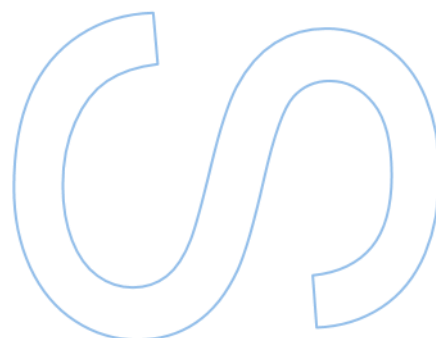
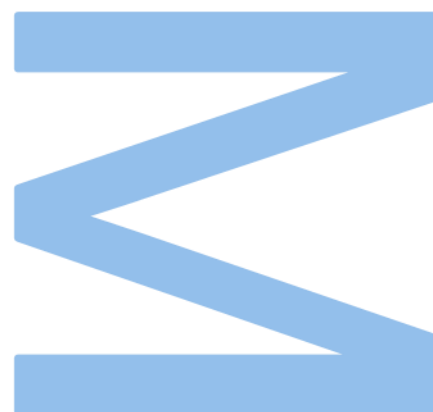


Efeitos da temperatura e salinidade na reprodução assexuada, estrobilação e sobrevivência de pólipos de *Catostylus tagi*

Pedro Figueiredo Silva
Mestrado em Recursos Biológicos Aquáticos
Departamento de Biologia
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
2024





Efeitos da temperatura e salinidade na reprodução assexuada, estrobilação e sobrevivência de pólipos de *Catostylus tagi*

Pedro Figueiredo Silva

Mestrado em Recursos Biológicos Aquáticos

Departamento de Biologia

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

2024

Orientador

Hugo Batista, MSc, Oceanário de Lisboa

Coorientador

Paula Enes, PhD, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto



Oceanário de Lisboa
Sempre diferente.

Agradecimentos

Durante este último ano, tive o privilégio de trabalhar com pessoas que fizeram destes meses uma experiência única e profundamente marcante para o meu desenvolvimento pessoal e enquanto profissional na área pela qual ganhei uma paixão ainda maior. Assim, gostaria de agradecer a todas as pessoas que me acompanharam até ao presente momento.

Primeiramente, gostaria de manifestar os meus sinceros agradecimentos às instituições que me permitiram desenvolver a minha tese. Extremamente grato ao Departamento de Biologia da Universidade do Porto por ter sido a instituição a apoiar-me no meu percurso profissional e um agradecimento especial ao Oceanário de Lisboa e a toda a equipa por me terem acolhido de forma tão calorosa, tendo sido esta a minha segunda casa durante este período.

Ao meu supervisor, João, por teres sido o meu principal pilar nesta tese. Obrigado, por teres estado sempre aqui presente, por todas as palavras de incentivo e pela paciência. Para além de supervisor, foste e és um grande amigo e uma inspiração que foi fundamental para o sucesso deste trabalho, espero um dia chegar a 1/4 do que tu já és!

Ao meu orientador, Hugo Batista, obrigado por me teres dado a oportunidade de realizar a tese num dos temas que mais me fascina e por toda a ajuda e entusiasmo que me forneceste ao longo deste ano, contribuíste muito para este trabalho e ajudaste bastante na sua construção e desenvolvimento!

À minha co-orientadora, Paula Enes, obrigado por te mostrares sempre disposta (e bem-disposta) a ajudar e por teres sido uma peça crucial no rumo deste trabalho, sempre conseguiste arranjar um tempinho para me ajudar, especialmente na análise de resultados e na parte estatística do trabalho!

Queria também, agradecer à Ana Ferreira, do Oceanário de Lisboa, que estive de certa forma envolvida no projeto e que ajudou a tornar isto tudo possível!

E por fim, gostaria de agradecer à minha família e amigos pelo apoio constante nos momentos difíceis, pela presença constante e pela paciência infinita que tiveram comigo, quer a família de Lisboa que me acolheu nestes meses e a família do Porto que sempre me deu forças!

Ao Tiago, à Traquituna, às BioLontras e a Biologia, agradeço por terem sido o meu refúgio e por estarem sempre aqui para me ajudar em qualquer situação! Obrigado por tudo!

Resumo

A frequência e a intensidade de blooms na generalidade dos cifozoários têm aumentado significativamente nos últimos anos, devido principalmente a ações antropogénicas e às alterações climáticas. O ciclo de vida destes organismos envolve uma fase bentónica (pólipos), que se reproduz assexuadamente, e uma fase pelágica e sexuada (medusa). Fatores como a temperatura e a salinidade influenciam a reprodução, podendo influenciar a dinâmica populacional destes organismos. Devido ao ciclo de vida complexo destes organismos, torna-se desafiante compreender quais são as fases mais sensíveis às variações das condições ambientais. A espécie *Catostylus tagi* é um cifozoário que ocorre em águas portuguesas e embora o seu ciclo de vida esteja descrito, desconhecem-se as condições favoráveis à sobrevivência dos pólipos, uma vez que não há relatos de observação no meio natural, e os fatores que induzem a sua estrobilação, bem como as condições em que se reproduzem assexuadamente, como por exemplo, a produção de podocistos. O presente estudo tem como objetivo preencher lacunas de conhecimento relativamente ao ciclo de vida de *C. tagi*, nomeadamente na fase de pólipo, e avaliar a resposta dos pólipos a diferentes condições de temperatura e salinidade. Para o efeito, 96 pólipos foram mantidos em placas multipoços durante 71 dias em diferentes regimes de temperaturas (14, 17, 20 e 23°C) e salinidades (10, 17,5, 25 e 35 ppt), de modo a investigar os seus efeitos na sobrevivência, na reprodução assexuada e no processo de estrobilação. A taxa de sobrevivência dos pólipos foi elevada, exceto nos tratamentos com uma salinidade de 35 ppt, independentemente da temperatura, onde a mortalidade foi considerável. A reprodução assexuada (produção de podocistos) foi maior nas temperaturas mais elevadas (20-23°C) e nas salinidades intermédias (17,5-25 ppt), tendo ocorrido o desenvolvimento de podocistos para novos pólipos nas salinidades mais reduzidas (10-17,5 ppt). Ocorreram mais ciclos de estrobilação nas temperaturas intermédias (17-20°C) e nas salinidades intermédias (17,5-25 ppt). As características eurialinas e euritérmicas apresentadas pelos pólipos, refletidas na distribuição temporal e espacial das medusas no estuário do Tejo, proporcionam vantagens para a futura aquacultura, investigação e produção de *C. tagi*. Este estudo é crucial pois demonstrou uma notável capacidade de adaptação de *C. tagi* a diferentes condições ambientais de temperatura e salinidade, permitindo uma melhor compreensão das condições ideais para o bem-estar e reprodução de pólipos desta espécie.

Palavras-chave: *Catostylus tagi*, estrobilação, podocistos, pólipos, reprodução

Abstract

The frequency and intensity of blooms in most scyphozoa have increased significantly in recent years, mainly due to anthropogenic actions and climate change. The life cycle of these organisms involves a benthic phase (polyp), which reproduces asexually, and a pelagic and sexual phase (medusa). Factors such as temperature and salinity influence reproduction and can affect the population dynamics of these organisms. Due to the complex life cycle of these organisms, it is challenging to understand which phases are most sensitive to variations in environmental conditions. The species *Catostylus tagi* is a scyphozoan that occurs in Portuguese waters. Although its life cycle has been described, the conditions favorable to the survival of the polyps are unknown, since there are no reports of observation in the natural environment, and the factors that induce their strobilation, as well as the conditions in which they reproduce asexually, such as the production of podocysts. The aim of this study is to fill knowledge gaps regarding the life cycle of *C. tagi*, particularly in the polyp stage, and to assess the response of the polyps to different temperature and salinity conditions. To this end, 96 polyps were kept in multiwell plates for 71 days at different temperatures (14, 17, 20 and 23°C) and salinities (10, 17.5, 25 and 35 ppt) to investigate their effects on survival, asexual reproduction and the strobilation process. The survival rate of the polyps was high, except in the treatments with a salinity of 35 ppt, regardless of temperature, where mortality was considerable. Asexual reproduction (podocyst production) was higher at higher temperatures (20-23°C) and intermediate salinities (17.5-25 ppt), with podocysts developing into new polyps at lower salinities (10-17.5 ppt). More strobilation cycles occurred at intermediate temperatures (17-20°C) and intermediate salinities (17.5-25 ppt). The euryhaline and eurythermal characteristics of the polyps, reflected in the temporal and spatial distribution of the medusas in the Tejo estuary, offer advantages for future aquaculture, research and production of *C. tagi*. This study is crucial because it has demonstrated *C. tagi*'s remarkable ability to adapt to different environmental conditions of temperature and salinity, allowing for a better understanding of the ideal conditions for the well-being and reproduction of polyps of this species.

Keywords: *Catostylus tagi*, podocysts, polyps, reproduction, strobilation

Índice

Lista de Tabelas	v
Lista de Figuras	vi
1. Introdução.....	1
1.1. Serviços dos ecossistemas e impactos dos organismos gelatinosos	1
1.2. Ciclo de vida dimórfico dos cifozoários	2
1.3. <i>Catostylus</i>	4
1.4. <i>Catostylus tagi</i>	5
1.5. Objetivos	8
2. Materiais e Métodos	9
2.1. Captura das medusas	9
2.2. Fertilização	9
2.3. Manutenção dos pólipos	10
2.4. Desenho Experimental	10
2.5. Análise dos pólipos	12
2.6. Análise estatística.....	13
3. Resultados.....	14
3.1. Efeitos da temperatura e salinidade nos pólipos	14
3.1.1. Sobrevivência	16
3.1.2. Reprodução assexuada	17
3.1.3. Estrobilação	19
4. Discussão	25
5. Conclusão.....	31
6. Referências Bibliográficas	32

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Efeitos de 16 combinações de temperatura e salinidade na sobrevivência, reprodução assexuada e estrobilação dos pólipos de <i>Catostylus tagi</i> . DP – Desvio padrão.....	15
Tabela 2 – ANOVA unifatorial dos efeitos da temperatura e salinidade na produção de podocistos	18
Tabela 3 – ANOVA unifatorial dos efeitos da temperatura e salinidade nos ciclos de estrobilação	22
Tabela 4 – ANOVA unifatorial dos efeitos da temperatura e salinidade nas fases de pré-estrobilação e bet-estrobilação	24

Lista de Figuras

Figura 1 – Exemplos de blooms de organismos gelatinosos: <i>Cotylorhiza tuberculata</i> (A), <i>Physalia physalis</i> (B). Fontes: (© F. Limena/Fonds (A), Tara João Brum (B).....	1
Figura 2 – Diagrama esquemático do ciclo de vida de um cifoário. Fonte: Pitt (2000).....	3
Figura 3 – Espécies do género <i>Catostylus</i> e a sua distribuição mundial. Adaptado de Jarms & Morandini (2011).....	5
Figura 4 – Fases do ciclo de vida de <i>Catostylus tagi</i> . A – Medusa adulta; B – Pólipo em fase de pré-estrobilação com 4 podocistos; C – Éfira/Medusa juvenil. Créditos de imagens: Pedro Silva	6
Figura 5 – Passos relativos à fertilização <i>in vitro</i> de <i>Catostylus tagi</i> . A – Coleta dos espécimes na doca do Oceanário de Lisboa; B – Gónadas em forma de cruz; C – Extração do tecido e cirros gástricos; D – Gónadas femininas; E – Gónadas masculinas; F – Baldes com arejamento contendo misturas de tecido gonadal. Créditos de imagens: Pedro Silva.....	9
Figura 6 – Imagem representativa do ensaio experimental, indicando as temperaturas (14, 17, 20 e 23°C) e salinidades (10, 17,5, 25 e 35 ppt) testadas. Créditos de imagem: Pedro Silva ..	11
Figura 7 – Processo de estrobilação. Créditos de imagens: Pedro Silva	13
Figura 8 – Curvas de sobrevivência (Kaplan-meier) dos pólipos de <i>Catostylus tagi</i> mantidos em 16 diferentes combinações de temperaturas e salinidades durante 71 dias de experiência ($n = 6$ por combinação)	16
Figura 9 – A-B: Podocistos produzidos por <i>Catostylus tagi</i> . Dp – Disco pedal. Créditos de imagens: Pedro Silva	17
Figura 10 – Variação da produção de podocistos realizada pelos pólipos nas diferentes temperaturas (14, 17, 20 e 23°C) e salinidades (10, 17,5, 25 e 35 ppt). Os valores representam médias $\pm$ desvio padrão, com $N = 6$ para cada combinação de temperatura e salinidade	18
Figura 11 – Pólipos que se desenvolveram a partir de podocistos. A – Pólipo recém-formado com 2 tentáculos; B – Pólipo mais desenvolvido com 5 tentáculos. Créditos de imagens: Pedro Silva.....	19
Figura 12 – Ciclo de estrobilação de pólipos de <i>Catostylus tagi</i> (A-H). ca – Cálice; lm – Lóbulo marginal; de – Disco de éfiras; ef – Éfira; rp – Ropálio; te – Tentáculo. Créditos de imagens: Pedro Silva.	20
Figura 13 – Variação do número de ciclos de estrobilação realizados pelos pólipos nas diferentes temperaturas (14, 17, 20 e 23°C) e salinidades (10, 17,5, 25 e 35 ppt). Os valores representam médias $\pm$ desvio padrão, com $N = 6$ para cada combinação de temperatura e salinidade	21
Figura 14 – Fases de pré-estrobilação, bet-estrobilação e estrobilação dos pólipos em quatro temperaturas (14, 17, 20 e 23°C) e quatro salinidades (10, 17,5, 25 e 35 ppt) durante 71 dias de experiência	23

1. Introdução

1.1. Serviços dos ecossistemas e impactes dos organismos gelatinosos

Os organismos gelatinosos incluem animais pertencentes a três filos que são filogeneticamente e morfologicamente muito distintos (Cnidaria, Ctenophora e Chordata). Agrupam cnidários pertencentes às classes Hydrozoa, Scyphozoa (verdadeiras medusas), Cubozoa e Staurozoa. Para além dos cnidários, também estão incluídos os Ctenophora que se caracterizam por possuírem 8 fiadas de pentes, sendo estes os maiores organismos a dependerem de cílios para se movimentarem na coluna de água (Tamm, 2014). Também compreendem espécies do filo Chordata, como, por exemplo, as salpas. Estes organismos podem ocorrer em grandes densidades e, quando este fenómeno acontece, são capazes de impactar fortemente o meio marinho (Hays *et al.*, 2018) (Figura 1).

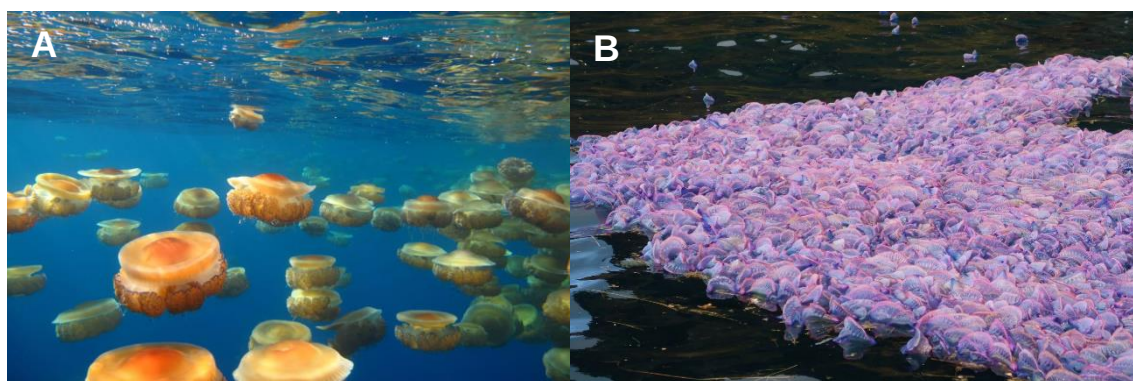


Figura 1. Exemplos de blooms de organismos gelatinosos: *Cotylorhiza tuberculata* (A), *Physalia physalis* (B). Fontes: (© F. Limena/Fonds (A), Tara João Brum (B).

Estes animais apresentam um registo fóssil muito pobre, isto porque 96-98% do seu corpo é constituído por água e decompõem-se rapidamente após morrerem (Gorbatenko *et al.*, 2009). Contudo, a ocorrência destes blooms não é um fenómeno recente. Há descobertas de cifomedusas fossilizadas que mostram que densas acumulações destes organismos já ocorrem desde o período Câmbrio (> 500 milhões de anos) (Young & Hagadorn, 2010). A problemática é que, em diversas regiões costeiras e estuários, a frequência e duração destes blooms têm aumentado drasticamente nas últimas décadas, principalmente em áreas impactadas por ações antropogénicas diretos (acréscimo de substratos artificiais, eutrofização, sobrepesca e introdução de novas espécies) e às alterações climáticas (aumento da temperatura e

acidificação dos oceanos) que têm contribuído para estes episódios (Attrill *et al.*, 2007). Isto afeta diretamente e indiretamente as atividades antropogénicas, o uso das águas costeiras e os recursos marinhos, podendo causar grandes estragos nas redes de pesca, a contaminação do pescado, o bloqueio dos filtros utilizados para dessalinização costeira e, claro, uma redução do uso recreativo das praias e zonas costeiras, diminuindo assim a produtividade da indústria turística. O aumento da frequência destes episódios reduz significativamente a biodiversidade do meio ambiente, incluindo espécies que são economicamente importantes, como o salmão (Graham *et al.*, 2014; Ruzicka *et al.*, 2016). Apesar dos impactos negativos que apresentam, os organismos gelatinosos são uma componente integral dos ecossistemas marinhos. Primeiramente, regulam e controlam a abundância de espécies de peixes e invertebrados que, de outra forma, teriam um impacto negativo nos ecossistemas. Para além disso, a maioria dos organismos gelatinosos entram na dieta de muitas espécies que se encontram em perigo de extinção, como a tartaruga-de-couro (Heaslip *et al.*, 2012). Algumas medusas estabelecem relações simbióticas com uma ampla variedade de espécies marinhas, no sentido de fornecer refúgio a peixes juvenis, promovendo assim a proteção e o desenvolvimento dos peixes nos estados iniciais de vida (Doyle *et al.*, 2014; Hays *et al.*, 2018). Apesar de se conhecer pouco acerca das relações simbióticas entre medusas e peixes, Nagelkerken *et al.* (2016) realizaram um estudo em que observaram que os peixes se aproximavam menos das medusas quando os níveis de dióxido de carbono da água eram mais elevados, pondo em causa o crescimento e o desenvolvimento de várias espécies que são importantes tanto economicamente como para os ecossistemas, já que recebiam uma menor proteção das medusas. Por fim, todos os organismos gelatinosos pertencentes ao filo Cnidaria contém colagénio nos seus tecidos, o qual é utilizado para fins farmacêuticos, e muitos possuem substâncias no seu muco que têm a capacidade de captar e sequestrar partículas muito pequenas, incluindo microplásticos (Doyle *et al.*, 2014).

Assim, os organismos gelatinosos desempenham um papel crucial nos ecossistemas, beneficiando não apenas os organismos circundantes, mas também o Homem. Contudo, quando ocorrem em grandes densidades, podem constituir uma ameaça para todo o ecossistema (Hays *et al.*, 2018).

1.2. Ciclo de vida dimórfico dos Cifozoários

A maior parte das espécies de cifozoários apresentam um ciclo de vida complexo e dimórfico, existindo uma alternância de gerações entre uma fase bentônica (pólipos) e uma fase pelágica (medusa). As medusas reproduzem-se sexualmente, levando à formação de larvas planctônicas ciliadas denominadas plânulas que se irão fixar a um substrato duro, desenvolvendo-se e formando pólipos. Os pólipos (*Scyphistoma*) reproduzem-se assexuadamente por diversas estratégias (gemulação lateral, formação de estolões, via produção de podocistos de resistência entre outros que poderão levar à formação de centenas de pólipos) e entram em estado de estrobilação, metamorfoseando-se de maneira a formarem medusas juvenis, designadas éfiras, que crescerão para medusas adultas (Arai, 1997). As estratégias de reprodução assexuada variam de acordo com as espécies de cifozoários, sendo que algumas espécies apresentam apenas uma estratégia de propagação (e.g, podocistos em *Rhopilema nomadica* (Lotan *et al.*, 1992)), enquanto outras manifestam várias formas de se reproduzirem (e.g., podocistos e gemulação em *Catostylus mosaicus* (Pitt, 2000)). O ciclo de vida típico de um cifozoário encontra-se esquematizado na Figura 2.

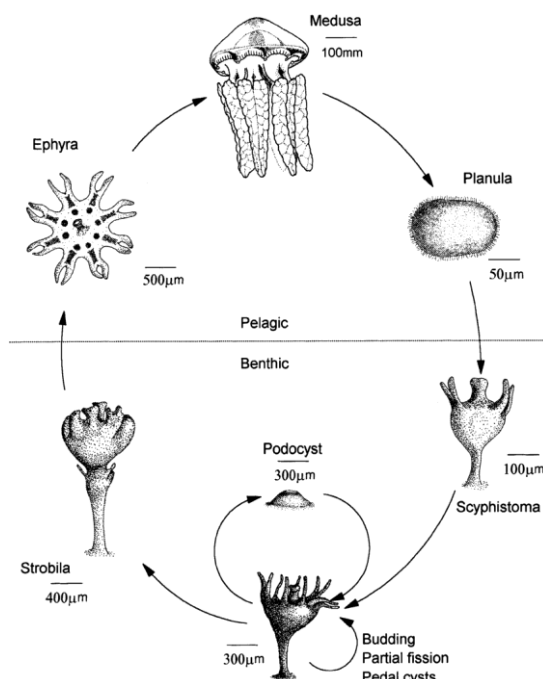


Figura 2. Diagrama esquemático do ciclo de vida de um cifozoário. Fonte: Pitt (2000).

Como referido, uma das estratégias de reprodução assexuada trata-se da produção de podocistos, que são pequenas agregações de células epidérmicas com reservas de compostos orgânicos que são produzidos nos discos pedais dos pólipos ou a partir da

formação de estolões e que, o seu desenvolvimento, leva à formação de um novo pólipo (Blanquet, 1972). Estes cistos, que podem ser viáveis por mais de dois anos, podem contribuir para o acréscimo de blooms de medusas (Arai, 1997). Contudo, lacunas de conhecimento acerca do funcionamento dos podocistos ainda estão presentes para muitas espécies, pelo que se torna importante perceber quando e em que condições é que são formados, principalmente para as espécies que apresentam apenas esta estratégia de reprodução assexuada como forma de propagação (Thein *et al.*, 2013).

Muitas espécies de cifozoários, especialmente as que habitam em ambientes costeiros, são tolerantes a uma ampla gama de condições ambientais, incluindo, por exemplo, a temperatura, salinidade, pH, concentração de oxigénio e disponibilidade de alimento (Arai, 1997; Lucas, 2001). O aquecimento global tem influenciado o aumento das populações de medusas, causando alterações na duração dos blooms e na distribuição das espécies. No entanto, devido ao ciclo de vida dimórfico destes organismos, notavelmente complexo, torna-se desafiante compreender quais as fases que são mais suscetíveis às condições ambientais (Prieto *et al.*, 2010). O crescimento das populações de diversas espécies de cifozoários pode ser justificado pelo sucesso da produção de éfiras pela fase bentónica, geralmente desencadeados por fatores ambientais como mudanças de temperatura, salinidade ou disponibilidade de alimento, variando estes fatores entre espécies (Prieto *et al.*, 2010). Estudos indicam que o aumento da temperatura contribui para o aumento da densidade dos pólipos e da reprodução assexuada em certas espécies (Purcell *et al.*, 2012; Widmer *et al.*, 2016). Contribuindo para a complexidade deste cenário, o conhecimento sobre o ciclo de vida da maioria dos cifozoários é limitado, sendo a fase de medusa mais estudada do que a fase de pólipo (Jarms *et al.*, 2019; Mills, 2001). Torna-se, portanto, fundamental compreender os fatores que alteram a reprodução assexuada dos pólipos, a estrobilação e o crescimento das éfiras para o estado adulto.

1.3. *Catostylus*

Atualmente conhecem-se 10 espécies do género *Catostylus*, podendo estas serem encontradas em zonas tropicais, subtropicais e temperadas (Figura 3). Apenas os ciclos de vida de *C. mosaicus*, *C. townsendi* e *C. tagi* foram descritos e investigados, pelo que as outras espécies se encontram descritas de forma incompleta e/ou raramente encontradas, sendo que a sua classificação deverá ser cuidadosamente considerada (Gueroun *et al.*, 2021; Jarms *et al.*, 2019; Pitt & Kingsford, 2000). No Oceano Atlântico,

o género está representado por três espécies: *C. tripterus* (Haeckel, 1880), encontrada na Guiné Equatorial; *C. cruciatus* (Lesson, 1830), que se encontra distribuída na costa Sul e Este do Brasil e *C. tagi* (Haeckel, 1869) que ocorre desde a costa Atlântica da Europa (França, Espanha e Portugal) até ao Sul do Congo na África Ocidental, tendo sido encontrada pela primeira vez no Rio Tejo, em Portugal (Jarms *et al.*, 2019). De acordo com Jarms & Morandini (2011), um avistamento duvidoso de *C. tagi* foi registado no Panamá (América Central), podendo este registo ter sido confundido com a *C. ornatellus*, espécie que ocorre em águas próximas. Devido aos escassos estudos realizados com as espécies pertencentes a este género, possivelmente algumas espécies poderão ser inválidas e/ou duvidosas, sendo necessário mais estudos de forma a perceber e reconhecer a verdadeira diversidade deste grupo de cifozoários (Jarms *et al.*, 2019).

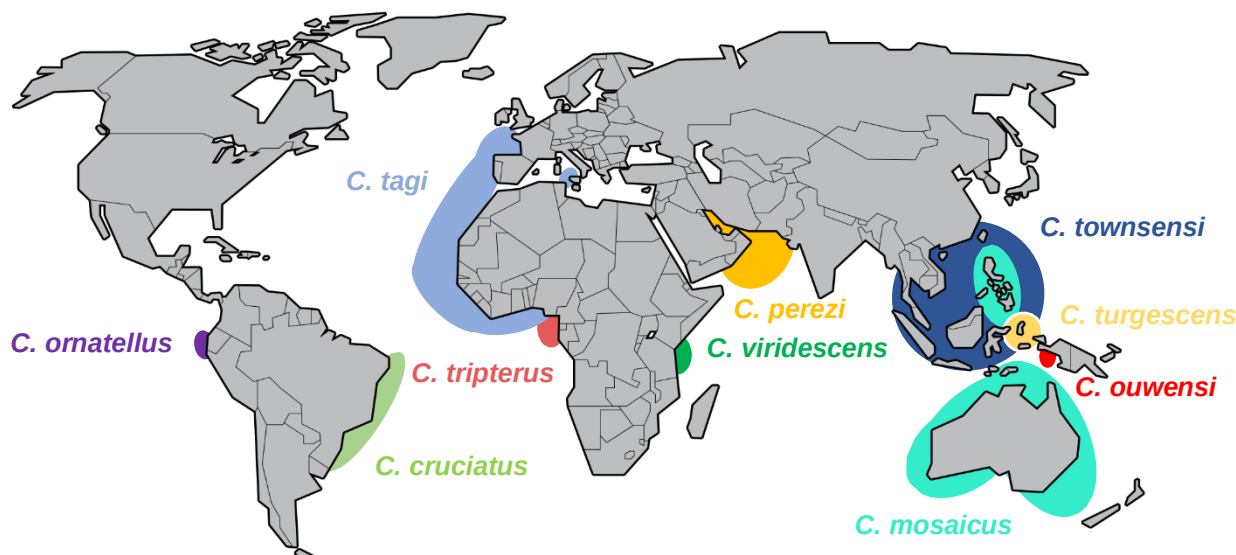


Figura 3. Espécies do género *Catostylus* e a sua distribuição mundial. Adaptado de Jarms & Morandini (2011).

1.3.1. *Catostylus tagi*

A espécie *Catostylus tagi*, conhecida como medusa-do-Tejo, pertence à classe Scyphozoa do Filo Cnidaria. Exibe um ciclo de vida tipicamente dimórfico, compreendendo uma fase de medusa que se reproduz sexualmente e uma fase assexuada, o pólipo. As medusas (Figura 4A) apresentam uma cor esbranquiçada, acastanhada ou azulada, oito tentáculos volumosos com excrescências em forma de cacho e fissuras avermelhadas ou acastanhadas no bordo da campânula, podendo esta atingir um tamanho de 65 centímetros de comprimento (Gueroun *et al.*, 2021). Já os pólipos (Figura 4B), usualmente pequenos, são tipicamente sésseis e esbranquiçados.

Quando totalmente formados, apresentam 16 tentáculos que utilizam para captura de alimento e defesa. Em certas condições abióticas (e.g, temperatura, salinidade), entram no processo de estrobilação e libertam as éfiras (Figura 4C) que crescem até ao estado de medusa adulta. A única estratégia de reprodução assexuada registada para esta espécie é a produção de podocistos (Gueroun *et al.*, 2021).

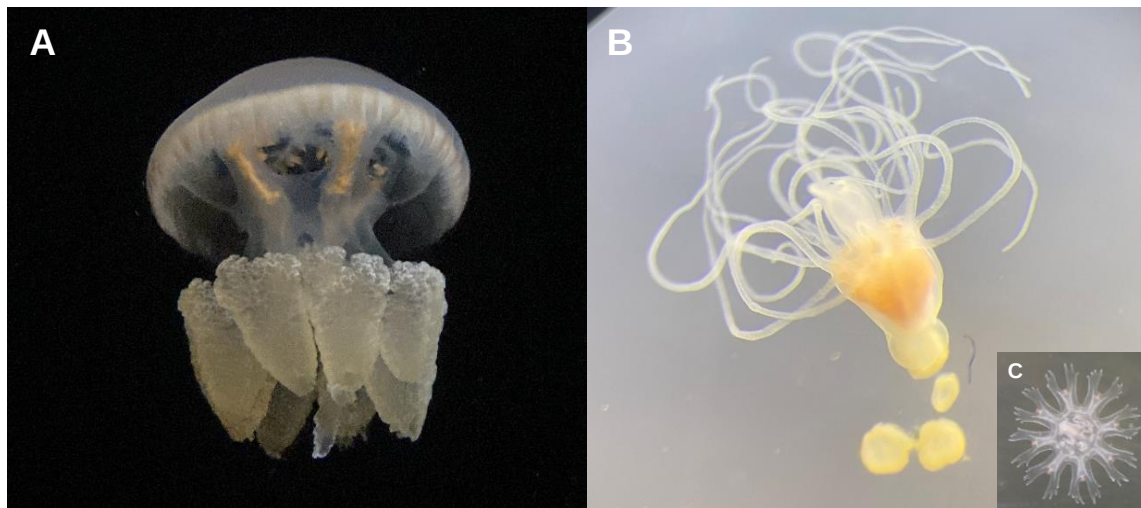


Figura 4. Fases do ciclo de vida de *Catostylus tagi*. A - Medusa adulta; B - Pólio em fase de pré-estrobilação com 4 podocistos; C – Éfira/Medusa juvenil. Créditos de imagens: Pedro Silva.

Trata-se da medusa mais comum em Portugal Continental, podendo ser facilmente observada em portos e marinas, especialmente nos rios Tejo e Sado, daí o nome medusa-do-Tejo. Os avistamentos de adultos de *C. tagi* têm sido registados por um programa de ciência cidadã, o GelAvista (gelavista.ipma.pt), que é responsável pela monitorização dos organismos gelatinosos em toda a costa portuguesa, Açores e Madeira. Lançado em 2016, pretende envolver a comunidade no desenvolvimento da ciência, colmatando assim a falta de conhecimento sobre as espécies que ocorrem em Portugal (GelAvista, 2023). Dados recolhidos pelo programa GelAvista nos últimos anos mostram que estes organismos ocorrem maioritariamente no estuário do Tejo de maio a março, o que sugere que esta espécie é tolerante a uma vasta gama de temperaturas e salinidades. A sua redução em abril pode ser explicada pela redução da estrobilação ou mortalidades elevadas das éfiras durante os meses frios de novembro e dezembro (Gueroun *et al.*, 2021). Nenhum avistamento de pólipos e éfiras de *C. tagi* foram alguma vez registados no meio natural, pelo que não se sabe onde é que os mesmos podem ser encontrados. Trata-se de uma espécie ligeiramente urticante e, por isso, deve evitar-se o contacto da pele com estes organismos (GelAvista, 2023). Estudos mostram que esta espécie apresenta grandes quantidades de ácidos gordos e antioxidantes, podendo ser introduzida no consumo humano (Morais *et al.*, 2009). Porém, apesar de Portugal

apresentar um dos maiores consumos per capita de organismos marinhos da Europa, o consumo de medusas é pouco frequente, sendo uma das razões a irritabilidade que podem provocar (Amaral *et al.*, 2018; Raposo *et al.*, 2018). Para além disso, apresentam colagénio nos seus tecidos, uma característica que os torna relevantes para aplicações nos setores biomédicos, especialmente na indústria cosmética (Calejo *et al.*, 2009).

A exibição de medusas em aquários, como o Oceanário de Lisboa, é um campo de interesse que oferece oportunidades de apreciação pública da vida marinha. A espécie *C. tagi* ganha destaque pela sua relevância local, proporcionando ao público uma apresentação da biodiversidade marinha da região. A existência de medusas em ambientes controlados, como aquários, oferece uma plataforma para a educação pública sobre os ecossistemas marinhos e a sua conservação (Hayward, 2012). No entanto, lacunas na compreensão do ciclo de vida desta espécie representam desafios na criação de condições necessárias para a sua reprodução bem-sucedida ao cuidado humano. Gueroun *et al.* (2021) descreveu o ciclo de vida completo de *C. tagi*, mas relativamente aos pólipos, muitas questões permanecem por responder. Os autores verificaram que o desenvolvimento dos pólipos foi significativamente mais rápido a temperaturas elevadas (20-25°C), que o processo de estrobilação foi 2-3 vezes mais rápido a 20°C do que a 15°C e que a alimentação foi um fator condicionante para a estrobilação, não havendo libertação de éfiras em pólipos que não foram alimentados. Observaram também que a temperatura não influenciou a produção de podocistos, permanecendo a questão sobre em que condições os mesmos são produzidos e quando é que se desenvolvem. Para além da temperatura, é igualmente provável que a salinidade represente um fator ambiental importante para a distribuição e sobrevivência dos pólipos nas regiões costeiras. No entanto, não existem estudos focados nos efeitos da salinidade nos pólipos de *C. tagi*, quer seja a nível da estrobilação, quer na reprodução assexuada e sobrevivência dos mesmos.

O presente estudo tem como objetivo determinar as respostas dos pólipos de *C. tagi* a combinações de diferentes regimes de temperatura e salinidade que podem vir a ser encontradas no seu habitat natural. Isto porque, embora se conheça a distribuição das medusas, não significa que os pólipos ocorram nos mesmos locais ou que apresentem as mesmas condições favoráveis ao seu desenvolvimento. Os efeitos da temperatura em pólipos de *C. tagi* já foram reportados anteriormente (Gueroun *et al.*, 2021). No entanto, os efeitos da salinidade e as suas interações com a temperatura nunca foram estudadas, tornando-se importante já que se tratam de fatores ambientais chave com

um papel crucial na determinação da presença e/ou ausência anual de medusas de *C. tagi*.

1.4. Objetivos

Os principais objetivos deste estudo são:

- Compreender os efeitos da temperatura e salinidade nas taxas de sobrevivência dos pólipos de *C. tagi*, na produção e desenvolvimento de podocistos, bem como no processo de estrobilação;
- Otimizar os métodos de cultivo dos pólipos, com o propósito de compreender quais as melhores condições para o bem-estar e reprodução destes organismos e consequentemente aprimorar a produção e controlo do ciclo de vida desta espécie.

2. Materiais e Métodos

2.1. Captura das medusas

Um total de 7 medusas-do-Tejo foram capturadas com auxílio de um camaroeiro na Doca dos Olivais onde se localiza o Oceanário de Lisboa (Figura 5A), zona onde são avistadas com bastante frequência. Posteriormente, foram colocadas em baldes e transportadas para o Laboratório de Medusas do Oceanário de Lisboa. O sexo das medusas não é possível identificar macroscopicamente, o que justifica a coleta de alguns indivíduos de forma a tentar obter uma proporção de fêmeas:machos equilibrada, garantindo assim uma maior variabilidade genética.

2.2. Fertilização

O tecido gonadal de cada medusa foi removido (Figura 5B-C), o sexo identificado microscopicamente (Figura 5D-E) e o tecido colocado separadamente em gobelés de 500 mL. Posteriormente, os tecidos masculinos e femininos foram misturados e distribuídos em dois baldes com 6 L de água salgada filtrada cada, com arejamento (temperatura de $19 \pm 1^\circ\text{C}$, salinidade de $32,8 \pm 0,5$ ppt), de forma a permitir a fertilização (Figura 5F).). Após 48 h, observaram-se ao microscópio amostras de água dos baldes, de maneira a verificar presença de larvas plânulas.

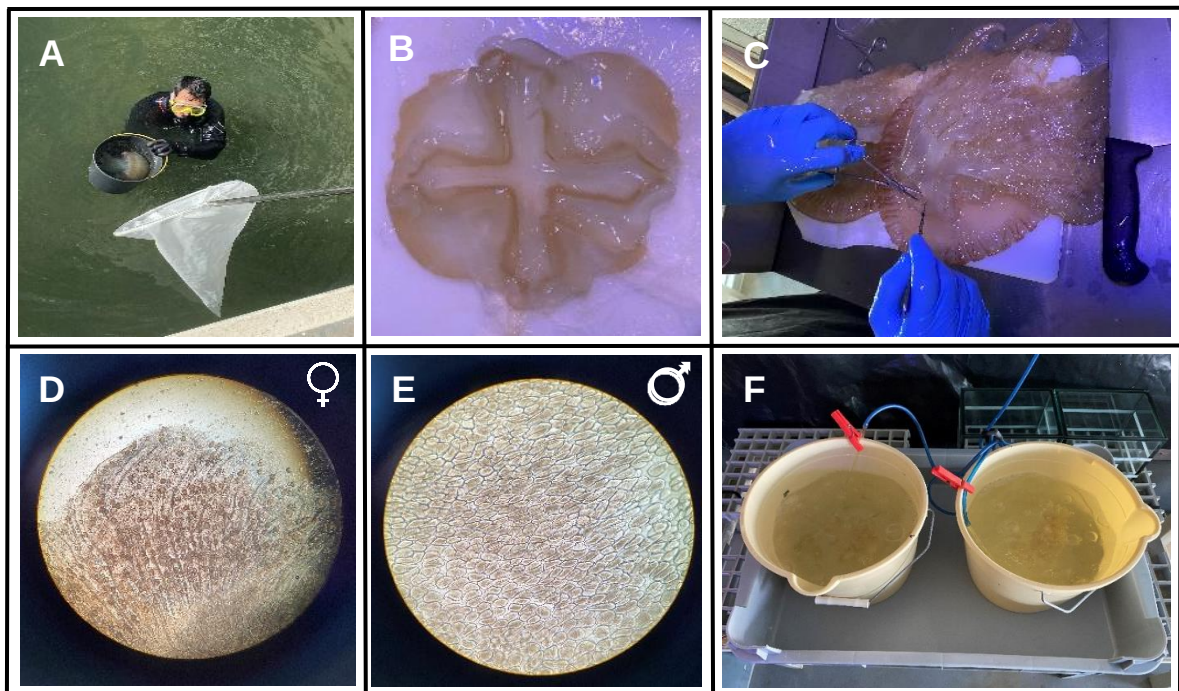


Figura 5. Passos relativos à fertilização *in vitro* de *Catostylus tagi*. A - Coleta dos espécimes na Doca dos Olivais; B - Gónadas em forma de cruz; C - Extração do tecido e cirros gástricos; D - Gónadas femininas; E - Gónadas masculinas; F - Baldes com arejamento contendo misturas de tecido gonadal. Créditos de imagens: Pedro Silva.

2.3. Manutenção dos pólipos

As plânulas foram subdivididas em quatro aquários com capacidade de 8 L cada, a uma temperatura de $19 \pm 1^\circ\text{C}$ e salinidade de $32,8 \pm 0,5$ ppt, condições favoráveis para o assentamento das plânulas (Gueroun *et al.*, 2021). Nestes aquários, biobolas previamente preparadas com biofilme foram inseridas, uma vez que a presença de biofilme já foi verificado como um requisito favorável para a fixação das plânulas (Holst & Jarms, 2007). A escolha da utilização das biobolas teve como objetivo aumentar a área de superfície disponível para a fixação das plânulas. A observação macroscópica do assentamento teve início 48 h após a introdução das plânulas. Análises dos parâmetros da água (temperatura, salinidade e pH) foram conduzidas diariamente, juntamente com trocas de 50% do volume da água ao final da manhã com o recurso a um crivo de $20\ \mu\text{m}$ (de maneira a não remover as plânulas dos aquários), com o objetivo de assegurar a manutenção das condições abióticas e garantir a qualidade biológica da água. Para além disso, procedeu-se a uma observação diária da água à lupa, a fim de verificar a presença de plânulas em suspensão. Foi iniciada uma alimentação diária ao final da manhã com 6 mL de rotíferos (a uma concentração de 200 rotíferos/mL), para alimentar os pólipos em desenvolvimento. Após uma semana de alimentação com rotíferos, e devido ao crescimento dos pólipos, foi implementada, também ao final da manhã, a alimentação diária destes com 6 mL de náuplios recém-eclodidos de *Artemia* com 24 h de vida (a uma concentração de 200 náuplios/mL), reduzindo-se, simultaneamente, a quantidade de rotíferos fornecidos (2 mL). A deteção de éfiras indicou o início do processo de estrobilação por parte dos pólipos, mostrando que estes já se encontravam desenvolvidos ao ponto de estrobilarem. Por isso, reduziu-se a quantidade diária de náuplios para 2 mL até ao início do ensaio.

2.4. Desenho Experimental

Foram definidos dois fatores experimentais variáveis: **Temperatura** (T), onde foram testados 4 níveis – 14°C (T1), 17°C (T2), 20°C (T3) e 23°C (T4) e **Salinidade** (S) onde foram testados igualmente 4 níveis – 10 ppt (S1), 17,5 ppt (S2), 25 ppt (S3) e 35 ppt (S4). As condições abióticas escolhidas são as encontradas atualmente no estuário do Tejo, onde se pensa que ocorrem e desenvolvem os pólipos de *C. tagi*, o que justifica a escolha dos diferentes níveis de condições abióticas testados (Gameiro *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2017). Para a realização deste estudo, foram utilizados quatro recipientes de forma a manter as temperaturas desejadas. Cada recipiente esteve em conexão com uma sump, equipada com uma bomba que permitiu a recirculação da água. As temperaturas definidas

foram alcançadas através do uso de dois refrigeradores (14°C e 17°C) e de duas resistências de aquecimento de água (20°C e 23°C). Em cada recipiente, foram colocadas quatro placas com 6 poços. Foi atribuída aleatoriamente uma salinidade a cada poço, representando cada salinidade uma cor, 6 réplicas por temperatura. A posição das placas de poços foram distribuídas aleatoriamente pelos recipientes e mantiveram-se as mesmas durante todo o ensaio. O ensaio encontra-se representado na Figura 6.

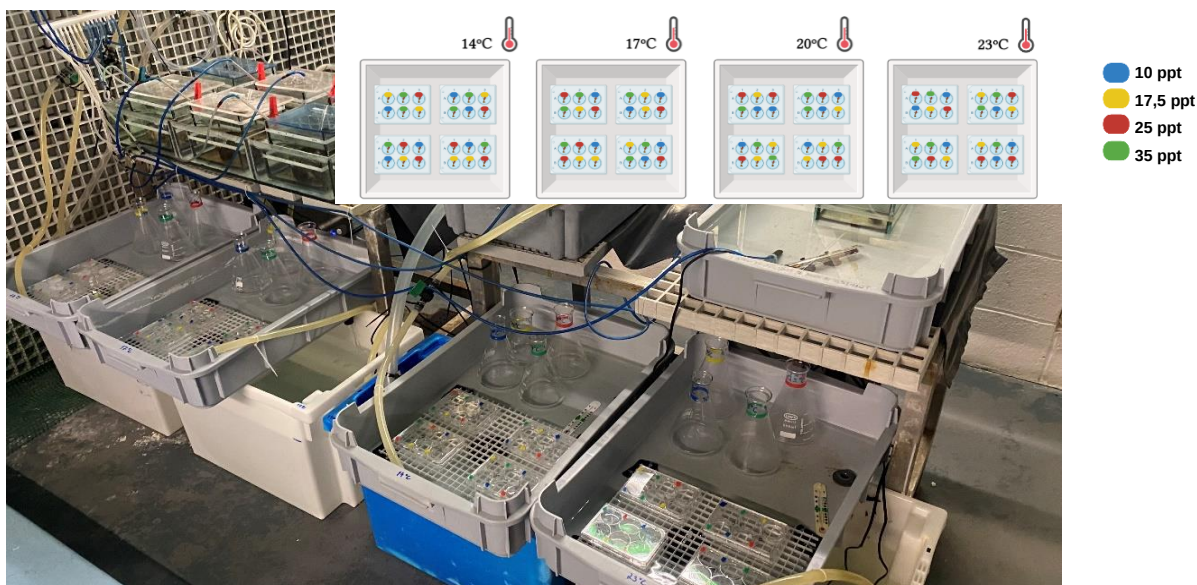


Figura 6. Imagem representativa do ensaio experimental, indicando as temperaturas (14, 17, 20 e 23°C) e salinidades (10, 17,5, 25 e 35 ppt) testadas. Créditos de imagem: Pedro Silva.

Os poços foram preenchidos com água nas salinidades desejadas e a uma temperatura de $19 \pm 1^\circ\text{C}$ antes da distribuição dos pólipos nos poços ($n = 1$ pólipo por poço), uma vez que os pólipos já se encontravam nos aquários a esta temperatura. Um total de 96 pólipos foram removidos cuidadosamente de forma aleatória dos aquários, utilizando uma pipeta de Pasteur de 3 mL. Os mesmos foram observados individualmente para assegurar a seleção apenas dos pólipos que não se encontravam no processo de estrobilação, uma vez que um dos objetivos deste estudo é compreender as condições abióticas (temperatura e salinidade) que levam os pólipos a estrobilar. Os pólipos foram distribuídos por quatro recipientes de 100 mL, contendo 30 mL de água proveniente dos aquários de origem, para evitar que o choque de temperatura e salinidade se tornasse fatal. Com o objetivo de aclimatar os pólipos às quatro salinidades em estudo, a cada 5 minutos, foram adicionados 5 mL de água previamente preparada com cada uma das salinidades testadas, de modo a atingir uma salinidade próxima da desejada nos quatro recipientes. Após a aclimação à salinidade, os pólipos foram colocados no sistema experimental, nos poços correspondentes a essa salinidade, tendo sido igualmente registado, antes da sua colocação nos poços, o número de podocistos produzido por cada pólipo. Este passo foi

crucial, uma vez que com este estudo pretendeu-se igualmente compreender de que forma e em que condições os podocistos são produzidos pelos pólipos. Após a introdução dos pólipos nas placas de poços, estas foram colocados nos respetivos recipientes, onde se deu a aclimação da temperatura dentro de cada poço que foi gradualmente atingida devido ao contacto dos poços com a água nas temperaturas desejadas. Como a luz é um fator que pode vir a afetar as variáveis em estudo, foi assegurado que todos os poços receberam uma luminosidade homogénea, sob um regime de 12 h luminosidade:12 h obscuridade. De forma a minimizar a evaporação e possíveis contaminações, os poços foram mantidos fechados durante todo o ensaio, exceto durante a coleta de dados, alimentações e mudanças de água. Antes do início do ensaio, verificou-se se as condições abióticas (temperatura e salinidade) dentro dos poços se alteraram com o fecho dos mesmos, confirmando-se que permaneceram constantes.

Durante a experiência, cuja duração foi de 71 dias, os pólipos foram alimentados duas vezes por semana, ao final da manhã, *ad libitum*, com náuplios de *Artemia* com 24 h de vida durante um período de 2 h, seguindo-se uma troca de 50% de água de forma a remover resíduos alimentares e produtos metabólicos. Este protocolo alimentar permitiu que os pólipos fossem saturados com alimento, resultando numa alimentação uniforme em todos os tratamentos. Desta forma, minimizou-se o efeito da alimentação aprimorada em temperaturas mais elevadas, já reportada para pólipos de cifozoários, onde os mesmos se alimentam mais ativamente e de forma mais eficiente do que em temperaturas mais baixas (Ma & Purcell, 2005). De maneira a manter as condições constantes de cada poço, a água utilizada quer para as alimentações como para as trocas de água já se encontrava previamente preparada nas condições de salinidade e temperatura dos respetivos poços (temperatura e salinidade).

2.5. Análise dos pólipos

Os poços contendo os pólipos foram submetidos a observações diárias sob uma lupa binocular ao longo de um período de 71 dias. Foram registados o número de pólipos que iniciaram o processo de estrobilação, o número de sobreviventes, o período de sobrevivência dos pólipos e o número de podocistos produzidos e desenvolvidos. De maneira a aprofundar a compreensão do processo de estrobilação, o qual se encontra esquematizado na Figura 7, procedeu-se à análise do período de “pré-estrobilação” (*pre-str*), definido como o intervalo de tempo desde o início da experiência até ao momento em que os pólipos iniciam o processo de estrobilação. Foi também analisado

o período de “bet-estrobilação” (*bet-str*), que representa o intervalo desde o início da estrobilação e a libertação da primeira éfira. Por fim, foi considerado o período de estrobilação (*str*) como o intervalo de tempo entre a libertação da primeira e a última éfira. O número de éfiras produzidas por pólipo foram quantificadas e eliminadas durante as observações dos poços.

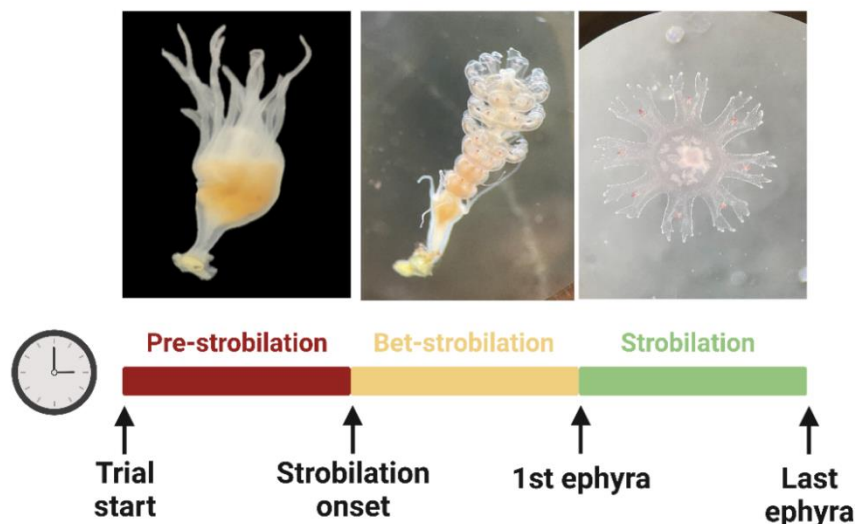


Figura 7. Processo de estrobilação. Créditos de imagens: Pedro Silva.

Foram investigadas outras estratégias de reprodução, como gemulação ou fissão longitudinal, nas diferentes condições de temperatura e salinidade testadas, embora só exista o registo da produção de podocistos como a única estratégia de reprodução desta espécie (Gueroun *et al.*, 2021).

2.6. Análise estatística

Os efeitos da temperatura e da salinidade na sobrevivência dos pólipos, no tempo de sobrevivência, no número de podocistos produzidos e desenvolvidos, e no número e duração dos ciclos de estrobilação realizados pelos pólipos foram analisados via Análise de Variância de dois fatores. Os dados foram testados previamente quanto à normalidade e homogeneidade (testes de Shapiro-Wilk e Levene, respetivamente). No caso de interação entre fatores, foi realizada uma ANOVA unifatorial para as variáveis em estudo. Testes de Tukey foram utilizados para identificar os tratamentos (temperatura e salinidade) que causavam os efeitos gerais das diferenças entre os grupos no teste da ANOVA. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas a $P < 0,05$. Os testes estatísticos foram realizados utilizando o software SPSS (versão 29.0).

3. Resultados

3.1. Efeitos da temperatura e salinidade nos pólipos

Os efeitos combinados da temperatura (14, 17, 20 e 23°C) e da salinidade (10, 17,5, 25 e 35 ppt) na sobrevivência dos pólipos, no tempo de sobrevivência, no número de podocistos produzidos e desenvolvidos, no número e duração dos ciclos de estrobilação realizados pelos pólipos e no número de éfiras produzidas estão indicados na Tabela 1.

Tabela 1. Efeitos de 16 combinações de temperatura e salinidade na sobrevivência, reprodução assexuada e estrobilação dos pólipos de *Catostylus tagi*. DP – Desvio padrão.

Salinidade (ppt)	Temperatura (°C)			
	14	17	20	23
Sobrevivência (%)				
10	100	100	100	100
17,5	100	100	100	100
25	100	100	100	100
35	50	16,6	33,3	33,3
Média do tempo de sobrevivência em dias (DP)				
10	71	71	71	71
17,5	71	71	71	71
25	71	71	71	71
35	43,6 (31,1)	26 (23,5)	50 (19,3)	28,5 (32,9)
Média do nº de podocistos produzidos (DP)				
10	0	0,6 (0,8)	2,6 (1,0)	2,3 (1,2)
17,5	0,3 (0,8)	0,3 (0,8)	4,3 (3,2)	5,1 (3,1)
25	0,3 (0,5)	0,1 (0,4)	3 (3,0)	8,1 (3,0)
35	0,1 (0,4)	0	0,6 (1,2)	1,5 (2,3)
Média do nº de podocistos desenvolvidos (DP)				
10	0	0,5 (0,8)	1 (0,6)	0,1 (0,4)
17,5	0,1 (0,4)	0	0,5 (1,2)	0,5 (0,4)
25	0,1 (0,4)	0	0	0
35	0	0	0	0
Média do nº de ciclos de estrobilação (DP)				
10	0	0,1 (0,4)	1,8 (0,7)	2 (1,2)
17,5	0,8 (0,4)	2,5 (0,5)	2,8 (1,1)	2 (0,6)
25	0,8 (0,4)	2,3 (1,8)	2,6 (1,5)	1,5 (1,0)
35	0,3 (0,5)	0,3 (0,5)	0,1 (0,4)	0,5 (0,8)
Fases estrobilação				
Média dos dias de fase de pré-estrobilação (DP)				
10	71 (0)	63,5 (18,3)	20 (6,7)	18,8 (20,3)
17,5	39 (16,8)	21 (6,5)	14,6 (8,8)	16,1 (12,8)
25	47,8 (12,6)	33 (27,7)	21,3 (24,6)	29,3 (28,6)
35	37,3 (25,7)	20,5 (14,7)	48,8 (20,4)	16,8 (26,5)
Média dos dias de fase de bet-estrobilação (DP)				
10	0	11 (0)	7,3 (1,3)	5,1 (0,7)
17,5	18,8 (3,0)	8 (1,7)	6,1 (2,6)	4,1 (0,9)
25	14,4 (2,3)	8,2 (2,7)	5,8 (1,0)	5,6 (2,0)
35	12,5 (2,12)	6,5 (2,1)	7 (0)	3 (0)

Média dos dias de fase de estrobilação (DP)				
10	0	1	1,5 (0,5)	2 (0,8)
17,5	3,3 (2,3)	3 (1,0)	1,8 (1,1)	1,5 (0,8)
25	2,8 (0,8)	3,4 (2,3)	1,2 (0,4)	2 (1,4)
35	4,5 (2,1)	3 (0)	0	1
Média do nº de éfiras libertadas (DP)				
10	0	2	3,3 (1,3)	4 (1,4)
17,5	4,8 (1,6)	3,6 (1,3)	4,55 (2,2)	5 (2,2)
25	4,2 (1,6)	5 (4,1)	3,8 (2,4)	7,4 (3,7)
35	2,5 (0,7)	4,5 (0,7)	0	2

Fonte de variação	Temperatura	Salinidade	Interação	Temperatura (°C)				Salinidade (ppt)			
				14	17	20	23	10	17,5	25	35
Sobrevivência	ns	***	ns	-	-	-	-	b	b	b	a
Tempo de Sobrevivência	ns	***	ns	-	-	-	-	b	b	b	a
Podocistos produzidos	***	***	***	a	a	b	c	ab	bc	c	a
Podocistos desenvolvidos	ns	**	ns	-	-	-	-	b	ab	a	a
Estrobilação (Nº ciclos)	***	***	**	a	b	b	b	a	b	b	a
Fases Estrobilação											
Pré-estrobilação (pré-strob)	***	**	***	b	ab	a	a	b	a	ab	ab
Bet-estrobilação (bet-strob)	***	*	*	c	b	ab	a	a	b	ab	ab
Estrobilação (strob)	***	ns	ns	b	b	a	a	-	-	-	-
Éfiras produzidas	ns	ns	ns	-	-	-	-	-	-	-	-

Ns – Não significativo; *P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

Letras diferentes indicam diferenças significativas para os fatores testados (P < 0,05).

3.1.1. Sobrevivência

Relativamente à sobrevivência e tempo de sobrevivência dos pólipos, não foram observados efeitos significativos da temperatura e da interação entre a temperatura e salinidade nestes fatores. Por outro lado, as diferentes salinidades testadas afetaram significativamente ($p < 0,001$) a sobrevivência e tempo de sobrevivência dos pólipos. Assim, as salinidades de 10, 17,5 e 25 ppt conduziram a valores de sobrevivência e de tempo de sobrevivência superiores aos observados com a salinidade de 35 ppt (Tabela 1 e Figura 8). Em todas as temperaturas testadas (14, 17, 20 e 23°C), a sobrevivência dos pólipos foi comprometida unicamente na presença de uma salinidade de 35 ppt. A 14°C, 50% dos pólipos expostos a 35 ppt de salinidade sobreviveram ao longo do período experimental. Em contraste, em temperaturas de 17, 20 e 23°C, a sobrevivência diminuiu consideravelmente, com taxas de sobrevivência de 16,6%, 33,3% e 33,3%, respetivamente.

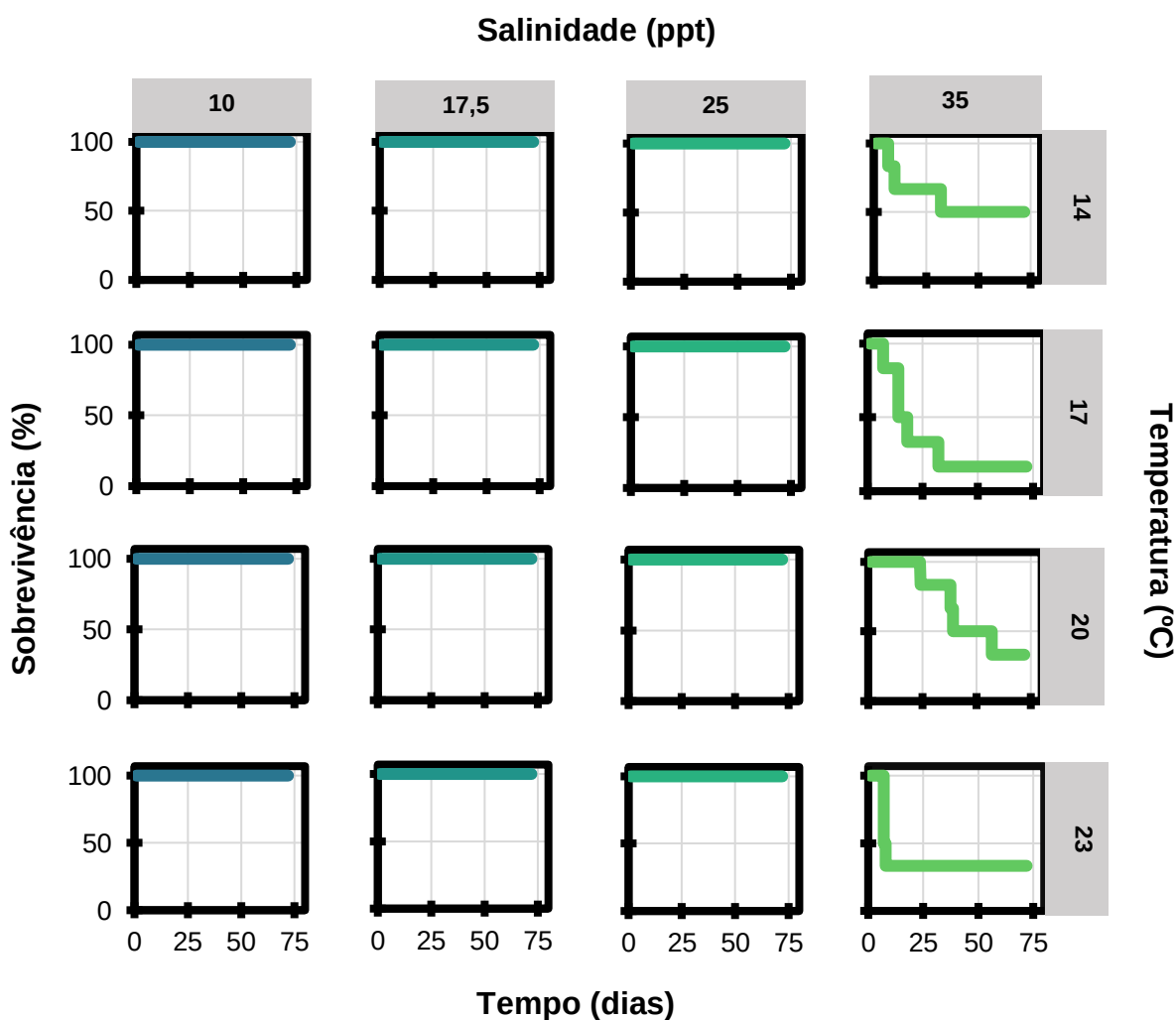


Figura 8. Curvas de sobrevivência (Kaplan-Meier) dos pólipos de *Catostylus tagi* mantidos em 16 diferentes combinações de temperaturas e salinidades durante 71 dias de experiência ($n = 6$ por combinação).

Inicialmente, os pólipos expostos à salinidade de 35 ppt, independentemente da temperatura, começaram a mostrar sinais de redução de atividade, que poderia ser observado pela diminuição do movimento dos pólipos, tornando-se menos ativos em comparação com os que estavam em condições de salinidade mais reduzida. Outro sinal evidente foi uma redução na alimentação, observada pela falta de interação com o alimento fornecido ou pela retração dos tentáculos, que são utilizados para a captura de alimento. Estes comportamentos culminaram na morte dos organismos gelatinosos, que se fragmentaram em pequenas porções dispersas pelos poços.

3.1.2. Reprodução assexuada

Relativamente à reprodução assexuada dos pólipos, verificou-se apenas a produção de podocistos como a única estratégia de reprodução (Figura 9). Os podocistos formaram-se nos discos pedais dos pólipos (Figura 9A). Posteriormente, os pólipos formaram um novo disco pedal na parte basal do corpo, e o disco pedal antigo foi reabsorvido pelo corpo, libertando o podocisto e perdendo a sua função de fixação do pólipo. Este processo resultou, em alguns casos, na formação de cascatas de podocistos na base dos poços (Figura 9B).

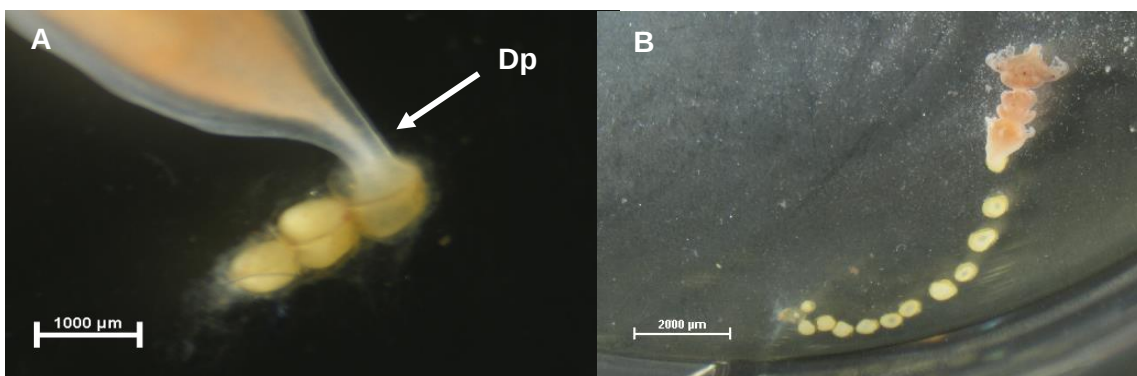


Figura 9. A-B: Podocistos produzidos por *Catostylus tagi*. Dp – Disco pedal. Créditos de imagens: Pedro Silva.

Os podocistos produzidos pelos pólipos em resposta aos diferentes valores de temperatura e salinidade apresentam-se na Tabela 1 e Figura 10. A temperatura e a salinidade apresentaram efeitos significativos na produção de podocistos ($p < 0,001$) (Tabela 1). Foi igualmente observada uma interação significativa entre ambos os fatores ($p < 0,001$), pelo que se realizou uma ANOVA unifatorial para o efeito da temperatura e da salinidade (Tabela 2). Relativamente ao fator temperatura, apenas existiram diferenças significativas no maior valor de temperatura (23°C), tendo-se registado uma maior produção de podocistos na salinidade 25 ppt comparativamente às salinidades 10

e 35 ppt (Tabela 2). Relativamente ao fator salinidade, e para valores de 10 e 17,5 ppt, a produção de podocistos foi significativamente maior nos tratamentos que apresentavam uma temperatura superior (20 e 23°C), comparativamente às temperaturas mais baixas (14 e 17°C). Para a salinidade de 25 ppt, a maior produção de podocistos foi obtida apenas com a temperatura mais elevada (23°C). Na salinidade de 35 ppt não existiram diferenças significativas para as temperaturas testadas.

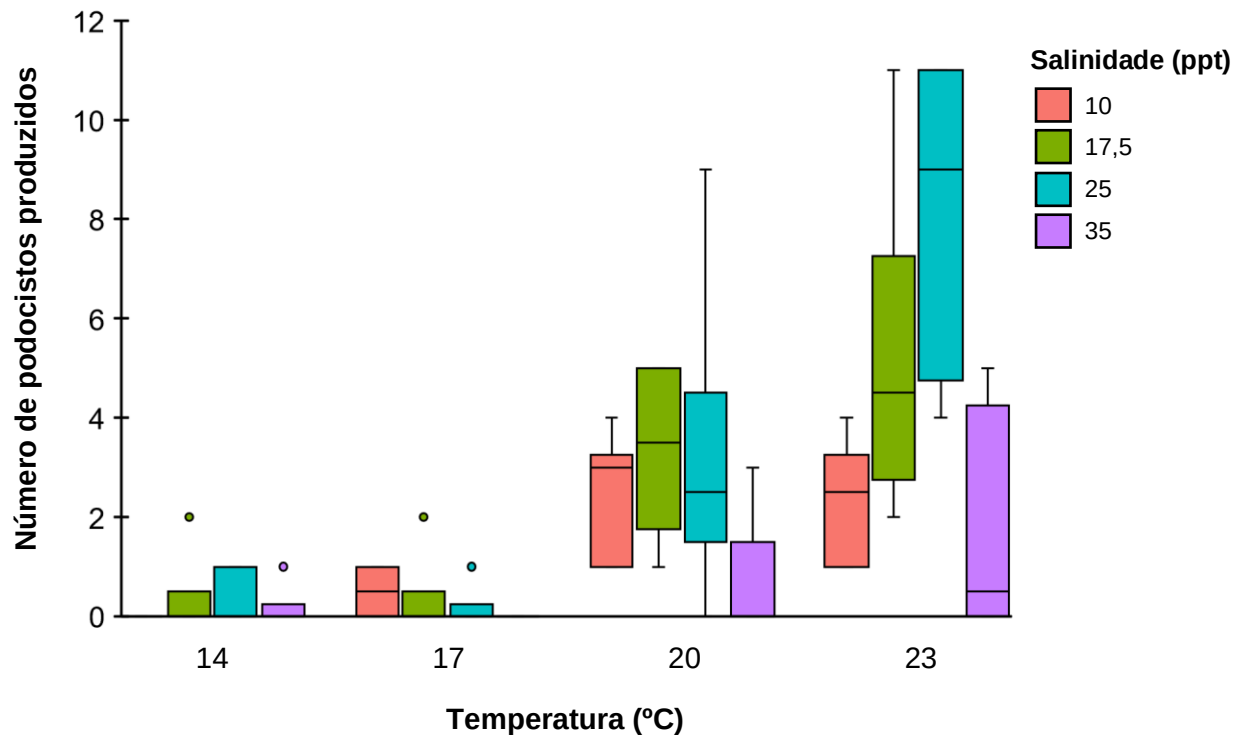


Figura 10. Variação da produção de podocistos realizada pelos pólipos nas diferentes temperaturas (14, 17, 20 e 23°C) e salinidades (10, 17,5, 25 e 35 ppt) testadas. Os valores representam médias $\pm$ desvio padrão, com N = 6 para cada combinação de temperatura e salinidade.

Tabela 2. ANOVA unifatorial dos efeitos da temperatura e salinidade na produção de podocistos.

Produção de podocistos																
Temperatura (°C)	14				17				20				23			
Salinidade (ppt)	10	17,5	25	35	10	17,5	25	35	10	17,5	25	35	10	17,5	25	35
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	a	ab	b	a

Produção de podocistos																
Salinidade (ppt)	10				17,5				25				35			
Temperatura (°C)	14	17	20	23	14	17	20	23	14	17	20	23	14	17	20	23
	a	a	b	b	a	a	b	b	a	a	a	b	-	-	-	-

Letras diferentes indicam diferenças significativas para os fatores testados ($P < 0,05$).

Grande parte dos podocistos produzidos pelos pólipos foram mantidos encistados nos poços até ao final do ensaio. Contudo, em certas condições de salinidade, os podocistos esbranquiçaram e desenvolveram-se, dando origem a um pólipo novo (Figura 11). Os efeitos da salinidade no desenvolvimento dos pólipos foram significativos ($p < 0,01$) (Tabela 1). Observou-se a formação de novos pólipos nos tratamentos com salinidades mais baixas (10 e 17,5 ppt), enquanto não houve a formação de novos pólipos nas salinidades mais elevadas (25 e 35 ppt), excetuando um podocisto a 25 ppt que se desenvolveu. Estes resultados foram confirmados pela análise estatística, que revelou um maior desenvolvimento de pólipos na salinidade de 10 ppt, comparativamente às salinidades de 25 e 35 ppt (Tabela 1). Não foram observados efeitos significativos da temperatura e da interação entre a temperatura e salinidade no desenvolvimento dos pólipos (Tabela 1).

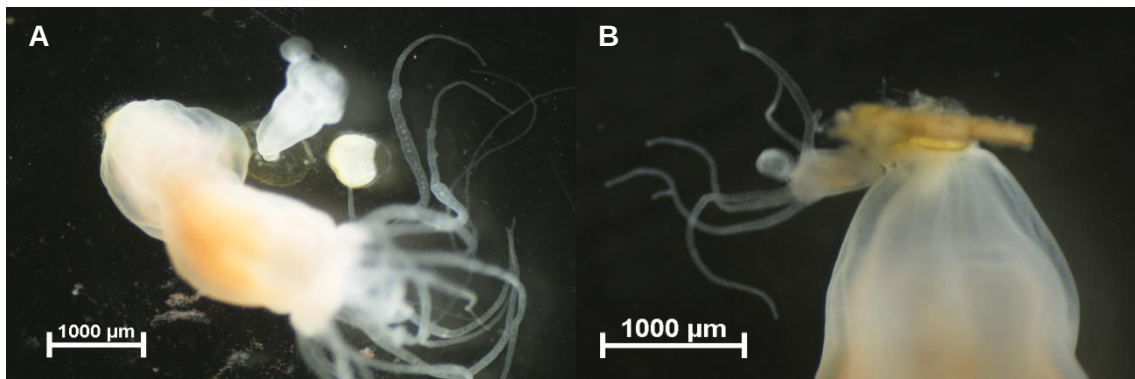


Figura 11. Pólipos que se desenvolveram a partir de podocistos. A – Pólipo recém-formado com 2 tentáculos; B – Pólipo mais desenvolvido com 5 tentáculos. Créditos de imagens: Pedro Silva.

3.1.3. Estrobilação

Os pólipos maduros de *C. tagi* apresentaram uma estrutura geral dos pólipos de cifozoários (Figura 12A), com uma série de tentáculos ($n = 16$) ao redor da boca utilizados para a captura de alimento. No início do processo de estrobilação observou-se um alongamento do cálice (Figura 12B), que permitiu ao pólipo aumentar de tamanho para posterior metamorfose do seu corpo. Observou-se de seguida a formação de um lóbulo marginal (Figura 12C), ao qual se adicionaram outros abaixo do primeiro lóbulo (Figura 12D), levando à formação de um disco de éfiras. De uma forma geral, os pólipos apresentaram um polidisco (várias éfiras libertadas por ciclo de estrobilação), sendo o estado de monodisco (uma éfira libertada por ciclo de estrobilação) verificado apenas em 2 de 96 pólipos. Após a formação total de um disco de éfiras, o pólipo iniciou a reabsorção dos tentáculos (Figura 12E) e as éfiras desenvolveram-se até apresentarem

ropálio e lapelas (Figura 12G). As éfiras começaram a pulsar e o pólipo formou novos tentáculos (Figura 12F). Após a libertação das éfiras, o pólipo desenvolveu 16 tentáculos e uma boca (Figura 12H), sendo o seu tamanho consideravelmente menor após um ciclo de estrobilação devido ao gasto de energia utilizado para a sua metamorfose. A duração de um ciclo de estrobilação variou de acordo com as condições testadas entre 4 e 25 dias. O número de ciclos de estrobilação realizados pelos pólipos em resposta aos diferentes níveis de temperatura e salinidade apresentam-se na Tabela 1 e Figura 13.

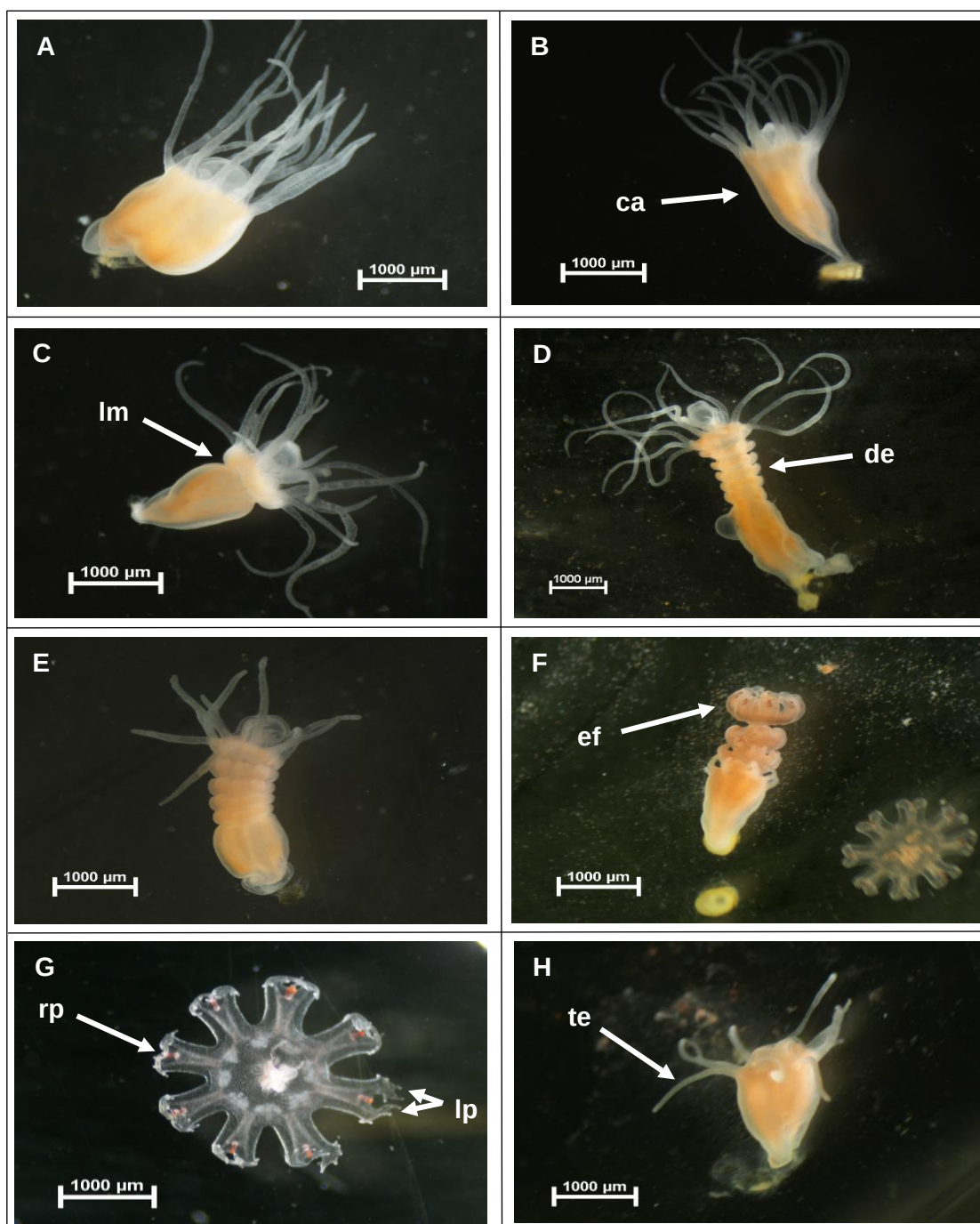


Figura 12. Ciclo de Estrobilação de pólipos de *Catostylus tagi* (A-H). ca – cálice; lm – Lóbulo marginal; de – Disco de éfiras; ef – Éfira; rp – Ropálio; lp – Lapelas; te – Tentáculo. Créditos de imagens: Pedro Silva.

A temperatura e a salinidade afetaram significativamente o número de ciclos de estrobilação dos pólipos ($p < 0,001$) (Tabela 1), tendo-se observado igualmente uma interação significativa entre ambos os fatores ($p < 0,01$) pelo que se realizou uma ANOVA unifatorial para o efeito da temperatura e da salinidade (Tabela 3). Relativamente ao parâmetro temperatura, verificou-se que o número de ciclos de estrobilação não foi significativamente influenciado pela temperatura mais elevada (23°C) nas diferentes salinidades testadas. Para a temperatura de 14°C, observou-se um maior número de pólipos a iniciarem os ciclos de estrobilação nas salinidades de 17,5 e 25 ppt comparativamente à salinidade de 10 ppt. Um resultado semelhante foi observado para a temperatura de 17°C, com as salinidades de 17,5 e 25 ppt, conduzindo a valores superiores de ciclos de estrobilação do que as salinidades de 10 e 35 ppt. Na temperatura de 20°C, as salinidades de 17,5 e 25 ppt registaram igualmente um maior número de ciclos de estrobilação do que a salinidade de 35 ppt. Relativamente ao parâmetro salinidade, no valor de 10 ppt observou-se um maior número de ciclos de estrobilação para as temperaturas mais elevadas (20 e 23°C) comparativamente às mais baixas (14 e 17°C). Na salinidade de 17,5 ppt, as temperaturas de 17 e 20°C apresentam um valor superior de ciclos de estrobilação do que a temperatura de 14°C. Para as salinidades de 25 e 35 ppt, não foram observadas diferenças significativas em nenhuma das temperaturas testadas.

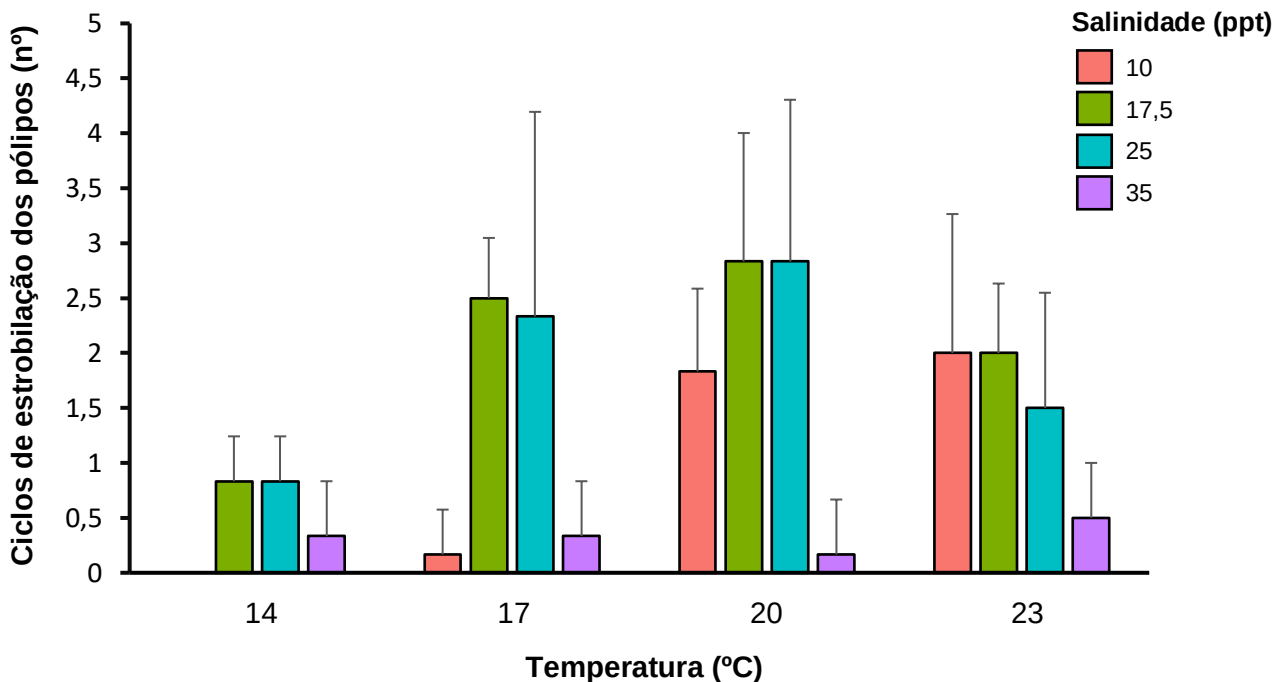


Figura 13. Variação do número de ciclos de estrobilação realizados pelos pólipos nas diferentes temperaturas (14, 17, 20 e 23°C) e salinidades (10, 17,5, 25 e 35 ppt). Os valores representam médias $\pm$ desvio padrão, com N = 6 para cada combinação de temperatura e salinidade.

Tabela 3. ANOVA unifatorial dos efeitos da temperatura e salinidade nos ciclos de estrobilação.

Temperatura (°C)	Estrobilação															
	14				17				20				23			
Salinidade (ppt)	10	17,5	25	35	10	17,5	25	35	10	17,5	25	35	10	17,5	25	35
	a	b	b	ab	a	b	b	a	ab	b	b	a	-	-	-	-

Salinidade (ppt)	Estrobilação															
	10				17,5				25				35			
Temperatura (°C)	14	17	20	23	14	17	20	23	14	17	20	23	14	17	20	23
	a	a	b	b	a	b	b	ab	-	-	-	-	-	-	-	-

Letras diferentes indicam diferenças significativas para os fatores testados ($P < 0,05$).

Para além do estudo do número de ciclos de estrobilação realizados pelos pólipos nas condições testadas, foi ainda analisada a duração (em dias) de cada uma das fases de um ciclo de estrobilação. A duração do primeiro ciclo de estrobilação dos pólipos nas diferentes condições testadas pode ser observada na Figura 14. Relativamente à fase de pré-estrobilação, definida como o tempo de permanência dos pólipos no estado maturo até alcançarem o primeiro ciclo de estrobilação, quer a temperatura quer a salinidade apresentaram efeitos significativos na duração desta fase ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respetivamente) (Tabela 1). Para além disso, foi igualmente observada uma interação significativa ($p < 0,001$) entre ambos os fatores, pelo que se realizou uma ANOVA unifatorial para o efeito da temperatura e da salinidade (Tabela 4). Relativamente à temperatura verificou-se que os ciclos de pré-estrobilação não foram significativamente influenciados pela temperatura de 23°C nos diferentes níveis de salinidades testados. Para a temperatura de 14°C, as salinidades de 17,5 e 35 ppt apresentaram ciclos de pré-estrobilação mais curtos do que a salinidade de 10 ppt. De forma semelhante e para a temperatura de 17°C, a salinidade de 10 ppt apresentou novamente o ciclo mais longo entre todas as salinidades testadas. Em contraste, na temperatura de 20°C, o ciclo de pré-estrobilação mais longo foi verificado para a salinidade de 35 ppt. Relativamente à salinidade, verificou-se que a fase de pré-estrobilação não foi significativamente influenciada pelas salinidades de 25 e 35 ppt para os diferentes valores de temperatura testados. Para as salinidades de 10 e 17,5 ppt, as temperaturas de 20 e 23°C apresentaram períodos de pré-estrobilação mais curtos comparativamente à temperatura de 14°C. Em relação à fase de bet-estrobilação, caracterizada pelo período em que os pólipos iniciam o processo de estrobilação até à libertação da primeira éfira, quer a temperatura quer a salinidade tiveram efeitos significativos na duração desta fase ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, respetivamente). Foi

igualmente verificada uma interação significativa ($p < 0,05$) entre ambos os fatores, pelo que se realizou uma ANOVA unifatorial para o efeito da temperatura e da salinidade (Tabela 4). Como certos grupos apresentaram menos de duas ocorrências em que os pólipos realizaram o processo de estrobilação, tornou-se estatisticamente inviável realizar comparações entre esses grupos, tendo-se procedido à análise apenas para as temperaturas de 14, 20 e 23°C e para as salinidades de 17,5 e 25 ppt. Relativamente ao parâmetro temperatura, a duração da fase bet-estrobilação não foi significativamente influenciada pelos valores de 20 e 23°C nos diferentes níveis de salinidade testados. Para a temperatura de 14°C, a salinidade de 17,5 ppt registou o período de bet-estrobilação mais longo comparativamente à salinidade de 35 ppt. Devido ao facto de nenhum pólipo ter iniciado o processo de estrobilação na salinidade de 10 ppt, não foi possível realizar comparações para esta salinidade. Relativamente à salinidade, e para o valor de 17,5 ppt verificou-se que a duração do período de bet-estrobilação foi significativamente superior nas temperaturas mais baixas (14 e 17°C). De igual modo, para a salinidade de 25 ppt, a temperatura mais baixa (14°C) apresentou um período de bet-estrobilação significativamente maior do que os registados para as temperaturas mais elevadas. A fase de estrobilação, caracterizada pelo período entre a libertação da primeira e da última éfira pelos pólipos, foi apenas significativamente influenciada pela temperatura (Tabela 1). As temperaturas de 14 e 17°C apresentaram um período de estrobilação superior ao registado nas temperaturas mais elevadas (20 e 23°C). As diferentes temperaturas e salinidades testadas não afetaram significativamente ($p > 0,05$) o número de éfiras produzidas. A duração do primeiro ciclo de estrobilação dos pólipos nas diferentes condições testadas pode ser observada na Figura 14.

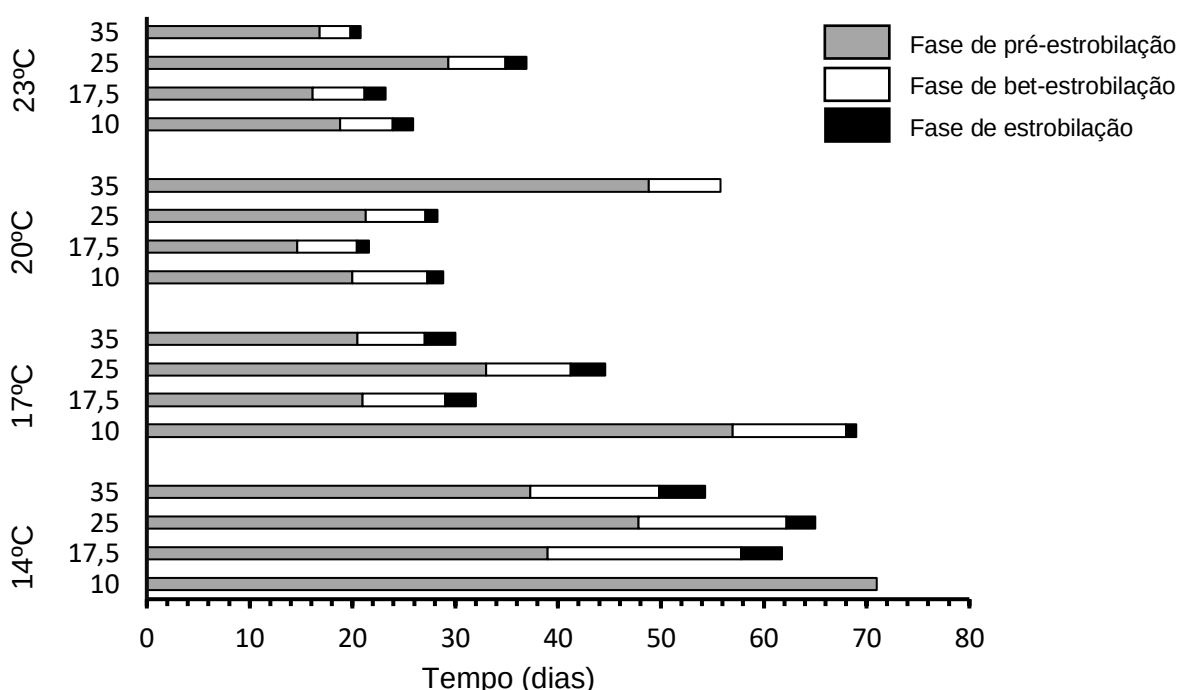


Figura 14. Fases de pré-estrobilação, bet-estrobilação e estrobilação dos pólipos em quatro temperaturas (14, 17, 20 e 23°C) e quatro salinidades (10, 17,5, 25 e 35 ppt) durante 71 dias de experiência.

Tabela 4. ANOVA unifatorial dos efeitos da temperatura e salinidade nas fases de pré-estrobilação e bet-estrobilação.

		Pré-estrobilação															
		14				17				20				23			
Temperatura (°C)	Salinidade (ppt)	10	17,5	25	35	10	17,5	25	35	10	17,5	25	35	10	17,5	25	35
		b	a	ab	a	b	a	a	a	a	a	a	b	-	-	-	-

		Pré-estrobilação															
		10				17,5				25				35			
Salinidade (ppt)	Temperatura (°C)	14	17	20	23	14	17	20	23	14	17	20	23	14	17	20	23
		b	b	a	a	b	ab	a	a	-	-	-	-	-	-	-	-

		Bet-estrobilação											
		14				20				23			
Temperatura (°C)	Salinidade (ppt)	10	17,5	25	35	10	17,5	25	35	10	17,5	25	35
			b	ab	a	-	-	-		-	-	-	-

		Bet-estrobilação							
		17,5				25			
Salinidade (ppt)	Temperatura (°C)	14	17	20	23	14	17	20	23
		c	b	ab	a	b	a	a	a

Letras diferentes indicam diferenças significativas para os fatores testados ($P < 0,05$).

4. Discussão

No presente estudo, foram testados os efeitos da temperatura e da salinidade na sobrevivência e na reprodução assexuada, assim como no processo de estrobilação dos pólipos de *Catostylus tagi*. Os pólipos sobreviveram em quase todos os tratamentos, exceto os que apresentavam uma salinidade de 35 ppt, onde a mortalidade foi elevada, mostrando diferenças significativas em relação aos restantes níveis de salinidade, independentemente da temperatura. Nenhuma mortalidade foi verificada nas demais salinidades, não havendo diferenças significativas entre as temperaturas testadas. Apesar de não terem sido verificadas mortalidades à temperatura de 14°C, os pólipos nestas condições apresentaram menor mobilidade e atividade em comparação com os pólipos mantidos a temperaturas mais elevadas, o que sugere que esta temperatura não é favorável para o desenvolvimento e crescimento dos pólipos ou que é necessário mais tempo para se observar possíveis resultados. Estes resultados são relevantes para compreender a distribuição espacial e temporal dos pólipos desta espécie, destacando a adaptabilidade dos mesmos a diferentes condições ambientais. Embora nunca tenham sido observados pólipos de *C. tagi* no meio natural e as medusas sejam comumente avistadas ao longo do estuário do Tejo e no mar, estes resultados indicam que salinidades abaixo dos 35 ppt são mais favoráveis para os pólipos. Portanto, é expectável que os pólipos estejam localizados mais a montante do estuário do Tejo (e.g., Vila Franca de Xira), onde os níveis de salinidade correspondem aos testados neste estudo (10-25 ppt) (Rodrigues *et al.*, 2017). Confirmou-se, então, as características euri térmicas e euri halinas dos pólipos, dado que sobreviveram em quase todos os níveis testados, quer de temperatura como de salinidade. Estas características, já verificadas nas plânulas de *C. tagi*, mantêm-se consistentes entre plânulas e pólipos de muitas espécies de cifo zoários que ocorrem em ambientes estuarinos, como *Chrysaora pacifica*, *Aurelia coerulea*, *Nemopilema nomurai* e *Rhopilema esculentum* (Conley & Uye, 2015; Dong *et al.*, 2015; Takao & Uye, 2018).

As estratégias de reprodução assexuada variam de acordo com as espécies de cifo zoários, sendo que algumas espécies apresentam apenas uma estratégia de reprodução (e.g., podocistos em *Rhopilema nomadica* (Lotan *et al.*, 1992)), enquanto outras manifestam várias formas de se reproduzirem (e.g. podocistos e gemulação em *Catostylus mosaicus* (Pitt, 2000)). Contrariamente a *C. mosaicus*, a produção de podocistos foi verificada como a única estratégia de propagação dos pólipos de *C. tagi*, confirmando os resultados de Gueroun *et al.*, 2021. Por um lado, um aumento de

podocistos leva ao aumento da produção de pólipos e, conseqüentemente, via estrobilação, à produção de medusas. Por outro lado, a produção de cistos permite a estas populações resistirem a condições adversas prolongadas que seriam prejudiciais para as medusas e pólipos, como a falta de alimento ou reduções de temperatura (Lucas *et al.*, 2012). Estudos recentes evidenciam que, ao contrário do que se pensava anteriormente, que os podocistos eram produzidos apenas em condições adversas, a taxa de produção de podocistos geralmente apresenta uma correlação positiva com a disponibilidade de alimento. Por exemplo, Guo (1990) demonstrou que, quando os pólipos de *Rhopilema esculenta* foram alimentados diariamente com náuplios de *Artemia*, produziam em média 7,4 podocistos por pólipo num período de 35 dias, sendo que 28,7% destes se desenvolveram. Por outro lado, observou que, quando o fornecimento de alimento foi interrompido durante vários dias, houve uma redução significativa nas taxas de produção de podocistos e uma diminuição do seu desenvolvimento. Já Gueroun *et al.*, 2021 verificaram que a produção de podocistos em *C. tagi* não foram influenciados pelo regime alimentar, sendo produzidos mesmo quando os pólipos não foram alimentados. No presente estudo, os pólipos de *C. tagi* foram alimentados duas vezes por semana e os podocistos formaram-se no substrato pelos discos pedais dos pólipos que se encontravam agarrados, o que ocorre na generalidade das espécies, como em *Rhopilema nomadica* (Lotan *et al.*, 1992). Após formar um podocisto no disco pedal, o pólipo pode formar um estolão e, de seguida, mover-se para uma nova posição, deixando o podocisto para trás. Neste novo local, pode formar outro disco pedal e, eventualmente, outro podocisto, criando uma cascata de podocistos. Em *C. mosaicus*, os podocistos são formados pelos estolões aplicados diretamente ao substrato, sem a participação dos pólipos (Pitt, 2000). Em contraste, os pólipos de *Rhopilema verrilli* produzem podocistos tanto na base do disco pedal como nos estolões (Calder, 1973). A produção de podocistos por *C. tagi* foi influenciada pela temperatura, refutando os resultados de Gueroun *et al.* (2021), onde verificaram que a temperatura não influenciou a sua produção. Estes resultados podem ser justificados pelo maior tempo de ensaio utilizado neste estudo (71 dias), em comparação com o estudo de Gueroun *et al.* (2021), que teve a duração de 33 dias. Uma maior produção de podocistos em *C. tagi* ocorreu significativamente nas temperaturas mais elevadas (20 e 23°C) neste estudo, havendo uma pequena produção dos mesmos às temperaturas mais reduzidas (14 e 17°C). A temperatura parece ser um fator que exerce uma forte influência na taxa de produção de podocistos em cifozoários, principalmente em espécies que apresentem apenas esta estratégia de reprodução assexuada (e.g. *Rhizostoma luteum* e *Nemopilema nomurai*), onde o aumento da temperatura intensifica

a produção de podocistos (Feng *et al.*, 2015; Kienberger *et al.*, 2018). Já em espécies que apresentam várias estratégias de reprodução assexuada, a temperatura parece impulsionar a gemulação. Como a única estratégia verificada neste estudo com o aumento da temperatura foi a produção de podocistos, poder-se-á considerar que *C. tagi* apenas possui esta estratégia de reprodução assexuada.

Em relação à salinidade, a produção de podocistos foi bastante reduzida em todos os níveis de salinidade nas temperaturas mais baixas (14 e 17°C), tendo-se verificado um aumento da sua produção em todos os níveis de salinidade nos tratamentos com temperaturas mais elevadas (20 e 23°C). As diferenças na produção de podocistos entre os vários níveis de salinidade só foram significativas na temperatura mais elevada (23°C), onde foi maior nas salinidades intermédias (17 e 25 ppt), comparativamente aos níveis extremos (10 e 35 ppt) utilizados neste estudo. Verificou-se, também, que as salinidades mais reduzidas (10 e 17,5 ppt) eram favoráveis para o desenvolvimento dos podocistos para novos pólipos, independentemente da temperatura. Todos os podocistos formados nos tratamentos que apresentavam as salinidades mais elevadas (25 e 35 ppt) mantiveram-se encistados durante o ensaio experimental, excetuando apenas um podocisto que se encontrava a 25 ppt e que se desenvolveu para um pólipo. Estes resultados sugerem, mais uma vez, que os pólipos de *C. tagi* podem apresentar uma distribuição preferencial nas zonas a montante do estuário do Tejo, onde os níveis de salinidade são mais favoráveis para a multiplicação dos pólipos. Deduz-se, com isto, que o aumento da temperatura nos meses de primavera permite aos pólipos produzirem mais podocistos e, nos locais onde as salinidades são mais reduzidas (10-17,5 ppt), estes desenvolvem-se para novos pólipos, contribuindo assim para a reprodução assexuada desta espécie e para uma eficiente propagação dos pólipos. Os podocistos permitem às populações de pólipos de *C. tagi* sobreviverem aos meses frios de novembro e dezembro, quando a temperatura da água pode atingir 9-10°C (Rodrigues *et al.*, 2017). Isto é crucial porque, durante o inverno, as baixas temperaturas e a possível redução na disponibilidade de alimento podem comprometer a sobrevivência dos pólipos, como ocorre com os pólipos da espécie *Rhopilema nomadica* no Mediterrâneo, onde as temperaturas mais baixas comprometem a sua sobrevivência (Prieto *et al.*, 2010). Os podocistos parecem garantir a viabilidade das populações durante estes meses até à chegada dos meses mais quentes, onde se desenvolvem e entram no processo de estrobilação, produzindo medusas que começam a ser observadas em maior número a partir de maio.

No presente estudo, o número de ciclos de estrobilação foi influenciado tanto pela temperatura como pela salinidade ($p < 0,001$). Os ciclos foram reduzidos a 14°C, onde os pólipos estrobilaram apenas uma vez em todos os níveis de salinidade, exceto na salinidade de 10 ppt. Observou-se um aumento progressivo no número de ciclos de estrobilação com o aumento da temperatura (17-23°C), tendo sido observados pólipos que realizaram até três ciclos de estrobilação nestas condições durante o ensaio experimental. Apesar de terem sido observados ciclos de estrobilação à temperatura de 14°C, algumas éfiras libertadas nestas condições apresentavam pouca mobilidade e, por vezes, encontravam-se deformadas, indicando que as temperaturas mais reduzidas não parecem ser favoráveis para o processo de estrobilação e sobrevivência das éfiras. Porém, são necessários estudos que se foquem nos efeitos das condições abióticas (e.g. temperatura e salinidade) nas éfiras de *C. tagi* para confirmar estes resultados. Mudanças de temperatura podem ser consideradas um estímulo que desencadeia o processo de estrobilação em várias espécies de cifozoários (Cargo & Schultz, 1967; Kikinger, 1992). Por exemplo, por um lado, os pólipos de *Chrysaora hysoschella* e *Aurelia aurita* iniciaram o processo de estrobilação quando a temperatura da água diminuiu de 15°C para 10°C no Outono (Holst, 2012). Por outro lado, o cifozoário *Rhizostoma pulmo* apresentou mais ciclos de estrobilação quando a temperatura da água se encontrava entre 21-28°C (Purcell *et al.*, 2012). Relativamente à influência da salinidade no processo de estrobilação, verificou-se no presente estudo, que os níveis intermédios (17,5 e 25 ppt) demonstraram um maior número de ciclos de estrobilação em comparação com os restantes níveis de salinidade (10 e 35 ppt) nas temperaturas de 14, 17 e 20°C. Para além disso, observou-se que, com o aumento da temperatura, ocorreu um aumento do número de ciclos de estrobilação em todas as salinidades, exceto na de 35 ppt, onde permaneceu reduzida independentemente da temperatura. A salinidade de 10 ppt demonstrou ser eficiente no processo de estrobilação nas temperaturas mais elevadas (20-23°C), ocorrendo uma redução ou até mesmo ausência de estrobilação nas temperaturas mais baixas (14-17°C). Estes resultados indicam que, apesar de se saber que a temperatura é um fator crucial para a realização do processo de estrobilação, a salinidade também representa um fator importante para este processo (Purcell *et al.*, 2012). Purcell *et al.* (2009) demonstraram que valores baixos de salinidade reduziram e atrasaram a estrobilação de pólipos de *Aurelia labiata*, sendo provável que certos valores de salinidade, dependendo da espécie, aumentem as necessidades energéticas de osmorregulação e diminuam a energia alocada para a reprodução. Isto pode justificar o reduzido número de ciclos de estrobilação na salinidade de 35 ppt em todas as temperaturas testadas e a inexistência de estrobilação

e produção de podocistos na condição 14°C – 10 ppt dos pólipos no presente estudo. Curiosamente, a 23°C, observou-se uma diminuição do número de ciclos de estrobilação nas salinidades de 17,5 e 25 ppt, em comparação com a temperatura de 20°C. Esta observação pode estar relacionada com uma maior produção de podocistos à temperatura de 23°C. Nos pólipos de cifozoários, a energia deve ser alocada entre a reprodução assexuada e a estrobilação, portanto valores de temperatura e salinidade que permitam a realização de ambos os processos serão ótimos para o aumento da população (Purcell *et al.*, 2012). Foi observado que, a 23°C, durante a produção de podocistos realizada pelos pólipos, estes encontravam-se em fase de pré-estrobilação, e vice-versa, ou seja, alternaram entre a realização do processo de estrobilação e a produção de podocistos. Na salinidade de 10 ppt, foram observados mais ciclos de estrobilação em comparação com as salinidades de 17,5 e 25 ppt à temperatura de 23°C. No entanto, a produção de podocistos foi mais reduzida nestas a 23°C – 10 ppt, indicando que os pólipos direcionaram mais energia para o processo de estrobilação. Em consonância com outras espécies de Rhizostomida (excetuando *Rhizostoma luteum*), a estrobilação dos pólipos do tipo polidisco (várias éfiras libertadas por ciclo de estrobilação) foi observada em *C. tagi* (Gueroun *et al.*, 2021). Relativamente aos ciclos de estrobilação, a temperatura e a salinidade não influenciaram apenas o número de ciclos, como também a sua duração. Foi observado que as temperaturas mais elevadas (20 e 23°C) reduziram a duração dos ciclos de estrobilação de *C. tagi* em comparação com as temperaturas mais baixas (14 e 17°C), que atrasaram e apresentavam ciclos de estrobilação mais longos. Estes resultados são consistentes com os de Gueroun *et al.* (2021), que verificaram que os ciclos de estrobilação de *C. tagi* foram mais curtos a 20°C do que a 15°C. A temperatura mostrou afetar significativamente a duração dos ciclos de estrobilação de vários pólipos de cifozoários. Em *R. pulmo*, por exemplo, os pólipos produziram as primeiras éfiras mais rapidamente a 28°C do que a 21°C (Purcell *et al.*, 2012). No presente estudo, em temperaturas mais elevadas, como 23°C, os ciclos de estrobilação foram curtos, independentemente da salinidade, o que pode indicar que o aumento da temperatura facilita os processos fisiológicos necessários para a estrobilação. Por outro lado, nas temperaturas mais baixas (14-20°C), a salinidade exerceu um papel mais significativo na determinação da duração dos ciclos de estrobilação, nomeadamente a salinidade de 17,5 ppt, que apresentou um período pré-estrobilação mais curto que as restantes salinidades. Estes resultados sugerem que os pólipos respondem de maneira distinta às combinações de temperaturas e salinidades e que a adaptabilidade fisiológica dos pólipos a diferentes níveis de salinidade regula a distribuição e dispersão de *C. tagi* nos locais onde ocorrem. Estudos demonstram que

o número de éfiras produzido por pólipo é afetado pela temperatura, salinidade, disponibilidade de alimento e tamanho dos pólipos (Purcell *et al.*, 1999; Russell, 1970). No entanto, as condições de temperatura e salinidade testadas no presente estudo não influenciaram significativamente o número de éfiras produzidas pelos pólipos por ciclo de estrobilação. Isto sugere que os efeitos destas variáveis não foram suficientes para se verificar diferenças significativas no número de éfiras produzidas. Torna-se, portanto, importante verificar se outros fatores, como a luminosidade e a disponibilidade de alimento, combinados com a temperatura e salinidade, influenciam o número de éfiras produzidas pelos pólipos de *C. tagi*.

Os pólipos que habitam zonas costeiras são expostos a grandes variações naturais de salinidade, associados a mudanças no escoamento de águas superficiais provenientes da terra e precipitação, bem como a flutuações sazonais de temperatura ao longo do ano (Purcell *et al.*, 2007). A temperatura e a salinidade da água são, portanto, importantes na iniciação e estimulação do crescimento e reprodução dos pólipos, tendo como resultado a distribuição e abundância das medusas (Gibson *et al.*, 2002). Medusas de *C. tagi* são observadas anualmente de maio a março no estuário do Tejo, sendo raros os seus avistamentos em abril e reduzidos durante os meses frios de Inverno (dezembro e janeiro), quando as temperaturas da água podem ser inferiores a 12°C (Rodrigues *et al.*, 2017). Isso sugere que o processo de estrobilação é curto durante este período e que a sobrevivência das éfiras é reduzida. De facto, no presente estudo, observou-se uma redução no número de ciclos de estrobilação nas temperaturas mais baixas em comparação com temperaturas mais elevadas. No entanto, esses ciclos não foram inexistentes, o que é consistente com os avistamentos sazonais de medusas nos meses de inverno e primavera na natureza. Isso indica que certos pólipos e éfiras possam sobreviver durante este período, embora o processo de estrobilação seja mais reduzido. Assim que a temperatura começa a aquecer nos meses de Primavera, os pólipos multiplicam-se e iniciam o processo de estrobilação, essencialmente em zonas onde as salinidades variam entre 10-25 ppt (e.g., Vila Franca de Xira) justificando o início do avistamento de medusas a partir de maio (Rodrigues *et al.*, 2017). Para além disso, todos os tratamentos receberam o mesmo tipo de alimentação *ad libitum*, o que pode não ocorrer no meio natural, onde poderá haver uma redução na disponibilidade de alimento durante os meses frios. Isso contribui para a redução da estrobilação realizada pelos pólipos, como observado Gueroun *et al.* (2021), que verificaram que os pólipos de *C. tagi* que não foram alimentados não estrobilaram, independentemente da temperatura.

5. Conclusão

O presente estudo revela uma elevada tolerância dos pólipos de *Catostylus tagi* a diferentes condições ambientais (temperatura e salinidade), o que contribui para uma melhor compreensão da biologia e ecologia desta espécie, preenchendo lacunas de conhecimento relativamente à fase de pólipo de *C. tagi*. As características eurialinas e euri térmicas apresentadas pelos pólipos, refletidas na distribuição temporal e espacial das medusas no estuário do Tejo, proporcionam vantagens para a futura aquacultura, investigação e produção de *C. tagi*. Os resultados deste estudo destacam a importância dos fatores ambientais, como a temperatura e a salinidade, na sobrevivência, reprodução assexuada e estrobilação dos pólipos, permitindo compreender as melhores condições para o bem-estar e reprodução destes organismos e, conseqüentemente, aprimorar a produção e controlo da fase de pólipo desta espécie. As condições de salinidade e temperatura que se verificaram mais favoráveis para a sobrevivência, reprodução assexuada e estrobilação dos pólipos de *Catostylus tagi* são as salinidades entre 17,5-25 ppt e temperaturas entre 17-20°C. No entanto, é crucial investigar outros parâmetros ambientais, como o pH, oxigénio, disponibilidade de alimento, alterações químicas da água e fotoperíodo, os quais podem também influenciar os parâmetros analisados. Este estudo permitiu uma compreensão inicial dos mecanismos de indução da estrobilação, ressaltando a importância de identificar mais fatores para uma melhor compreensão e controlo deste processo. Para além disso, foi possível compreender de que forma é que a temperatura e salinidade influenciam a reprodução assexuada e a multiplicação dos pólipos. Adicionalmente, a fase de éfira permanece pouco estudada, sendo fundamental determinar os fatores ambientais críticos que afetam a sua sobrevivência e crescimento, pois esta fase é determinante para a ocorrência e abundância de medusas adultas, contribuindo para a compreensão do ciclo de vida completo de *C. tagi*. Em resumo, estudos como o presente representam uma mais-valia e são essenciais para avaliar a resposta de *C. tagi* às alterações climáticas, que parecem favorecer a dispersão desta espécie, bem como para prever a distribuição temporal e espacial desta espécie.

6. Referências Bibliográficas

- Amaral, L., Raposo, A., Morais, Z., & Coimbra, A. (2018). Jellyfish ingestion was safe for patients with crustaceans, cephalopods, and fish allergy. *Asia Pacific Allergy*, 8(1).
- Arai, M. N. (1997). *A functional biology of Scyphozoa*. Springer Science & Business Media.
- Attrill, M. J., Wright, J., & Edwards, M. (2007). Climate-related increases in jellyfish frequency suggest a more gelatinous future for the North Sea. *Limnology and Oceanography*, 52(1), 480-485.
- Blanquet, R. (1972). Structural and chemical aspects of the podocyst cuticle of the scyphozoan medusa, *Chrysaora quinquecirrha*. *The Biological Bulletin*, 142(1), 1-10.
- Calder, D. (1973). Laboratory observations on the life history of *Rhopilema verrilli* (Scyphozoa: Rhizostomeae). *Marine Biology*, 21, 109-114.
- Calejo, M., Morais, Z., & Fernandes, A. (2009). Isolation and biochemical characterisation of a novel collagen from *Catostylus tagi*. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 20(14), 2073-2087.
- Cargo, D. G., & Schultz, L. P. (1967). Further observations on the biology of the sea nettle and jellyfishes in Chesapeake Bay. *Chesapeake Science*, 8, 209-220.
- Conley, K., & Uye, S.-i. (2015). Effects of hyposalinity on survival and settlement of moon jellyfish (*Aurelia aurita*) planulae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 462, 14-19.
- Dong, J., Sun, M., Purcell, J. E., Chai, Y., Zhao, Y., & Wang, A. (2015). Effect of salinity and light intensity on somatic growth and podocyst production in polyps of the giant jellyfish *Nemopilema nomurai* (Scyphozoa: Rhizostomeae). *Hydrobiologia*, 754, 75-83.
- Doyle, T. K., Hays, G. C., Harrod, C., & Houghton, J. D. (2014). Ecological and societal benefits of jellyfish. *Jellyfish blooms*, 105-127.
- Feng, S., Zhang, G.-T., Sun, S., Zhang, F., Wang, S.-W., & Liu, M.-T. (2015). Effects of temperature regime and food supply on asexual reproduction in *Cyanea nozakii* and *Nemopilema nomurai*. *Hydrobiologia*, 754, 201-214.
- Gameiro, C., Cartaxana, P., & Brotas, V. (2007). Environmental drivers of phytoplankton distribution and composition in Tagus Estuary, Portugal. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 75(1-2), 21-34.
- GelAvista. (2023). Programa de monitorização de organismos gelatinosos.
- Gibson, R., Barnes, M., & Atkinson, R. (2002). Impact of changes in flow of freshwater on estuarine and open coastal habitats and the associated organisms. *Oceanography and marine biology: an annual review*, 40, 233.
- Gorbatenko, K., Nikolayev, A., Figurkin, A., & Il'inskii, E. (2009). Quantitative composition, distribution, and feeding of large jellyfish (Scyphozoa et Hydrozoa) on the West Kamchatka shelf in summer. *Russian Journal of Marine Biology*, 35(7), 579-592.
- Graham, W. M., Gelcich, S., Robinson, K. L., Duarte, C. M., Brotz, L., Purcell, J. E., Madin, L. P., Mianzan, H., Sutherland, K. R., & Uye, S.-i. (2014). Linking human well-being and jellyfish: ecosystem services, impacts, and societal responses. *Frontiers in Ecology and the*

- Environment*, 12(9), 515-523.
- Gueroun, S. K., Torres, T. M., Dos Santos, A., Vasco-Rodrigues, N., Canning-Clode, J., & Andrade, C. (2021). *Catostylus tagi* (Class: Scyphozoa, Order: Discomedusae, Suborder: Rhizostomida, Family: Catostylidae) life cycle and first insight into its ecology. *PeerJ*, 9, e12056.
- Hays, G. C., Doyle, T. K., & Houghton, J. D. (2018). A paradigm shift in the trophic importance of jellyfish? *Trends in ecology & evolution*, 33(11), 874-884.
- Hayward, E. (2012). Sensational jellyfish: Aquarium affects and the matter of immersion. *differences*, 23(3), 161-196.
- Heaslip, S. G., Iverson, S. J., Bowen, W. D., & James, M. C. (2012). Jellyfish support high energy intake of leatherback sea turtles (*Dermochelys coriacea*): video evidence from animal-borne cameras. *PloS one*, 7(3), e33259.
- Holst, S. (2012). Effects of climate warming on strobilation and ephyra production of North Sea scyphozoan jellyfish. *Jellyfish Blooms IV: Interactions with humans and fisheries*, 127-140.
- Holst, S., & Jarms, G. (2007). Substrate choice and settlement preferences of planula larvae of five Scyphozoa (Cnidaria) from German Bight, North Sea. *Marine Biology*, 151, 863-871.
- Jarms, G., Morandini, A., Schmidt-Rhaesa, A., Giere, O., & Straehler-Pohl, I. (2019). World atlas of jellyfish. *Abhandlungen des Naturwissenschaftlichen Vereins in Hamburg*.
- Kienberger, K., Riera-Buch, M., Schönemann, A. M., Bartsch, V., Halbauer, R., & Prieto, L. (2018). First description of the life cycle of the jellyfish *Rhizostoma luteum* (Scyphozoa: Rhizostomeae). *PloS one*, 13(8), e0202093.
- Kikinger, R. (1992). *Cotylorhiza tuberculata* (Cnidaria: Scyphozoa)-Life history of a stationary population. *Marine Ecology*, 13(4), 333-362.
- Lotan, A., Ben-Hillel, R., & Loya, Y. (1992). Life cycle of *Rhopilema nomadica*: a new immigrant scyphomedusan in the Mediterranean. *Marine Biology*, 112, 237-242.
- Lucas, C. H. (2001). Reproduction and life history strategies of the common jellyfish, *Aurelia aurita*, in relation to its ambient environment. *Jellyfish Blooms: Ecological and Societal Importance: Proceedings of the International Conference on Jellyfish Blooms, held in Gulf Shores, Alabama, 12-14 January 2000*.
- Lucas, C. H., Graham, W. M., & Widmer, C. (2012). Jellyfish life histories: role of polyps in forming and maintaining scyphomedusa populations. *Advances in marine biology*, 63, 133-196.
- 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.
- Mills, C. E. (2001). Jellyfish blooms: are populations increasing globally in response to changing ocean conditions? *Hydrobiologia*, 451, 55-68.
- Morais, Z. B., Pintao, A. M., Costa, I. M., Calejo, M. T., Bandarra, N. M., & Abreu, P. (2009). Composition and in vitro antioxidant effects of jellyfish *Catostylus tagi* from Sado Estuary (SW Portugal). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 18(1-2), 90-107.
- Nagelkerken, I., Pitt, K. A., Rutte, M. D., & Geertsma, R. C. (2016). Ocean

- acidification alters fish–jellyfish symbiosis. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1833), 20161146.
- Pitt, K. (2000). Life history and settlement preferences of the edible jellyfish *Catostylus mosaicus* (Scyphozoa: Rhizostomeae). *Marine Biology*, 136, 269-279.
- Pitt, K., & Kingsford, M. (2000). Reproductive biology of the edible jellyfish *Catostylus mosaicus* (Rhizostomeae). *Marine Biology*, 137, 791-799.
- Prieto, L., Astorga, D., Navarro, G., & Ruiz, J. (2010). Environmental control of phase transition and polyp survival of a massive-outbreaker jellyfish. *PloS one*, 5(11), e13793.
- Purcell, J., Uye, S., & Lo, W. (2007). Anthropogenic causes of jellyfish blooms and direct consequences for humans: A review. *Marine Ecology Progress Series*.
- Purcell, J. E., Atienza, D., Fuentes, V., Olariaga, A., Tilves, U., Colahan, C., & Gili, J.-M. (2012). Temperature effects on asexual reproduction rates of scyphozoan species from the northwest Mediterranean Sea. *Jellyfish Blooms IV: Interactions with humans and fisheries*, 169-180.
- Purcell, J. E., White, J. R., Nemazie, D. A., & Wright, D. A. (1999). Temperature, salinity and food effects on asexual reproduction and abundance of the scyphozoan *Chrysaora quinquecirrha*. *Marine Ecology Progress Series*, 180, 187-196.
- Raposo, A., Coimbra, A., Amaral, L., Gonçalves, A., & Morais, Z. (2018). Eating jellyfish: Safety, chemical and sensory properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(10), 3973-3981.
- Rodrigues, M., Rosa, A., Cravo, A., Fortunato, A., & Jacob, J. (2017). Characterisation of the study areas: tagus estuary and Ria Formosa.
- Russell, F. S. (1970). The Medusae of the British Isles volume II: pelagic scyphozoa, with a supplement to the first volume of Hydromedusae.
- Ruzicka, J. J., Daly, E. A., & Brodeur, R. D. (2016). Evidence that summer jellyfish blooms impact Pacific Northwest salmon production. *Ecosphere*, 7(4), e01324.
- Takao, M., & Uye, S.-i. (2018). Effects of low salinity on the physiological ecology of planulae and polyps of scyphozoans in the East Asian Marginal Seas: potential impacts of monsoon rainfall on medusa population size. *Hydrobiologia*, 815, 165-176.
- Tamm, S. L. (2014). Cilia and the life of ctenophores. *Invertebrate Biology*, 133(1), 1-46.
- Thein, H., Ikeda, H., & Uye, S.-i. (2013). Ecophysiological characteristics of podocysts in *Chrysaora pacifica* (Goette) and *Cyanea nozakii* Kishinouye (Cnidaria: Scyphozoa: Semaestomeae): effects of environmental factors on their production, dormancy and excystment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 446, 151-158.
- Widmer, C. L., Fox, C. J., & Brierley, A. S. (2016). Effects of temperature and salinity on four species of northeastern Atlantic scyphistomae (Cnidaria: Scyphozoa). *Marine Ecology Progress Series*, 559, 73-88.
- Young, G. A., & Hagadorn, J. W. (2010). The fossil record of cnidarian medusae. *Palaeoworld*, 19(3-4), 212-221.