

Instituto Politécnico de Leiria
Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar

Ensaio de reprodução da medusa *Phyllorhiza punctata*
para fins ornamentais



Fábio Alexandre dos Santos Miranda

2016

Instituto Politécnico de Leiria
Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar

Ensaio de reprodução da medusa *Phyllorhiza punctata*
para fins ornamentais

Fábio Alexandre dos Santos Miranda

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Aquacultura

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação do Doutor Paulo Maranhão

2016

Título: Ensaio de reprodução da medusa *Phyllorhiza punctata* para fins ornamentais

Copyright © Fábio Alexandre dos Santos Miranda

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2016

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

À equipa do CETEMARES por todo o apoio técnico, por me receberem e ajudado a efetuar este trabalho. A todos os bolseiros e estudantes presentes no edifício.

Ao professor doutor Paulo Maranhão por todo o acompanhamento ao longo do trabalho, que sempre se encontrou disponível para clarificar duvidas e encontrar soluções a diversos problemas.

Ao mestre João Chambel por todo o apoio teórico e prático ao longo de todo o trabalho, que sem este seria mais difícil de ser realizado.

À professora Susana Mendes que sempre demonstrou disponibilidade para ajudar.

À Escola Superior de Tecnologia do Mar pela possibilidade da realização do trabalho experimental no edifício CETEMARES.

À minha mãe e à minha avó que sem elas nada disto teria sido possível, tendo me apoiado em todas as ocasiões.

Resumo

Ao longo das últimas décadas verificou-se um aumento do mercado de organismos ornamentais, tornando-se num mercado bastante lucrativo. Os cnidários são um dos grupos com maior interesse e valorização dentro dos organismos ornamentais, dentro destes as medusas têm captado a atenção como organismos ornamentais, apresentando uma grande margem de progressão, sendo atualmente consideradas como uma espécie emergente na indústria da aquariorfilia.

Embora existam muitas espécies de medusa com potencial ornamental, a seleção de uma espécie alvo para o uso em aquários domésticos obriga a que sejam eleitos alguns critérios de adequabilidade, nomeadamente não ser letal ou perigosa para o Homem. A espécie *Phyllorhiza punctata* é uma das espécies com muita procura no mercado ornamental. Este trabalho teve como objetivo estudar as condições ideais para obter medusas a partir da fase de pólipos. Neste sentido foram realizados vários ensaios de forma a otimizar cada fase do processo.

Durante todo o processo de produção de medusas é necessário retirar os pólipos de um lugar para outro, colocando-os em novos substratos e esperar que se fixem. Neste sentido é importante que os pólipos se fixem aos substratos, para que ao serem manipulados não se soltem. Assim, foi realizado um estudo relativo à fixação de pólipos em diferentes substratos, nomeadamente: placa de 6 poços, caixa de petri, gobelet de vidro e de plástico. Verificou-se que os pólipos desta espécie não apresentam preferência por nenhum dos substratos em estudo, apresentando ao final de 7 dias uma taxa de fixação superior a 90% independentemente dos substratos usados.

Definido o substrato a utilizar nos ensaios, procedeu-se ao estudo das condições ótimas de temperatura e alimentação na reprodução assexuada por gemulação, tendo sido estudadas três temperaturas (20, 24 e 26°C), combinadas com duas condições de alimento (com e sem alimentação). Verificou-se que a produção de novos pólipos por gemulação obtém-se fornecendo alimento aos pólipos e mantendo-os a 24 ou 26°C.

Do ponto de vista de desenvolvimento de éfiras em pequenas medusas, testaram-se diferentes alimentações ((A) náuplios de artémia (10 Ind/ml), (B) rotíferos (20 Ind/ml), (C) náuplios de artémia (5 Ind/ml) + rotíferos (10 Ind/ml), (D) Microalga (*Nannochloropsis* sp., 5×10^5 células/ml), (E) Microalga (*Nannochloropsis* sp., 5×10^5 células/ml) + náuplios de artémia (10 Ind/ml), (F) Microalga (*Nannochloropsis* sp., 5×10^5 células/ml) + rotíferos (20

RESUMO

Ind/ml)), verificando-se que a utilização de Microalgas + Rotíferos, maximiza o crescimento e a sobrevivência, comparativamente com as restantes dietas em estudo.

O presente trabalho permitiu aumentar o conhecimento sobre a reprodução assexuada de pólipos e crescimento de éfiras de *P. punctata*. Ao longo do trabalho foi possível observar que existem condições chave que permitem otimizar o processo de produção desta espécie em aquacultura. Especialmente a importância da alimentação dos pólipos durante o processo de reprodução assexuada por gemulação, bem como da alimentação das éfiras com microalga e rotíferos conjuntamente.

Palavras chave: *Phyllorhiza punctata*; medusas; aquacultura ornamental; éfiras

ABSTRACT

Abstract

The trade of aquatic organisms for ornamental purposes has grown in last years and became a multi-billion dollar industry. The market growth has fostered a growing search for new ornamental species. The valorisation of jellyfish as ornamental organism features a large margin of growth.

Although have many species of jellyfish with potential for the ornamental market, the selection of one specie for use in home aquariums, need a special care, namely is essential that this specie do not dangerous for the humans.

The jellyfish Phyllorhiza punctata jellyfish is one of the jellyfish with high potential for the ornamental market. This work aimed the study of the optimal culture conditions in captivity to produce jellyfish. Beyond the general goal, this study aimed define the optimal conditions for polyp fixation, polyp asexual reproduction and ephyra growth-out.

The polyp phase has a high importance during the aquaculture processes of jellyfish, and for several tasks is necessary remove polyps from the aquarium to another substrate. In this sense, is essential to define which substrates can be used during the aquaculture procedures to pin the polyps. In this study were tested the effect of six weel plates, plastic petri dish, plastic goblet and glass goblet on polyp fixation. Results showed that after 7 days for all substrates, polyp fixation reached around 90%, with no statistically significant differences found in the polyp fixation rate between the different substrates tested.

Defined the subtract to use in the tests, we carried out the study of the optimal conditions of temperature and alimentation in the asexual reproduction by budding, were studied three temperatures (20, 24 and 26°C), combined with two conditions of alimentation (with and without alimentation). It was verified that the production of new polyps by budding is obtained providing food and by keeping them at 24 or 26°C.

From the point of view of developing ephyra to small jellyfish, different feeds were tested ((A) baby brine shrimp (10 Ind/ml), (B) rotifers (20 Ind/ml), (C) baby brine shrimp (5 Ind/ml) + rotifers (10 Ind/ml), (D) Microalgae (*Nannochloropsis* sp., 5×10^5 cells/ml), (E) Microalgae (*Nannochloropsis* sp., 5×10^5 cells/ml) + baby brine shrimp (10 Ind/ml), (F) Microalgae (*Nannochloropsis* sp., 5×10^5 cells/ml) + rotifers (20 Ind/ml)), was verified that the utilization of Microalgae + Rotifers, maximizes the growth and the survival, when compared with the others diets.

ABSTRACT

The present work allowed to increase the knowledge about the asexual reproduction of polyps and the growth of ephyrae of *P. punctata*. Throughout the study was possible to observe the key conditions that allow optimize the production process of this species in aquaculture. Especially the importance of the alimentation of polyps over the process of asexual reproduction by budding, as well as the alimentation of ephyrae with microalgae and rotifers together.

Key words: *Phyllorhiza punctata*; jellyfish; ornamental aquaculture; ephyra

Índice

Agradecimentos	V
Resumo	VII
Abstract	IX
Índice de figuras	XIII
Índice de tabelas	XV
1. Introdução	- 1 -
2. Objetivos	- 5 -
3. Materiais e métodos	- 7 -
i. Manutenção da população de pólipos.....	- 7 -
ii. Culturas de zooplâncton.....	- 7 -
iii. Efeito de diferentes substratos na fixação de pólipos.....	- 7 -
iv. Efeito da temperatura e alimentação na indução da reprodução assexuada (Gemulação).....	- 8 -
v. Efeito da alimentação no desenvolvimento da fase planctónica.....	- 9 -
vi. Análise estatística.....	- 10 -
-	-
4. Resultados	- 11 -
i. Efeito de diferentes substratos na fixação de pólipos.....	- 11 -
ii. Efeito da temperatura e alimentação na indução da reprodução assexuada (gemulação).....	- 12 -
iii. Efeito da alimentação no desenvolvimento da fase planctónica.....	- 14 -
5. Discussão	- 17 -
i. Efeito de diferentes substratos na fixação de pólipos.....	- 17 -
ii. Efeito da temperatura e alimentação na indução da reprodução assexuada (gemulação).....	- 19 -
iii. Efeito da alimentação no desenvolvimento da fase planctónica.....	- 20 -
6. Conclusão	- 21 -
7. Referências bibliográficas	- 23 -
8. Anexos	- 27 -

Índice de Figuras

Figura 1.1- Representação do ciclo de vida de uma medusa, apresentando a reprodução assexuada e sexuada.....	- 3 -
Figura 4.1- Taxa de fixação de pólipos de <i>P. punctata</i> em diferentes substratos (A) gobelet de plástico, B) gobelet de vidro, C) caixa de Petri de plástico, D) placa de seis poços) ao longo de 7 dias. Os valores correspondem à média (n=3).....	- 11 -
Figura 4.2- Somatório de formação de novos pólipos de <i>P. punctata</i> ao longo de 34 dias em diferentes tratamentos: 20A) 20° C com alimento; 24A) 24° C com alimento; 26A) 26° C com alimento; 20S) 20° C sem alimento; 24S) 24° C sem alimento, 26S) 26° C sem alimento. Os valores correspondem à média (n=3).....	- 12 -
Figura 4.3- Sobrevivência (%) de éfiras de <i>P. punctata</i> alimentadas com diferentes dietas ((A) náuplios de artémia (10 Ind/ml), (B) rotíferos (20 Ind/ml), (C) náuplios de artémia (5 Ind/ml) + rotíferos (10 Ind/ml), (D) Microalga (<i>Nannochloropsis</i> sp., 5x10 ⁵ células/ml), (E) Microalga (<i>Nannochloropsis</i> sp., 5x10 ⁵ células/ml) + náuplios de artémia (10 Ind/ml), (F) Microalga (<i>Nannochloropsis</i> sp., 5x10 ⁵ células/ml) + rotíferos (20 Ind/ml)) ao longo de 24 dias. Os valores correspondem à média (n=3).....	- 14 -
Figura 4.4 - Crescimento (mm) de éfiras de <i>P. punctata</i> alimentadas com diferentes dietas ((A) náuplios de artémia (10 Ind/ml), (B) rotíferos (20 Ind/ml), (C) náuplios de artémia (5 Ind/ml) + rotíferos (10 Ind/ml), (D) Microalga (<i>Nannochloropsis</i> sp., 5x10 ⁵ células/ml), (E) Microalga (<i>Nannochloropsis</i> sp., 5x10 ⁵ células/ml) + náuplios de artémia (10 Ind/ml), (F) Microalga (<i>Nannochloropsis</i> sp., 5x10 ⁵ células/ml) + rotíferos (20 Ind/ml)) ao longo de 24 dias. Os valores correspondem à média (n=3).....	- 15 -
Figura 4.5 - Sequência de fotos representantes do desenvolvimento de éfiras de <i>P. punctata</i> , desde a fase de éfira após ser liberada (A) até a fase inicial de medusa juvenil (F).....	- 16 -

Índice de tabelas

Tabela 4.I- Número de pólipos originados por cada pólipos, por dia. Os valores são apresentados na forma média \pm DP.....- 13 -

1. Introdução

Ao longo das últimas décadas verificou-se um aumento do mercado de organismos ornamentais, tornando-se num mercado bastante lucrativo (apresentando um aumento de 50 para 250 milhões de dólares nas ultimas duas décadas), vindo assim a ganhar importância na economia mundial (Olivotto *et al.*, 2006; Dhaneesh *et al.*, 2012; Anusha *et al.*, 2014). Este mercado é suportado em sua grande parte pelo hobby da aquarofilia, os organismos associados a este hobby proveem de um vasto grupo de organismos, incluindo peixes, plantas e invertebrados onde estão presente os cnidários, sendo comercializadas aproximadamente duas mil espécies e milhões de espécimes anualmente em todo o mundo (Ukaonu *et al.*, 2011).

O crescimento deste mercado tem promovido uma busca crescente por novas espécies ornamentais (Cohen *et al.*, 2013). Os cnidários (corais, anêmonas e medusas) são um dos grupos com maior interesse e valorização dentro dos organismos ornamentais. Entre os cnidários, as medusas têm captado a atenção como organismos ornamentais, apresentando uma grande margem de progressão, sendo atualmente consideradas como uma espécie emergente na indústria da aquarofilia (Chambel *et al.*, 2016).

Embora existam muitas espécies de medusa com potencial ornamental, a seleção de uma espécie alvo para a manutenção em aquários privados obriga a que sejam eleitos alguns critérios de adequabilidade, nomeadamente não ser letal ou perigosa para o Homem, bem como ser facilmente mantida *ex situ*.

Uma das espécies de medusa com enorme potencial é a *Phyllorhiza punctata*, medusa conhecida pela sua coloração castanha clara com manchas redondas brancas. Esta é uma espécie de medusa não letal para o Homem, que pode ser manipulada pelo proprietário do aquário, sem que sejam necessárias medidas excecionais de proteção.

Phyllorhiza punctata

Espécie descrita em 1884 por Von Lendenfeld em Port Jackson, pertence à classe Scyphozoa, à ordem Rhizostomeae e à família Mastigiidae (Mayer, 1910). Ocorre de forma natural entre o Japão e a Austrália, sendo que se tornou numa espécie invasora no Mar do Golfo do México, na costa da Califórnia, no Havai e no Mar Mediterrâneo (Ocaña-Luna *et al.*, 2010). Para além da sua coloração castanha clara devido à presença de zooxantelas, com manchas brancas na campânula, pode ser facilmente distinguida pelos seus oito

INTRODUÇÃO

braços orais em forma de J, sendo a sua dimensão máxima de 62 cm (Graham *et al.*, 2003; Morandini *et al.*, 2006).

Movimentam-se através de contrações rítmicas da sua campânula, mas a sua capacidade natatória é limitada sendo facilmente arrastadas por correntes (Abramoff e Thomson, 1994; Levinton, 2001; Huber e Castro, 2015). Possuem simetria radiada (Margulis e Schwartz, 1997) e capturam as presas ativando os cnidócitos, que libertam uma toxina nas presas deixando-as paralisadas (Levinton, 2001), posteriormente o alimento é conduzido até à cavidade gastrovascular onde ocorre a digestão (Campbell *et al.*, 1999). São organismos que apresentam apenas uma abertura para o exterior, sendo que esta funciona tanto como boca como ânus (Abramoff e Thomson, 1994; Campbell *et al.*, 1999; Krogh, 2005).

A figura 1.1 representa o ciclo de vida geral apresentado pelas medusas da classe Scyphozoa. Tal como a maioria das espécies pertencentes a esta classe, *P. punctata* possui um ciclo de vida anual e com duas fases bem distintas (bentónica e planctónica), apresenta também as duas formas de reprodução, a sexuada na sua fase planctónica adulta e a reprodução assexuada na sua fase bentónica. Na sua fase planctónica ou de vida livre as medusas são dióicas, reproduzem-se sexualmente. Neste processo dá-se a libertação dos gâmetas na água por parte do macho, após a libertação os gâmetas irão fecundar os óvulos da fêmea, que se encontram junto da bolsa gástrica.

Após um desenvolvimento embrionário as larvas, denominadas de plânulas, serão libertadas pela fêmea na coluna de água, e irão deslocar-se até ao fundo da coluna de água fixando-se no fundo. Com a fixação, a larva sofre uma transformação, passando a ser denominado de pólipó, dando assim início a fase bentónica ou sésil do ciclo de vida (Riisgård e Madsen, 2011).

Nesta fase o ciclo de vida pode ter dois percursos. Num, o pólipó pode reproduzir-se assexuadamente. Nesta fase o novo pólipó é libertado na coluna de água ou formado junto ao pólipó de origem, desta forma são formadas réplicas semelhantes e há um aumento rápido do número de pólipos (gemulação). O outro percurso que o pólipó pode ter é através de uma metamorfose, onde o pólipó irá sofrer várias alterações até criar e libertar uma éfira (estrobilação). As éfiras são jovens medusas, de vida livre, que após crescerem atingem a maturidade diferenciando-se em machos e fêmeas (Vagelli, 2007; Willcox *et al.*, 2007; Holst e Jarms, 2010; Kamiyama, 2011)

INTRODUÇÃO

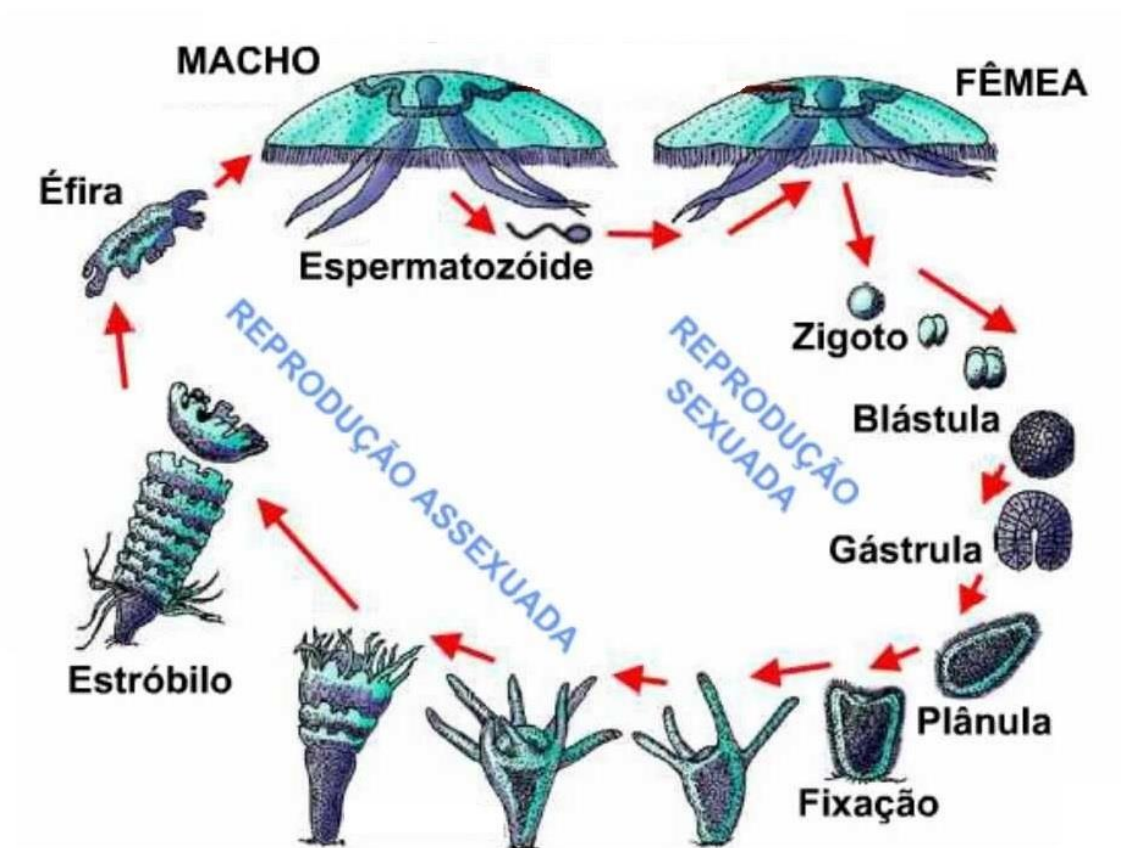


Figura 1.1- Representação do ciclo de vida de uma medusa, apresentando a reprodução assexuada e sexuada.

As medusas são conhecidas por causarem grandes *blooms* na natureza, provocando graves problemas a nível ecológico, social e ambientais. Esses episódios ocorrem na natureza de forma sazonal e sincronizada, tornando-se assim inviável a introdução no mercado ornamental de espécies selvagens, pois não é possível garantir um fornecimento contínuo durante todo o ano (Lucas, 2001; Toyokawa *et al.*, 2011; Cohen *et al.*, 2013). A forma de garantir uma disponibilidade constante e controlada de medusas no mercado ornamental é através da produção em cativeiro.

No entanto, e embora a utilização de medusas em aquários públicos se tenha iniciado nos anos 60, e desde então realizados diversos avanços na manutenção de medusas em cativeiro, nomeadamente o desenvolvimento de tanques/aquários específicos inspirados em variações do *planctonkreisel* desenhado originalmente por Wolf Greve (1960), a estabulação, cultivo e nutrição de medusas *ex situ* é ainda considerada uma área recente que necessita de avanços técnicos para uma otimização da produção em grande escala (Raskoff *et al.*, 2003; AZA, 2013). A informação atualmente disponível relativamente à produção de medusas em cativeiro é escassa. A grande maioria do conhecimento

INTRODUÇÃO

científico existente é relativo a estudos ecológicos, que pretendem relatar, conhecer e prever o que se passa em ambiente natural. No entanto em aquacultura pretende-se maximizar a produção e é pouca a informação científica existente que permita a transposição para a produção de medusas em aquariofilia. Para além disso, muitas vezes as informações presentes nesses estudos ecológicos são de difícil aplicação à aquacultura.

OBJETIVOS

2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo geral o estudo da manutenção, reprodução e desenvolvimento de *Phyllorhiza punctata* em cativeiro, com o objetivo de responder à crescente procura destes organismos no mercado ornamental. Uma vez que até à data, e apesar do elevado potencial que estes organismos apresentam como espécies ornamentais, não havia informação científica acerca das condições de reprodução desta espécie em cativeiro.

Assim, o trabalho teve como objetivos específicos, o estudo do:

- i. Efeito de diferentes substratos na fixação de pólipos.
- ii. Efeito da temperatura e alimentação na indução da reprodução assexuada.
- iii. Efeito da alimentação no desenvolvimento da fase planctónica.

3. Materiais e métodos

Nos seguintes subcapítulos serão descritos os materiais e métodos utilizados nos diferentes ensaios efetuados.

i. Manutenção da população de pólipos

Os pólipos de *Phyllorhiza punctata* utilizados neste estudo foram recolhidos da população de pólipos mantida em laboratório no edifício CETEMARES da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar de Peniche, do instituto politécnico de Leiria, tendo sido cedidos pelo Oceanário de Lisboa. Os pólipos foram mantidos em aquários de vidro, em sistema fechado, de 20 Lts, com trocas parciais de água de 50%, de dois em dois dias, com uma salinidade de 35, fotoperíodo 12h:12h, com temperatura controlada de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ e alimentados diariamente com náuplios de artémia e rotíferos como alimento diário *ad libitum*.

ii. Culturas de zooplâncton

Diferentes espécies de zooplâncton foram produzidas em laboratório para serem usadas na alimentação de pólipos, éfiras e medusas de *P. punctata*. Os rotíferos da espécie *Brachionus plicatilis* foram mantidos a $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, usando água salgada esterilizada a 35 e alimentados com pasta de alga *Nannochloropsis sp.* (Phytobloom Ice Nannochloropsis, Necton SA, Portugal), de acordo com as instruções do fabricante. Os náuplios de artémia, foram obtidos através da eclosão de cistos de artémia GSL (Ocean Nutrition, Bélgica), enriquecidos com Red Pepper (Bernaqua, Bélgica), segundo instruções do fabricante.

iii. Efeito de diferentes substratos na fixação de pólipos

Este ensaio teve como objetivo estudar a fixação de pólipos de *P. punctata* em diversos materiais, tendo-se utilizado quatro tipos de substratos:

MATERIAIS E MÉTODOS

- A) gobelet de plástico,
- B) gobelet de vidro,
- C) caixa de Petri de plástico,
- D) placa de seis poços.

Utilizaram-se 840 pólipos, que foram distribuídos por cada um dos tratamentos, 10 pólipos/réplica/substrato/dia (3 réplicas/ tratamento). A água utilizada apresentava uma salinidade de 35. Os diferentes substratos com os pólipos foram colocados numa sala com temperatura controlada de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo 12h:12h. Durante 7 dias os pólipos foram observados e verificado o numero de pólipos existentes/fixos. A cada dia um grupo de réplicas para cada substrato foi verificado e descartado. Durante os 7 dias não foram efetuadas alimentações ou trocas de água.

iv. Efeito da temperatura e alimentação na indução da reprodução assexuada (Gemulação)

Este ensaio consistiu no estudo de diferentes temperaturas e da alimentação na formação de novos pólipos através da reprodução assexuada. Foram estudados seis tratamentos:

- 20A- 20°C com alimento,
- 24A- 24°C com alimento,
- 26A- 26°C com alimento,
- 20S- 20°C sem alimento,
- 24S- 24°C sem alimento,
- 26S- 26°C sem alimento.

As temperaturas foram controladas através de 3 estufas de incubação refrigeradas (IPP 110, Memmert, Alemanha). Foram individualizados 108 pólipos usando placas de 24 poços (18 pólipos/tratamento/réplica). Os pólipos utilizados foram recolhidos da população stock mantida a $23\pm 1^{\circ}\text{C}$. De forma a não provocar um choque térmico muito brusco, consoante o tratamento a temperatura foi alterada em $0,5^{\circ}\text{C}$ por dia, até se atingir a

MATERIAIS E MÉTODOS

temperatura desejada. Durante 30 dias os pólipos foram alimentados de dois em dois dias, com uma mistura de náuplios de artémia enriquecidos (5 Ind/ml) e rotíferos (10 Ind/ml). O alimento foi administrado durante 30 min de forma a permitir o encontro presa predador, sendo posteriormente feita a limpeza com recolha do alimento e troca de água. A água usada estava a uma temperatura igual à dos pólipos de acordo com as temperaturas descritas anteriormente e a uma salinidade de 35. Diariamente os pólipos foram observados e a mortalidade e número de novos pólipos registado. Os novos pólipos formados foram recolhidos, permanecendo sempre o pólipo isolado.

v. Efeito da alimentação no desenvolvimento da fase planctónica

Este ensaio consistiu no estudo de diferentes dietas no desenvolvimento larvar de éfiras até à fase de pequena medusa (<9 mm), tendo sido estudadas 6 dietas:

- (A) náuplios de artémia (10 Ind/ml),
- (B) rotíferos (20 Ind/ml),
- (C) náuplios de artémia (5 Ind/ml) + rotíferos (10 Ind/ml),
- (D) Microalga (*Nannochloropsis* sp., 5×10^5 células/ml),
- (E) Microalga (*Nannochloropsis* sp., 5×10^5 células/ml) + náuplios de artémia (10 Ind/ml),
- (F) Microalga (*Nannochloropsis* sp., 5×10^5 células/ml) + rotíferos (20 Ind/ml).

As éfiras usadas neste estudo foram obtidas através de estrobilação de pólipos mantidos em laboratório. Foram distribuídas 435 éfiras por 18 tanques cilindrocónicos de um litro, com água a uma salinidade de 35, com arejamento de fundo, mantidos numa sala de temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), tendo-se usado 24 éfiras por tanque, (3 réplicas por dieta).

Durante 24 dias, a cada 2 dias, após troca parcial de água de 50%, o alimento foi monitorizado através de contagem, sendo adicionado o alimento necessário, para manter as concentrações pretendidas. Também de 2 em 2 dias, foi feita a monitorização da sobrevivência e 3 éfiras por réplica foram recolhidas aleatoriamente e observadas à lupa trinocular (Stemi 305 K LAB, Zeiss, Alemanha), fotografadas (Axiocam 105, Zeiss, Alemanha) e medido o seu diâmetro usando o software ZEN 2011.

vi. Análise estatística

Com o objetivo de estudar o efeito do substrato (A - gobelet de plástico, B - gobelet de vidro, C - caixa de Petri de plástico, D - placa de seis poços, ou seja, ensaio i) na taxa de fixação de pólipos de *P. punctata* e também o efeito da dieta (A - náuplios de artémia (10 Ind/ml), B - rotíferos (20 Ind/ml), C - náuplios de artémia (5 Ind/ml) + rotíferos (10 Ind/ml), D - Microalga (*Nannochloropsis* sp., 5×10^5 células/ml), E - Microalga (*Nannochloropsis* sp., 5×10^5 células/ml) + náuplios de artémia (10 Ind/ml), F - Microalga (*Nannochloropsis* sp., 5×10^5 células/ml) + rotíferos (20 Ind/ml), ou seja ensaio iii) na sobrevivência e desenvolvimento de éfiras de *P. punctata*, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) com 1 fator (Zar, 2009). Adicionalmente, para avaliar o efeito da temperatura (20°C, 24°C, 26°C) e do alimento (com alimento e sem alimento, ou seja, ensaio ii) no número de pólipos libertados, foi realizada uma ANOVA com 2 fatores (Zar, 2009). Todos os pressupostos inerentes à realização dos métodos foram devidamente validados (nomeadamente, a normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias). Sempre que adequado foi utilizado o teste de comparações múltiplas de Tukey. Nos casos em que a normalidade dos dados e/ou homogeneidade de variâncias não se verificou, foi utilizado o teste de Kruskal–Wallis, seguido do teste de Games-Howell (Games e Howell, 1976; Kirk, 1982). Sempre que aplicável os resultados apresentam-se sob a forma de média \pm desvio-padrão (DP). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de 5% (isto é, sempre que p-value <0,05). Os resultados foram processados e analisados com o software estatístico IBM SPSS Statistics 22 e a elaboração gráfica através do programa Graph Pad Prism 5.

4. Resultados

Os resultados obtidos nos diferentes ensaios efetuados serão descritos nos seguintes subcapítulos.

i. Efeito de diferentes substratos na fixação de pólipos

Com objetivo de estudar a fixação de pólipos de *P. punctata* foi verificado o efeito do substrato na taxa de fixação (Fig. 4.1).

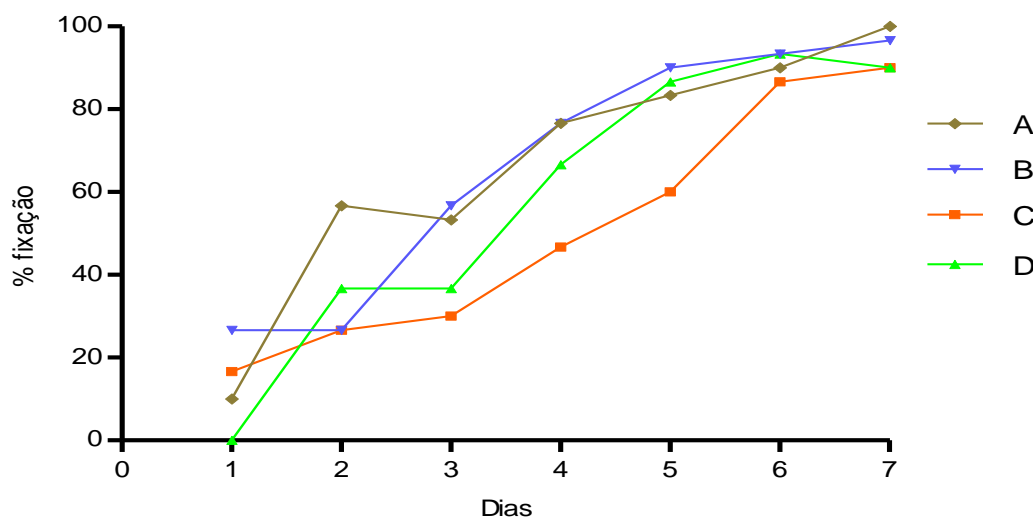


Figura 4.1- Taxa de fixação de pólipos de *P. punctata* em diferentes substratos (A) gobelet de plástico, B) gobelet de vidro, C) caixa de Petri de plástico, D) placa de seis poços) ao longo de 7 dias. Os valores correspondem à média (n=3).

É possível verificar que durante o ensaio os pólipos desta espécie de medusa se conseguem fixar em qualquer dos materiais em estudo. À exceção do substrato D após 24 horas, existem pólipos fixos em todos os materiais em estudo, no entanto as taxas de fixação são inferiores a 25%. Observa-se igualmente, de uma forma geral para todos os materiais, um aumento da taxa de fixação com o tempo, sendo que ao 4º dia de ensaio começam-se a evidenciar diferenças significativas entre os diferentes materiais, nomeadamente uma menor fixação nas caixas de petri comparativamente aos restantes

RESULTADOS

materiais ($p < 0,05$). Ao 6º dia, a taxa de fixação é de $86,7 \pm 5,8\%$ no substrato C, $93,4 \pm 5,8\%$ no D, $93,4 \pm 5,8\%$ no B e $90,0 \pm 10,0\%$ no A, sem que existam diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes materiais em estudo ($p > 0,05$). Ao final de 7 dias em todos os substratos a fixação é igual ou superior a 90%, independentemente do substrato ($p > 0,05$).

ii. Efeito da temperatura e alimentação na indução da reprodução assexuada (gemulação)

Com objetivo de estudar a formação de novos pólipos de *P. punctata* foi verificado o efeito dos fatores temperatura e alimentação na sua indução (Fig. 4.2).

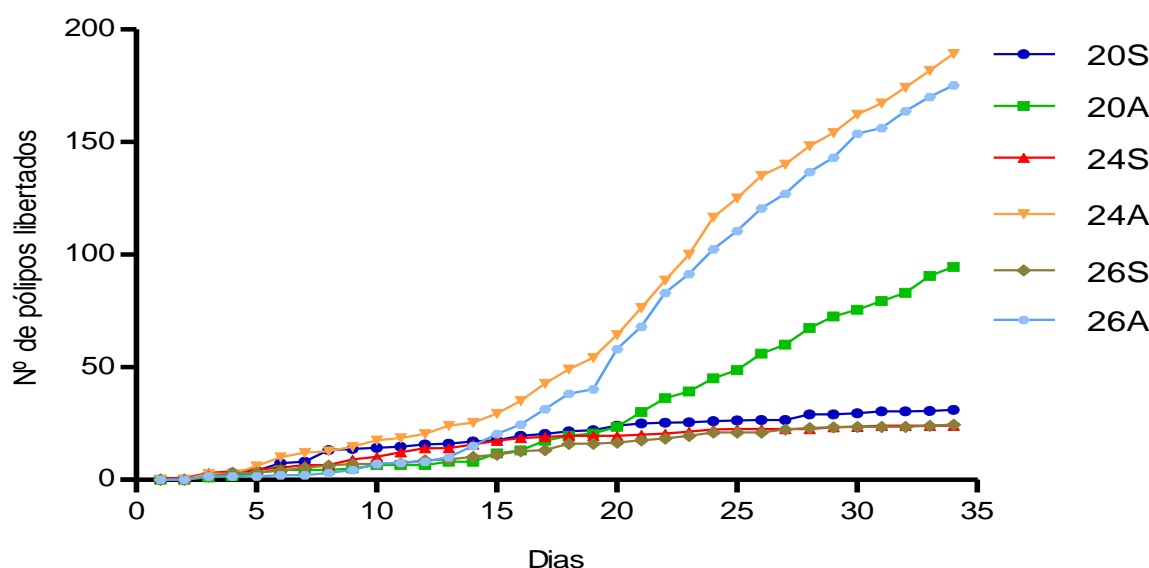


Figura 4.2- Somatório de formação de novos pólipos de *P. punctata* ao longo de 34 dias em diferentes tratamentos: 20A) 20º C com alimento; 24A) 24º C com alimento; 26A) 26º C com alimento; 20S) 20º C sem alimento; 24S) 24º C sem alimento, 26S) 26º C sem alimento. Os valores correspondem à média ($n=3$).

A partir do dia 16 observa-se um aumento reprodutivo estatisticamente significativo nos tratamentos 24A e 26A face aos restantes tratamentos ($p < 0,05$). A partir do dia 21 a influencia das diferentes condições em estudo tornam-se mais evidentes na produção de novos pólipos. Havendo de uma forma geral uma maior produção de novos pólipos nos

RESULTADOS

tratamentos com alimento comparativamente aos sem alimento ($p < 0,05$). Sendo a produção de novos pólipos maior nos pólipos alimentados e mantidos a 24 e 26°C, comparativamente com os pólipos alimentados mantidos a 20°C ($p < 0,05$). No caso dos pólipos que não foram alimentados, não se verificou diferenças no número de novos pólipos libertados ($p > 0,05$) (Anexo 1).

Durante os 34 dias de ensaio, independentemente das condições de manutenção dos pólipos, todos os pólipos se reproduziram assexuadamente, originando pelo menos um novo pólipo. No final do ensaio cada pólipo, originou em média, $3,9 \pm 2,6$ novos pólipos no tratamento 24S, $3,9 \pm 1,9$ no tratamento 26S, $5,7 \pm 2,2$ no tratamento 20S, $15,1 \pm 5,7$ no tratamento 20A, $25,6 \pm 6,8$ no tratamento 26A e uma média de $28,3 \pm 8,3$ no tratamento 24A.

De forma a avaliar o potencial reprodutivo dos pólipos de *P. punctata*, foi calculada a produção diária de novos pólipos em cada uma das condições de estudo, estando os resultados apresentados na tabela 4.I. Pode verificar-se que o valor médio mínimo observado ocorreu nos tratamentos sem alimento, onde em média cada pólipo colocado a 20°C, 24°C e 26°C originou a cada dia $0,171 \pm 0,07$, $0,125 \pm 0,08$ e $0,128 \pm 0,05$ novos pólipos/dia, respetivamente. Por outro lado, o maior número de pólipos foi observado nos tratamentos 20°C, 24°C, 26°C com alimento, onde cada pólipo originou, em média, $0,557 \pm 0,18$, $0,928 \pm 0,32$ e $0,860 \pm 0,21$ novos pólipos por dia, respetivamente. O valor mínimo de pólipos originados por pólipo foi observado no tratamento 24°C sem alimento, tendo um valor de 0,029. Por outro lado, o máximo foi observado no tratamento 24°C com alimento, apresentando um valor de 1,324.

Tabela IV.I- Número de pólipos originados por cada pólipo, por dia. Os valores são apresentados na forma média \pm DP.

tratamento	20S	20C	24S	24C	26S	26C
Media \pm DP	0,171 $\pm 0,07$	0,557 $\pm 0,18$	0,125 $\pm 0,08$	0,928 $\pm 0,32$	0,128 $\pm 0,05$	0,860 $\pm 0,21$
Mínimo	0,088	0,294	0,029	0,177	0,059	0,412
Máximo	0,294	0,824	0,265	1,324	0,235	1,206

RESULTADOS

iii. Efeito da alimentação no desenvolvimento da fase planctónica

Com objetivo de estudar a sobrevivência e o crescimento de éfiras de *P. punctata* foi verificado o efeito de diferentes dietas. Para todas as dietas foi possível observar tanto alterações nas dimensões e desenvolvimento das éfiras como na sua taxa de sobrevivência (Fig. 4.3).

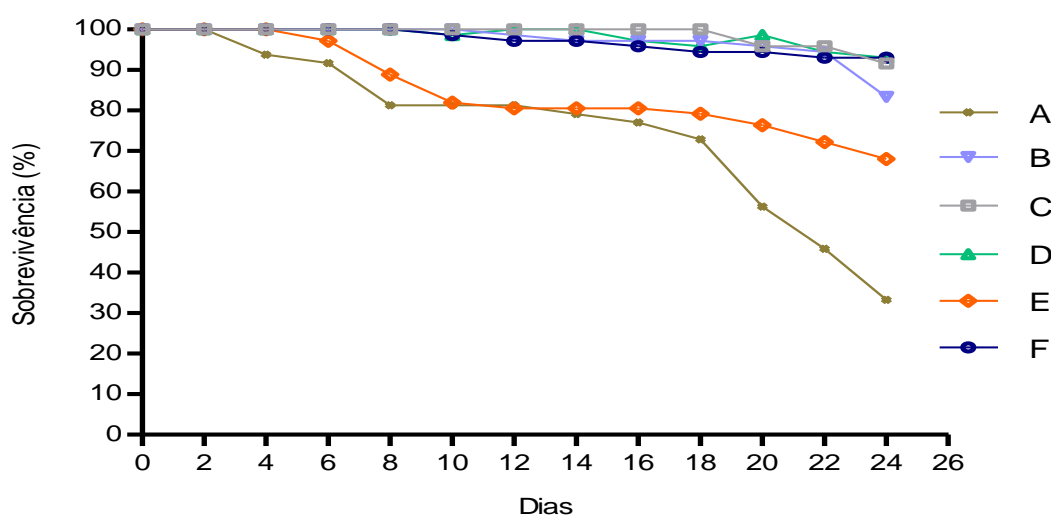


Figura 4.3- Sobrevivência (%) de éfiras de *P. punctata* alimentadas com diferentes dietas ((A) náuplios de artémia (10 Ind/ml), (B) rotíferos (20 Ind/ml), (C) náuplios de artémia (5 Ind/ml) + rotíferos (10 Ind/ml), (D) Microalga (*Nannochloropsis* sp., 5×10^5 células/ml), (E) Microalga (*Nannochloropsis* sp., 5×10^5 células/ml) + náuplios de artémia (10 Ind/ml), (F) Microalga (*Nannochloropsis* sp., 5×10^5 células/ml) + rotíferos (20 Ind/ml)) ao longo de 24 dias. Os valores correspondem à média (n=3).

A figura 4.3 mostra-nos que a sobrevivência se mantém elevada ao longo do ensaio em todos os tratamentos exceto nas dietas A e D. A sobrevivência mantém-se constante até ao oitavo dia, apresentando apenas uma pequena redução a partir do dia 4 na dieta A. Após o oitavo dia observa-se uma diminuição mais acentuada da taxa de sobrevivência nas dietas A e E (81% e 89% de sobrevivência, respetivamente) ($p < 0,05$). A partir do dia 10, e até ao dia 16, as sobrevivências mantiveram-se constantes, sendo observadas diferenças estatisticamente significativas entre as dietas A e E, quando comparadas com as restantes ($p < 0,05$). Após o 16º dia, a dieta A volta a ter uma redução mais acentuada da taxa de sobrevivência, apresentando a partir do dia 20 diferenças estatisticamente significativas com as restantes dietas ($p < 0,05$).

RESULTADOS

No final do ensaio, ao 24^o dia, independentemente da dieta houve sobrevivência de uma parte das éfiras. Assim, a dieta A demonstrou ter uma sobrevivência de 33,3% \pm 23,6, a dieta E) apresentou uma sobrevivência de 68,1% \pm 41,7, a dieta B apresentou 83,3% \pm 15,0, C apresentou 91,7% \pm 0,0 e ambas as dietas D e F apresentaram uma sobrevivência de 93,1% \pm 2,4.

Na figura 4.4 observa-se que houve alteração das dimensões das éfiras em todas as dietas ao longo do ensaio, percebendo-se que existem dietas onde o crescimento é positivo e mais acentuado. De igual modo, é também possível observar alguns casos onde se visualiza um decréscimo nas dimensões. O tamanho médio das éfiras manteve-se constante durante os primeiros 9 dias do ensaio, não havendo qualquer diferença estatisticamente significativa entre as diversas dietas ($p > 0,05$).

É possível observar que a dieta F apresenta diferenças no crescimento ao dia 11 relativamente às restantes mantendo-se estas diferenças até ao final do ensaio ($p < 0,05$). A partir do dia 15 as dietas E, B e C, apresentam diferenças em relação às restantes dietas ($p < 0,05$). Ao dia 18 as dietas B e C, apresentam uma diminuição de tamanho, evidenciando assim diferenças estatisticamente significativas com as restantes dietas ($p < 0,05$).

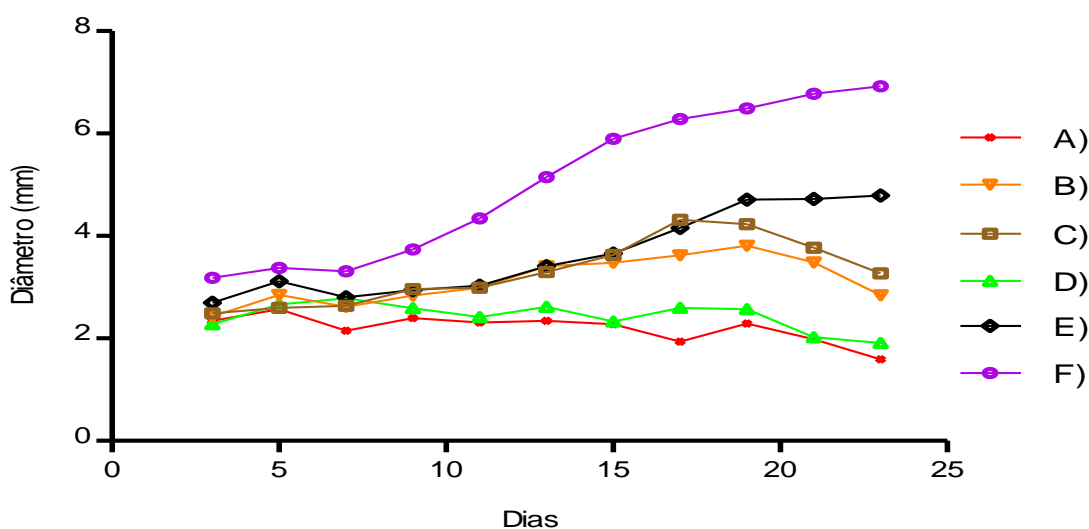


Figura 4.4 - Crescimento (mm) de éfiras de *P. punctata* alimentadas com diferentes dietas ((A) náuplios de artémia (10 Ind/ml), (B) rotíferos (20 Ind/ml), (C) náuplios de artémia (5 Ind/ml) + rotíferos (10 Ind/ml), (D) Microalga (*Nannochloropsis* sp., 5x10⁵ células/ml), (E) Microalga (*Nannochloropsis* sp., 5x10⁵ células/ml) + náuplios de artémia (10 Ind/ml), (F) Microalga (*Nannochloropsis* sp., 5x10⁵ células/ml) + rotíferos (20 Ind/ml)) ao longo de 24 dias. Os valores correspondem à média (n=3).

RESULTADOS

No final do ensaio a dieta A apresenta uma média de diâmetro de $1,592 \text{ mm} \pm 0,349$, a dieta D uma média de $1,909 \text{ mm} \pm 0,359$, a dieta B uma média de $2,842 \text{ mm} \pm 0,599$, a dieta C uma média de $3,270 \text{ mm} \pm 0,587$, E de $4,789 \text{ mm} \pm 1,136$ e a dieta F apresenta uma média de $6,925 \text{ mm} \pm 1,131$.

O desenvolvimento das éfiras foi registado fotograficamente (Fig. 4.5) ao longo do ensaio de crescimento e sobrevivência, de forma a observar as transformações físicas e estruturais das éfiras ao longo do desenvolvimento até medusa juvenil.

Na figura 4.5.A, pode-se observar uma éfira ao dia 1 acabada de ser libertada pelo pólipó após a estrobilação do mesmo, nesta fase a éfira é muito simples não apresentando tecidos desenvolvidos. Na figura 4.5.B, ao 9º dia já é possível observar o aparecimento de tecidos entre os diferentes braços da éfira, tecidos estes que darão origem a campânula da mesma. Na figura 4.5.C, ao dia 11 do ensaio é possível observar o início do desenvolvimento dos tentáculos por onde o alimento é capturado. Do dia 13 ao 24 (D, E e F) as éfiras continuam a aumentar os seus tecidos, já no último dia do ensaio (dia 24 figura 4.5.F) as éfiras passam a denominar-se de medusas no estado juvenil, pois já apresentam os tecidos da campânula completamente desenvolvidos.

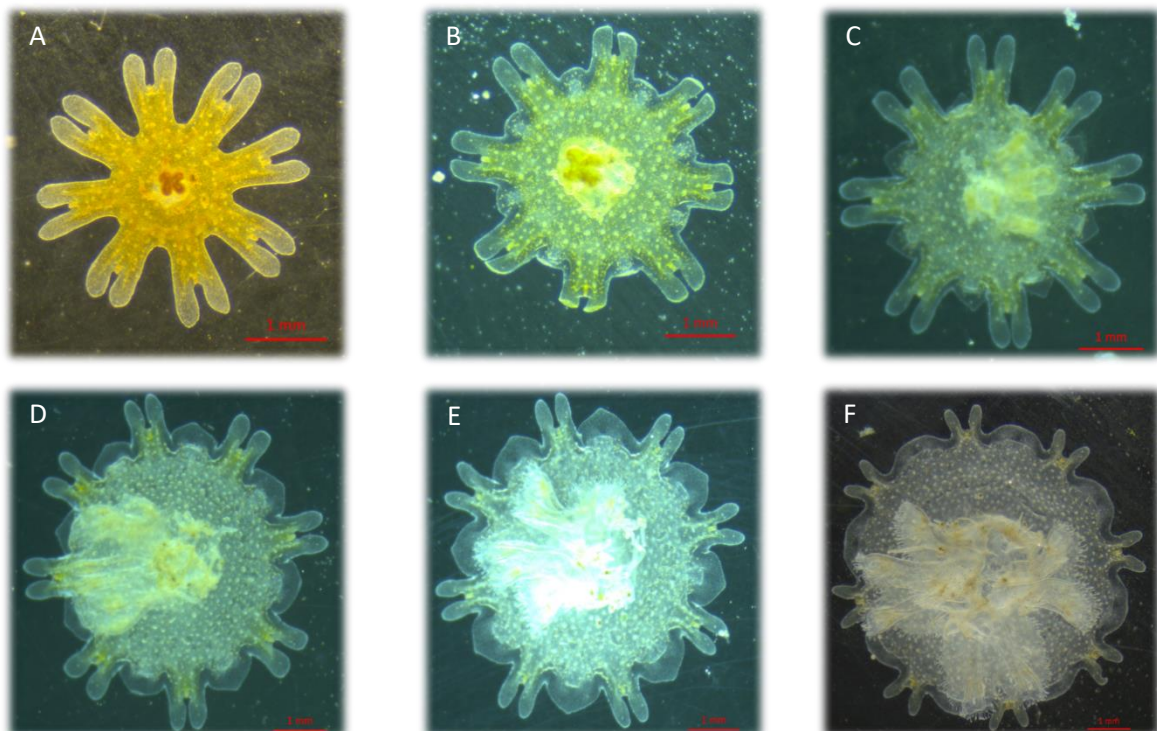


Figura 4.5 - Sequência de fotos representantes do desenvolvimento de éfiras de *P. punctata*, desde a fase de éfira após ser libertada (A) até a fase inicial de medusa juvenil (F).

5. Discussão

Ao nível de produção de medusas para fins ornamentais pouco se sabe até a data, no entanto para algumas das espécies com interesse ornamental existem estudos ecológicos que permitiram retirar algumas informações aplicáveis à aquacultura dessas espécies. No caso de *P. punctata* essas informações são muito reduzidas. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo estudar algumas das fases do ciclo de produção de *P. punctata* em cativeiro, de forma a desenvolver e otimizar as condições de cultivo da espécie.

Parte dos estudos realizados neste trabalho incidiram sobre os pólipos de *P. punctata*, isto porque em termos de aquacultura, a fase de pólipo tem especial importância, uma vez que os pólipos toleram grandes densidades e têm a capacidade de reprodução assexuada (Han e Uye, 2010). Assim, a maximização dos parâmetros de manutenção e reprodução assexuada permite obter uma grande quantidade de éfiras, sem ter de se manter medusas adultas permanentemente, que requerem sistemas de grande capacidade para se reproduzirem sexualmente, originando pólipos.

A nutrição, as densidades e condições de cultivo, são os fatores que mais afetam a rentabilidade de uma aquacultura, influenciando o crescimento, o bem-estar e a saúde dos organismos. Deste modo, o estabelecimento de protocolos de produção específicos para cada espécie, são elementos essenciais para o sucesso de qualquer produção aquícola (Conceição *et al.*, 2007).

i. Efeito de diferentes substratos na fixação de pólipos

Como referido anteriormente, a fase de pólipo é crucial para a produção de medusas, e controlar cada processo é uma mais-valia para a otimização da produção comercial de medusas. As rotinas da produção de medusas em cativeiro implicam uma contínua manipulação dos pólipos sendo necessário remover os pólipos de um aquário e colocá-los noutra, por outro lado é importante garantir que os pólipos estão bem fixos ao substrato para que estes não se libertem quando o substrato é movido, uma vez que a existência de pólipos soltos dificulta em muito as rotinas de alimentação e limpeza dos organismos.

DISCUSSÃO

Neste sentido, foi estudada a taxa de fixação de pólipos de *P. punctata* em 4 tipos de substratos comumente disponíveis em laboratórios e aquaculturas. Todos os substratos independentemente da sua composição demonstraram poder ser utilizados com sucesso durante os processos de produção de medusas em cativeiro. Tendo sido as taxas de fixação superiores a 90% em todos os materiais ao fim de 7 dias. No entanto, e no caso de se necessitar obter pólipos bem fixos, sem risco de se libertarem, num menor curto espaço de tempo, o substrato mais adequado deve ser o do gobelet de plástico, que apresenta fixações em volta dos 50% aos 2-3 dias.

Embora até a data não existam estudos que tentem identificar quais os melhores substratos para fixar pólipos de medusa, após estes terem sido removidos do substrato onde se encontram fixos, para esta ou outra espécie de medusa, é possível verificar que na literatura, para a realização dos mais diversificados estudos (na maioria do ponto de vista ecológicos) são utilizados diferentes metodologias para a mesma espécie, por exemplo para a medusa da lua (*Aurelia aurita*), Han e Uye (2010), colocaram pólipos para se fixarem em placas quadradas de poliestireno, Liu *et al.*, (2009) e Purcell, (2012), utilizaram placas de 6 poços, Vagelli (2007) pedaços de plástico e Ishii e Watanabe (2003) utilizaram caixas de petri de plástico, sendo que o tempo que os autores esperaram para os pólipos se fixarem variou entre 3 a 10 dias, sendo que no caso dos 3 dias o número de pólipos fixos foi reduzido.

Para além destes dados, existem estudos, que embora não avaliem a preferência dos pólipos pelo substrato, estudam a influência do substrato na fixação das larvas plânulas, e neste caso pode-se verificar, tal como comprovado por Holst e Jarms (2006), que observaram que os materiais melhores na fixação de plânulas eram os materiais sintéticos (plástico e vidro) em comparação com os materiais presentes no meio natural (conchas). Por outro lado, os resultados obtidos por Brewer (1984) não vão de encontro aos resultados observados neste ensaio, uma vez que este encontra uma grande disparidade entre a fixação de plânulas em vidro e em plástico. Esta diferença entre os resultados obtidos em ambas as experiências pode se dever ao facto de que os indivíduos usados estarem em diferentes estados de desenvolvimento, podendo a plânula apresentar uma maior capacidade de escolha de substratos quando comparado ao pólipo já formado.

DISCUSSÃO

ii. Efeito da temperatura e alimentação na indução da reprodução assexuada (gemulação)

Através dos resultados obtidos neste ensaio percebeu-se que pólipos alimentados e mantidos a uma temperatura de 24 – 26°C produzem uma maior quantidade de pólipos comparativamente com os pólipos mantidos a 20 °C e/ou não alimentados. Embora não existam dados até a data que demonstrem a influência da temperatura e alimentação na formação de novos pólipos de *P. punctata*, estes resultados fazem sentido quando vemos as características biológicas da espécie. De acordo com Verity *et al.*, (2011) esta é uma espécie que vive em águas mais quentes, a diminuição da temperatura diminui o metabolismo dos pólipos traduzindo-se numa diminuição da alimentação. Neste estudo e à semelhança de outros realizados para outras espécies, para além da temperatura, o alimento tem um papel muito importante na produção de novos pólipos, havendo um incremento da reprodução na presença de alimento (Webster e Lucas, 2012, Kamiyama, 2013).

Embora os comportamentos entre diferentes espécies de medusas sejam muito diferentes, a tendência verificada para um aumento da reprodução de novos pólipos com o aumento da temperatura é semelhante à de muitas outras espécies de medusas pertencentes à classe Scyphozoa, de acordo com Purcell (2012), que estudaram o comportamento reprodutivo de pólipos de *Aurelia aurita*, *Rhizostoma pulmo* e *Chrysaora quinquecirrha*. Todas estas espécies aumentaram a produção de novos pólipos com o aumento da temperatura e diminuem ou cessam a produção de pólipos com a diminuição da temperatura. Outros resultados similares foram obtidos para *A. aurita*, por Ishii e Watanabe (2003) que estudaram diferentes combinações de temperatura e disponibilidade de alimento na reprodução assexuada dos pólipos, mostrando que a produção de pólipos é superior quando se mantém uma alimentação contínua e um intervalo de temperatura superior, sendo que no caso deste estudo o melhor resultado foi de $122,7 \pm 13,7$ pólipos após 147 dias, tendo sido obtido por alimentação contínua com redução de temperatura efetuada apenas após 40 dias. Ma e Purcell (2005), observaram que para *Moerisia lyonsi* o melhor tratamento para obter o maior número de novos pólipos é à temperatura de 29°C com uma salinidade entre 5 e 15 e com uma alimentação moderada a alta, tendo também observado que o pior tratamento foi aos 20°C com uma salinidade de 25 e com uma alimentação de 4 copépodes por pólipo por dia. Willcox *et al* (2007) observaram que uma população de pólipos de *A. aurita* apresenta um maior crescimento com uma temperatura mais elevada quando comparada com uma mais reduzida, sendo que obteve um

DISCUSSÃO

crescimento do número de pólipos de 189% para uma temperatura de 16°C e de apenas 8% à temperatura de 10°C. No entanto, e tal como demonstrado por Liu *et al.*, (2009), para pólipos de *A. aurita* e por Brewer e Feingold (1991), para *Cyanea capillata*, se o aumento da temperatura for muito elevado, comparativamente à temperatura normal para a espécie há uma redução da produção de novos pólipos e aumento da mortalidade.

iii. Efeito da alimentação no desenvolvimento da fase planctónica

Através dos resultados obtidos neste ensaio percebeu-se que éfiras alimentadas com a dieta F apresentam um crescimento e sobrevivência superior comparativamente às éfiras alimentadas com as restantes dietas. Apesar deste ter sido o primeiro ensaio onde foram estudadas diferentes alimentações no desenvolvimento de éfiras de *P. punctata*, os resultados obtidos quando confrontados com os de Båmstedt *et al.*, (2001) para a *A. aurita*, apresentam semelhanças com o crescimento apresentado na dieta D sendo que ambos apresentam um crescimento muito reduzido inicialmente, estabilizando até ao final. Quando se comparam os resultados obtidos na dieta A, Båmstedt *et al.*, (2001) descrevem um crescimento elevado, por outro lado para *P. punctata* os resultados obtidos não apresentam um crescimento elevado, apresentando mesmo um decréscimo do diâmetro das éfiras. Tendo em conta que o tamanho inicial das éfiras é semelhante, não se pode concluir que o tamanho do predador comparado com o da presa tenha efeitos negativos no crescimento. Por outro lado, é possível que as éfiras de *A. aurita* possam apresentar uma maior capacidade de captura da artémia em comparação às éfiras de *P. punctata*. Outras possíveis hipóteses são a possibilidade de estas capturarem o alimento, mas não apresentarem a capacidade de o digerir e/ou as necessidades nutricionais das éfiras não serem completamente satisfeitas com o uso exclusivo de artémia como dieta para crescimento.

CONCLUSÃO

6. Conclusão

Com os resultados obtidos neste estudo foi possível determinar algumas das condições ótimas para a produção de medusas da espécie *P. punctata*, permitindo assim a realização de protocolos com vista a produção destas medusas.

Desta forma foi possível perceber que para a fixação dos pólipos os materiais usados em laboratório não apresentam diferenças entre si, facilitando assim a manutenção e manuseamento dos pólipos. Da mesma forma foi possível compreender que a melhor forma para obter um maior número de pólipos será manter os pólipos a 24°C ou 26°C com fornecimento de alimento, uma vez que ambos os tratamentos apresentam um grande número de pólipos formados ao decorrer do tempo. Relativamente ao crescimento de éfiras com vista a obtenção juvenis de medusas, conclui-se que a dieta de rotíferos + *Nannochloropsis* sp. permite um crescimento rápido das éfiras, com elevadas taxas de sobrevivência.

Com este trabalho foi possível perceber a grande lacuna de informação existente na espécie estudada tal como nas restantes medusas em geral. Grande parte da informação encontrada é relacionada com experiências ecológicas em diversas regiões onde estas medusas habitam, não havendo até à data informação relativamente à produção de medusas em cativeiro.

Embora o trabalho realizado tenha contribuído para o aumento do conhecimento das condições ótimas para a produção de medusas da espécie *P. punctata*, de forma a viabilizar a produção desta espécie em aquacultura mais estudos serão necessários realizar. Nomeadamente, estudos que visem a obtenção das condições ótimas para a indução da estrobilação e as condições ótimas para a o desenvolvimento de juvenis de medusas desta espécie. A realização destes estudos em conjunto com os resultados obtidos no presente estudo irá permitir o desenvolvimento de protocolos sobre a reprodução de medusas de *P. punctata*, estando ai reunidas as condições para que se possa iniciar a produção desta espécie em cativeiro em condições otimizadas.

7. Referências bibliográficas

- Abramoff, P., Thomson, R., (1994). Laboratory Outlines in Biology VI, W. H. Freeman.
- Anusha, P., Thangaviji, V., Velmurugan, S., Michaelbabu, M., Citarasu, T., (2014). Protection of ornamental gold fish *Carassius auratus* against *Aeromonas hydrophila* by treating *Ixora coccinea* active principles. Fish & Shellfish Immunology 36(2), 485-493.
- AZA, T. (2013). Jellyfish Care Manual. A. o. Z. a. Aquariums, Silver Spring, 79.
- Båmstedt, U., Wild, B., Martinussen, M., (2001). Significance of food type for growth of ephyrae *Aurelia aurita* (scyphozoa). Marine Biology 139, 641–650.
- Brewer, R., Feingold, J., (1991). The effect of temperature on the benthic stages of *Cyanea* (Cnidaria: Scyphozoa), and their seasonal distribution in the Niantic River estuary, Connecticut. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 152, 49–60
- Brewer, R., (1984). The influence of the orientation, roughness, and wettability of solid surfaces on the behavior and attachment of planulae of *Cyanea*. Biological Bulletin 166, 11–21.
- Campbell, N., Reece, J., Mitchell, L., (1999), Biology. Pearson Higher Education & Professional Group 5, 1175.
- Chambel, J., Araújo, T., Mendes, C., Miranda, F., Câncio, L., Maranhão, P., Pedrosa, R., (2016). New marine ornamental species: the potential of Monn jellyfish *Aurelia aurita*. Frontiers in Marine Science. Conference Abstract: IMMR| International Meeting on Marine Research.
- Cohen, F., Valenti W., Calado R., (2013). Traceability Issues in the Trade of Marine Ornamental Species. Reviews in Fisheries Science 21(2), 98-111.
- Conceição, L., Ribeiro L., Engrola S., Aragão C., Morais S., Lacuisse M., Soares F., Dinis M., (2007). Nutritional physiology during development of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). Aquaculture 268(1–4), 64-81.
- Dhaneesh, K., Devi, K., Kumar, A., Balasubramanian, T., Tissera, K., (2012). Breeding, embryonic development and salinity tolerance of Skunk clownfish *Amphiprion akallopisos*. Journal of King Saud University - Science 24(3), 201-209.
- Games P., Howell J., (1976). Pairwise Multiple Comparison Procedures with Unequal N's and/or Variances: A Monte Carlo Study. Journal of Educational Statistics 1:113-125

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Graham, W., Martin, D., Felder, D., Asper, V., Perry, H., (2003). Ecological and economic implications of a tropical jellyfish invader in the Gulf of Mexico. *Biological Invasions* 5, 53-69.
- Han, C., Uye, S., (2010). Combined effects of food supply and temperature on asexual reproduction and somatic growth of polyps of the common jellyfish *Aurelia aurita* s.l. *Plankton & Benthos Research* 5 (3), 98-105.
- Holst, S., Jarms, G., (2006). Substrate choice and settlement preferences of planula larvae of five Scyphozoa (Cnidaria) from German Bight, North Sea. *Marine Biology* 151, 863–871
- Holst, S., Jarms, G., (2010). Effects of low salinity on settlement and strobilation of scyphozoa (Cnidaria): Is the lion's mane *Cyanea capillata* (L.) able to reproduce in the brackish Baltic Sea? *Hydrobiologia* 645(1), 53-68
- Huber, M., Castro, P., (2015). *Loose Leaf for Marine Biology*, McGraw-Hill Education 10, 480.
- Ishii, H., Watanabe T., (2003). Experimental study of growth and asexual reproduction in *Aurelia aurita* polyps. *Sessile Organisms* 20, 69–73.
- Kamiyama, T., (2011). Planktonic ciliates as a food source for the scyphozoan *Aurelia aurita* (s.l.): Feeding activity and assimilation of the polyp stage. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 407(2), 207-215.
- Kamiyama, T., (2013). Planktonic ciliates as food for the scyphozoan *Aurelia aurita* (s.l.): Effects on asexual reproduction of the polyp stage. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 445, 21-28.
- Kirk R., (1982). *Experimental design: procedures for the behavioral sciences*. Brooks/Cole Pub. Co., Monterey, Calif.
- Krogh, D., (2005). *Biology: A Guide to the Natural World*, Pearson Education, Incorporated 3, 777.
- Levinton, J., (2001). *Marine Biology: Function, Biodiversity, Ecology*, Oxford University Press.
- Liu, W., Lo, W., Purcell, J., Chang, H., (2009). Effects of temperature and light intensity on asexual reproduction of the scyphozoan, *Aurelia aurita* (L.) in Taiwan. *Hydrobiologia* 616, 247-258.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lucas, C., (2001). Reproduction and life history strategies of the common jellyfish, *Aurelia aurita*, in relation to its ambient environment. *Hydrobiologia* 451, 229–246
- Ma, X., Purcell J., (2005). Temperature, salinity, and prey effects on polyp versus medusa bud production by the invasive hydrozoan *Moerisia lyonsi*. *Marine Biology* 147, 225–234.
- Margulis, L., Schwartz K., (1997). Five Kingdoms, Student Handbook to Accompany Five Kingdoms: An Illustrated Guide to the Phyla of Life on Earth, Macmillan Higher Education. Macmillan Higher Education 3, 520.
- Morandini, A., Soares, M., Matthews-Cascon, H., Marques, A., (2006). A survey of the Scyphozoa and Cubozoa (Cnidaria, Medusozoa) from the Ceará coast (NE Brazil). *Biota Neotropica* 6(2), 1-8.
- Ocaña-Luna A, Sánchez-Ramírez M, Aguilar-Durán R., (2010). First record of *Phyllorhiza punctata* von Lendenfeld, 1884 (Cnidaria: Scyphozoa, Mastigiidae) in Mexico. *Aquatic Invasions* 5(1), 79-84.
- Olivotto, I., Rollo, A., Sulpizio, R., Avella, M., Tosti, L., Carnevali, O., (2006). Breeding and rearing the Sunrise Dottyback *Pseudochromis flavivertex*: the importance of live prey enrichment during larval development. *Aquaculture* 255(1–4), 480-487.
- Purcell, J., (2012). Jellyfish and Ctenophore Blooms Coincide with Human Proliferations and Environmental Perturbations. *Annual Review of Marine Science* 4, 209-235.
- Raskoff, K., Sommer, F., Hamner, W., Cross, K., (2003). Collection and culture techniques for gelatinous zooplankton. *Biological Bulletin* 204(1), 68-80.
- Riisgård, H., Madsen C., (2011). Clearance rates of ephyrae and small medusae of the common jellyfish *Aurelia aurita* offered different types of prey. *Journal of Sea Research* 65(1), 51-57.
- Toyokawa, M., Aoki, K., Yamada, S., Yasuda, A., Murata, Y., Kikuchi, T., (2011) Distribution of ephyrae and polyps of jellyfish *Aurelia aurita* (Linnaeus 1758) *sensu lato* in Mikawa Bay, Japan. *Journal of Oceanography* 67(2), 209–218
- Ukaonu, S., Mbawuike, B., Oluwajoba, E., Williams, A., Ajuonu, N. Omogoriola, H., Olakolu, F. Adegbile, O., Myade, E., (2011). Volume and value of ornamental fishes in the Nigerian export trade. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 2(4), 662 – 664.

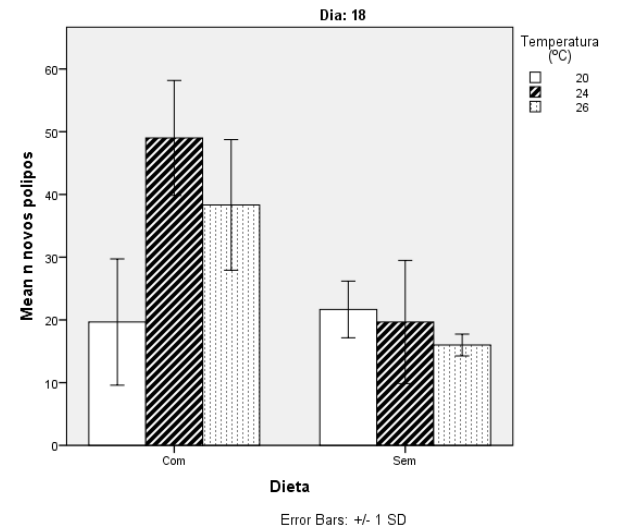
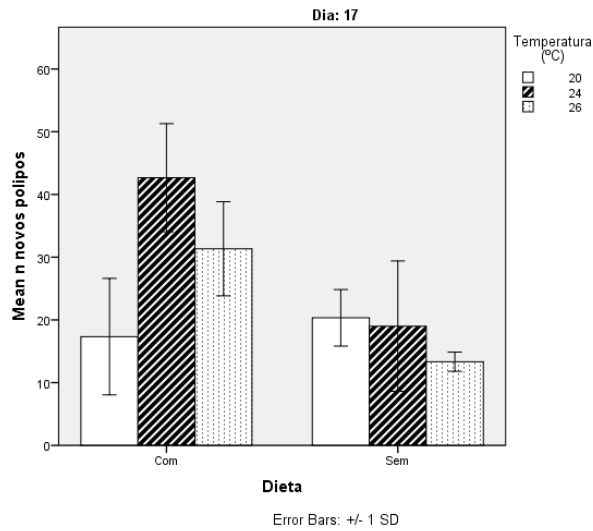
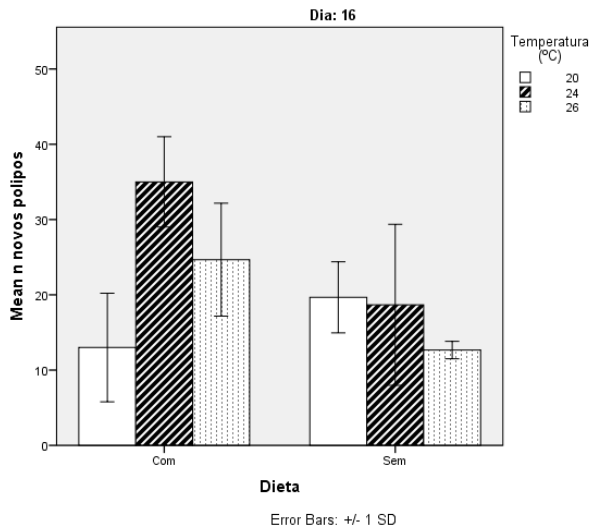
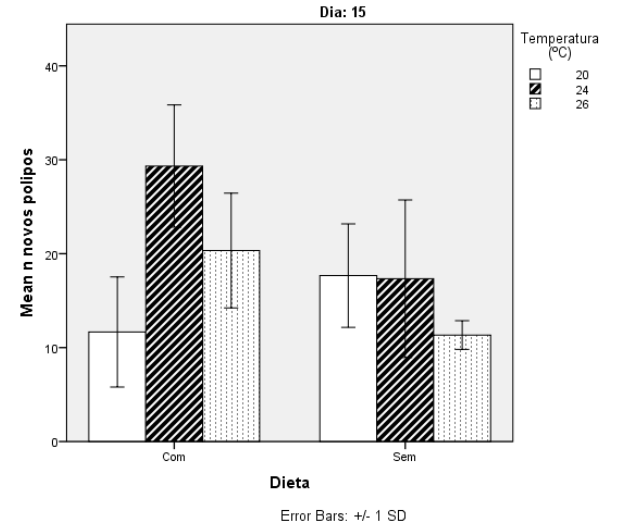
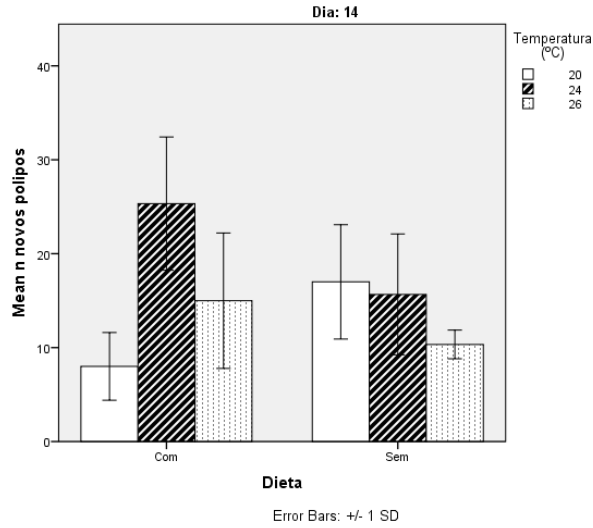
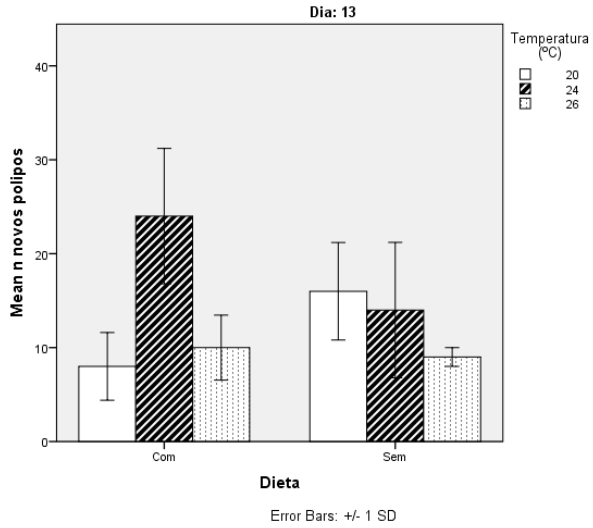
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Vagelli, A., (2007). New observations on the asexual reproduction of *Aurelia aurita* (Cnidaria, Scyphozoa) with comments on its life cycle and adaptive significance. *Invertebrate Zoology* 4(2), 111-127.
- Verity, P., Purcell, J., Frischer, M., (2011). Seasonal patterns in size and abundance of *Phyllorhiza punctata*: an invasive scyphomedusa in coastal Georgia (USA). *Marine Biology* 158, 2219–2226.
- Webster, C., Lucas, C., (2012). The effects of food and temperature on settlement of *Aurelia aurita* planula larvae and subsequent somatic growth. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 436, 50–55.
- Willcox, S., Moltschaniwskyj, N., Crawford, C., (2007). Asexual reproduction in scyphistomae of *Aurelia* sp.: Effects of temperature and salinity in an experimental study. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 353(1), 107-114.
- Zar, J., (2009). *Biostatistical analysis*, Upper Saddle River, NJ: Pearson Education International 5, 944.

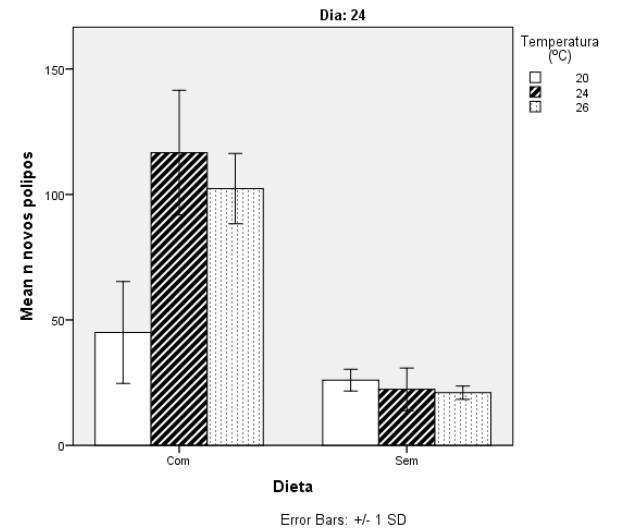
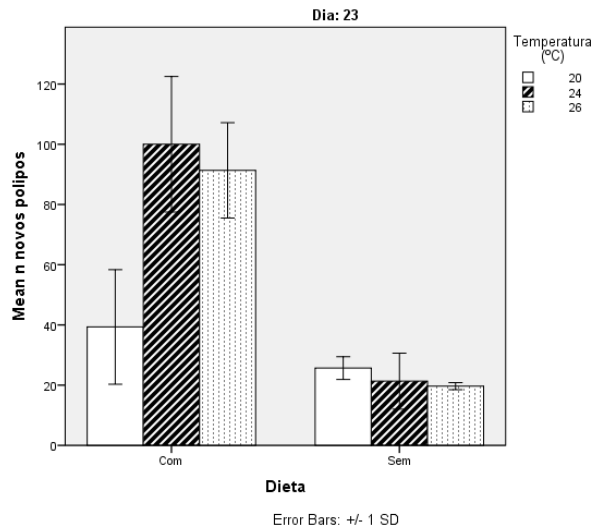
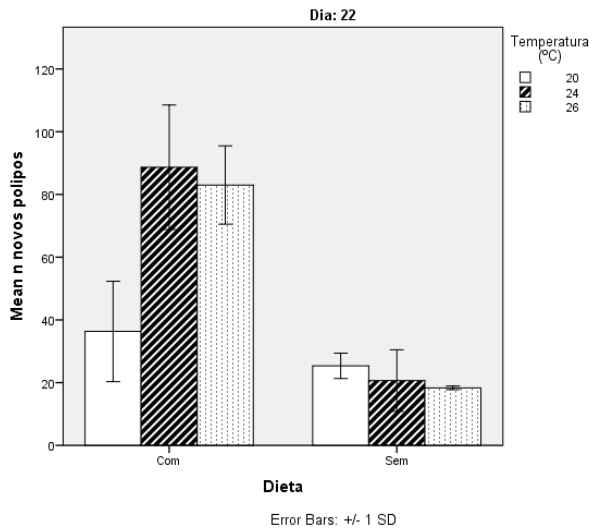
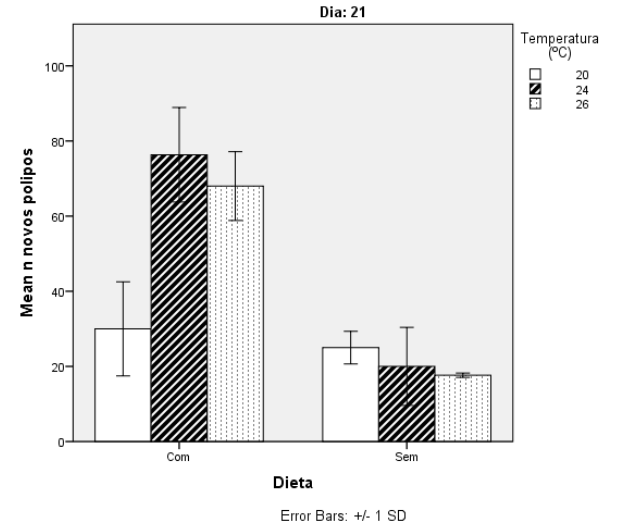
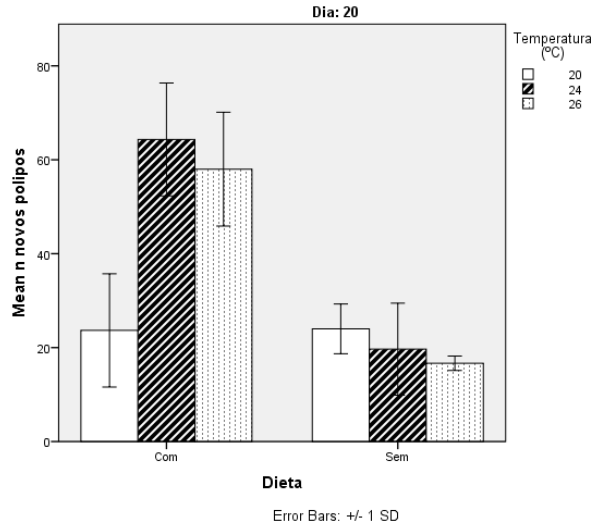
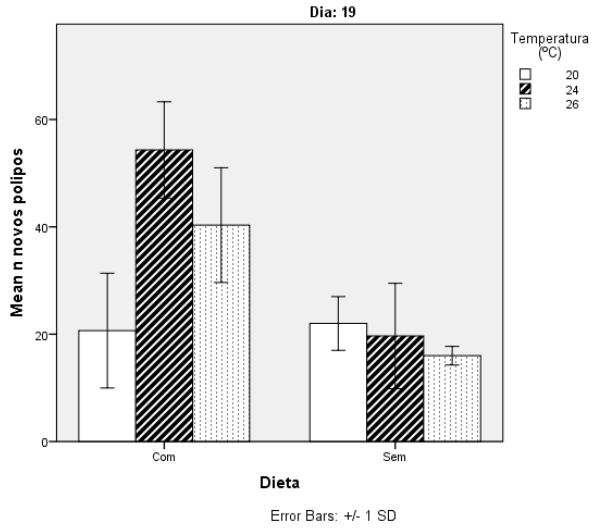
8. Anexos

Análise estatística da anova de dois fatores no ensaio do Efeito da temperatura e alimentação na indução da reprodução assexuada (Gemulação)

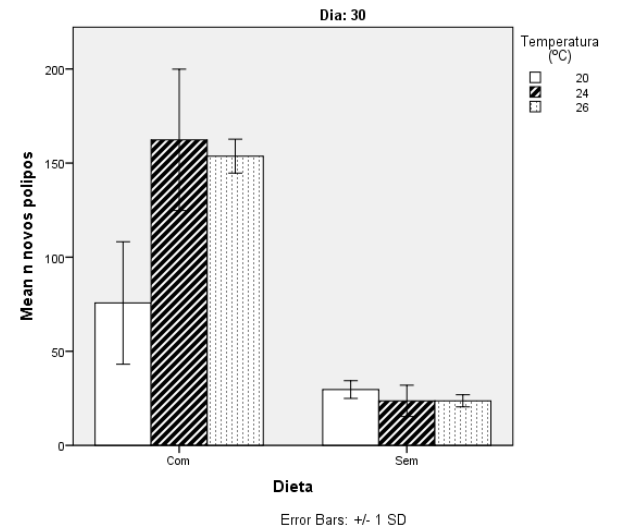
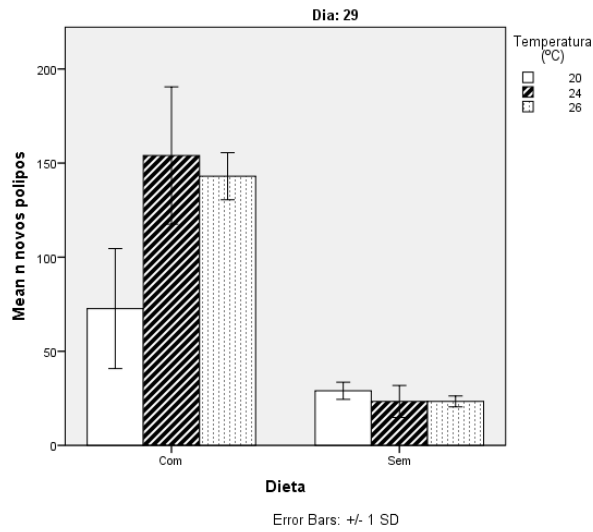
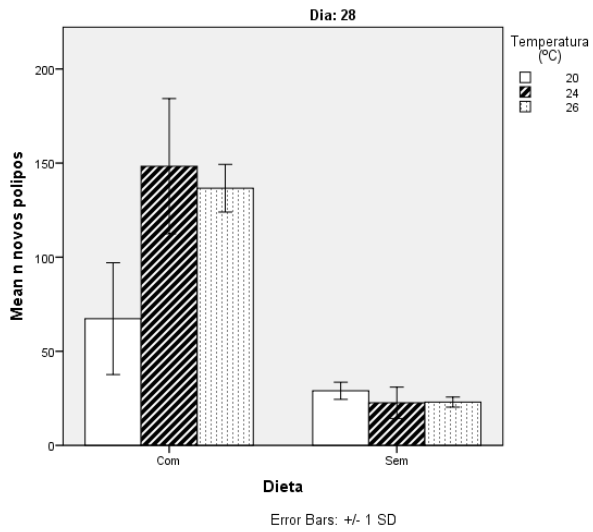
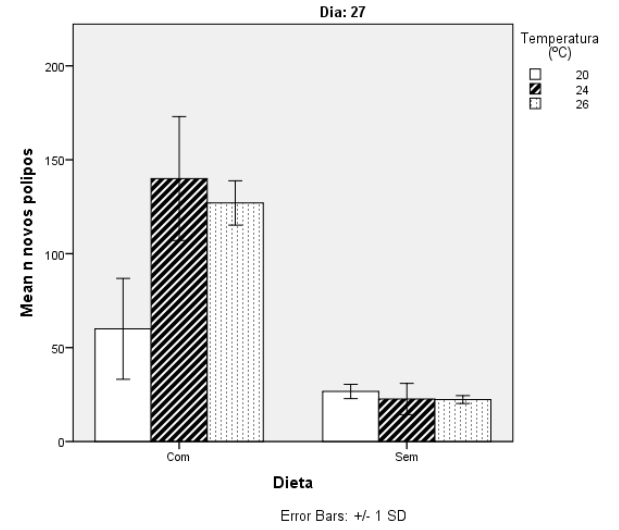
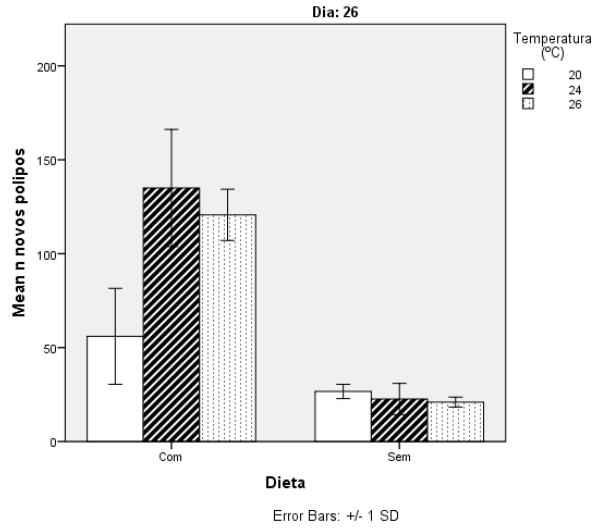
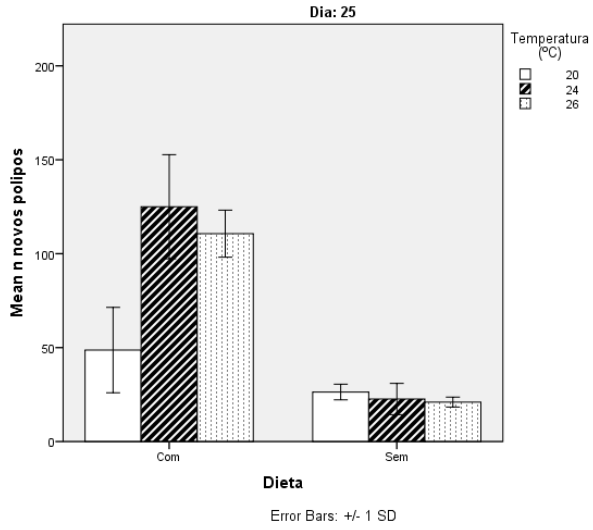
ANEXOS



ANEXOS



ANEXOS



ANEXOS

