos de marcadores, fracionaram os clados

(terminologia antiga) em 15 linhagens correspondentes à gêneros, no qual o gênero *Symbiodinium* (antigo Clado A) representa uma linhagem basal de Symbiodiniaceae. O grupo é encontrado nos oceanos Atlântico, Pacífico e Índico, e estabelece simbioses com Hexacorallia, Octocorallia – subclasses de Anthozoa – Hydrozoa e Scyphozoa – classes de Medusozoa (Nitschke *et al.*, 2022).

O aprimoramento de abordagens genômicas ampliou substancialmente a resolução das relações filogenéticas entre os organismos ao longo da história. No entanto, obter genomas ou transcriptomas completos de alta qualidade ainda é inviável para muitos táxons, especialmente, em razão do alto custo. O método de “genome skimming”, por sua vez, extrai dados superficiais de genomas completos e retém frações dos dados de sequenciamento para estudos filogenômicos. De maneira eficaz, portanto, a técnica de baixa cobertura é útil para organismos não modelo e pode ser utilizada para obter elementos ultra-conservados (UCEs), éxons e outros genes de interesse (Quek e Huang, 2021).

Ao classificar os táxons e aperfeiçoar as estimativas de distribuição e diversidade das espécies, a abordagem de “genome skimming” pode favorecer estudos de filogenia e genômica comparativa de invertebrados marinhos. Grandes grupos, como o subfilo Anthozoa, com mais de 7.500 espécies descritas, são alvos de estudos filogenômicos que combinam uma variedade de métodos para a resolução de questões em diferentes escalas (Quattrini *et al.*, 2024). Deste modo, as abordagens representam oportunidades para gerar hipóteses filogenéticas sólidas de grupos taxonômicos e seus endossimbiontes, explorando amplamente aspectos ecológicos e evolutivos das espécies (Malé *et al.*, 2014).

Este capítulo, portanto, tem como objetivo avaliar a diversidade dos endossimbiontes de *Actinostella flosculifera* (Le Sueur, 1817) por meio de abordagens genômicas e transcriptômicas. A partir da reconstrução da posição filogenética dos indivíduos em associação, pretende-se discutir a maneira como as espécies interagem com seus ambientes e como elas respondem às mudanças ecológicas e evolutivas, bem como quais abordagens fornecem resultados mais significativos. Esses são tópicos de extrema importância para a conservação das espécies e dos ecossistemas marinhos diante das mudanças climáticas globais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta de amostras

Foram coletados 19 espécimes de *Actinostella flosculifera* em várias localidades de água rasa, totalizando cinco regiões ao longo da costa norte e sudeste do Brasil: Praia de Muro Alto, Ipojuca, Estado de Pernambuco (N = 1; 8°25'44"S, 34°58'35"W); Cabo Frio, Estado do Rio de Janeiro (N = 1; 22°57'27"S, 42°00'59"W); Praia do Lambert, Saco da Ribeira, Ubatuba, Estado de São Paulo (N = 3; 23°30'04"S, 45°07'09"W); Florianópolis, Estado de Santa Catarina (N = 1; 27°46'58.3"S, 48°30'25"W). Foram coletadas, ainda, amostras na Colômbia, Punta Bello, Córdoba (N = 1; 9°25'15"N, 75°44'43"W); nos Estados Unidos, Summerland Key (N = 4; 24°41'11.2"N 81°26'38.7"W) e Tavernier, Flórida (N = 1; 25°01'18.8"N 80°30'49.1"W); no Golfo do México, na praia de Chabihau, Península de Yucatán, México (YU_Me) (N = 4; 21°21'25"N, 89°07'36"W); e, por fim, na Espanha, em Ilhas Canarias (N = 3; 28°07'43"N, 15°27'10"W).

As coletas foram feitas manualmente, utilizando um martelo, um cinzel e uma colher metálica. Os espécimes coletados foram transferidos para o laboratório, onde foram processados e analisados. Estas amostras coletadas fazem parte do projeto de doutorado de Jeferson Durán-Fuentes, deste modo, o material utilizado neste capítulo apresenta objetivos diferentes para estudos filogenéticos e de transcriptoma. As amostras de Florida, Estados Unidos, foram sequenciadas por RNA-seq, enquanto as demais amostras foram utilizadas para o genome-skimming, conforme os textos abaixo detalham.

Coleta de tecido, extração de RNA, sequenciamento e montagem do transcriptoma

As cinco amostras de Summerland Key e Tavernier da Florida, Estados Unidos, foram coletadas a partir do tecido da fronda dos espécimes. O RNA do material foi extraído utilizando o kit RNeasy® Plus Micro (Qiagen). Cada uma das amostras foi homogeneizada com um valor entre 5 e 10 mg de tecido e 350 µl de tampão RLT Plus utilizando uma seringa. O material foi transferido para uma coluna de centrifugação gDNA Eliminator, seguindo o protocolo do fabricante. A quantidade total de RNA foi medida a partir de um fluorômetro Qubit® Flex e um kit de ensaio Qubit™ RNA BR, e a qualidade do material foi avaliada utilizando um TapeStation

(Agilent Technologies, EUA). Todas as amostras apresentaram um Índice de Integridade do RNA (RIN) superior a 7. Cinco bibliotecas de RNA foram geradas a partir de 250 ng de RNA utilizando o NEBNext® UltraExpress RNA Library Prep, o Módulo de Isolamento Magnético de mRNA NEBNext® Poly(A) e os Oligos Multiplex NEBNext® para Illumina (New England Biolabs) e, posteriormente, sequenciadas utilizando um sequenciamento single-end de 75 pb numa máquina NextSeq 500 (Illumina, EUA).

As análises de bioinformática seguiram o pipeline de Pérez-Moreno *et al.*, 2023, com várias modificações. Os arquivos FASTQ brutos foram aparados utilizando o Fastp v0.23.4 (Chen *et al.*, 2023), e as leituras não emparelhadas resultantes foram concatenadas com a Contig Annotation Tool (CAT) v5.3 (<https://github.com/dutilh/CAT>). A qualidade da leitura foi avaliada antes e depois do corte utilizando o FastQC v0.12.1 (<https://github.com/s-andrews/FastQC>), MultiQC v1.20 (Ewels *et al.*, 2016) e SeqKit v2.8.0 (Shen *et al.*, 2016). Os erros de sequenciamento foram corrigidos com o Rcorrector v1.0.7 (<https://github.com/mourisl/Rcorrector>).

Os transcriptomas foram montados *de novo* a partir de uma abordagem multi-montadora, que aproveita os pontos fortes de diferentes algoritmos e configurações de parâmetros para obter uma montagem única, ideal e menos fragmentada (Gilbert 2019; Ortiz *et al.*, 2021). Para cada amostra, as montagens foram geradas usando SPAdes v4.2 (Bankevich *et al.*, 2012) e Trinity v2.15.2 (Grabherr *et al.*, 2011). As montagens Trinity foram produzidas usando parâmetros padrão, enquanto as montagens SPAdes foram geradas com a opção --rna e sua estratégia multi-*k-mer* integrada ($k = 39,59$). As saídas do SPAdes foram então filtradas sob três níveis de rigor (hard_filtered_transcripts.fasta, soft_filtered_transcripts.fasta e transcripts.fasta), todos incluídos nas etapas de fusão subsequentes. As quatro montagens por amostra (Trinity + três versões SPAdes) foram mescladas e padronizadas usando o script trformat.pl (com a opção -MINTR 180 para reter transcritos ≥ 180 bp), que combinou simultaneamente as montagens e unificou os nomes dos transcritos. As sequências resultantes foram então processadas com o pipeline EvidentialGene (EviGene) (Gilbert, 2019) para gerar um único transcriptoma ideal. Foi aplicado um limite mínimo de comprimento de aminoácidos de 20 resíduos.

Coleta de tecido, extração de DNA, sequenciamento e montagem do genome-skimming

As 14 amostras coletadas nas diferentes localidades, exceto nos Estados Unidos, foram retiradas do disco pedal dos espécimes. O DNA genômico das amostras foi extraído utilizando o kit QIAamp DNA Blood. A quantidade de DNA genômico utilizada na preparação das bibliotecas variou entre 364 e 1.744 ng de DNA total. A preparação das bibliotecas e o sequenciamento foram realizados na University of Wisconsin–Madison Collaborative Genomics Core Facility, em uma plataforma Illumina NovaSeq X Plus (leituras pareadas de 150 bp – PE).

Para as análises de bioinformática, o pipeline de Quattrini *et al.* (2024) foi executado com algumas modificações. A limpeza dos arquivos FASTQ brutos foi realizada utilizando o Fastp v0.23.4 (Chen *et al.*, 2018). Os dois arquivos FASTQ não pareados foram concatenados utilizando o Contig Annotation Tool (CAT) v5.3 (<https://github.com/dutilh/CAT>). A qualidade das leituras antes e depois do processamento foi avaliada com FastQC v0.12.1 (<https://github.com/s-andrews/FastQC>), MultiQC v1.20 e SeqKit v2.8.0 (Shen *et al.*, 2016), e as leituras foram montadas utilizando Spades v3.15.5 (Bankevich *et al.*, 2012).

Extração de Symbiodinaceae nos genomes skimming e transcriptoma

As sequências de Symbiodinaceae foram extraídas a partir dos mapeamentos dos transcriptomas e dos resultados de genome skimming no pacote Geneious Prime version 2023.1.2 (Kearse *et al.*, 2012). Uma sequência de referência da espécie *Symbiodinium microadriaticum* (Genbank: LK934668) foi utilizada para as análises. Deste modo, as sequências foram comparadas com o banco de dados de nucleotídeos do GenBank para confirmar a amplificação bem-sucedida do marcador/organismo alvo.

Estas sequências foram adicionadas com as sequências de metabarcoding (Capítulo 2) e de outros estudos, como Pochon *et al.* (2014). Os conjuntos de sequências foram anotados e separados de acordo com os marcadores ITS1, 5.8S, ITS2 e 28S, utilizando a mesma sequência de referência no Geneious Prime. Logo, as sequências foram alinhadas separadamente no MAFFT v7.53 utilizando o algoritmo L-INS-i e a opção “--maxiterate 1000” (Kato *et al.*, 2009), e

posteriormente concatenadas utilizando o SequenceMatrix v1.8 (Vaidya *et al.*, 2011). A reconstrução por máxima verossimilhança (ML) foi realizada no IQ-Tree2 (Minh *et al.*, 2020).

Uma abordagem concatenada foi empregada com um modelo de partição proporcional edge-linked, utilizando o ModelFinder (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017) para determinar o modelo evolutivo ideal para cada partição. O suporte dos ramos foi avaliado por meio de 1000 réplicas do teste SH-like de razão de verossimilhança aproximada (SH-aLRT) (Guindon *et al.*, 2010), 1000 réplicas de bootstrap ultrarrápido (UFBoot2) (Hoang *et al.*, 2018), além dos testes paramétricos aLRT (Anisimova e Gascuel 2006) e Bayes aproximado (Anisimova *et al.*, 2011). A seleção da melhor partição e do melhor modelo evolutivo para cada conjunto de dados foi baseada no critério de informação bayesiano (BIC), utilizando o ModelFinder conforme implementado no IQ-Tree2. As árvores resultantes foram editadas e visualizadas usando TreeGraph v2 (Stöver and Müller 2010).

RESULTADOS

A análise filogenética de genome skimming, utilizando uma abordagem de Máxima Verossimilhança (ML), resultou em uma topologia robusta para a família Symbiodiniaceae (Figura 1). O outgroup, composto por táxons dos gêneros *Peltodinium* e *Priddiniales*, foi utilizado para enraizar a árvore, confirmando a monofilia das nove clados principais (A-I). A análise filogenética dos endossimbiontes de *A. flosculifera* resolveu o conjunto de sequências em 8 clados distintos (gêneros) de Symbiodiniaceae (Figura 1): B, A, I, C, H, F, D e G. Uma sequência, no entanto, se ramifica mais próxima da raiz da árvore, não se agrupando com os clados mais abundantes, B, A e C, com alto suporte. Os Clados B e C foram recuperados com alto suporte estatístico, sendo que o Clado B, predominantemente composto por espécies de *Breviolum*, formou um grupo-irmão do Clado A com valores de suporte de, por exemplo, (99/1.00) no nó basal. Por sua vez, o Clado H é notavelmente diverso e inclui táxons proximamente relacionados a *Fugacium* e *Gerakladium*.

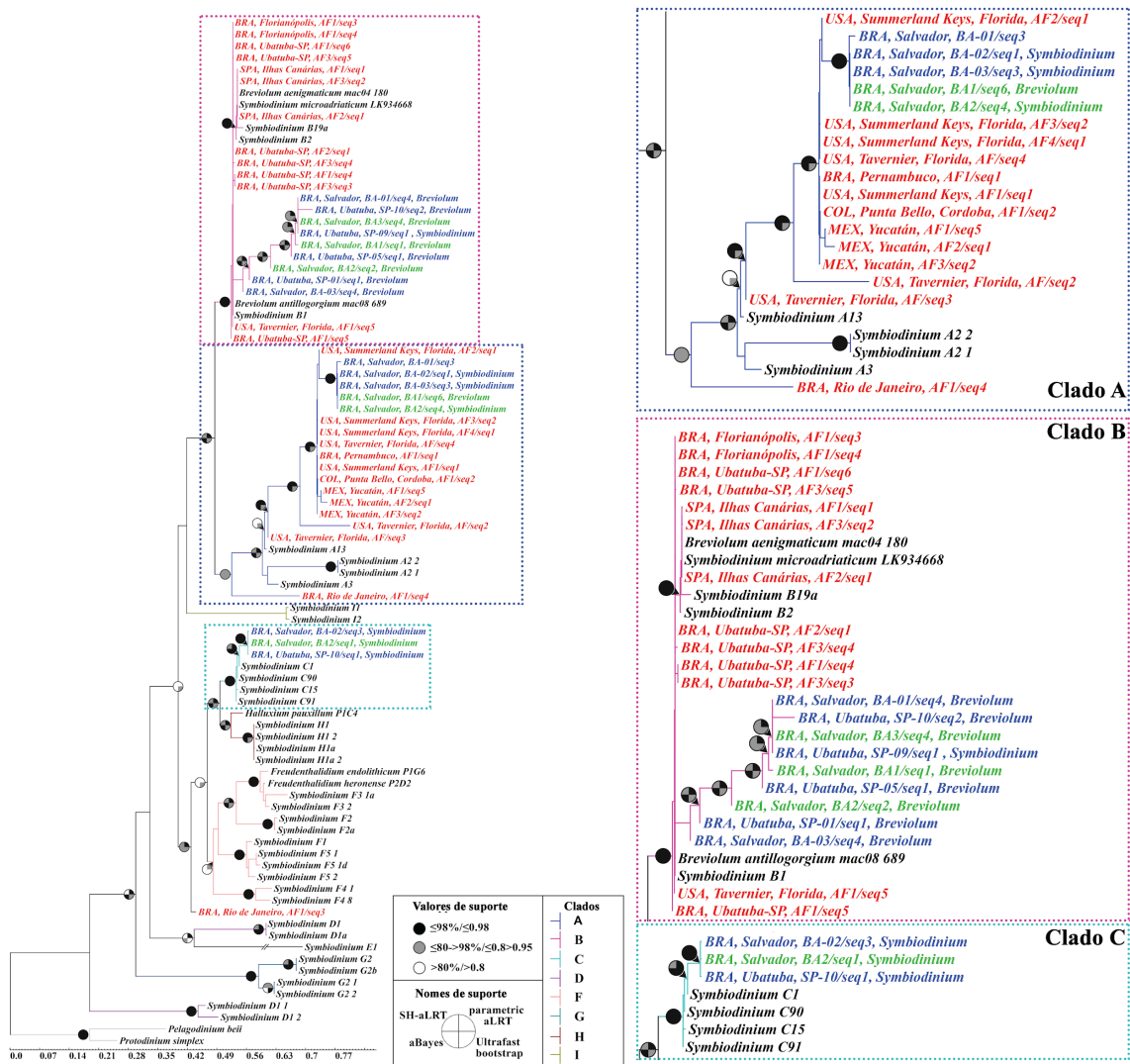


Figura 1. Reconstrução da posição filogenética dos endossimbiontes de *A. flosculifera*. A árvore foi enraizada a partir da sequência de referência de *Symbiodinium microadriaticum*. As sequências em vermelho representam os dados obtidos por meio das abordagens transcriptômicas e de genome skimming, enquanto as sequências em azul representam os resultados obtidos de *A. flosculifera* e *C. andromeda* por meio do metabarcoding (Capítulo 1 e 2).

DISCUSSÃO

O presente estudo utilizou dados de genome skimming (GK) e transcriptômica para elucidar as relações filogenéticas dos endossimbiontes em *Actinostella flosculifera* (Le Sueur, 1817). A topologia filogenética robusta obtida, com forte suporte para os nós principais (ex., Clado B/Clado A com (0,99/1), fornece uma base sólida para a discussão da diversidade taxonômica (Minh *et al.*, 2020).

Os resultados confirmam a ampla diversidade da família Symbiodiniaceae, resolvendo o conjunto de sequências em oito clados distintos (gêneros) (B, A, I, C, H, F, D e G). Essa alta riqueza de clados em um único hospedeiro, a anêmona *A. flosculifera*, é um achado significativo, indicando que este cnidário atua como um hospedeiro generalista ou flexível em termos de associações simbióticas, um padrão cada vez mais reconhecido em anêmonas, em contraste com a especificidade frequentemente observada em alguns corais (Jones *et al.*, 2008). A capacidade de abrigar múltiplos clados pode conferir a *A. flosculifera* uma maior resiliência a estressores ambientais, como o aumento da temperatura, através da troca ou rearranjo de simbiossiontes mais tolerantes (Logan *et al.*, 2014).

A recuperação da Clado B (*Breviolum*) como grupo-irmão da Clado A (*Symbiodinium*), com alto suporte, está em linha com as revisões taxonômicas mais recentes, que reposicionam *Symbiodinium* como linhagem basal (Nitschke *et al.*, 2022). O agrupamento das amostras em vermelho (provenientes de genome skimming e transcriptômica) dentro desses clados conhecidos valida o uso destas técnicas genômicas de baixa cobertura para a taxonomia e filogenia de Symbiodiniaceae.

Os dados de GK e transcriptômica foram cruciais para a obtenção de uma árvore resolvida, especialmente no contexto de organismos não-modelo com genomas complexos, como os dinoflagelados (Quek e Huang, 2021). A integração de múltiplos marcadores (ITS1, 5.8S, ITS2, 28S) e a abordagem concatenada com modelos de partição otimizados (ModelFinder) são responsáveis pela robustez da topologia. A técnica de GK demonstrou ser eficaz na extração de sequências ribossomais informativas (rDNA) de baixa cobertura, permitindo a inclusão de amostras de diversas localidades do Brasil, Colômbia, México e Espanha. Isso superou os desafios de obtenção de genomas completos, provando ser uma ferramenta valiosa para estudos filogenômicos em larga escala geográfica e taxonômica (Quattrini *et al.*, 2024). Por outro lado, o uso de dados de RNA-seq (transcriptômica) das amostras da Flórida (USA) complementou a abordagem de genome skimming, fornecendo sequências de alta qualidade de genes expressos, o que pode aumentar a precisão da filogenia, especialmente em táxons de difícil resolução.

A sequência que se ramifica de forma basal, sem se agrupar nos clados mais abundantes, pode representar um novo genótipo não descrito ou uma linhagem rara. Isso reitera a necessidade de estudos genômicos aprofundados para capturar a diversidade críptica de Symbiodiniaceae (Franklin *et al.*, 2012).

Implicações Ecológicas e Evolutivas da Diversidade Geográfica

O estudo utilizou amostras de *A. flosculifera* de uma ampla faixa de distribuição geográfica, desde o Caribe (Colômbia, México) até o Sudeste/Sul do Brasil, e o Atlântico Leste (Espanha - Ilhas Canárias). A ocorrência de diversos clados em *A. flosculifera* ao longo de amplas latitudes sugere que a anêmona pode estar explorando a plasticidade de suas associações simbióticas para se adaptar às variações ambientais locais. Em ambientes com forte variabilidade térmica ou luminosa (como em algumas áreas costeiras tropicais e subtropicais), a capacidade de associar-se a clados termotolerantes (como D ou B) e clados mais sensíveis (como A ou C) pode ser a chave para a sua persistência. A presença da Clado H (*Fugacium*/Gerakladium), conhecida por sua associação com hospedeiros de água temperada e por vezes fria, nas amostras de latitudes mais altas do Brasil e Ilhas Canárias, pode indicar uma resposta ecotípica específica à temperatura ou profundidade.

Os dados de metabarcoding (em azul na Figura 1) de outros estudos em *A. flosculifera* e *C. andromeda* (Capítulo 2) na mesma figura oferecem um valioso contexto comparativo. A sobreposição dos genótipos obtidos por genome skimming (vermelho) e metabarcoding (azul) corrobora a consistência dos métodos e reforça a prevalência destes clados nas anêmonas.

Este estudo demonstra, de forma inequívoca, que *Actinostella flosculifera* abriga uma rica e diversificada comunidade de endossimbiontes Symbiodiniaceae ao longo de sua distribuição. A resolução filogenética alcançada por meio da integração de abordagens genômicas de baixo custo e alta resolução (genome skimming e transcriptômica) forneceu insights cruciais sobre o potencial adaptativo dessa anêmona. Compreender quais genótipos de Symbiodiniaceae estão presentes em quais localidades e como eles se relacionam filogeneticamente é fundamental para prever a vulnerabilidade ou resiliência dos cnidários em face das Mudanças Climáticas Globais (MCG).

Estudos futuros devem focar na quantificação relativa dos clados em diferentes condições ambientais e na análise funcional dos transcriptomas para ligar a diversidade genômica à resposta fisiológica do holobionte (hospedeiro + simbiote) ao estresse térmico. Essa é uma rota crucial para informar estratégias de conservação eficazes para os ecossistemas marinhos costeiros.

Plasticidade Simbiótica e Adaptação a Regimes Térmicos Locais

A coexistência de múltiplos clados permite que o holobionte se ajuste às flutuações ambientais por meio de mecanismos de "shuffling" (ajuste nas proporções relativas dos simbiontes) ou "switching" (aquisição de novos simbiontes) (Logan *et al.*, 2014). Nossos dados, ao demonstrar a presença de clados com perfis térmicos contrastantes (ex., o termotolerante Clado D e o Clado H, frequentemente associada a águas mais temperadas/frias), apoiam a hipótese de que a diversidade é moldada por adaptação a regimes térmicos locais. Em regiões cronicamente quentes ou sob estresse térmico, como as amostras do Caribe e do Nordeste brasileiro, a prevalência de clados termotolerantes (como Clado D - *Durusdinium*) é esperada e tem sido documentada em outros ecossistemas estressados, como no Golfo Pérsico/Arábico (Fiesinger *et al.*, 2025), onde a baixa diversidade e a estabilidade temporal desses simbiontes são a chave para a sobrevivência do hospedeiro.

Inversamente, a detecção da Clado H em amostras de latitudes mais altas (Sul do Brasil ou Ilhas Canárias, que podem experimentar temperaturas médias mais baixas) sugere uma resposta ecotípica do holobionte. Essa variação na composição filogenética é crucial, pois a tolerância térmica pode variar não apenas entre clados, mas também entre populações geograficamente distintas de um mesmo genótipo. Assim, a variação observada na *A. flosculifera* pode refletir a adaptação de populações específicas de Symbiodiniaceae a microclimas locais ao longo de sua distribuição.

O Holobionte e a Estabilidade Microbiológica no Estresse

A capacidade adaptativa do holobionte de *A. flosculifera* não reside apenas na diversidade de Symbiodiniaceae. O sucesso da anêmona em colonizar diferentes ambientes é sustentado pela interação complexa de todos os membros do holobionte (hospedeiro, Symbiodiniaceae e microbioma associado). Estudos indicam que o microbioma bacteriano é altamente específico para cada linhagem de

Symbiodiniaceae e desempenha um papel funcional significativo na resiliência do simbionte ao estresse (Camp *et al.*, 2020). Notavelmente, cepas termotolerantes, como as da Clado D, demonstraram possuir as comunidades bacterianas mais estáveis sob estresse térmico (Camp *et al.*, 2020). Essa estabilidade microbiana pode ser funcional, pois as bactérias associadas podem fornecer compostos essenciais, como antioxidantes (e.g., zeaxantina), que ajudam a proteger o fotossistema II (PSII) das Symbiodiniaceae contra danos causados pelo calor e pela luz excessiva. Portanto, a plasticidade observada em *A. flosculifera* é uma estratégia em múltiplos níveis:

Macro-nível: Permitindo o switching de clados em resposta a mudanças ambientais de longo prazo.

Micro-nível: Mantendo associações com clados cujos microbiomas associados conferem uma resiliência fisiológica intrínseca à fotossíntese em condições extremas.

A investigação filogenética em escala genômica (genome skimming) é o primeiro passo para mapear essa diversidade; o próximo passo lógico para o nosso estudo é correlacionar os clados geográficos identificados com as características do microbioma, utilizando os dados de RNA-seq (transcriptômica) das amostras da Flórida para obter insights funcionais sobre o holobionte.

Implicações para a Conservação e a Trajetória Evolutiva

A compreensão da diversidade de Symbiodiniaceae e sua distribuição é vital para a conservação. A detecção de nove clados demonstra o potencial de *A. flosculifera* para se manter em diferentes cenários de mudanças climáticas. No entanto, o futuro da associação simbiótica depende da sua capacidade de sobrevivência em todas as fases da vida, incluindo o recrutamento larval (Loures *et al.*, 2025). As associações larva-Symbiodiniaceae são vulneráveis aos impactos das mudanças climáticas, afetando a reprodução e a dispersão. Ao fornecer dados genômicos de alta resolução para as Symbiodiniaceae em *A. flosculifera*, este estudo estabelece uma linha de base crucial para o monitoramento genético de simbiontes em cnidários não corais. Isso permite rastrear a perda potencial de linhagens sensíveis e o aumento na dominância de genótipos termotolerantes em resposta ao aquecimento (Fiesinger *et al.*, 2025). Assim, a diversidade filogenética

documentada neste estudo é apenas um reflexo da história evolutiva, bem como um indicador do potencial adaptativo da anêmona para enfrentar os desafios ambientais futuros.

RECONHECIMENTOS

Os estudos deste capítulo tiveram apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Nº 88887.952891/2024-00), e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Nº 22/16193-1 e 22/09430-7).

REFERÊNCIAS

- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19: 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
- Bellis ES, Howe DK, Denver DR (2016). Genome-wide polymorphism and signatures of selection in the symbiotic sea anemone *Aiptasia*. *BMC Genomics* 17: 160. doi: 10.1186/s12864-016-2488-6.
- Camp, E. F., Kahlke, T., Nitschke, M. R., Varkey, D., Fisher, N. L., Fujise, L., ... & Suggett, D. J. (2020). Revealing changes in the microbiome of Symbiodiniaceae under thermal stress. *Environmental Microbiology*, 22(4), 1294-1309.
- Chen S (2023) fastp 1.0: An ultra-fast all-round tool for FASTQ data quality control and preprocessing. *iMeta* e70078.
- Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* 32(19): 3047–3048. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>.
- Fiesinger, A., Alderdice, R., Colin, L., Manns, H., Perna, G., Stankiewicz, K. H., ... & Voolstra, C. R. (2025). Symbiodiniaceae shifts over the last decade on the hottest coral reefs on Earth. *Coral Reefs*, 1-16.
- Franklin EC, Stat M, Pochon X, Putnam HM, Gates RD (2012). GeoSymbio: a hybrid, cloud-based web application of global geospatial bioinformatics and ecoinformatics for Symbiodinium-host symbioses. *Mol Ecol Resour* 2: 369–373. doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.03081.x.
- Gilbert DG (2019). Longest protein, longest transcript or most expression, for accurate gene reconstruction of transcriptomes? *BioRxiv* 829184.
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, ... & Regev A (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology* 29(7): 644-652.
- Jones AM, Berkelmans R, van Oppen MJH, Mieog JC, Sinclair W (2008). A community change in the algal endosymbionts of a scleractinian coral following a natural bleaching event: field evidence of acclimatization. *Proc R Soc B* 275: 1359–1365.

- Katoh K, Asimenos G, Toh H (2009). Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. *Methods Mol Biol* 537: 39–64.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647–1649. <https://doi.org/10.1007/s12526-024-01433-9>.
- Keshavmurthy S, Hsu C-M, Kuo C-Y, Meng P-J, Wang J-T, Chen C (2012). Symbiont communities and host genetic structure of the brain coral *Platygyra verweyi*, at the outlet of a nuclear power plant and adjacent areas. *Mol Ecol* 21: 4393–4407.
- Logan CA, Dunne JP, Eakin CM, Donner SD (2014). Incorporating adaptive responses into future projections of coral bleaching. *Glob Chang Biol* 20: 125–139.
- Loures, A., Räddecker, N., Voolstra, C. R., Garrido, A. G., Zilberberg, C., Faria, S. C., ... & Mies, M. (2025). The larva-Symbiodiniaceae association at risk: putative impacts of climate change on reproduction, dispersal, and recruitment in coral reefs. *Coral Reefs*, 1-23.
- Malé PJ, Bardon L, Besnard G, Coissac E, Delsuc F, Engel J, Lhuillier E, Scotti-Saintagne C, Tinaut A, Chave J (2014). Genome skimming by shotgun sequencing helps resolve the phylogeny of a pantropical tree family. *Mol Ecol Resour* 5: 966–975. doi: 10.1111/1755-0998.12246. Epub 2014 Apr 2. PMID: 24606032.
- Nitschke MR, Rosset SL, Oakley CA, Gardner SG, Camp EF, Suggett DJ, Davy SK (2022). The diversity and ecology of Symbiodiniaceae: A traits-based review. *Adv Mar Biol* 92: 55–127. doi: 10.1016/bs.amb.2022.07.001. Epub 2022 Aug 27. PMID: 36208879.
- Ortiz R, Gera P, Rivera C, Santos JC (2021). Pincho: a modular approach to high quality de novo transcriptomics. *Genes* 12(7): 953.
- Pérez-Moreno JL, Kozma MT, DeLeo DM, Bracken-Grissom HD, Durica DS, Mykles DL (2023). CrustTome: a transcriptome database resource for large-scale analyses across Crustacea. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 13(7): jkad098.
- Pochon *et al.* (2014). Multi-gene analysis of Symbiodinium dinoflagellates: a perspective on rarity, symbiosis, and evolution. *PeerJ* 2: e394. DOI 10.7717/peerj.394.
- Quattrini AM, McCartin LJ, Easton EE, Horowitz J, Wirshing HH, Bowers H, Mitchell K, González-García MdP, Sei M, McFadden CS, Herrera S (2024). Skimming genomes for systematics and DNA barcodes of corals. *Ecology and Evolution* 14: e11254. <https://doi.org/10.1002/ece3.11254>.
- Quek R, Huang D (2022). Application of phylogenomic tools to unravel anthozoan evolution. *Coral Reefs* 41: 1–21. doi: 10.1007/s00338-021-02072-3.
- Rowan R, Powers DA (1991). A Molecular Genetic Classification of Zooxanthellae and the Evolution of Animal Algal Symbioses. *Science* 251: 1348–1351. DOI: 10.1126/science.251.4999.1348.
- Shen W, Le S, Li Y, Hu F (2016) SeqKit: a cross-platform and ultrafast toolkit for FASTA/Q file manipulation. *PloS One* 11(10): e0163962. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163962>.

CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos nesta pesquisa revelaram que as interações entre cnidários e dinoflagelados da família Symbiodiniaceae são dinâmicas e complexas, sugerindo que *Actinostella flosculifera* e *Cassiopea andromeda* compartilham uma flexibilidade simbiótica. Ao integrar abordagens moleculares e filogenômicas, tornou-se evidente que a plasticidade desenvolvida pelas espécies se manifesta em diferentes escalas, refletindo os desafios ecológicos que cada uma enfrenta no ecossistema bentônico. À medida que *A. flosculifera* parece adequar suas associações de acordo com os gradientes latitudinais em resposta às heterogeneidades ambientais, a medusa invasora é capaz de utilizar suas habilidades mixotróficas e a diversidade dos seus simbiossiontes para colonizar novos territórios, sustentando pequenas comunidades a partir da produção de muco.

A presença de diversos filótipos de Symbiodiniaceae em *A. flosculifera*, revelada pela abordagem de genome skimming e transcriptômica, desafia a especificidade estrita clássica observada em cnidários. A riqueza das associações e a estabilidade fornecida por filótipos termotolerantes sugerem que a resistência e resiliência do holobionte atuam em níveis, incluindo a própria flexibilidade simbiótica dos hospedeiros e as interações com comunidades bacterianas que operam diretamente com as algas dinoflageladas. Em cenários alarmantes de aquecimento global, identificar e avaliar o sucesso adaptativo das interações entre diferentes populações de cnidários e seus simbiossiontes torna-se indispensável para que novas estratégias de conservação sejam desenvolvidas.

A interpretação dos resultados adquiridos sugere, ainda, que parte da vitalidade dos ecossistemas marinhos costeiros parece estar intimamente ligada à saúde das associações ecológicas que os sustentam. Deste modo, torna-se evidente que a resiliência do holobionte não depende apenas de uma estratégia única, mas da sua capacidade de sustentar uma rede diversificada de simbiossiontes, adaptando-a de acordo com as exigências do ambiente. Pesquisas futuras, portanto, podem solucionar as limitações deste trabalho quanto à resolução dos marcadores utilizados, identificando onde diferenças funcionais para a sobrevivência dos holobiontes residem, e quanto aos fatores pontuais de coleta, distinguindo se os

padrões identificados refletem adaptações locais ou são resultado da plasticidade fenotípica das espécies.

REFERÊNCIAS

- Brown T, *et al.* (2017). Worldwide exploration of the microbiome harbored by the cnidarian model, *Exaiptasia pallida* (Agassiz in Verrill, 1864) indicates a lack of bacterial association specificity at a lower taxonomic rank. *PeerJ* 5: e3235. 16 maio 2017.
- Cavanaugh, CM (1994). Microbial Symbiosis: Patterns of Diversity in the Marine Environment. *Am Zool* 34(1): 79–89. doi: 10.2307/3883820.
- Curtis E, *et al.* (2023). Bacterial microbiome variation across symbiotic states and clonal lines in a cnidarian model. *Front Mar Sci* 10: 10 fev 2023.
- Guibert I, *et al.* (2020). Metabarcoding reveals distinct microbiotypes in the giant clam *Tridacna maxima*. *Microbiome* 8(1): 21 abr 2020.
- Maire J, Blackall LL, Van Oppen MJH (2021). Microbiome characterization of defensive tissues in the model anemone *Exaiptasia diaphana*. *BMC Microbiol* 21(1): 21 maio 2021.
- McCauley M, Goulet TL, Jackson CR, Loesgen S (2023). Systematic review of cnidarian microbiomes reveals insights into the structure, specificity, and fidelity of marine associations. *Nat Commun* 14(1): 4899. doi: 10.1038/s41467-023-39876-6.
- Millán-Márquez AM, Velasco-Montoya DA, Terraneo TI, *et al.* (2024). Symbiodiniaceae diversity in *Pocillopora* corals in different environments of the Colombian Eastern Pacific: symbiont specificity in spite of coral-host flexibility. *Coral Reefs* 43: 1581–1597. <https://doi.org/10.1007/s00338-024-02552-2>.
- Nitschke M, Rosset S, Oakley C, Gardner S, Camp E, Suggett D, Davy S (2022). The diversity and ecology of Symbiodiniaceae: A traits-based review. doi: 10.1016/bs.amb.2022.07.001.
- Pita L, Rix L, Slaby BM, *et al.* (2018). The sponge holobiont in a changing ocean: from microbes to ecosystems. *Microbiome* 6: 46. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0428-1>.
- Weiland-Bräuer N, Pinnow N, Langfeldt D, Roik A, Güllert S, Chibani CM, Reusch TBH, Schmitz RA (2020). The native microbiome is crucial for offspring generation and fitness of *Aurelia aurita*. *mBio* 11: e0233620. <https://doi.org/10.1128/mBio.02336-20>.
- Xu M, Cheng K, Xiao B, Tong M, Cai Z, Jong M, Chen G, Zhou J (2023). Bacterial Communities Vary from Different Scleractinian Coral Species and between Bleached and Non-Bleached Corals. *Microbiol Spectr* 11: e04910-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04910-22>.